HAL
open science

Caractérisation des carboxypeptidases B d'Anopheles gambiae et analyse de leurs rôles sur le développement de Plasmodium falciparum et sur la reproduction des moustiques

Aurélie Fougère

To cite this version:

Aurélie Fougère. Caractérisation des carboxypeptidases B d'Anopheles gambiae et analyse de leurs rôles sur le développement de Plasmodium falciparum et sur la reproduction des moustiques. Biodiversité. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66504 . tel-00829524

HAL Id: tel-00829524

https://theses.hal.science/tel-00829524v1

Submitted on 3 Jun 2013

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.

UNIVERSITE PARIS 6 – PIERRE ET MARIE CURIE

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

Complexité Du Vivant

Présentée par

Aurélie FOUGERE

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Caractérisation des carboxypeptidases B d'*Anopheles gambiae* et Analyse de leurs rôles sur le développement de *Plasmodium falciparum* et sur la reproduction des moustiques

Soutenue publiquement le 28 Septembre 2012

Devant le Jury composé de :

Catherine BOURGOUIN	Directeur de thèse
Isabelle FLORENT	Rapporteur
Frédéric SIMARD	Rapporteur
Dominique HIGUET	Examinateur
Jean-Paul LATGE	Examinateur
Isabelle MORLAIS	Examinateur

Remerciements

Mon doctorat a été une aventure aussi enrichissante que bouleversante faisant entrer la recherche dans ma vie et m'emportant avec elle au grès de ses aléas. Le goût pour la découverte et la biologie c'est éveillé très tôt en moi, peut être grâce à *il était un fois… la vie* d'Albert Barillé qui a bercé mon enfance. Mon doctorat m'a permis de réaliser mes premiers pas dans le monde de la recherche qui mêle originalité et créativité au coté cartésien de la science. Tant au niveau scientifique qu'humain, cela a été pour moi une période très riche et emplis d'émotion. Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui ont interagit, collaboré ou qui m'ont tous simplement soutenue pendant cette période :

Aux membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail. Je tiens à remercier Isabelle Florent et Frédéric Simard d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail malgré leurs nombreuses obligations. Merci à Dominique Higuet, Isabelle Morlais et Jean-Paul Latgé d'avoir gentiment accepté de faire partie de mon jury de thèse.

À Kenneth Vernick, qui m'a accueillie dans l'Unité de Génétique et Génomique des Insectes Vecteurs (GGIV) m'initiant ainsi à l'immunité des insectes et à Odile Puijalon et Geneviève Milon pour leurs accueils chaleureux au sein du département de Parasitologie et Mycologie de l'Institut Pasteur.

À Catherine Bourgouin sans qui rien n'aurait été possible. Elle m'a intégré dans son laboratoire dès mon stage de master II malgré ma 5ème années atypique. Je tiens à lui adresser ma profonde gratitude pour m'avoir initiée à la recherche, guidant mes premiers pas tout en canalisant la tête brulée que je suis parfois. Mais aussi pour ses grandes qualités humaines et tous ce que l'on a partagé au cour de ces années.

À François Lacoste et au conseil du DIM Maladies Infectieuses et à celui de Pasteur - Weismann qui ont cru au projet et qui m'ont apporté leurs soutiens financiers me permettant de finir ma thèse dans de meilleures conditions.

À tous les membres du CEPIA, du GGIV, du 3ème étage du bâtiment Metchnikoff et des autres équipes de l'Institut Pasteur, qui m'ont supporté pendant 4 ans et plus particulièrement à Emilie Pondeville, Christian Mitri, Emmanuel Bischoff et Nicolas Puchot qui ont interagi dans le projet.

Mais aussi, un clin d'œil à Jean-Claude Jacques qui est partie trop tôt. Je lui dédie cette thèse, non seulement car c'est lui qui a guidé mes premiers pas dans le laboratoire mais aussi pour tous les à côtés que son sourire faisait…

À Jacques d'Alayer et Ahamed Haouz pour leurs collaborations dans le projet.

À Sarah Bonnet et Catherine Lavazec qui ont initié le projet mais aussi pour toutes les discutions scientifiques.

À Tristan Wagner, Anthony Bouillon et Sylvie Garnero pour tous les à côtés…

Et pour finir, un grand merci a tous mes proches, parents et amis qui m'ont soutenue et qui ont toujours cru en moi.

Résumé

Mes travaux de thèse portent sur deux gènes *cpbAg1* et *cpbAg2* qui codent des enzymes digestives : les carboxypeptidases digestives du moustique *Anopheles gambiae*, vecteur majeur africain de *Plasmodium falciparum*, parasite responsable des formes graves du paludisme. La contribution de CPBAg1 dans le développement de *P. falciparum* chez *An. gambiae* a été démontrée ainsi qu'un rôle potentiel dans la production des œufs du moustique (Lavazec *et al*., 2005 & 2007). Cependant le rôle potentiel de CPBAg2 dans ces deux phénotypes n'avait pas été abordé. Nos travaux ont permis de montrer des propriétés enzymatiques différentes pour chaque carboxypeptidase, avec CPBAg1 qui libère de l'arginine et de la lysine tandis que CPBAg2 est spécifique de l'arginine. La cinétique d'apparition *in vivo* des protéines montre une production précoce de CPBAg1 et une production constante de CPBAg2 au cours du processus de digestion du repas sanguin. L'analyse fonctionnelle de CPBAg1 et CPBAg2 utilisant l'inactivation génique par ARN interférence a permis de comprendre leurs rôles respectifs. Ainsi, CPBAg1 est impliquée dans le développement de *P.falciparum* chez *An. gambiae*, suggérant une plus forte dépendance du parasite pour les ressources en lysine. A l'inverse, CPBAg2 intervient au cours de la vitellogénèse du moustique et son inactivation induit également un retard du développement ovarien. Ainsi, ce dernier semble être plus dépendant de l'arginine, produit principalement par CPBAg2. CPBAg1 et CPBAg2 pourraient de ce fait être utilisées comme les cibles de nouvelles stratégies pour diminuer la transmission du paludisme, en bloquant le parasite chez le moustique tout en diminuant la production d'œufs.

Abstract

Anopheles gambiae is the main African mosquito vector of *Plasmodium falciparum*, the most deadly malaria parasite. Two paralogous genes, *cpbAg1* and *cpbAg2*, coding for digestive carboxypeptidase B were previously identified, and CBPAg1 was shown to be involved in *P. falciparum* development and egg production in the mosquito (Lavazec *et al.*, 2005; 2007). However, the possible role of CPBAg2 on these two phenotypes was not known. Our experimental work led first to demonstrate that CPBAg1 and CPBAg2 exhibit different biochemical characteristics. CPBAg1 is able to hydrolyse both basic residue lysine and arginine in contrast to CPBAg2 that is specific to arginine. Secondly, the kinetics of CPB synthesis *in vivo* show that CPBAg1 is produced early during the blood digestion process while CPBAg2 is produced all along this process. Lastly, using RNA interference to inactivate each or both *cpbAg* genes permitted to unravel the role of each CPBAg. CPBAg1 promotes *P. falciparum* development in the mosquito, suggesting a dependence of the sporogonic stages of the parasite for lysine. In contrast, CPBAg2 has a marginal effect on parasite development but act on egg development and maturation. Beside limiting egg maturation, the inactivation of *cpbAg2* delays egg development. This physiological process seems to be dependent upon arginine availability produced mainly by CPBAg2. These results validate CPBAg1 and CPBA2 as targets for new strategies that will block the parasite within mosquitoes with a concomitant decrease in reproductive capacity, therefore targeting CPBAg1 and CPBA2 could contribute to reduce malaria transmission.

Table des Matières

Introduction 14

I. Le paludisme 15
A. Généralités 15
B. Contexte historique et découverte 16
C. Épidémiologie, médicaments et résistance 18
D. Indicateurs de la maladie, évaluation et compétence vectorielle 19
E. Manifestation clinique et immunité 21
F. Méthodes de lutte appliquées et alternatives 23
1. Lutte chimique et biologique sur le vecteur 23
2. Réduire la transmission : vaccin et/ou modification génétique des vecteurs 25
II. Le parasite Plasmodium 27
A. Généralités 27
B. Cycle de développement de *Plasmodium* 28
1. Chez l'homme 29
2. Chez le moustique 30
III. Le moustique Anophèles : hôte et vecteur de Plasmodium 33
A. Généralités 33
B. Cycle de développement du moustique *Anopheles* 34
C. La digestion chez les anophèles, insectes hématophages 35
1. Organisation du tube digestif 36
a. La formation de la matrice péritrophique 36
b. Les protéases impliquées dans la digestion du sang 38
i. Les endopeptidases 38
ii. Les exopeptidases 40
D. La reproduction des anophèles 43
1. Accouplement et appareil reproducteur femelle 43
2. De l'ovogenèse aux follicules matures 44
3. Repas sanguin et induction de la vitellogénèse 46
E. Les interactions entre *Plasmodium* et *Anophèles* 48
IV. Contexte et objectif du travail de thèse 49

Matériels et Méthodes 51

I. Production des protéines recombinantes 52
A. La production de CPBAg2r 52
1. Baculovirus 52
2. Expression dans *Pichia pastoris* 54
a. Construction du vecteur d'expression 54
b. Electroporation de *P. pastoris* 56
c. Milieux d'expression 57
B. Activités enzymatiques 58
1. Mesure d'activité 58

1. Cinétique d'activation 59
2. Cinétique d'inhibition thermique 60
II. Les Immunisations 61
A. Chez la souris 61
B. Chez le lapin 63
C. ELISA 64
III. Le matériel biologique : les moustiques 65
A. Gorgement et dissections (TD, ovaires, spermathèques) 65
B. Les extractions 66
1. Des protéines 66
2. De l'ADN génomique 67
3. Des ARN totaux 67
IV. Les procédures d'analyses 68
A. Analyse in silico 68
1. Alignement des séquences sur la structure secondaire de la carboxypeptidase B d'*Heliothis zea* 68
2. Superposition des séquences sur la structure 3D de la Carboxypeptidase A2 humaine 69
B. Analyse des protéines 69
1. Electrophorèse et coloration 69
2. Western-Blot 70
C. Analyse de l'expression des gènes 72
1. Transcription inverse (RT) et PCR semi-quantitative 72
2. PCR quantitative selon la méthode des gammes étalons 73
V. Les outils pour l'analyse fonctionnelle 74
A. Inactivation génique par ARN interférence transitoire 74
1. Synthèse des ARN double brins 74
2. Procédure d'injection de moustiques 75
B. Test de l'effet bloquant des anticorps anti-CPBAg sur le développement de *P. falciparum* 76
VI. Les procédures de l'analyse fonctionnelle 76
A. Les infections d'*A. gambiae* avec *P. falciparum* 76
B. L'observation du développement ovarien d'*A. gambiae* en condition d'ARNi 77

Résultats 78

Chapitre I : Caractérisation biochimique de CPBAg1 et CPBAg2 80

A. Production et purification de CPBAg2 82
1. Clonage et sélection 82
2. Optimisation de la production de CPBAg2r 84
3. Optimisation de la purification 85
a. Chromatographie d'affinité (N_i) en batch 85
b. Analyse *in silico* des glycosylations potentielles sur la séquence de CPBAg2 87
c. Glycosylation de CPBAg2r produite chez *P. pastoris* 88
d. Chromatographies sur colonne 89

B. Propriétés biochimiques des CPBAg 92
1. Maturation des CPBAgr 92
a. Analyse *in silico* des sites potentiels de clivage des zymogènes 93
b. Activation de CPBAg2r par la trypsine et la chymotrypsine 94
c. Identification des sites effectifs de maturation de la pro-enzyme CPBAg2 95
2. Caractérisation biochimique des CPBAgr 96
a. Caractérisation des paramètres enzymatiques 96
b. Caractérisation des sensibilités à la chaleur 99
c. Alignements structuraux et conformations tridimensionnelles de CPBAg1 et CPBAg2 100
d. Conclusions 102

Chapitre II : Rôles biologiques de CPBAg1 et CPBAg2 105

A. Les CPBAg in-vivo 107
1. Cinétique d'apparition des CPBAg à l'issue de la prise du repas sanguin non-infecté par le moustique 107
a. Evaluation de la spécificité des anticorps de souris 108
b. Cinétique d'apparition des CPBAg au cours de la digestion du repas sanguin 109
c. Corrélation avec l'expression génique 110
B. Caractérisation fonctionnelle des CPBAg 111
1. Validation de l'ARN interférence 112
a. Optimisation de l'inactivation de *cpbAg2* 112
b. Expression en condition d'inactivation 113
2. Evaluation de la contribution respective des CPBAg sur le développement de *Plasmodium falciparum* 114
a. Sur la prévalence d'infection 114
b. Sur l'intensité d'infection 116
3. Evaluation de la contribution respective des CPBAg sur la capacité reproductive des moustiques 118
a. Caractérisation de la cinétique de maturation ovarienne chez *A. gambiae* 120
b. Caractérisation des rôles spécifiques des *cpbAg* dans le développement ovarien 121
i. Impact sur le développement ovarien 121
ii. Impact sur la cinétique d'apparition des œufs développés 123

Chapitre III : Données immunologiques 127

A. Validation d'anticorps pour l'analyse fonctionnelle des CPBAg 127
1. Evaluation de la spécificité des anticorps par ELISA 128
2. Evaluation de la contribution respective des CPBAg sur le développement de *Plasmodium falciparum* par l'ajout d'anticorps dans le repas sanguin 129
B. Evaluation de la réponse immunitaire (protection) à long terme issue d'une seule injection d'antigène, synergie de blocage ? 131

Discussion 134

A. Les CPBAg possèdent des propriétés enzymatiques différentes 136

1. Rôles des zymogènes sur l'activité des CPBAg.....136
2. Sensibilité enzymatique et cinétique d'apparition des protéines 138
B. Le développement de *P. falciparum* chez *A. gambiae* dépend des acides aminés basiques ou seulement de la lysine ?.....139
1. Existe-t-il une compétition métabolique entre le parasite et le moustique pour les ressources en acides aminés basiques?.....142
2. La dépendance métabolique d'*A. gambiae* envers l'arginine 144
C. L'utilisation des CPBAg comme cible d'une stratégie limitant la transmission parasitaire. 146
1. Les TBV ou vaccins altruistes.....146
D. Les moustiques transgéniques 148
1. La technique d'ARNi est-elle adéquate ?.....149
2. L'arginine un ligand aux multiples facettes, est elle un senseur de l'immunité ?....150
3. Les autres variabilités et interactions du système *Anopheles-Plasmodium* 151

Références Bibliographiques.....152

Table des Figures

Figures de l'Introduction :

Figure I.1 : Répartition de la fréquence allélique de la mutation de la β-globine (β 6Glu → Val) 17
Figure I.2 : Répartition géographique de *P. falciparum* 18
Figure I.3 : Classification et répartition de l'endémicité du paludisme 21
Figure I.4 : Cycle de développement de *Plasmodium* 28
Figure I.5 : Représentation schématique du développement de *Plasmodium* chez le moustique 31
Figure I.6 : Densité parasitaire de *P. bergheï* chez *A. stephensi* et de *P. falciparum* chez *A. gambiae* 32
Figure I.7 : Distribution des espèces dominantes d'*Anopheles* 33
Figure I.8 : Cycle de développement des moustiques anautogènes 35
Figure I.9 : Schéma de l'appareil digestif du moustique *Anopheles* 36
Figure I.10 : Photographie d'*Anopheles gambiae* 36
Figure I.11 : Modèle structural de la matrice péritrophique du stade adulte d'*A. gambiae* 37
Figure I.12 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la poche catalytique des carboxypeptidases B lors de la protéolyse 41
Figure I.13 : La spermathèque chez la femelle *Anopheles gambiae* 43
Figure I.14 : Représentation des ovaires de la femelle anophèle 44

Figures de Matériels et Méthodes :

Figure M.1 : Schéma des recombinaisons homologues entre le vecteur d'expression de CPBAg2 (pPICZαA) et le génome de *P. pastoris* 54
Figure M.2 : une droite pendant 5 min lors de la mesure de la densité optique où la pente reflète la vitesse initiale (V_i) de la réaction enzymatique (figure 18 a). 58

Figures du Chapitre I des Résultats :

Figure R.I.1 : Clonage de *cpbAg2* dans le vecteur d'expression pPICZαA 83
Figure R.I.2 : Comparaison de différents clones de CPBAg2r 83
Figure R.I.3 : Détermination de la durée optimale d'induction de CPBAg2r 84
Figure R.I.4 : Comparaison des rendements protéiques des 3 éluats issus des élutions successives avec l'histidine et l'imidazole 85
Figure R.I.5 : Comparaison de l'activité spécifique (AS) de CPBAg2 en fonction des traitements de purification 85
Figure R.I.6 : Comparaison des rendements de CPBAg2r issu d'élutions successives d'histidine 86
Figure R.I.7: Prédiction des glycosylations potentielles de CPBAg2r. Analyse *in silico* de sa séquence par le logiciel NetNGlyc 87
Figure R.I.8 : Validation des glycosylations prédites sur la séquence de CPBAg2r 87
Figure R.I.9 : Traitement à la PNGaseF 88

Figure R.I.10 : Purification de CPBAg2r produite chez *Pichia pastoris* par la 1ère gel filtration 89
Figure R.I.11 : Purification de CPBAg2r produite chez *Pichia pastoris* par MonoQ 90
Figure R.I.12 : Purification de CPBAg2r produite chez *Pichia pastoris* par la 2ème gel filtration 91
Figure R.I.13 : Maturation de CPBAg1r 92
Figure R.I.14 : Comparaison des formes et activités de CPBAg2r après différents traitements d'activation 94
Figure R.I.15 : Identification des sites de clivage engendrés par la maturation de CPBAg2r 94
Figure R.I.16 : Alignement structurel de CPBAg1 et CPBAg2 95
Figure R.I.17 : Schéma réactionnel de l'activité des CPBAg envers le substrat Hippuryl-arginine 96
Figure R.I.18 : Table des paramètres enzymatiques de CPBAg1 et CPBAg2 préalablement activées 97
Figure R.I.19 : Caractérisation de la sensibilité à la chaleur de CPBAg1r 98
Figure R.I.20 : Détermination de l'énergie d'activation de CPBAg1r 99
Figure R.I.21 : Comparaison des sensibilités thermiques des CPBAg 99
Figure R.I.22 : Table des pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences protéiques utilisées pour l'alignement structural de la figure R.I.16 100
Figure R.I.23 : Structures tridimensionnelles des carboxypeptidases B 101

Figures du Chapitre II des Résultats :

Figure R.II.1 : Table des acides aminés nécessaires et indispensables au développement des insectes 106
Figure R.II.2 : Evaluation de la spécificité de reconnaissance du sérum dirigé contre CPBAg2 108
Figure R.II.3 : Cinétique d'apparition de CPBAg1 et CPBAg2 lors du processus digestif d'*A. gambiae* 109
Figure R.II.4 : Cinétique d'expression des *cpbAg* 110
Figure R.II.5 : Validation des dsARN utilisés pour l'ARNi 111
Figure R.II.6 : Positionnement schématique des amorces sur les séquences des *cpbAg* 112
Figure R.II.7 : Expression des *cpbAg* en fonction des différents traitements d'inactivation 113
Figure R.II.8 : Prévalence d'infection traduisant le nombre de moustiques infectés en fonction des différentes conditions d'inactivation 114
Figure R.II.9 : Intensité d'infection traduisant le nombre d'oocystes par tube digestif de moustiques infectés en fonction des différentes conditions d'inactivation 116
Figure R.II.10 : Cinétique de maturation ovarienne d'*A. gambiae* dans les conditions expérimentales du laboratoire 120
Figure R.II.11 : Représentation photographique des différents stades de développement ovarien en fonction de la taille des Anophèles 121
Figure R.II.12 : Effet de l'ARNi des *cpbAg* sur le développement ovarien répartis en 4 classes 122
Figure R.II.13 : Effet de l'ARNi des *cpbAg* sur le développement ovarien répartis en 3 classes 122
Figure R.II.14 : Effet de l'ARNi des *cpbAg* sur la cinétique d'apparition des œufs développés 123

Figures du Chapitre III des Résultats :

Figure R.III.1 : Évaluation de l'affinité et de la spécificité des sérums de lapin dirigés contre CPBAg1 et CPBag2 128
Figure R.III.2 : Prévalence d'infection traduisant le nombre de moustiques infectés et intensité d'infection traduisant le nombre d'oocystes par tube digestif de moustiques infectés en fonction des différentes dilutions des anticorps anti-CPBAg ajoutés dans le repas sanguin infectant 130
Figure R.III.3 : Évaluation de l'affinité des anticorps produits chez la souris à J21 post immunisation par CPBAg1 et CPBAg2 et la combinaison des deux protéines 131

Figure de synthèse : Récapitulatif des résultats majeurs obtenus 133

Figures de la Discussion :

Figure D.1 : Les voies métaboliques conduisant à la synthèse d'Arginine chez *A.gambiae* et *P. falciparum* et représentation schématique de l'implication de cet acide aminé chez les insectes 142
Figure D.2 : Identification des régions protéiques conservées entre les CPBAg et la CPA2 humaine 147

Liste des Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AOX	Alcool OXydase
ARN	Acide RiboNucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messager
CEPIA	CEntre de Production et d'Infection des Anophèles
CP	CarboxyPeptidase
CPBAg	CarboxyPeptidase B d'*Anopheles gambiae*
ds	double brin (double strand)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GEMSA	GuanidinoEthyl-MercaptoSuccinic Acid
GFP	Green Fluorescent Protein
NO	monoxyde d'azote (Nitric Oxyde)
NOS	Nitric Oxyde Syntase
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PES	PolyEther-Sulfone
PNGaseF	Peptide-N4-(acetyl-β-glucosaminyl)-asparagine amidase
qPCR	quantitative PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS PolyAcrilamid Gel Electrophresis
TBV	Transmission Blocking Vaccine
TOR	Target Of Rapamycin
HRP2	Histidine-Rich-Protein 2
ENSANG	Base de données Ensemble du génome d'*Anopheles gambiae*
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus

Introduction

I. Le paludisme

A. Généralités

Le paludisme est une maladie parasitaire récurrente ou chronique, due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* qui est transmis à l'homme par la piqûre d'une femelle moustique du genre *Anopheles*, elle-même infectée après avoir piqué un homme impaludé. La transmission de la maladie se fait donc par l'intermédiaire du moustique et, bien que rare, la seule contamination naturelle inter-humaine directe se réalise par la voie transplacentaire. Bien que les méthodes de lutte employées aient permis de réduire les zones géographiques où sévit la maladie, le paludisme reste l'une des plus graves maladies infectieuses à laquelle l'homme n'a jamais été confronté.

En 2010, 655 000 décès sont associés au paludisme, dont 91% se produisent sur le continent Africain et 86% concernent des enfants de moins de 5 ans (WHO, 2011). Grâce aux différentes interventions de ces dernières années, l'incidence du paludisme a reculé de 17% et le taux de mortalité a chuté de 25% en 10 ans. Cependant, Les moyens de lutte dont on dispose aujourd'hui contre cette maladie sont sérieusement menacés. L'apparition de résistances à divers endroits du globe aussi bien du parasite face aux antipaludiques de première ligne (chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine, amodiaquine) que des moustiques vecteurs face à la plupart des insecticides rend ce fléau toujours incontrôlable.

Pour enrayer cette maladie, le développement de nouvelles stratégies de luttes vaccinales, thérapeutiques et/ou anti-vectorielles sont donc nécessaires.

B. Contexte historique et découverte

Le plus ancien écrit sur le paludisme, également dénommé «malaria », date de 2700 ans avant J.C. en Chine (par l'empereur Huang Ti), où les trois phases de l'accès palustre sont symbolisées par trois dragons : le premier tenant un marteau symbolisant le mal de tête, le second portant un sceau d'eau glacé symbolisant les frissons et le dernier portant un diadème de fer rouge symbolisant la fièvre (*in* Bischoff, manuscrit de thèse, 2001). D'autres civilisations comme la Mésopotamie, l'Egypte ancienne, l'Inde, la Grèce, Rome en passant par le moyen âge et jusqu'à nos jours attestent de par des tablettes médicales, des peintures rupestres et des écrits, de la coévolution de la maladie avec l'homme à travers les âges. Lancisi en 1717, fut le premier médecin à décrire la présence de pigment noir dans la rate et le cerveau de patients en suggérant que la cause de la maladie serait issue d'un insecte des marais. En 1879, Afanasiev émet l'hypothèse que les granules noirs (l'hémozoïne : pigment parasitaire), observés en premier par Heinrich Meckel von Hemsbach, dans le sang des malades morts du paludisme en 1847 peuvent être l'agent étiologique du paludisme. C'est en 1880 que le parasite *Plasmodium* est décrit par Laveran lorsqu'il observe le processus d'exflagellation des gamétocytes mâles dans les globules rouges de ses patients. Il émettait même l'hypothèse que ce parasite était transmis par les moustiques. Trois ans auparavant, Manson décrit que ces formes flagellées ne seraient pas présentes chez l'homme mais spécifiques d'un autre hôte : le moustique. C'est Ross qui incrimine les moustiques *Anopheles* en 1897, puis il démontre un an plus tard chez l'oiseau que le paludisme est transmis par la piqûre de l'Anophèle femelle. En 1898, Grassi observe le développement complet de *P. falciparum* et *P. vivax* chez le moustique et celui de *P. malariae* en 1899. En 1900, Schaudinn indexe les différents stades du développement parasitaire de la nomenclature toujours

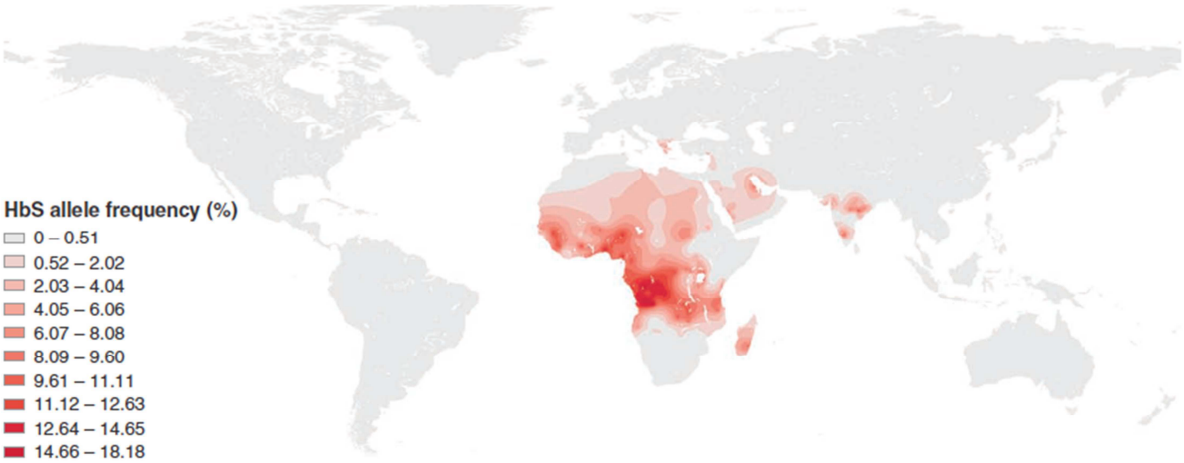


Figure I.1 : Répartition de la fréquence allélique de la mutation de la β-globine (β 6Glu → Val).
Mutation dénommé gène HbS pour Sickle cell haemoglobine
Source : Piel *et al*., 2010.

en vigueur. En 1922, Stephens décrit une quatrième plasmodie : *P. ovale* (qu'il observait dès 1918). Dans les décennies qui suivirent, la phase de latence entre l'inoculation et l'apparition des plasmodies dans le sang a été étudiée pour découvrir les cycles de développement complet des plasmodies. En commençant par la découverte du cycle érythrocytaire de *P. elongatum* par Raffaele en 1934 chez l'oiseau. Les phases hépatiques des plasmodies infectant les primates ont été décrites par Short et Garnham en 1948 pour *P. cynomolgi* et *P. vivax*, suivi par celui de *P. falciparum* en 1951 décrit par Short, et celui de *P.ovale* en 1955 par Garnham. La découverte des formes parasitaires persistantes dite « dormantes » de *P. cynomolgi* par Krotoski en 1980 complète les connaissances du cycle de vie des plasmodies.

Les relations étroites hôtes/parasites résultent d'une longue coévolution. Chacun des partenaires exerce une pression de sélection sur l'autre dont les multiples bases moléculaires requièrent une forte dynamique des génomes respectifs, reflet de l'adaptation acquise au fil des âges. L'une des conséquences chez l'homme est la sélection naturelle des gènes qui altèrent les globules rouges donnant un avantage sélectif contre le paludisme, tel que celui de la drépanocytose (Piel *et al.*, 2010) où la carte (figure I.1) des fréquences alléliques corrobore celle de l'émergence de la maladie (Cf. ci-après). D'autres liens géographiques existent entre le paludisme et des polymorphismes érythrocytaires tel que des thalassémies, un déficit en glucose 6-Phosphate déshydrogénase, de l'elliptocytose héréditaire ou des ovalocytoses (*in* Doumbo *et al.*, 2007).

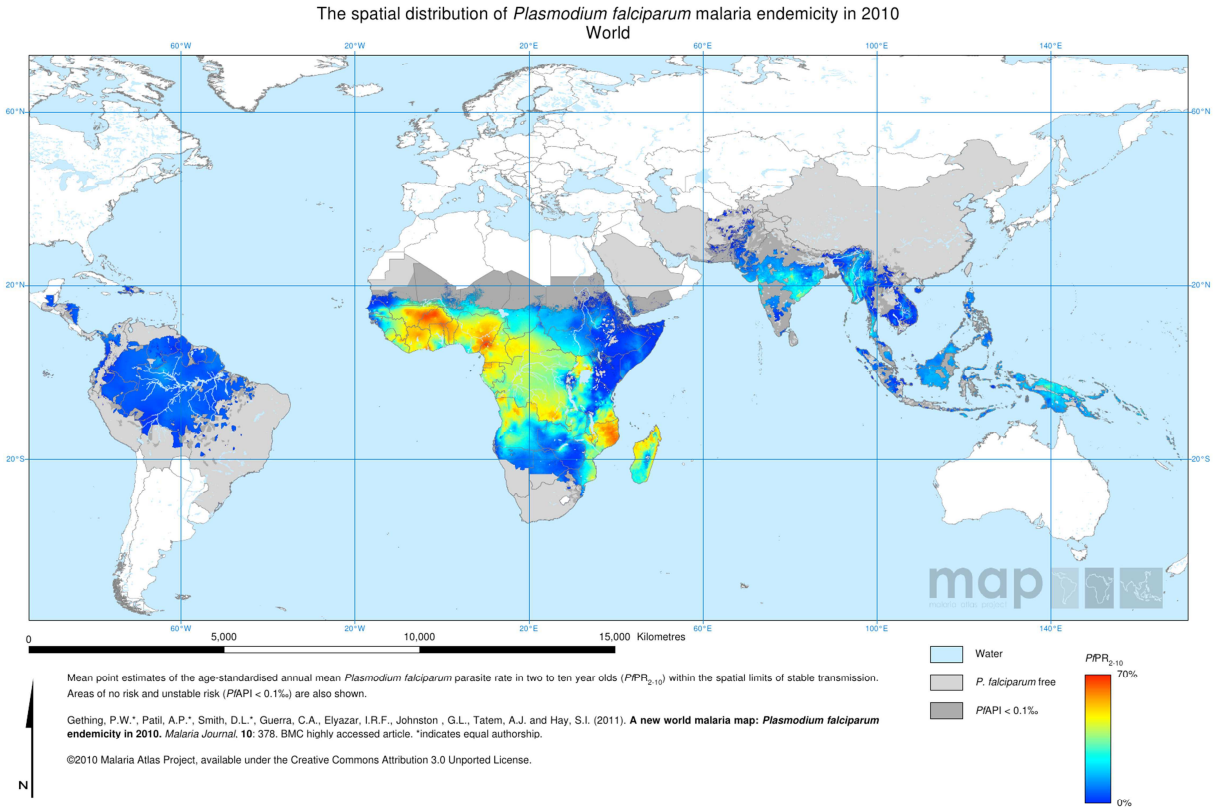


Figure I.2 : Répartition géographique de *P. falciparum*
Source : Malaria Atlas Project de l'université d'Oxford.

C. Épidémiologie, médicaments et résistance

Le paludisme a été éliminé de nombreux pays tempérés au cours du vingtième siècle pour être de nos jours confiné dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique, d'Asie et d'Afrique. La carte figure I.2 montre l'endémicité de *P. falciparum* à travers le monde. L'OMS estime qu'en 2010, 3,3 milliards de personnes étaient exposées à un risque palustre. Les plus élevés sévissant dans les régions d'Afrique (47%) et d'Asie du Sud-Est (37%), (WHO, 2011).

Les médicaments utilisés contre la maladie peuvent être soit prophylactiques soit curatifs. Les chimioprophylaxies sont utilisées par les personnes réalisant de courts séjours dans les zones endémique (< 3mois). Leurs coûts élevés et leurs incidences sur le métabolisme ne permettent pas leur utilisation à long terme ni leur distribution à plus grande échelle. L'apparition de nombreuses résistances à leur encontre qui se produit de façon récurrente, continue de progresser géographiquement ne faisant que diminuer leurs fenêtres d'action. Les traitements antipaludiques d'utilisation courante sont la quinine (Quinimax®), la méfloquine (Lariam®), l'halofantrine (Halfan®) et l'atovaquone-proguanil (Malarone®). Ils ciblent le stade sanguin du parasite à l'exception de la malarone qui cible également les stades hépatiques. Les traitements curatifs du paludisme utilisent majoritairement les ACT (Artemisin combination traitment) avec entre autre l'artémether-luméfatrine qui est la coformulation reconnue par l'OMS la plus utilisé. L'atovoquone et la sulfadoxine pyriméthamine sont également des traitements curatifs prescrits.

Trois zones épidémiologiques sont classées en fonction du niveau de résistance rencontré. La première classe, zone sans chloroquinorésistance concerne l'Amérique centrale et Haïti ; la deuxième classe, en zone de chloroquinorésistance concerne l'Inde, le Sri-Lanka et quelques pays d'Afrique de l'ouest (Burkina Faso, Mali…) ; la troisième classe, concerne les zones de prévalence élevée pour les chloroquinorésistances et celles ou sévissent des multirésistances. Le nombre de pays inclus dans ce dernier groupe est en constante augmentation ; il inclut la majorité des pays d'Afrique centrale et d'Afrique de l'Est et depuis peu intègre le Sénégal, la Côte d'Ivoire, la Guinée-Bissau, la Guinée-Conakry et la Sierra Leone. Ce groupe est également retrouvé dans tout le bassin amazonien et dans les zones dites de multirésistances d'Asie du Sud-Est (régions frontalières entre la Thaïlande, le Laos et le Myanmar) (WHO, 2011).

D. Indicateurs de la maladie, évaluation et compétence vectorielle

La forte variabilité de la transmission dans le temps et l'espace ainsi que les facteurs climatiques, écologiques et démographiques définissent localement le niveau de la transmission, l'incidence et la sévérité des symptômes. La transmission du parasite qui engendre la maladie peut être saisonnière dit épidémique ou stable tout au long de l'année dit endémique. Elle est également régie par des relations et interactions complexes propres à chaque couple de parasite et d'espèce vectrice, confinés dans un espace géographique restreint.

L'évaluation de la maladie réside dans l'observation de plusieurs indicateurs à la fois chez l'homme et le vecteur. Le principal indicateur observé chez l'humain est la prévalence d'infection ou parasitémie correspondant à la quantité de parasites présente dans le sang, déterminée par

microscopie (goutte épaisse ou frottis sanguin) ou par tests immunologiques dits tests rapides basés sur la reconnaissance spécifique (anticorps monoclonaux) de la protéine HRP2 (Histidine Rich Protein 2) spécifique de *P.falciparum*, et de différentes formes isomèriques spécifiques de la lactate deshydrogénase (LDH) commune à toutes les espèces plasmodiales ou spécifique de *P. vivax* ou de *P. falciparum*. Les rates hypertrophiées des sujets atteints peuvent également être un indicateur de la maladie.

Au niveau entomologique, les différents facteurs qui peuvent influencer l'endémie sont la distribution et l'abondance des vecteurs, leur espérance de vie, leur anthropophilie (préférence pour l'hôte vertébré humain), la fréquence de piqûre et leur capacité à transmettre le parasite ou compétence vectorielle. La prise de plusieurs repas sanguin pour achever le cycle gonotrophique de deux des plus grands vecteurs de pathologies humaines : *A. gambiae* et *Ae. aegypti* augmentent drastiquement la transmission de pathogènes (Scott *et al.*, 2012).

Les descriptions mathématiques du système utilisent le taux d'inoculation entomologique (exprimé en nombre de piqûres infectantes reçues par l'homme et par unité de temps) correspondant au produit de ce taux d'infectivité par le nombre de piqûres reçues et la capacité vectorielle qui définit le nombre de nouvelles infections disséminées par cas, par jour et par (un) vecteur.

La capacité vectorielle (C) est mesurée par cette équation mathématique :$C = \frac{ma^2bp^n}{-\ln(p)}$

ou m est la densité du vecteur, a le nombre de piqûre infectante par homme et par jour, b la compétence vectorielle équivalent à la proportion de moustique apte à transmettre la maladie, p le taux de survie quotidien des vecteurs et n la durée de la phase extrinsèque du cycle parasitaire. En effet, comme cette notion de capacité vectorielle prend en compte les paramètres propres du

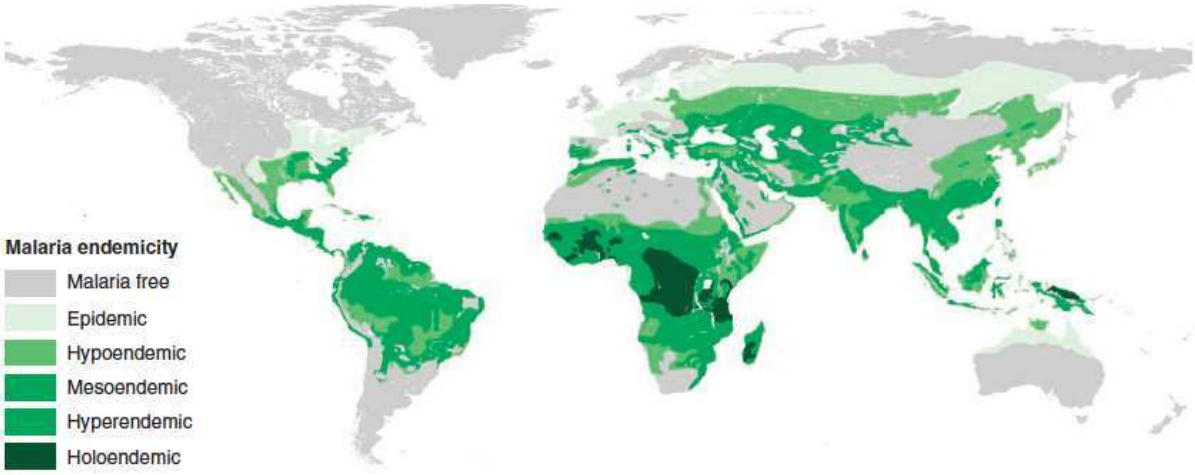


Figure I.3 : Classification et répartition de l'endémicité du paludisme

Source : Piel *et al*., 2010 adaptée de Hay *et al*., 2004.

vecteur ainsi que les facteurs environnementaux qui peuvent moduler le processus d'interaction hôte-pathogène (*in* Rodhain *et al.*, 1985), c'est un bon outil pour évaluer le niveau de transmission et réaliser des modèles de distribution du système.

Le niveau d'intensité de la maladie est évalué par la prévalence de la parasitémie dans le sang, exprimée en nombre d'hématies infecté par µl de sang ou en pourcentage. Plusieurs niveaux de transmission ont été distingués par Metselaar et Van Thiel (1959) : les zones hypoendémiques de faible transmission (prévalence inférieure ou égale à 10%), les zones mésoendémiques de grande variabilité d'intensité (prévalence entre 11 et 50%) surtout observé dans les petites régions rurales, les zones hyperendémiques d'intense transmission saisonnière (prévalence de 51 à 75%) et les zones holoendémiques de forte transmission pérenne tous au long de l'année (parasitémie supérieure ou égale à 75%). L'article de Piel *et al*., en 2010 reprend la nomenclature utilisée par Hay en 2004, figure I.3, où sont distinguées encore plus de classes dans le niveau de transmission de la maladie (pour faire la corrélation entre la distribution globale de la maladie et les déficiences géniques des différentes populations humaines).

E. Manifestation clinique et immunité

L'infection plasmodiale n'engendre pas de réponse immune par l'organisme, après une période d'incubation asymptomatique qui peut aller de 7 jours pour *P. falciparum* à 21 jours pour *P. malariae*, il se manifeste par l'apparition brutale de fièvres, de tremblements intermittents, d'arthralgies, de nausées et vomissements, d'anémie (due à l'hémolyse) ou d'hémoglobinurie. Dans les cas graves, il peut provoquer des splénomégalies, céphalées sévères, ischémies cérébrales, hépatomégalie ou encore des hypoglycémies. Les manifestations cliniques typiques de

la maladie sont l'alternance de frissons, chaleurs et sueurs qui surviennent de façon chronique tous les trois jours pour les deux principales plasmodies (*P. vivax* et *P. falciparum*).

Des facteurs génétiques conférant à certains sujets une immunité naturelle totale ou partielle face à l'infection parasitaire existent. Ils peuvent être classés en deux catégories : les facteurs érythrocytaires et non-érythrocytaires.

Le plus connu des facteurs érythrocytaires est le polymorphisme des groupes sanguin Duffy négatif principalement retrouvé chez les sujets d'Afrique de l'ouest empêchant la permissivité des érythrocytes à l'infection de *P. vivax.* Mais plusieurs autres facteurs existent, tel que les thalassémies, mutation engendrant des déficiences dans la synthèse d'une ou des chaines formant l'hémoglobine des globules rouges qui confère un avantage protecteur des érythrocytes contre le développement de *P. falciparum*. La déficience des érythrocytes en glucose-6-phosphate désydrogénase (G6PD) empêche l'augmentation du stress oxydatif des érythrocytes associé au métabolisme du parasite.

Les facteurs non érythrocytaires, tels que les groupes HLA et le polymorphisme de la réponse immune peuvent également conférer une immunité naturelle contre l'infection parasitaire.

D'autre part, l'immunité acquise progressivement en zone pérenne de transmission joue un rôle incontestable dans la maladie, elle se met en place d'autant plus vite que la transmission locale est intense. Cette immunité n'empêchant pas d'être de nouveau contaminé ni d'éliminer totalement le parasite, mais protège progressivement des formes cliniques graves de la maladie tant que l'exposition est récurrente. Le sujet tolère ainsi des taux de parasitémie de plus en plus importants tout en restant cliniquement asymptomatique, rendant exceptionnel le décès d'adulte en zone d'intense transmission.

F. Méthodes de lutte appliquées et alternatives

De part la triade complexe d'interactions entre le parasite, l'homme et l'anophèle modulé par les conditions environnementales, de nombreuses stratégies de contrôle, prévention, et traitement contre le paludisme ont été utilisées.

En premier lieu, les stratégies de contrôle visent à réduire les contacts entre l'homme et les moustiques vecteurs en réduisant les gîtes larvaires et en utilisant notamment des moustiquaires imprégnées d'insecticide (pyréthrinoïdes), des répulsifs, des protections individuelles par les vêtements long, la pulvérisation et des bâches imprégnées d'insecticide dans les maisons d'habitation.

Les méthodes de lutte utilisées depuis plus d'un demi-siècle ont engendré en plus des multiples résistances (des parasites aux médicaments et des moustiques aux insecticides), des problèmes de pollution environnementale conséquent. Les principales stratégies employées ou à l'étude sont décrites ci-après.

1. Lutte chimique et biologique sur le vecteur

Cette stratégie tend à réduire ou à remplacer les populations de moustiques par des modifications environnementales utilisant des agents biologiques ou chimiques. Il peut cibler à la fois le stade adulte et le stade larvaire du développement de l'insecte.

L'utilisation d'huile déversée sur les gites larvaires empêchant la respiration des larves ou l'introduction dans ces gites de poissons se nourrissant de moustiques ou par le drainage des eaux

de pluie provoquant l'assèchement des gites larvaires (*in* Rodhain *et al.*, 1985; Keiser *et al.*, 2005) illustrent de façon non exhaustive quelques applications. Cependant la disparité géographique et l'apparition temporaire des gites larvaires rendent la mise en place de cette stratégie très difficile. Les insecticides ciblant le stade adulte, dont le plus connu est le dichloro-diéthyl-trichloroéthane (DDT) découvert par Othmar Zeidler en 1873 mais dont les propriétés insecticides ne sont mises en évidence qu'en 1939 par Muller. Cet insecticide est utilisé lors du 1er programme de lutte anti-vectorielle (*in* Rodhain *et al.*, 1985). D'autres composés synthétiques ont ensuite été utilisés, appartenant aux groupes des organochlorés (dieldrine) comme le DDT, aux organophosphorés (malathion, gfenitrothion, téméphos, chloropyrifos), aux carbamates (propoxur) et aux pyréthrinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, lambda-cyalothrine, alpha-cyperméthrine et bifenthrine).

La mise en contact d'agents biologiques ou de toxines au moment du stade larvaire ou adulte des moustiques a également été utilisée comme alternative de lutte biologique. Par exemple, les bactéries *Bacillus thuringiensis israelensis* produisent des toxines larvicides (Mittal *et al.*, 2003). Ou encore, des champignons tels que *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* (Knols *et al.*, 2010) ciblent le stade adulte de plusieurs espèces de *Culicidae* dont *Anopheles gambiae s.s*, vecteur principal de *Plasmodium* en Afrique Sub-Saharienne (Scholte *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2006; Mnyone *et al.*, 2010). Cette stratégie affecte la survie, la fécondité et le comportement hématophage des moustiques infectés (Scholte *et al.*, 2006) apportant une alternative et un complément dans la lutte contre les populations résistantes aux insecticides chimiques (Farenhorst *et al.*, 2009) qui offrent aujourd'hui la meilleur alternative de contrôle rapide des moustiques vecteurs (Blanford *et al.*, 2011).

Ces méthodes ont permis l'élimination locale de la maladie dans plusieurs pays mais l'incidence des méthodes de lutte incontestablement néfastes au niveau écologique, dont les plus connues sont le drainage des sols et l'utilisation massive de DDT, a fait des ravages aux niveaux des sols et des écosystèmes. D'autres stratégies sont aujourd'hui privilégiées, telle que la lutte biologique citée précédemment ou la modification de nectar de plante toxique pour *Anopheles* (Muller *et al.*, 2010) ou encore la modification génétique des insectes vecteurs. Toutes ces approches doivent intégrer de multiples paramètres aussi bien écologiques que socio-économiques en plus des axes d'actions classiques à renforcer (Thomas *et al.*, 2012).

2. Réduire la transmission : vaccin et/ou modification génétique des vecteurs

Les stratégies vaccinales ont pour objectif de protéger la communauté en réduisant la transmission (l'endémie) et pas seulement les individus. Les stratégies vaccinales ciblent principalement :

- le stade hépatique du parasite qui diminuera la probabilité de déclencher les symptômes de la maladie,
- le stade asexuel sanguin qui diminuera la sévérité des symptômes et la transmission,
- les stades parasitaires chez le moustique ou le moustique lui-même ce qui limitera directement la transmission.

Pour être efficace, cette dernière stratégie doit utiliser des antigènes très immunogènes (Kaslow *et al.*, 1992). En effet, les cibles de cette stratégie étant soit des protéines du moustique, soit des protéines parasitaires exprimées lors de ses stades de développement chez le moustique,

les molécules antigéniques ne sont jamais naturellement en contact avec le système immunitaire humain et aucune stimulation secondaire naturelle de l'immunité ne se produira.

De plus, les pays endémiques, où les stratégies vaccinales doivent être appliquées, sont pour la majorité en difficulté économique, rendant difficile la distribution et pratiquement impossible l'utilisation de rappel vaccinal. Pour optimiser la réussite de ce type de stratégie, elle doit être efficace en termes d'immunogénicité et de persistance des anticorps dès la première injection.

Grâce à l'avancée des connaissances sur le moustique, d'autres stratégies ciblant la réduction des populations vectorielles ou leur remplacement ont été explorées. Elles reposent sur l'établissement de lignées de moustiques génétiquement modifiés, qui peuvent être combinées avec une action sur le parasite. Les modifications confèrent des dominants létaux aux moustiques qui reposent par exemple sur le lâcher de mâles fertiles donnant naissance à des femelles non viables (Coleman *et al.*, 2004) ou sur des moustiques qui deviennent réfractaires à l'infection (Boëte *et al.*, 2003). L'objectif étant de limiter les populations de moustiques vecteurs ou de les remplacer par des populations non vectrices afin d'arrêter la transmission (Miller *et al.*, 2002; Christophides *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Catteruccia *et al.*, 2007).

II. Le parasite Plasmodium

A. Généralités

L'agent pathogène responsable du paludisme est un hématozoaire du genre *Plasmodium* également appelé hématozoaire de Laveran, appartenant à la famille des *Plasmodiidae*, à l'ordre des *Haemosporidae*, à la classe des *Aconoidasida*, sous-embranchement des *Apicomplexa* et le sous embranchement des *Alveolata* du phylum des *chromalveolata* du domaine eucaryote. C'est un parasite unicellulaire protozoaire de petite taille (de 1 à 20 µm selon son stade de développement) qui parasite entre autre les globules rouges du sang.

De très nombreuses espèces de plasmodies sont répertoriées (plus de 140) possédant des cycles biologiques similaires et assez complexes. Ces cycles de vie nécessitent deux hôtes : un hôte intermédiaire vertébré et un hôte définitif insecte dont le plus commun est la femelle hématophage du moustique du genre *Anopheles* seule à transmettre les plasmodies de mammifères. Malgré le fait que les hôtes vertébrés des plasmodies soient très diversifiés, incluant en plus de l'homme : reptiles, oiseaux, rongeurs, singes… Chaque espèce de *Plasmodium* a des hôtes et vecteurs bien spécifiques limitant les possibilités d'interactions et d'infections transversales entre espèces.

Parmi toutes ces espèces, seules 5 d'entre elles ont la capacité de parasiter l'homme : *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi, 1890), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) et *Plasmodium knowlesi*, qui jusqu'à lors était cantonné au singe et qui a été récemment décrite comme pouvant infecter l'espèce humaine avec des foyers d'infection trouvés en Asie du sud-est (Antinori *et al.*, 2012).

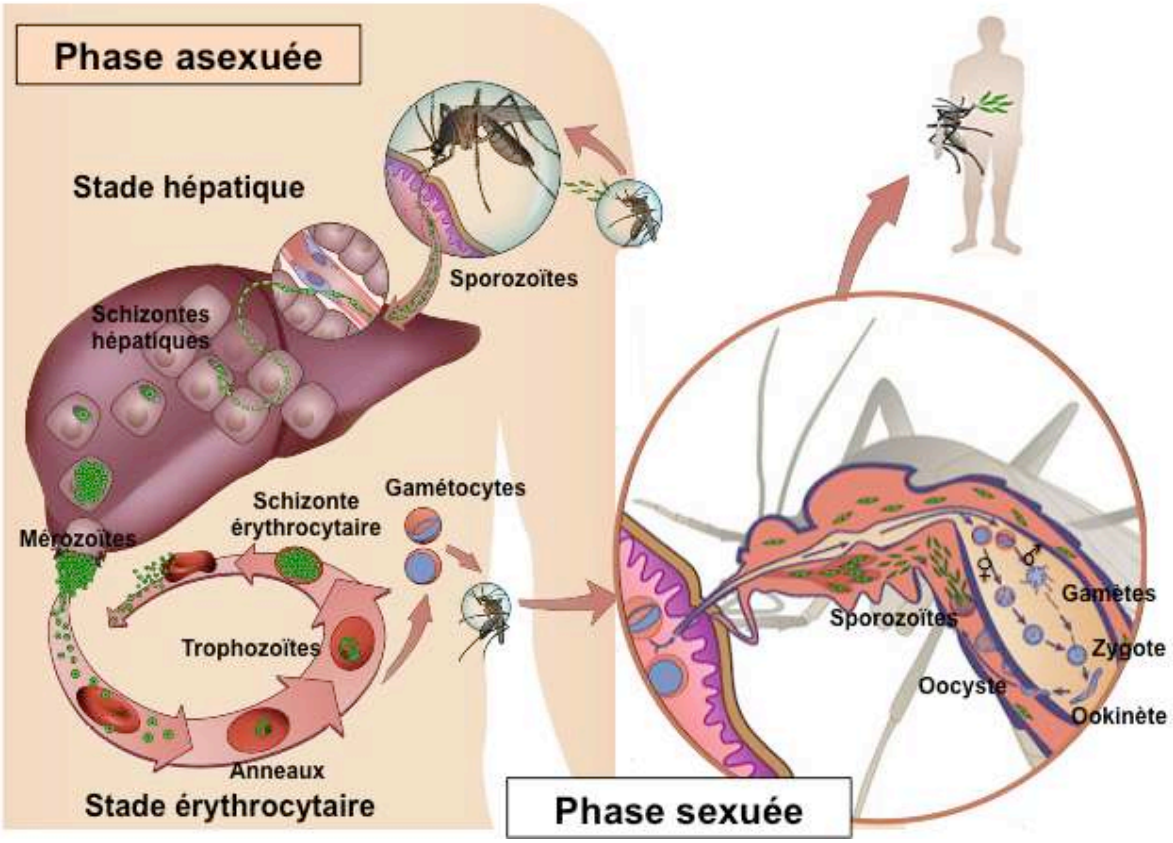


Figure I.4 : Cycle de développement de *Plasmodium*

Source : Adaptation des rapports EMBO de 2010 et 2011.

P. falciparum a longtemps été considéré comme la seule espèce qui, en absence de traitement médical, engendre des accès palustres mortels et du neuropaludisme, lorsque les globules rouges infectés bloquent les vaisseaux sanguins irriguant le cerveau (Idro *et al.*, 2010). Cependant, Cox-Singh en 2010 montre que le parasite *P. knowlesi* peut lui aussi engendrer des pathologies cérébrales dont les mécanismes encore inconnus engendrent des différences symptomatiques avec son cousin africain (absence de coma malgré l'apparition d'hémorragie pétéchiale et la séquestration des parasites dans le cerveau).

B. Cycle de développement de *Plasmodium*

Le cycle de développement de *P. falciparum* est complexe. Il effectue une phase asexuée d'intense multiplication chez son hôte vertébré où il se trouve sous forme haploïde. Cette phase peut se subdiviser en deux, le stade hépatique dans les cellules du foie suivi du stade érythrocytaire dans les globules rouges. Chez l'anophèle femelle, le parasite réalise sa reproduction sexuée suivie d'intenses multiplications parasitaires, l'ensemble de ces évènements est appelé : phase sporogonique (figure I.4). Les températures extérieures permissives à cette seconde partie sont variables suivant les espèces, allant de 16°C pour *P. vivax* à 20°C minimum pour *P. falciparum.* L'exemple phare de la modulation du cycle de vie parasitaire par l'environnement est un allongement de la durée du développement de *P. falciparum* chez le moustique de 9 à 20 jours par une diminution de la température ambiante de 10°C (passage de 30°C à 20°C) (*in* Rodhain *et al.*, 1985).

1. Chez l'homme

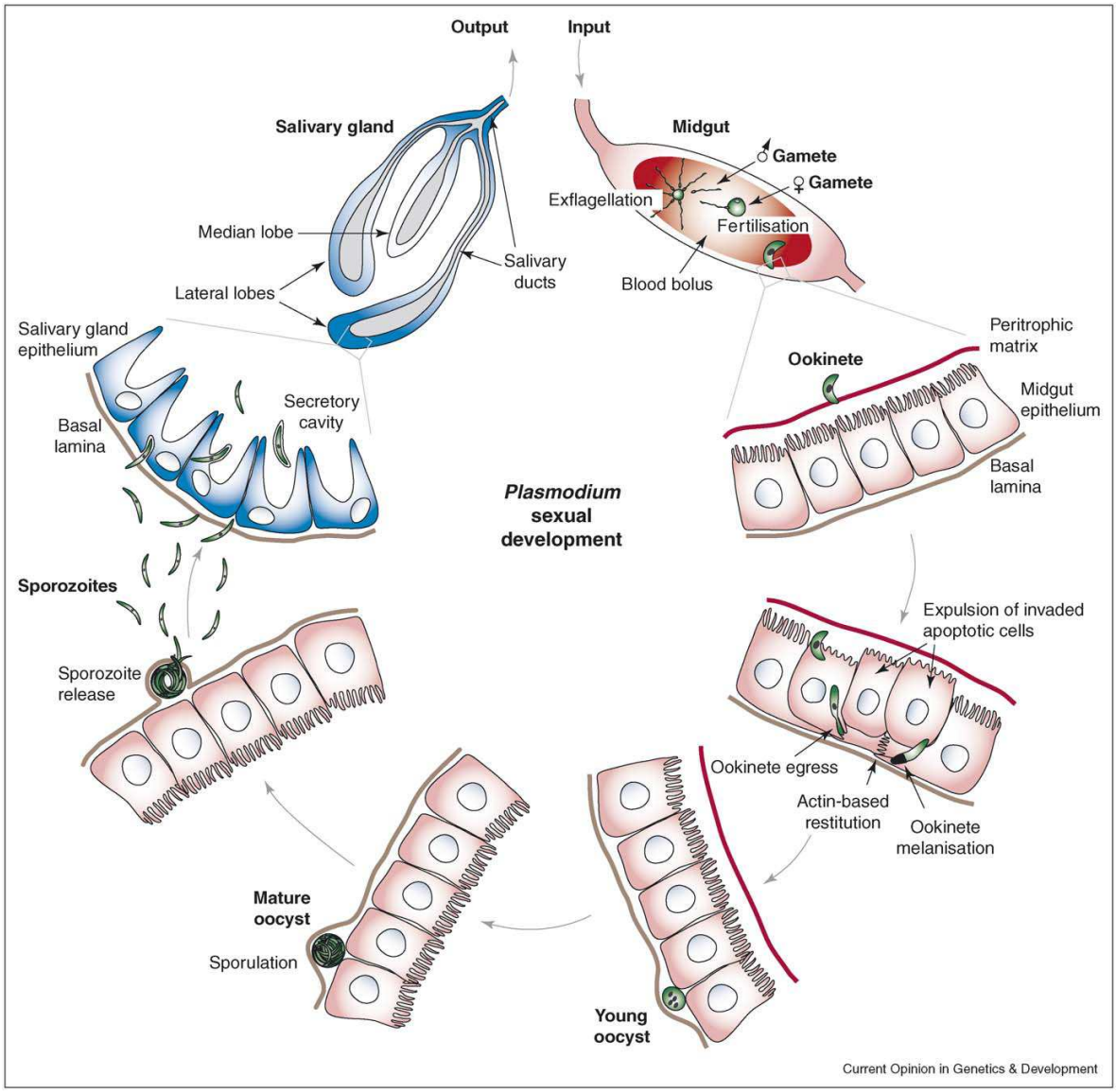
Au cours de la piqûre, l'Anophèle femelle infectée injecte dans le derme avec sa salive quelques parasites sous forme de sporozoïtes fusiformes. Cette forme pénètre dans les capillaires sanguins et/ou lymphatiques, et peut également se multiplier au niveau de la peau (Gueirard *et al.*, 2010). Ensuite, *via* la circulation sanguine, les sporozoïtes migrent rapidement (≈ 30 minutes) vers le foie où ils pénètrent dans les hépatocytes afin d'effectuer la phase hépatique de leur développement. Le parasite rentre alors en réplication au sein de la vacuole parasitophore. Cette prolifération intracellulaire repousse en périphérie le noyau de la cellule pour former une masse multi-nucléée appelée schizonte hépatique. Après une période d'incubation de 6 à 15 jours suivant les espèces plusieurs dizaines de milliers de mérozoïtes finissent par être dispersés dans la circulation sanguine via des mérosomes (Baer *et al.*, 2007).. Pour certaines plasmodies, telles que *P. vivax* et *P. ovale*, des sporozoïtes peuvent rester quiescents dans le foie quelques mois à plusieurs années sous formes d'hypnozoïtes avant de réaliser une schizogonie tardive responsable des accès palustres survenant même plusieurs années après la primo-infection. Cette phase hépatique ou pré-érythrocytaire correspond à la période d'incubation de la maladie, cliniquement asymptomatique, durant de 7 à 12 jours pour *P.falciparum*.

Une fois dans le sang, les mérozoïtes réalisent une phase de prolifération asexuée en pénétrant dans les hématies hôtes où ils se différencient au sein de la vacuole parasitophore en forme anneau puis en trophozoïte. Une phase de réplication commence ainsi, formant des schizontes mûrs et un corps en rosace après segmentation. Ce dernier va se dilater et une fois mûr il va éclater libérant entre 8 et 32 mérozoïtes. C'est à partir de l'éclatement des hématies que les symptômes de la maladie commencent. Une fois libérés, les mérozoïtes vont réinfecter d'autres globules rouges sains effectuant ainsi de nouveaux cycles schizogoniques érythrocytaires.

Après plusieurs cycles, certains trophozoïtes sont détournés pour se différencier et initier la gamétocytogenèse. Cinq stades de différenciation gamétocytaire se succèdent, dont seul le 5ième est détectable dans la circulation sanguine après leur désequestration de la moelle *via* la variation de déformabilité de la membrane des globules rouges (Tibùrcio *et al.*, 2012). Le développement du parasite ne continuera qu'à la condition de changer d'hôte via son absorption par l'anophèle.

2. Chez le moustique

En prenant son repas sanguin sur une personne impaludée, la femelle anophèle ingère aussi bien les formes sexuées qu'asexuées du parasite. Seuls les formes gamétocytaires à potentiel sexuel mâle ou femelle absorbés assurent la pérennisation du cycle parasitaire. Les modifications environnementales du parasite occasionnées par son arrivée dans le tube digestif du moustique sont interprétées comme un stress par le parasite, qui a pour conséquence le déclenchement de sa gamétogenèse. Ce processus réalise la maturation des micro- (mâle) et macro- (femelle) gamétocytes en micro- et macro- gamètes ce qui conduit à libérer dans le bol alimentaire du moustique, les micro- et macrogamètes après rupture de la membrane plasmique de leurs hématies hôtes. Le processus de gamétogenèse est distinct suivant les deux sexes. Le macro-gamétocyte femelle évolue rapidement en macrogamète alors que les microgamètocytes mâles subissent trois cycles mitotiques successifs conduisant à la formation de huit noyaux, chacun associés à un flagelle. Ces derniers émergent à la surface du corps du gamétocyte pour former les microgamètes, c'est l'exflagellation. Ce phénomène est induit principalement par la combinaison de différents facteurs : une diminution de la température d'environ 5°C, une augmentation du pH extracellulaire passant de 7,3 à 8 - 8,3 (Sinden *et al.*, 1975; Nijhout *et al.*, 1978; Billker *et al.*, 1997) et par l'acide



Plasmodium migration in the mosquito host. The developmental lifecycle of Plasmodium in the mosquito starts with a female mosquito bite and blood meal on a malaria-infected vertebrate host; it ends with a new bite approximately three weeks later. Soon after blood feeding, ingested parasite gametocytes produce male and female gametes that fertilise and form the zygotes. Still in the gut lumen, the zygotes transform into motile ookinetes. Approximately one day after blood feeding, the ookinetes traverse the midgut epithelium; the invaded epithelial cells become apoptotic and are extruded from the midgut epithelium. Mosquito immune reactions result in processes, such as lysis and melanisation, mainly mediated by proteins that are present in the mosquito hemolymph. These processes drastically reduce the number of ookinetes that successfully develop to the next parasite stage, the oocyst, on the basal side of the epithelium. Approximately two weeks later — this length of time depends on the parasite–mosquito species combination — multiple nuclear divisions within each oocyst are followed by membrane partitioning and budding off of several thousand haploid sporozoites. Upon oocyst burst, this army of sporozoites is released into the haemocoel; many reach and infect the median and the distal lateral salivary gland lobes. Invasion of the salivary gland epithelial cells is thought to occur through the formation of a parasitophorous vacuole, following the interaction of sporozoites with the basal lamina and invagination of the host cell plasmalemma. A similar parasitophorous vacuole is formed around the sporozoites during their escape from the salivary glad cells into the secretory cavity of the glands. The final act of the parasites in the mosquito is the breakdown of this second vacuole and migration of sporozoites into the salivary ducts, from where they are ejected into a new vertebrate host upon the next mosquito bite.

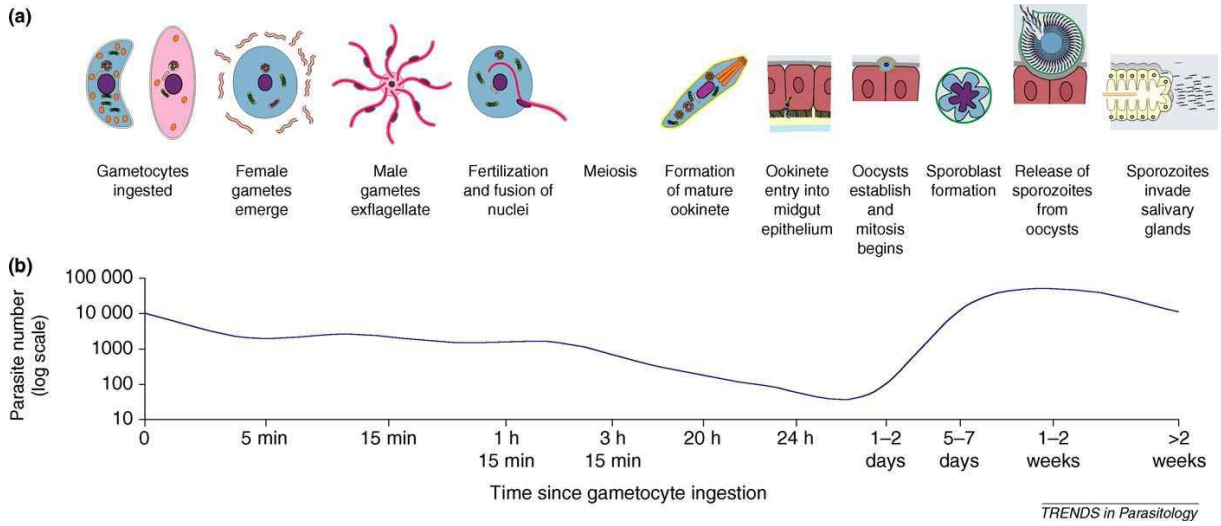
Figure I.5 : Représentation schématique du développement de *Plasmodium* chez le moustique
Source : Vlachou *et al.,* 2006.

xanthurénique, un intermédiaire de la voie de synthèse du tryptophane chez le moustique (Billker *et al.*, 1998). D'autre part, comme le pH sanguin est de 7,4 et le pH du tube digestif des anophèles est de 7,6, les faibles variations du pH de l'environnement parasitaire lors de son passage chez le moustique ne devraient donc pas influencer le développement parasitaire.

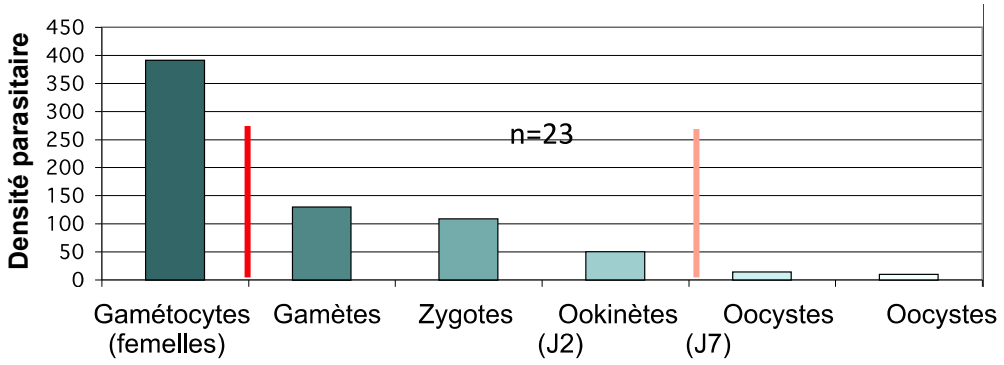
Après l'exflagellation, les membranes plasmiques suivies des noyaux des gamètes mâle et femelle fusionnent, c'est la fécondation qui conduit à la formation d'un zygote diploïde entre vingt minutes et une heure après la prise du repas par le moustique. Plusieurs facteurs influencent le succès reproductif des gamétocytes chez le vecteur, tel que le nombre, le sex-ratio et l'âge des gamétocytes ingérés par les moustiques (Carter *et al.*, 1980; Lensen *et al.*, 1999; Robert *et al.*, 1996; Mitri *et al.*, 2009). Le pouvoir infectant des gamétocytes peut également être modifié par la variabilité naturelle des systèmes immunitaires humains mais aussi par les interactions avec les médicaments utilisés en prophylaxie ou en traitement curatif.

Le zygote va ensuite maturer en ookinète (œuf mobile), cette étape s'effectue dans les premières 24h de l'arrivée du parasite dans le tube digestif de l'anophèle. A ce stade, le parasite traverse à la fois la membrane péritrophique et celle de l'épithélium digestif (figure I.5). La traversée commence par la sécrétion de chitinases (Shahabuddin *et al.*, 1994) alors que celle de l'épithélium digestif du moustique peut s'effectuer à travers ou entre les cellules qui le composent (Vlachou *et al.*, 2006). Entre les deux, l'ookinète se trouve dans l'espace ectopéritrophique, en contact avec les microvillosités des cellules épithéliales du tube digestif qui sont elles mêmes recouvertes de glycocalyx (structure glycosylée formant un réseau associé aux microvillosités des cellules) (Zieler *et al.*, 1998). L'ookinète envahit alors l'épithélium digestif et atteint la membrane basale en 48h après son ingestion par le moustique où il évolue en oocyste. Les dommages subis

A



B



C. Gouagna, non publié.

Figure I.6 : Densité parasitaire de P. bergheï chez A. stephensi et de P. falciparum chez A. gambiae

[A] : Représentation schématique des formes parasitaires rencontrées chez le moustique associée à la densité plasmodiale de P. bergheï

Source : Baton et al., 2005.

[B] : Densité plasmodiale des différents stades de développement de P. falciparum chez A. gambiae

Source : Gouagna et al., non publié.

par les cellules de l'épithélium digestif qui sont traversées par les ookinètes sont irréversibles et conduisent à leur apoptose (Kumar *et al.*, 2004).

Cette brève phase diploïde s'achève une fois que les oocystes se situent entre les cellules épithéliales et la lame basale, où les oocystes deviennent sphériques commençant leur différenciation. Une division méiotique suivie par une succession de 13 mitoses conduit au développement de nombreux sporozoïtes à l'intérieur d'un même oocyste, c'est la sporogonie. Cette maturation induite par contact avec la lame basale de l'épithélium dure entre 8 et 28 jours selon les espèces de plasmodies et la température ambiante (Beier *et al.*, 1998). Elle s'achève par l'éclatement de l'oocyste qui libère ces éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe de l'insecte. Moins de 25% (Hillyer *et al.*, 2007) des sporozoïtes libérés gagnent via l'hémolymphe, les glandes salivaires qu'ils envahissent en traversant leur épithélium pour atteindre le canal salivaire d'où ils pourront être injectés avec la salive lors du prochain repas sanguin du moustique et commencer de ce fait un autre cycle. Dans ce tissu, plusieurs milliers de sporozoïtes peuvent survivre et rester infectants pour l'hôte vertébré pendant 40 jours signifiant que le moustique peut rester infectant tout au long de sa vie (Beier *et al.*,1998).

Chez la femelle moustique, les plasmodies passent par plusieurs phases de développement où le nombre de parasites se réduit avant d'être réamplifié, les rendements parasitaires chez son hôte moustique sont synthétisés figure I.6.

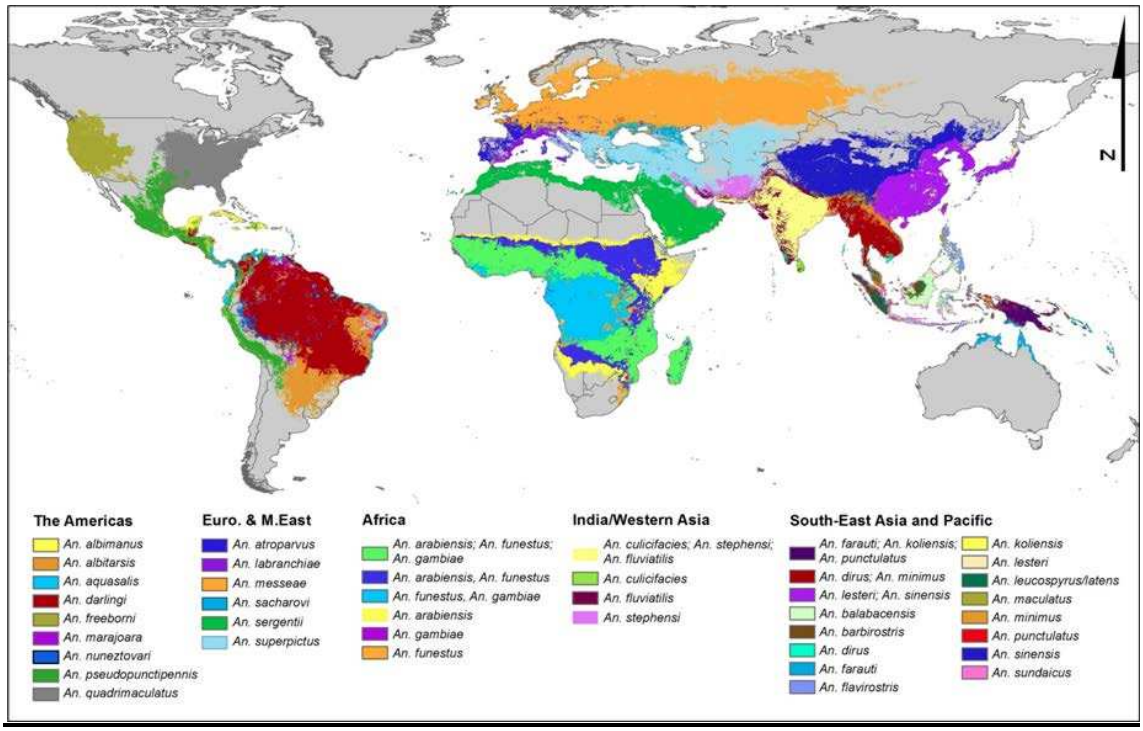


Figure I.7 : Distribution des espèces dominantes d'*Anopheles*
Source : Sinka *et al.*, 2012.

III. Le moustique Anophèles : hôte et vecteur de Plasmodium

C'est lors d'une piqûre de femelle moustique anophèle sur un homme impaludé, que le cycle de vie parasitaire continue. Après son développement chez le moustique, il retournera chez l'homme à l'occasion d'une autre piqûre permettant la poursuite du cycle de développement des plasmodies. Lors des 48h qui succèdent le repas sanguin du moustique qu'il soit parasité ou non, différents évènements biologiques s'opèrent tel que la formation de la matrice péritrophique, la digestion du repas sanguin et la vitellogénèse.

A. Généralités

Les moustiques responsables de la transmission du paludisme à l'homme appartiennent au genre *Anopheles* de la sous famille des *Anophelinae*, de la famille des *Culicidae*, du sous ordre des *Nématocères*, de l'ordre des *Diptères* et de la sous classe des *Ptérygota* chez les Insectes. La plupart des espèces d'*Anophelinae* et de *Culicinae* comme *Aedes aegypti* sont des moustiques anautogènes qui ont besoin d'un repas de sang pour obtenir les réserves protéiques qui sont nécessaires à la maturation de leurs œufs.

A ce jour, 484 espèces d'*Anophèles* sont répertoriées mais seul 68 peuvent assurer la transmission du parasite à l'homme (*in* Service, 2002). Cependant, seule une quarantaine d'entres elles ont une réelle importance au niveau épidémiologique, avec *A. gambiae* vecteur majeur de *P. falciparum* en Afrique et *A. stephensi* vecteur majeur de *P. vivax* sur le continent asiatique. Une répartition non exhaustive des espèces principalement rencontrées est représentée figure I.7, extraite de Sinka 2012.

La prévalence d'infection des moustiques est observée soit par la présence d'oocystes au niveau de sa paroi stomacale soit par la présence de sporozoïtes au niveau de ses glandes salivaires.

Les observations et captures réalisées sur le terrain permettent d'évaluer le degré de contact entre l'homme et les différentes espèces d'*Anopheles*. Tous d'abord, le degré d'agressivité, d'anthropophilie (préférence de la prise du repas sanguin sur l'homme), d'endo- et exo-phagie (prise du repas de sang à l'intérieur ou à l'extérieur des maison), la durée de leur cycle gonotrophique (période entre le repas de sang et la ponte), et même la durée de vie des moustiques. Cette dernière s'étalant en moyenne sur une trentaine de jours, mais de récente recapture de moustiques marqués ont permis l'observation d'une femelle moustique marquée 212 jours auparavant (Lehmann *et al.*, 2010).

B. Cycle de développement du moustique *Anopheles*

Les anophèles comme la plupart des moustiques se nourrissent de nectar de fleurs, riche en eau et pauvre en lipides et protéines mais suffisant comme source d'énergie. Les espèces d'Anopheles sont en majorité anautogènes, mais seules les femelles sont hématophages, nécessitant un repas de sang pour combler les besoins protéiques nécessaires à la réalisation de leur cycle gonotrophique (maturation de leurs œufs et ponte). Elles prélèvent un maximum de 3µl de sang tous les 2 à 3 jours et réalisent un cycle gonotrophique entre deux repas. Les femelles ont vu leurs pièces buccales évoluer de façon à s'adapter, en plus de sucer le nectar, à percer la peau ; les femelles sont dites solénophages c'est-à-dire qu'elles cherchent les vaisseaux afin d'ingérer un

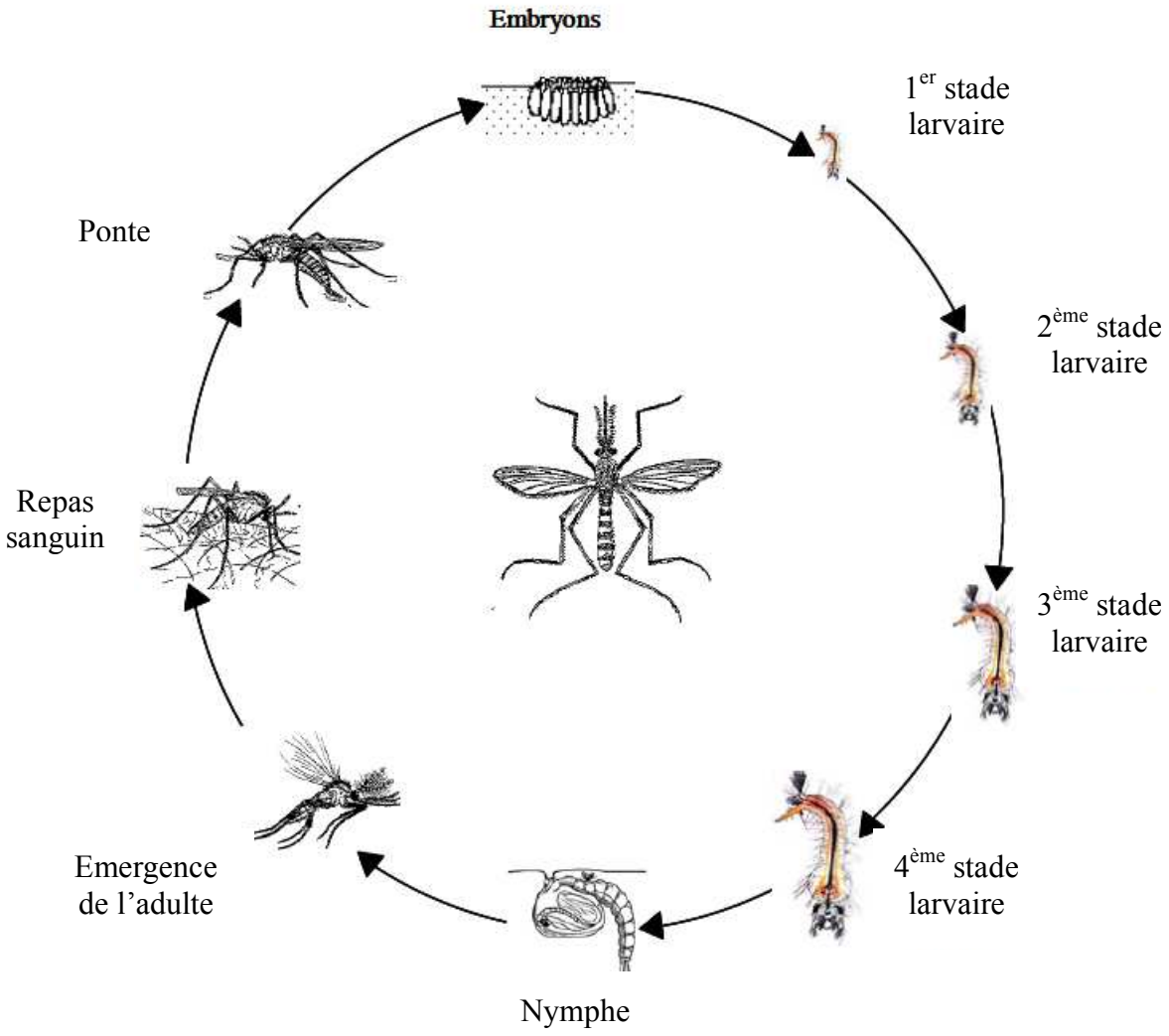


Figure I.8 : Cycle de développement des moustiques anautogènes
Les stades aquatiques sont communs aux mâles et aux femelles. Ils se composent de 4 stades larvaires suivis d'un stade nymphal. Après métamorphose c'est l'émergence du stade adulte où les mâles se nourrissent de nectar alors que le repas sanguin et la ponte sont réservés aux femelles adultes.

maximum de sang. Les mâles possèdent eux des pièces buccales plus rudimentaires se nourrissant exclusivement de nectar. Le cycle de développement des moustiques est similaire pour les stades larvaires et nymphaux quelque soit le sexe du moustique alors que la prise du repas sanguin et la ponte sont réservées aux femelles adultes (figure I.8). Le développement des moustiques commence par 4 stades de développement larvaire suivis d'un stade nymphal où s'effectue la métamorphose. Ensuite, il y a émergence des moustiques adultes, c'est la fin de la vie aquatique pour passer au milieu aérien. Les femelles adultes une fois matures prennent leur premier repas de sang avant ou après copulation avec les mâles (dépendant des sous espèces d'anophèles) pour pondre à la surface d'eau stagnante entre 50 et 500 œufs (*in* Clements, 1992).

C. La digestion chez les anophèles, insectes hématophages

L'ingestion de sang ou d'extraits protéiques par les moustiques déclenche la synthèse de la matrice péritrophique et la libération d'une cascade d'enzymes protéolytiques. Le corps de l'anophèle adulte est occupé en majeure partie par l'appareil digestif, responsable de la digestion du sang et des sucs végétaux (*in* Rodhain *et al.*, 1985). Le système digestif schématisé figure I.9 est constitué dans sa partie antérieure d'une pompe pharyngienne qui se prolonge par un œsophage auquel sont annexés trois ventricules où viennent s'accumuler les sucs végétaux. Un proventricule relie l'œsophage au mésentéron que l'on appelle tube digestif, en arrière duquel commence l'intestin postérieur qui aboutit à l'anus. A l'inverse des drosophiles qui ne cessent de s'alimenter et dont le volume du tube digestif varie peu (Goldstein *et al.*, 1971), celui des moustiques, insecte hématophage varie significativement (figure I.10) avec comme fonction première une osmorégulation. Les tubes digestifs des moustiques présentent également des différences

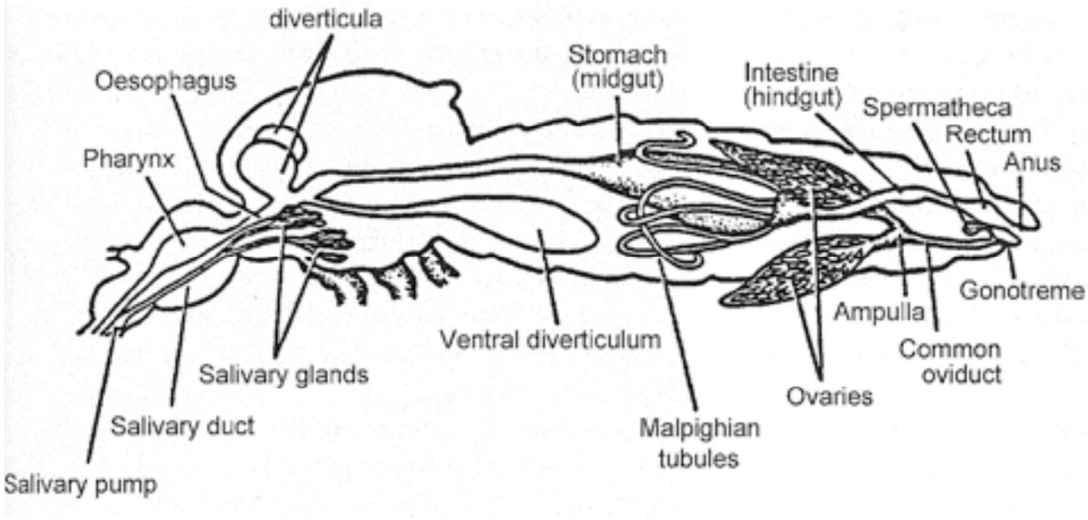


Figure I.9 : Schéma de l'appareil digestif du moustique *Anopheles*

Source : Impact-Malaria, Sanofi-Aventis.

Figure I.10 : Photographie d'*Anopheles gambiae*
Comparaison morphologique du moustique avant et après la prise du repas sanguin
Source : Vector Base.

morphologique suivant les espèces (Shahabuddin *et al.*, 2000). La digestion dure environ deux jours, permettant d'induire la vitellogénèse et d'assurer la maturation des œufs. Pour éviter un fort choc thermique au moment de l'ingestion de sang, les anophèles excrètent par l'anus une goutte d'urine mêlée à du sang (Lahondère *et al.*, 2012).

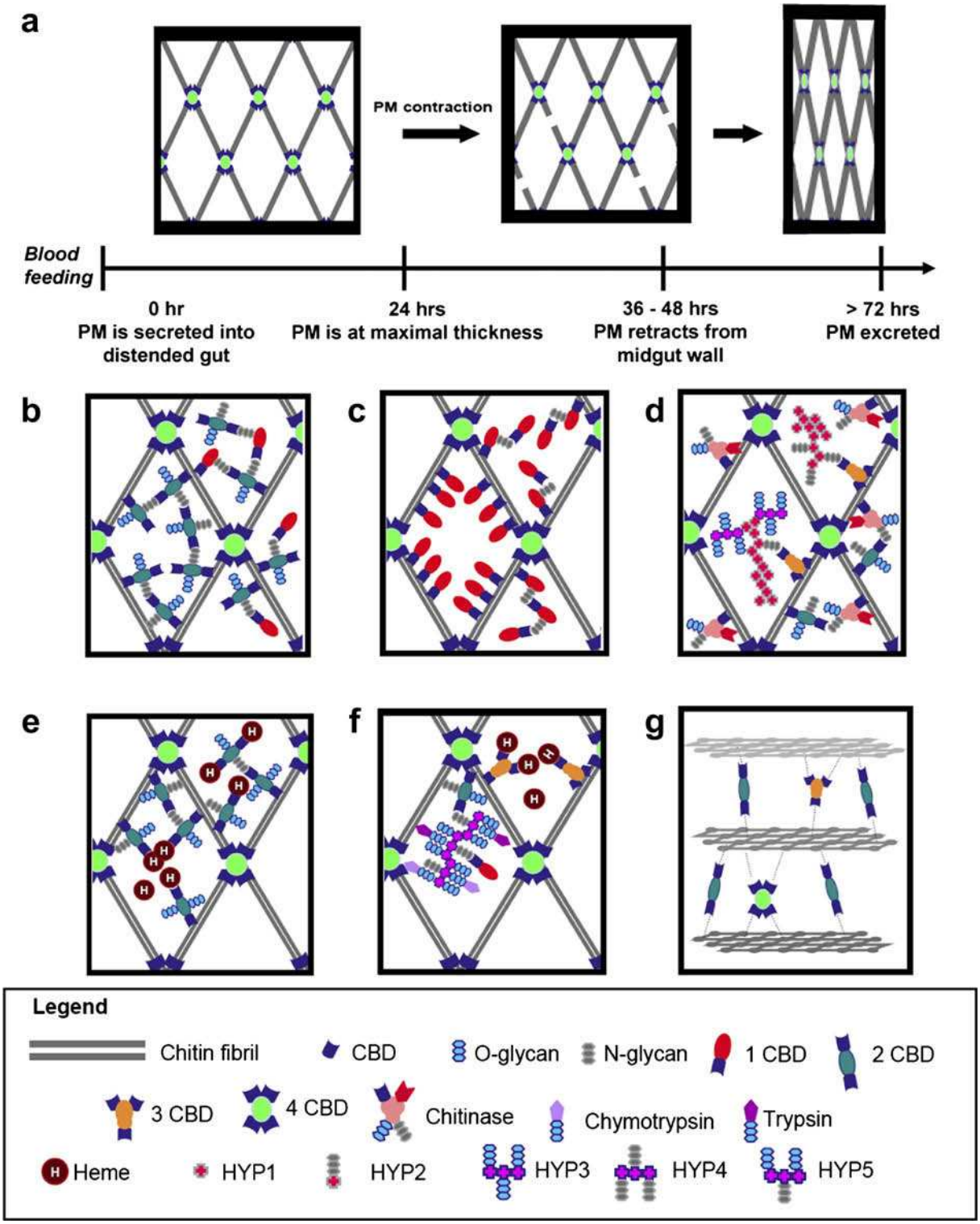
Le processus de digestion va impliquer plusieurs protéases sécrétées par l'épithélium du moustique et va être accompagné de la formation d'une structure chitineuse entourant le repas sanguin : la matrice péritrophique. Les protéases impliquées dans la digestion du repas sanguin vont dégrader les protéines du sang en acides aminés nécessaires à la production des œufs (*in* Clements, 1992).

1. Organisation du tube digestif

a. La formation de la matrice péritrophique

Il existe deux types de matrice péritrophique chez les insectes (Shao *et al.*, 2001), le type 1 décrit ci-dessous et le type 2 de 0,1 à 2µm d'épaisseur, synthétisée en continu à partir des cellules du cardia formant comme un manchon ouvert aux extrémités, retrouvé au stade larvaire des moustiques et au stade adulte d'autres insectes comme les Drosophiles.

Au stade adulte, la matrice péritrophique est une enveloppe semi-perméable acellulaire de 4 à 5 µm qui se dépose autour du bol alimentaire du moustique. Elle compartimente l'estomac en deux espaces, le premier : endopéritrophique, contient le bolus alimentaire du moustique alors que le second : ectopéritrophique, délimite l'espace entre la matrice et la membrane de l'épithélium digestif.



Proposed structural model of the adult An. gambiae PM. (Panel a) It is speculated that intersecting chitin fibrils form cross-hatch apertures and provide the structural scaffold of the PM. Peritrophins with chitin-binding domains (CBD) interact with other peritrophins and digestive enzymes such as trypsin and chymotrypsin get caught in the PM during transit to the lumenal blood meal. Peritrophins also interact with chitinase and non-CBD hypothetical proteins (HYP1-5) as well as trapping toxic heme (Devenport et al. 2006) all within the apertures of the PM. Peritrophins and these other molecules strengthen the PM and provide structural support and control of porosity, contractility, and thickness.

Figure I.11 : Modèle structural de la matrice péritrophique du stade adulte d'*A. gambiae*
Source : Dinglasan *et al.*, 2009.

La digestion du sang peut être réalisée normalement en l'absence de matrice péritrophique qui entoure le bolus sanguin (Berner *et al.*, 1983; Billingsley *et al.*, 1992) mais une aide potentielle de ce maillage tridimensionnel n'est pas à exclure dans ce processus. C'est la distension des cellules de l'épithélium digestif des moustiques, induite par la prise du repas de sang, qui provoque la sécrétion de la matrice péritrophique dans la lumière du tube digestif (Richards *et al.*, 1977; Bilingsley *et al.*, 1992; Shao *et al.*, 2001). Chez les anophèles, cette structure fibreuse est stockée dans des vésicules sécrétrices, elles-mêmes accumulées au niveau du pôle apical des cellules épithéliales. Des enzymes digestives telles que la trypsine colocalisent dans ces mêmes vésicules indiquant un mécanisme de sécrétion commun entre ces différentes protéines (Devenport *et al.*, 2004). Chez *A. gambiae*, la formation de la matrice est rapide, dès les 30 premières minutes de la digestion (Shen *et al.*, 1998), et les vésicules de sécrétion disparaissent totalement entre 1h à 1h30 après la prise du repas (Stäubli *et al.*, 1966). La structure de la matrice est observable par microscopie électronique à partir de 12h après le repas pour être mature entre 24h et 36h et disparaître après la digestion du sang (Rudin *et al.*, 1991). Au niveau postérieur, la matrice péritrophique est perforée ou incomplètement formée pour permettre la défécation (Romoser *et al.*, 1975; Bilingsley *et al.*, 1992).

La matrice péritrophique forme un réseau tridimensionnel chitino-protéique contenant plus de 200 protéines telles que des glycoprotéines, des protéoglycanes, des péritrophines qui sont enchevêtrés dans des réseaux de chitine (Richards *et al.*, 1977) représentée figure I.11 extraite des données du protéome de la matrice péritrophique d'*A. gambiae* par Dinglasan en 2009 également détaillée dans la revue entomologique d'Hegedus de la même année. Sa fonction est d'isoler et de protéger le pôle apical des cellules de l'épithélium intestinal de pathogènes comme des bactéries, des virus… (Lehane *et al.*, 1997; Tellam *et al.*, 1999). Par la compartimentation de l'estomac, elle concentre l'action protéolytique des enzymes digestives, évitant les reconnaissances aspécifiques,

la dispersion des enzymes et du bolus non digéré. Le contenu des membranes péritrophiques et du fluide ecto-péritrophique peut également moduler l'activité de différentes protéases digestives (en fonction de la longueur du peptide cible) (Bolognesi *et al.*, 2008). Des gradients de fluides activateurs et/ou inhibiteurs d'activités pourraient ainsi moduler, grâce à leur disposition le long du tube digestif, l'activité protéolytique des enzymes digestives assurant le relais et/ou la synergie d'action du processus digestif.

b. Les protéases impliquées dans la digestion du sang

Le processus digestif du repas sanguin des moustiques déclenche la sécrétion de protéases qui peuvent être séparées en deux groupes : les endopeptidases et les exopeptidases. L'apparition de ces enzymes au cours de la digestion semble être régie par deux grandes phases de digestion : l'une précoce et l'autre tardive.

i. Les endopeptidases

Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques au sein de la chaîne protéique coté carboxylique des acides aminés basique (Lys et Arg) pour la Trypsine et après les résidus aromatiques (Tyr, Trp et Phe) pour la chymotrypsine. Elles appartiennent à la classe des Sérines protéases et sont sécrétées par l'épithélium digestif des moustiques.

Le séquençage du génome d'*A. gambiae* (Holt *et al.*, 2002) a ouvert la voie et a permis entre autre l'annotation des différents clusters des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le processus digestif. Les trypsines sont les enzymes majoritairement sécrétées lors de la digestion

et sont responsables d'environ 75% de l'activité protéolytique d'homogénat de tube digestif de moustique (Briegel *et al.*, 1975). Un cluster de 7 gènes codant pour 5 trypsines fonctionnelles est trouvé sur le chromosome 3R (11kb, division 30A) d'*A. gambiae*, c'est le premier cluster décrit où les expressions des gènes qu'il renferme sont modulées différemment par le repas sanguin (Muller *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 1995). Les deux premières (tryp 1 et 2) sont précoces et induites en grande quantité par le repas sanguin : la régulation s'effectuant au niveau traductionnel. Les trypsines 3, 4 et 7 sont exprimées constitutivement chez les femelles non gorgées. La troisième et la septième sont sous-exprimées par le repas, elles sont dites tardives, présentes majoritairement entre la huitième et la trente-sixième heure après l'ingestion de sang : leur régulation s'opère au niveau traductionnel (Muller *et al.*, 1995; Lemos *et al.*, 1996) alors que leurs transcrits ne sont plus détectables au delà de 28h après le repas. Les moustiques *Aedes*, plus documentés dans l'étude de leur métabolisme, permettent de proposer un schéma de ce qui s'opère chez ces moustiques. Dès les premiers jours de l'insecte, l'hormone juvénile (JH) induit la transcription de l'ARNm des trypsines précoces, qui sont accumulés dans les cellules épithéliales du moustique avant d'être traduits dès la prise du repas sanguin (Noriega *et al.*, 1997). Les trypsines capables d'auto-activation (Noriega *et al.*, 1996) jouent également sur l'activation enzymatique d'autres enzymes digestives comme les trypsines tardives (Barillas-Mury *et al.*, 1995; Noriega *et al.*, 1999) ou sur des exopeptidases telles que les carboxypeptidases (Cf. Chapitre I). Chez *A. gambiae*, l'activité des trypsines est principalement retrouvée dans la partie postérieure du tube digestif (Billingsley *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1996).

Une autre classe de protéase à sérine est également représentée lors du processus digestif du moustique : les chymotrypsines. Localisées au niveau du chromosome 2L chez *A. gambiae* (division 25D), trois chymotrypsines sont exprimées, les deux premières apparaissant de façon

croissante entre 12h et 48h après la prise du repas sanguin du moustique qui induit la transcription des gènes dont elles sont issues (Shen *et al.*, 2000; Vizioli *et al.*, 2001) tandis que la troisième est présente de façon similaire aux trypsines 3 et 7, dite tardive.

ii. Les exopeptidases

Des exopeptidases sont également sécrétées par l'épithélium digestif afin de compléter la chaîne catabolique du processus digestif. En fonction de leur site d'action, deux classes se distinguent : les aminopeptidases qui libèrent les acides aminés en position amino-terminale des protéines ou des peptides alors que les carboxypeptidases libèrent les acides aminés en position carboxy-terminale de ces mêmes éléments.

La première détection d'activité fut celle d'aminopeptidases d'*A. stephensi* réalisée par Billingsley en 1990. L'activité est détectée dans la partie antérieure et postérieure du tube digestif pour être induite côté postérieur par la prise du repas de sang (Billingsley *et al.*, 1991). L'activité des aminopeptidases augmente rapidement après la prise du repas sanguin. En parallèle de l'activité de trypsines tardives, le pic d'activité des aminopeptidases est détecté entre la dix-huitième et la vingt-quatrième heure après l'ingestion du repas sanguin (Lemos *et al.*, 1996). Les aminopeptidases d'*A. stephensi* clivent préférentiellement les acides aminés non polaires et en particulier les résidus alanine et leucine et proline mais également la méthionine, la proline, la lysine et l'arginine. Chez *A. gambiae* les données sur le nombre d'aminopeptidases restent à clarifier : les blasts génomiques de la base de donnée Ensembl pour *A. gambiae* (ENSANG) en prédisent 3 (Dinglasan *et al.*, 2007) alors que l'analyse du séquençage d'*A. gambiae pest* en identifie 4 (Zhang *et al.*, 2008) (avec un seul acide aminé de différence pour deux d'entre elles).

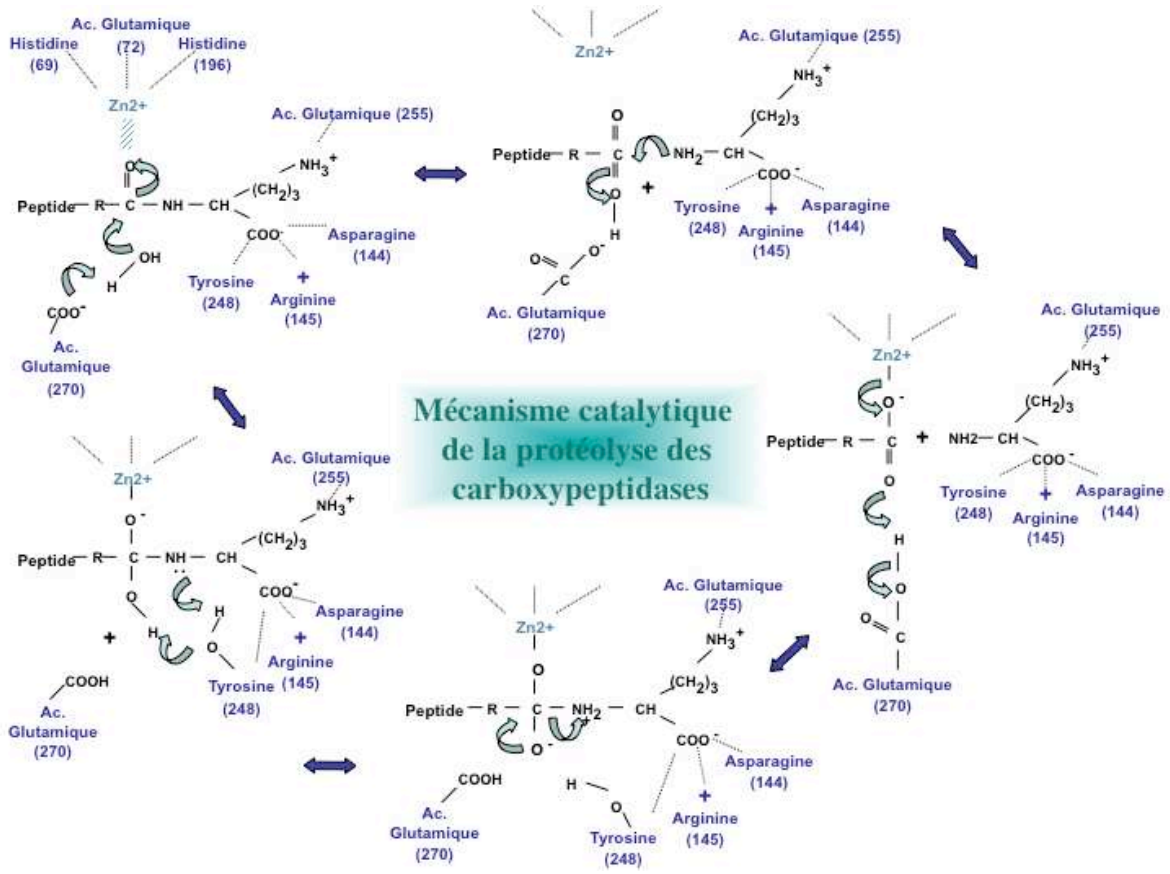


Figure I.12 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la poche catalytique des carboxypeptidases B lors de la protéolyse

Les carboxypeptidases B sont des métalloprotéases qui possèdent un cation métallique, ici le zinc fixé à la protéine par les chaines latérales de deux histidines et un glutamate du site actif. Le zinc active une molécule d'eau nécessaire pour l'attaque nucléophile d'un acide glutamique (ici) ou d'un acide aspartique (comme chez les CPBAg) qui donne la spécificité de clivage envers les résidus basiques. Les attaques nucléophiles sont symbolisées par les flèches bleu clair. Les autres acides aminés mentionnés participent à la stabilisation du groupement Carboxy-terminal du substrat, pour les CPBAg seul une arginine et une tyrosine remplissent cette fonction.

Ces protéines sont localisées à la surface des microvillosités de la barrière en brosse des cellules intestinales (côté lumen). En plus de leur fonction protéolytique, les aminopeptidases peuvent être vraisemblablement incorporées au même titre que les trypsines et chymotrypsines, dans la matrice péritrophique grâce à leurs site d'encrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Dinglasan *et al.*, 2009). Ce pied d'encrage facilite le passage du tube digestif du moustique pour différents parasites : *P. falciparum – A. gambiae* ou *A. stephensi* / *P. bergheÏ – A.gambiae* (Dinglasan *et al.*, 2007). Elles colocalisent avec les toxines de *Bacillus thuringiensis* conférant aux aminopeptidases une implication de récepteur putatif des agents pathogènes du tube digestif, suggérant une implication des aminopeptidases dans l'immunité des moustiques (Zhang *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les carboxypeptidases digestives chez *A. gambiae*, deux classes ont été identifiées : la classe A et la classe B. Ce sont des métalloprotéases dépendante du zinc qui appartiennent au clan MC de la famille M14 des protéases selon la classification enzymatique de Barett, Rawling et Woessner (*in* Barrett, 2004) c'est à dire qu'un ion métallique, participe à la catalyse du clivage de la liaison peptidique en jouant le rôle de promoteur de structuration et d'acide de Lewis, comme schématisé sur la figure I.12.

Chez *A. gambiae*, 5 carboxypeptidases de la famille A sont prédites par la base de donnée Vector Base (http://agambiae.vectorbase.org), toutes localisées sur le chromosome 3 à l'exception de la 4ème qui est située sur le chromosome X. Elles sont toutes fortement exprimées dans le tube digestif d'*A. gambiae* et seules les deux premières ne sont pas aussi exprimées dans les carcasses (Lavazec *et al.*, 2005). Les enzymes de la classe A clivent préférentiellement les acides aminés hydrophobes grâce aux interactions (hydrophobes) conférées par l'isoleucine de leurs sites actifs. Cependant chez *A. gambiae*, les carboxypeptidases A 1 et 2 (CPA1 et CPA2) se distinguent par la

présence d'une valine au sein de leur site actif. L'expression du gène codant CPA1 est induite par le repas sanguin, son profil d'expression est biphasique avec deux pics d'expressions à 3 et 20 heures après l'ingestion du repas même s'il ne contient pas de protéine (Edwards *et al.*, 1997).

Les carboxypeptidases de la classe B clivent préférentiellement les acides aminés basiques tels que la lysine et/ou l'arginine grâce aux interactions ioniques et à l'attraction de la charge négative de l'acide aspartique présent en position (S1') de leurs sites actifs (figure I.12). Seuls 2 paralogues sur une famille de 21 gènes prédisant des carboxypeptidases B selon l'annotation du génome sont exprimés à des taux significatifs dans le tube digestif d'*A. gambiae* : *cpbAg1 et cpbAg2* (Lavazec *et al.*, 2005). Les protéines sont sécrétées sous forme de pro-enzyme ou zymogène dans la lumière du tube digestif grâce à leur peptide signal respectif. L'étude de *cpbAg1* a montré une accumulation de son transcrit avant le repas sanguin pour chuter dès l'absorption de sang (Lavazec *et al.*, 2005). Le transcrit de *cpbAg2* est quant à lui induit par la prise du repas de sang (*in* Lavazec, 2004). L'activation de CPBAg1 est réalisée par clivage protéolytique de la trypsine, la libérant de son propeptide. La caractérisation de CPBAg1 a montré que des anticorps dirigés contre cette molécule bloquent le développement de *P. falciparum* chez *A. gambiae* (Lavazec *et al.*, 2008). Ces mêmes anticorps bloquent le développement de *P. falciparum* chez un autre anophèle, *Anopheles stephensi*, vecteur de *P. falciparum* sur le sous-continent Indien (Thiery *et al.*, non publié). Ces anticorps reconnaissent à faible affinité CPBAg2, suggérant que cette enzyme pourrait également être impliquée dans le développement de *P. falciparum*. La caractérisation de leurs implications respectives dans le développement de *P. falciparum* restait inexplorée, faisant l'objet de mon doctorat.

La cinétique de digestion fait apparaître une cascade de protéines qui clivent les protéines et peptides présents dans la lumière intestinale. Les trypsines et chymotrypsines libèrent

respectivement des extrémités carboxy-terminal basiques et aromatiques des peptides en cours de digestion. Ils seront à leur tour pris en charge de ce même coté par les CPB (basique) et les CPA (aromatique) qui libèrent les acides aminés pour qu'ils soient incorporés selon les besoins métaboliques du moustique.

Le processus digestif des moustiques s'harmonise autour des populations bactériennes dont les concentrations augmentent après le repas. Leurs compositions pourraient participer à l'hydrolyse des composés sanguins et/ou moduler l'action protéolytique des enzymes digestives du moustique.

D. La reproduction des anophèles

1. Accouplement et appareil reproducteur femelle

Pour assurer son cycle gonotrophique, la femelle moustique a besoin de prendre un repas de sang. Cet apport protéique est digéré pour assurer la production de vitellus conduisant au développement vitellogénique des ovocytes. Comme les anophèles sont poïkilothermes, la durée du cycle gonotrophique dépend de la température allant de plusieurs semaines lors des saisons hivernales (basse température) à 2-3 jours à 25°C (*in* Clements, 1999). Suivant les espèces l'accouplement s'effectue avant, pendant ou après la prise du premier repas de sang. Les mâles anophèles sont eurygames, c'est à dire qu'ils ont besoin d'espace pour s'accoupler. En effet, ils forment des nuages ou essaims (Yuval *et al.*, 2006; Diabaté *et al.*, 2011) dans lesquels les femelles pénètrent pour être inséminées en 20 à 25 secondes. A l'inverse des mâles, les femelles ne s'accouplent généralement qu'une seule fois au cours de leur vie. Après copulation les spermatozoïdes sont stockés dans la spermathèque (figure I.13) ou ils peuvent survivre plusieurs

Figure I.13 : La spermathèque chez la femelle *Anopheles gambiae*

[A] La spermathèque est une sphère de cuticule située au niveau du 10ème segment abdominal, observé à la loupe. Source : Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4).
[B] Photographie d'une spermathèque pleine de spermatozoïdes.
[C] Photographie d'une spermathèque vide.

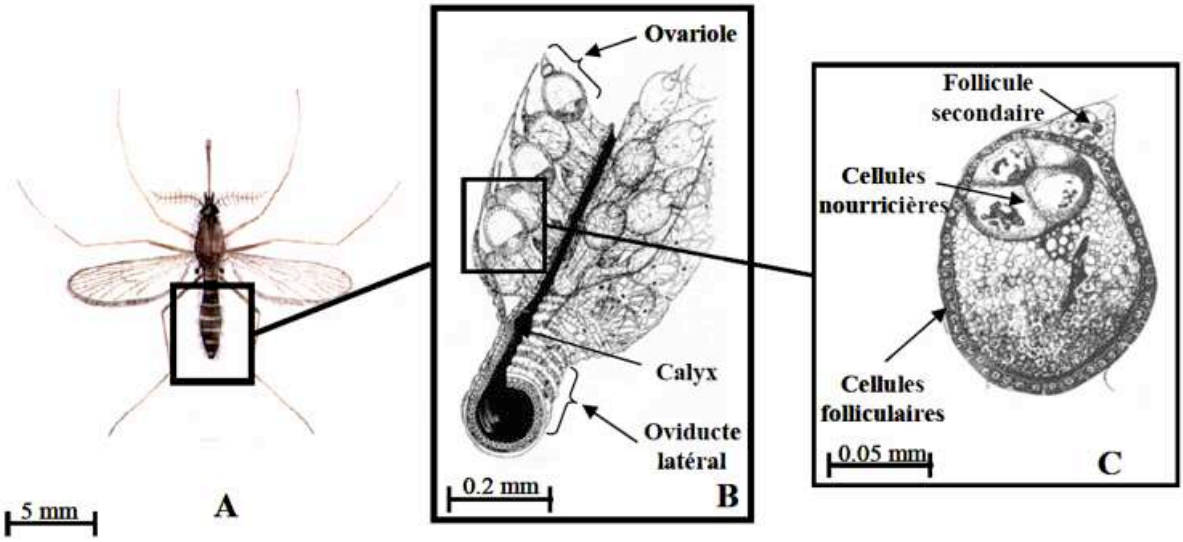


Figure I.14 : Représentation des ovaires de la femelle anophèle

(A) Dessin d'une femelle moustique.
(B) Demi-paire d'ovaires où sont représentées les nombreuses ovarioles synchrones. Les ovocytes primaires matures passent dans le calyx et par l'oviducte.
(C) Coupe sagittale du follicule primaire vitellogénique et du follicule secondaire prévitellogénique.
Source : Clements, 1992.

semaines. Les femelles moustiques possèdent dans l'abdomen postérieur deux ovaires dorso-latéraux constitués de 50 à 500 ovarioles. Ils sont innervés et oxygénés par deux trachées qui se subdivisent pour alimenter chacune des ovarioles (figure I.14). Les ovocytes matures passent par le calyx, une cavité reliant chaque ovaire avec l'oviducte latéral. Ce dernier débouchant dans la chambre génitale, lieu de la fécondation, elle même reliée avec la spermathèque et les glandes accessoires.

2. De l'ovogenèse aux follicules matures

Un cycle ovarien débute par la formation de follicules dans le germarium, puis s'en sépare pour se développer dans le vitellarium pour obtenir un ovocyte mature qui sera pondu en milieu aquatique.

Les ovarioles sont des chambres latérales qui contiennent les follicules ovariens en cours de développement croissant : du follicule secondaire proche du germarium, coté antérieur de l'ovariole où débute le cycle, au follicule proximal ou primaire, côté postérieur dit vitellarium pour finir vers le calyx afin de rejoindre l'oviducte. Chaque follicule contient en plus de l'ovocyte, sept cellules nourricières ou trophocytes, les ovarioles sont dits méroïstiques polytrophiques. Ces cellules de lignées germinales sont délimitées par une monocouche de cellules folliculaires. Les cellules nourricières servent à accumuler des ARNm, des réserves de protéines, de lipides et d'organites (ribosomes, mitochondries) avant leur transport vers l'ovocyte pour assurer sa maturation. La formation de l'ovocyte et des cellules nourricières résulte de la division des cystoblastes. Ces cellules centrales du germarium, subissent une série de trois mitoses à cytocinèse incomplète donnant un cystocyte de huit cellules interconnectées de ponts cytoplasmiques. L'une

des deux cellules centrales (possédant trois ponts cytoplasmiques) deviendra l'ovocyte en réalisant une méiose pour se bloquer en métaphase. Les sept autres cellules deviennent polyploïdes par des cycles successifs d'endoréplication, ce sont les futures cellules nourricières (*in* Clements, 1999).

Au cours d'un cycle gonotrophique de moustiques anautogènes tel que sont les anophèles, deux cycles ovariens s'opèrent en simultané dans chaque ovariole. Le premier débute juste après l'émergence des individus ou quelques follicules se détachent du germarium pour se développer, ce sont les follicules primaires. Ils resteront bloqués au stade pré-vitellogénique jusqu'au repas de sang. Ce dernier déclenche la maturation vitellogénique des follicules primaires produisant des ovocytes matures. Il provoque également la séparation du follicule secondaire du germarium, engendrant son passage au stade pré-vitellogénique. Ce dernier restera bloqué en métaphase jusqu'au prochain repas sanguin. L'ingestion de sang, provoque également l'apparition d'une troisième série de follicules dans le germarium pour un prochain cycle gonotrophique (*in* Clements, 1999).

Cinq stades morphologiquement différents ont été décrits chez *A. gambiae* en 1911 par Christophers. Ils peuvent être regroupés en trois grandes phases. La phase pré-vitellogénique durant de 2 à 3 jours à 25°C : le follicule se sépare du germarium (stade G), puis il est entouré d'une vingtaine de cellules folliculaires (stade I) pour conduire à un ovocyte distinguable des cellules nourricières qui occupe la moitié de l'espace du follicule mais arrête sa croissance au stade pré-vitellogénique jusqu'au repas de sang (stade II). A la suite de ce dernier, c'est la vitellogénèse, il y a endocytose vers l'ovocyte des protéines sécrétées dans le corps gras constituant le vitellus (stade III), l'ovocyte prend alors 75% de la taille du follicule. La maturation de l'ovocyte continue, il s'allonge et occupe 90% de l'espace du follicule (stade IV). Les cellules nourricières vident leur contenu dans l'ovocyte et meurent puis les cellules folliculaires synthétisent le chorion. C'est le passage de la phase vitellogénique à la phase de synthèse du

chorion ou phase trophique. Enfin, l'ovocyte atteint sa morphologie finale, le chorion et les structures polarisées sont formées, c'est la phase post-trophique (stade V). Si un gite larvaire adéquat pour la ponte est à proximité, cette dernière phase ne dure que quelques heures sinon les femelles sont capables de retenir la ponte plus de 15 jours. La fécondation des ovocytes a lieu au cours de la ponte (par l'entrée de spermatozoïdes contenus dans la spermathèque au niveau du micropyle) levant le blocage en première division de méiose de l'ovocyte (*in* Clements, 1999).

3. Repas sanguin et induction de la vitellogénèse

Au cours du mécanisme reproducteur, la production et l'accumulation de protéines de réserve sont des points cruciaux pour assurer la maturation des œufs. Elles sont régies chez les insectes par la voie TOR (Target of Rapamycin). Les moustiques prennent leur repas sanguin pour obtenir les apports nécessaires pour terminer leur vitellogénèse et initier le début de leur second cycle gonotrophique. Comme chez la plupart des insectes, la production de protéines du vitellus des moustiques a lieu exclusivement dans les cellules du corps gras situé à la surface interne de la cuticule. Ces précurseurs protéiques Yolk (YPP) sont composés majoritairement de vitellogénines qui sont incorporées par les ovocytes et stockées sous forme de vitelline ; mais aussi de carboxypeptidases vitellines, et de protéases s'apparentant aux cathepsines B qui clivent les constituants du vitellus pendant l'embryogenèse et également de lipophorines (protéine de transport de lipides).

Chez *Drosophila melanogaster* cette voie de signalisation est contrôlée à la fois par la voie insuline (Lizcano *et al.*, 2003; Miron *et al.*, 2003) et par la concentration d'acide aminés (Zhang *et al.*, 2000). Chez les moustiques, l'espèce la plus documentée est *Aedes aegypti* notamment grâce

aux travaux successifs de l'équipe d'A. Raïkhel, qui montre l'activation de cette voie par la 20-hydroxyecdysone, les acides aminés et la voie insuline (*in* Clements, 1992; in Raïkhel *et al.*, 2005; Swevers *et al.*, 2005). Sous l'action de l'hormone juvénile (JH) les cellules du corps gras deviennent polyploïdes et augmentent leurs capacités de transcription. L'ingestion de sang déclenche la sécrétion de différents facteurs neuroendocrines comme l'hormone ecdysteroïdogénique ovarienne ou les peptides insuline-like. Les acides aminés libres présents intrinsèquement dans le bolus sanguin ou libérés par l'action d'enzymes digestives sont directement utilisés pour la production de protéines de réserve. Ils activent aussi la synthèse de la vitellogénèse *via* l'activation de la S6-kinase dépendante de la voie TOR (Hansen *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005).

La nutrition, la photopériode, la température, l'âge, l'accouplement… sont différents facteurs qui peuvent moduler à la fois la vitesse et la densité de formation et de maturation des follicules ovariens des moustiques. Dans la nature, *A. gambiae* et *A. aegypti* nécessitent fréquemment un deuxième repas sanguin pour réaliser leurs cycles gonotrophiques (Scott *et al.*, 2012). D'autre part, le nombre d'œufs matures à l'issue d'un cycle gonotrophique est proportionnel au volume de sang ingéré, la taille des femelles est de ce fait un facteur non négligeable. A l'inverse de *Culex pipiens* (diapause suivant la photopériode), *A. gambiae* a un cycle gonotrophique s'étalant de 2 à 3 jours, quelle que soit la période de l'année (*in* Clements, p347, 1992).

E. Les interactions entre *Plasmodium* et *Anophèles*

Les interactions entre les plasmodies et leur hôte vertébré perdurent depuis si longtemps que les préceptes Darwinien semblent être observables sur l'espèce humaine (Cf. Introduction § I.B.). D'un autre coté, dans la nature, la majorité des anophèles offrent un environnement largement inhospitalier pour les plasmodies (Sinden *et al.*, 2004). La résistance à l'infection des anophèles peut être modulée entre autre par les interactions génotypes-génotypes entres les sous espèces des moustiques et des plasmodies (Lambrechts *et al.*, 2005).

Une grande proportion des moustiques *A. gambiae* présents dans la nature sont résistants à l'infection de *P. falciparum*, et cette résistance naturelle est génétiquement contrôlée (Riehle *et al.*, 2006, Science ; Niaré *et al.*, 2002). *A. gambiae* possède un système immunitaire raffiné, avec entre autres deux voies de signalisations distinctes mises en place selon la classe de pathogènes rencontrée. Les bactéries Gram – et *P. falciparum* sont reconnue par la voie Imd et ; les champignons, bactéries Gram + et les plasmodies de rongeurs *P. yoelii* et *P. bergheï* sont eux pris en charge par la voie Toll (Mitri *et al.*, 2009 ; Mitri *et al.*, 2012).

Par ailleurs, le système comprenant l'interaction entre le parasite *Plasmodium* et son vecteur/hôte *Anopheles* est drastiquement modulé par les conditions environnementales : température, microbiotome…(Wolinska *et al.*, 2009). Les données sur la transmission résultantes de ce(s) interaction(s) ne peuvent être considérées qu'à une échelle locale où les facteurs climatiques, écologiques, démographiques et socio-économiques doivent être prises en compte ainsi que l'accès et les répercutions des méthodes de contrôles qui doivent s'adapter en conséquence (Thomas *et al.*, 2012).

IV. Contexte et objectif du travail de thèse

L'expression des enzymes digestives du moustique est régulée par l'ingestion d'un repas de sang. Les travaux précédents de l'équipe dans laquelle j'effectue ma thèse ont permis de mettre en évidence que la présence de *P. falciparum* chez *A. gambiae*, induit l'expression de deux gènes codant des carboxypeptidases digestives de la famille B : CPBAg1 et CPBAg2 et modifie l'activité carboxypeptidase totale (Lavazec *et al.*, 2005). CPBAg1 a été caractérisée et des anticorps dirigés contre cette molécule bloquent le développement de *P. falciparum* chez *A. gambiae* (Lavazec *et al.*, 2007).

D'autre part, il existe vraisemblablement une compétition métabolique entre le moustique et le parasite pour les ressources en arginine libérées par l'activité des CPBAg du moustique. L'arginine est non seulement nécessaire au développement parasitaire mais active chez le moustique la voie TOR, indispensable à la réalisation de la vitellogénèse et à la maturation des œufs. L'ingestion d'anticorps anti-CPBAg1 par le moustique réduit sa capacité à produire des œufs (Lavazec *et al.*, 2007).

Cependant, les effets des anticorps anti CPBAg1 sur le parasite et sur la production des œufs pourraient également être dûs à la reconnaissance aspécifique de CPBAg2 par ces anticorps. Il est donc indispensable de discriminer les deux CPB pour connaître leur contribution respective dans ces phénotypes.

Mon projet de thèse vise donc à établir le rôle respectif des deux CPBAg dans les interactions hôte-parasite du système *A. gambiae* et *P. falciparum* et dans la physiologie du moustique dans l'espoir de valider leur utilisation pour développer de nouvelles méthodes de contrôle de la transmission de l'agent éthiologique qui engendre le paludisme.

Pour cela, j'ai caractérisé in vitro les propriétés biochimiques de chacune des deux CPBAg et étudié leur profil d'expression lors de la digestion d'un repas sanguin. Enfin, j'ai analysé leur fonction respective *in vivo* en les inactivant soit par injection d'ARN doubles brins provoquant l'inactivation génique des *cpbAg* soit par l'ajout d'anticorps spécifiques au repas sanguin qui diminuera leurs activités biochimiques respectives.

Matériels et Méthodes

I. Production des protéines recombinantes

Pour mener à bien l'ensemble du projet, et étudier d'éventuelle similitude et différence entre les deux carboxypeptidases B d'*A. gambiae* : CPBAg1 et CPBAg2 exprimées au niveau du tube digestif ; les formes recombinantes de deux protéines ainsi que des anticorps dirigés contre chacune d'elles sont nécessaires pour combler entre autres les besoins de leurs caractérisations biochimiques.

A mon arrivée au laboratoire, la forme recombinante de CPBAg1 était disponible en quantité suffisante pour couvrir les besoins de l'ensemble de la thèse. Elle avait été produit au cours de la thèse de C. Lavazec en utilisant le système baculovirus - cellules d'insectes pour obtenir une protéine recombinante fonctionnelle de CPBAg1. Au cours de cette même période, cette protéine a également servi pour la production d'anticorps anti-CPBAg1 dans le modèle lapin. En ce qui concerne CPBAg2, aucune forme recombinante ni anticorps n'était disponible.

A. La production de CPBAg2r

1. Baculovirus

Un premier lot de protéines CPBAg2r a été produit en système d'insecte - baculovirus par la plate-forme 5 : Production des Protéines Recombinantes et d'Anticorps de l'Institut Pasteur, grâce au gène cloné par B. Boisson. De même que la protéine recombinante CPBAg1, produite en baculovirus, CPBAg2r possède une extension de 6 résidus Histidine, en position C-terminale. Le lot protéique fourni contenait en plus de notre protéine d'intérêt deux formes protéiques de plus faible masse moléculaire nécessitant une étape supplémentaire de purification. En vue d'effectuer

un tamis moléculaire, l'échantillon nécessite d'être concentré pour optimiser la résolution de l'élution. Après dialyse contre du PBS, l'échantillon protéique est lyophilisé à -80°C sous vide permettant de concentrer l'échantillon sans le dénaturer ni altérer son activité enzymatique. L'intégrité de la protéine après ces différents traitements est vérifiée par électrophorèse sur gel dénaturant coloré au bleu de coomassie. La remise en suspension de la protéine dans un volume 10 fois moindre à celui dans laquelle était la protéine avant la lyophilisation a permis de concentrer d'autant la protéine. Cette procédure a également concentré les sels contenus dans le tampon qui doivent être éliminé avant la chromatographie d'exclusion. L'échantillon a été dessalé par son passage sur des mini-colonnes (PIERCE #89882 et #89891), selon le protocole recommandé par le fabricant menant à l'échange des sels de l'échantillon contre du PBS. L'échantillon est collecté par centrifugation (2 min, 1500 g), puis injecté à trois reprises (par passage d'un maximum de 42 µl contenant 2 mg de protéine doit être respecté) sur la colonne chromatographique d'exclusion par la taille (ou gel filtration) Superdex 75 PC3 (Amersham Biosciences) équilibré dans du PBS. Tous les tampons utilisés sont filtrés à 0,2 µm puis dégazés pour ne pas endommager la résine de la colonne.

Après passage sur colonne, la composition des fractions protéiques constituant les pics d'absorbances majeurs est analysée par électrophorèse sur gel SDS coloré au bleu de coomassie, alors que celles provenant des pics mineurs sont analysées de la même façon mais après séchage complet au Speed-Vac (Savant) pour les concentrer. De façon surprenante, les trois pics majeurs observés contiennent non exclusivement la protéine d'intérêt. En effet, les deux premiers pics contiennent toujours les protéines contaminantes de faible masse moléculaire apparente. Ces résultats montrent qu'en condition native, les deux contaminants protéiques s'associent très fortement à CPBAg2r et que celle-ci peut adopter trois conformations différentes dont deux se

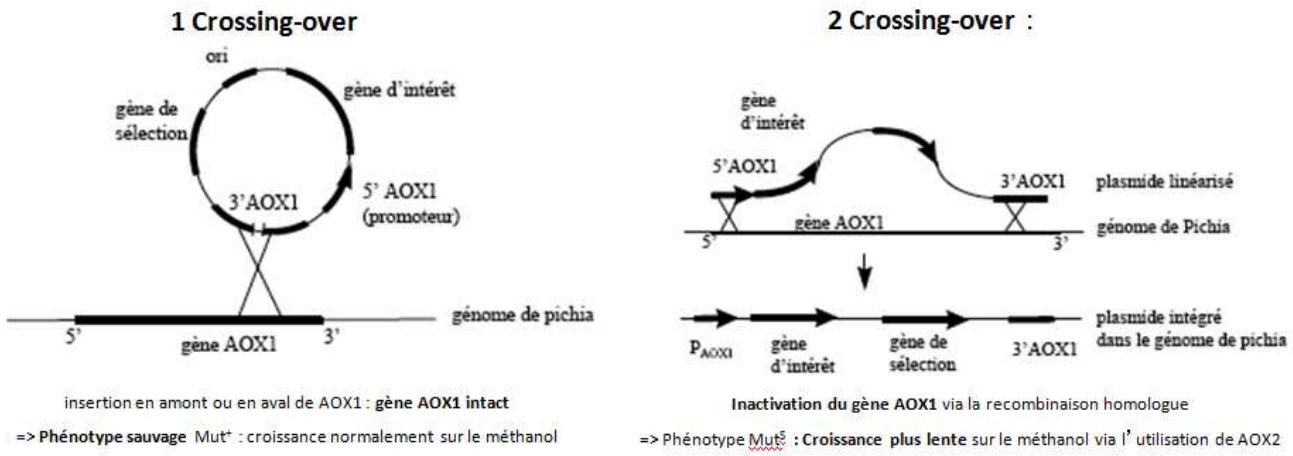


Figure M.1 : Schéma des recombinaisons homologues entre le vecteur d'expression de CPBAg2 (pPICZαA) et le génome de *P. pastoris*

lient à ces protéines contaminantes. La purification de la protéine CPBAg2r a été efficace lors du troisième pic d'élution qui ne contient que la protéine d'intérêt, migrant à 50 kDa. Cependant, la procédure expérimentale de purification utilisée a engendré de lourde perte (98,5%), passant de 2,4 mg à 110 µg de protéine « pure » selon notre méthode de détection.

Ce lot protéique a permis, grâce à son utilisation comme antigène, de réaliser des anticorps chez la souris (Cf. Matériels et Méthodes § II.A.). Cependant, les rendements observés ont conduit à changer le système d'expression de CPBAg2r, pour son expression chez *Pichia pastoris*.

2. Expression dans *Pichia pastoris*

a. Construction du vecteur d'expression

La séquence codant pour la pro-enzyme de CPBAg2 a été extraite du plasmide PVL-CPBAg2 clone 4 de B. Boisson pour être intégrée dans le vecteur pPICZαA (Invitrogen ref. #V190-20) de manière à être exprimée chez *Pichia pastoris* (*Pp*) souche SMD1168 : auxotrophe pour l'histidine et déficiente en protéase A (*pep4*Δ, *his4*), (Cregg *et al*., 2000).

Les inserts ont été extraits du clone PVL-CPBAg2 en encadrant la séquence codant pour la pro-enzyme (proCPBAg2) par les sites de clivages enzymatiques de *Xho1 et de Xba1* respectivement en 5' et 3' des amplicons. Leur ligature est effectuée entre des séquences homologues du gène AOX1 (alcool oxydase 1) de *Pp* dans le vecteur pPICZαA (au ratio 3 inserts pour un vecteur) préalablement digéré séquentiellement. Par recombinaison homologue entre le vecteur d'expression et le génome de *Pp* (figure M.1) grâce à l'homologie du gène AOX1 présent de part et d'autre, *cpbag2* doit s'intégrer dans le génome de *Pichia*. La ligation de la séquence de *cpbAg2* dans pPICZαA est réalisée de façon à obtenir en fusion traductionnelle, le facteur α de

Saccharomyces cerevisiae côté amino terminal qui engendrera le signal de sécrétion de la protéine dans le surnageant de culture et deux étiquettes : C-Myc et poly-histidine (6H) côté carboxy terminal facilitant la purification et la reconnaissance par Western Blot.

Le produit de ligation a été amplifié via la transformation par choc thermique de cellules chimiocompétentes commerciales d'*Escherichia coli* XL1 Blue Subcloning-Grade (Stratagene ref. #200130) (à raison de 1 ng de vecteur pour 50 µl de cellule). L'unique modification du protocole recommandé par le fournisseur est l'utilisation de milieu bactérien 2YT (Trypticase Yeast) supplémentée à hauteur de 0,4% final par du glucose à la place du SOC recommandé. La sélection des clones bactériens transformés est basée sur le gène codant pour la résistance à la zéocine portée par le vecteur. L'isolement des clones bactériens contenant le plasmide a été réalisé par l'étalement de 50 ou 100 µl de la solution de transformation sur boite de Pétri LB (Luria Bertani) additionné de Zéocine (Invitrogen ref. #R-25001) à raison de 25 µg/ml final. Après vérification par PCR, une douzaine de clones bactériens transformés ont été identifiés conduisant à la sélection d'un seul clone contenant la construction d'intérêt. Après sélection, le plasmide est purifié en utilisant le protocole recommandé par le kit Qiagen (#27104). Après vérification de la séquence du clone, il est linéarisé par digestion enzymatique avec *Sce1* afin de faciliter sa recombinaison chez *P. pastoris.*

b. Electroporation de *P. pastoris*

Le vecteur d'expression est électroporé chez *P. pastoris*, cette technique fait subir à la cellule une brève impulsion électrique qui induit une différence de potentiel membranaire engendrant l'ouverture temporaire des pores membranaires laissant pénétrer l'ADN à l'intérieur des cellules.

Pour ce faire, une culture en phase exponentielle de croissance de *P. pastoris* à la DO_{280nm} = 1,5, a été lavée quatre fois (centrifugation 1500 g pendant 5 minutes et 4°C) dont les deux premier lavages sont effectués dans de l'eau stérile glacée et les deux suivants dans du sorbitol 1M glacé. Un mélange de 80 µl de cellules ainsi préparées est mis en contact 5 minutes avec 5 µg de vecteur linéarisé dans les cuves d'électroporation préalablement refroidies. Les paramètres utilisés pour électroporer les cellules sont les suivants : capacitance : 25 µF, résistance : 400 ohms, voltages : 1,5 kV et une constante de temps de 8 msec. Juste après l'électroporation, 1 mL de sorbitol 1M glacé est ajouté dans les cuves avant que les levures transformées soient étalées sur boite additionnée de Zéocine (Invitrogen #450430). Après transformation, l'isolement des clones est réalisé par la sélection des levures ayant intégré la séquence de *cpbAg2*. La présence d'épisome (plasmide non intégré dans le génome) par analyse PCR n'a pu être exclue. L'identification des transformants s'est effectuée sur le rendement de production de la protéine CPBAg2r fonctionnelle qu'ils offrent.

c. Milieux d'expression

Plusieurs optimisations ont été réalisées pour augmenter le rendement de production, notamment sur le milieu de culture utilisé. Classiquement, les milieux utilisés pour la croissance de *P. pastoris* sont MGY (Minimal Glycérol Yeast medium) pour l'obtention de la biomasse précédant l'induction au méthanol en milieu MM (Minimal Methanol). Le milieu MGY est composé de 1,34% YNB (Yeast Nitrogen Base avec sulfate d'ammonium mais sans acide aminé, Difco #233520), de 1% de glycérol (Sigma #15523), de 4.10^{-5}% de biotine et de 4.10^{-3}% d'histidine (Sigma #53319). Le milieu MM est composé de 1,34% YNB, de 4.10^{-5}% de biotine, de 0,5% de méthanol (Sigma #32213) et de 4.10^{-3}% d'histidine. L'optimisation de la production de CPBAg2r a conduit à enrichir les milieux de culture pour utiliser du BMGY (Buffered Glycerol Complex Medium) pour la croissance de biomasse suivi par du BMMY (Buffered Methanol Complex Medium) pour l'induction. Ils se composent de 1% d'extrait de levure (Fluka #70161), de 2% de peptone, de 100 mM phosphate de potassium pH 6 (Sigma #P5655), de 1,34% YNB new (Yeast Nitrogen Base w/o sulfate d'ammonium w/o acide aminé, Sigma #Y0626 additionné de sulfate d'ammonium, Sigma #A4418), de 4.10^{-5}% de biotine et de 1% de glycérol pour le BMGY ou de 0,5% de méthanol pour le BMMY.

Les procédures d'optimisation de la production et purification de CPBAg2r produite chez *Pichia pastoris* sont décrites dans le chapitre I.

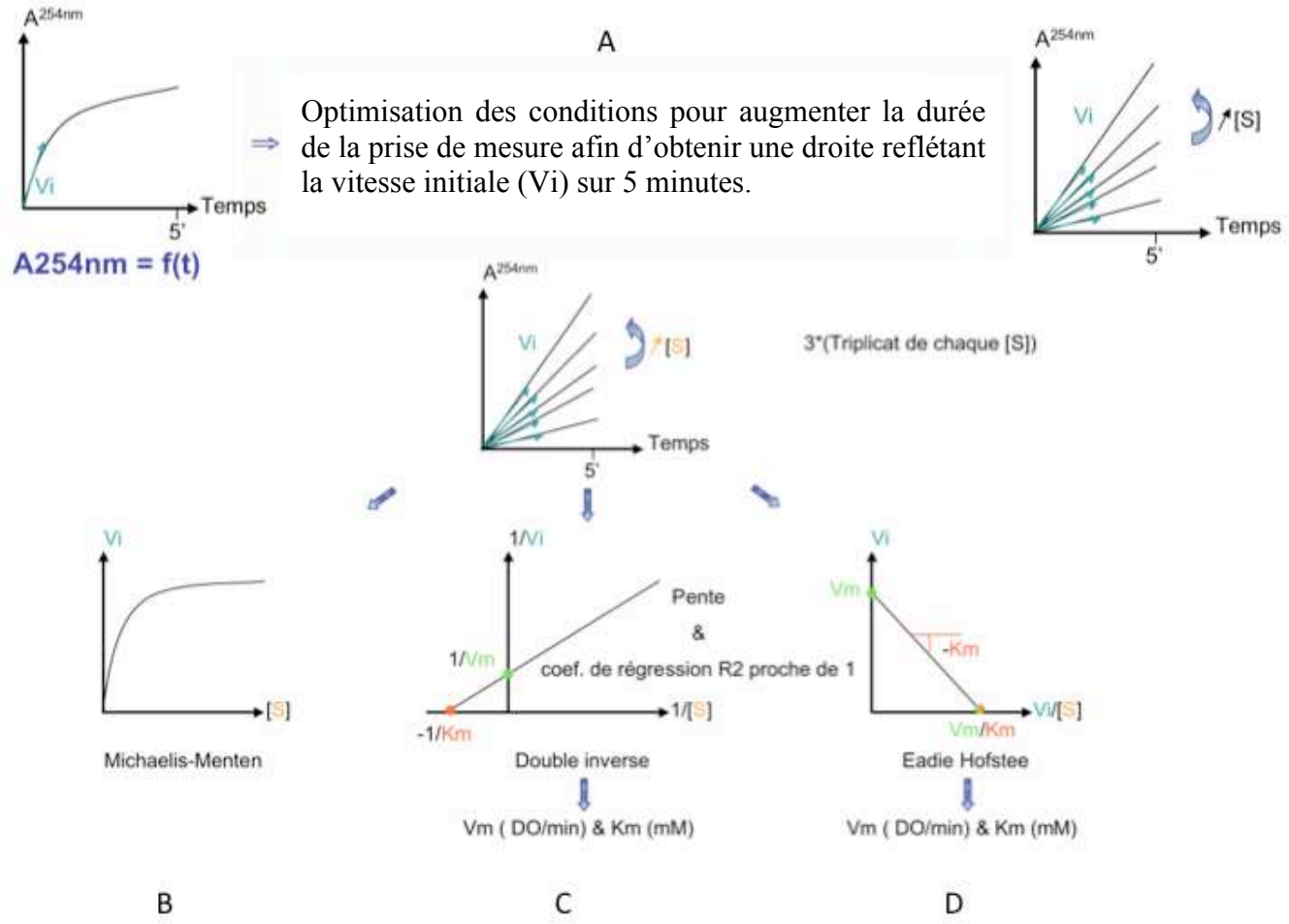


Figure M.2 : Représentation schématique du traitement des données du dosage enzymatique de l'activité des CPBAg

[A] : Optimisation des conditions de la mesure
[B] : Représentation de Michaelis et Menten
[C] : Représentation double inverse
[D] : Eadie Hofstee.

B. Activités enzymatiques

1. Mesure d'activité

Le dosage des activités enzymatiques de CPBAg1 et CPBAg2 est basé sur leur capacité à cliver les résidus basiques en position carboxy-terminale. Pour cela, on utilise deux substrats synthétiques : l'hippuryl-arginine (Hip-Arg) (Sigma #H-2508) et l'hippuryl-lysine (Sigma #H6750) qui après action des CPBAg engendrent de l'arginine ou de la lysine et de l'acide hippurique. C'est l'absorbance de ce dernier à 254 nm qui permet de visualiser l'avancement de la réaction. Les échantillons sont placés dans une cuve en quartz (type 105.201-QS,10mm, Hellma) à travers laquelle l'absorbance est mesurée pendant 5 minutes à 25°C à l'aide d'un spectrophotomètre DU800. Les essais sont réalisés dans un volume réactionnel de 120 µl dans du tampon de cinétique composé de Tris-HCl 25 mM associé à 100 mM de NaCl à pH 7,6, proche du pH physiologique des tubes digestifs d'*Anopheles*. Pour caractériser les paramètres enzymatiques des CPBAg, leurs quantités sont fixes et celle des substrats varie de 0,075 mM, 0,15 mM, 0,3 mM, 0,45 mM; 0,6 mM; 0,75 mM à 0,90 mM. La procédure expérimentale est optimisée afin d'obtenir une droite pendant 5 min lors de la mesure de la densité optique où la pente reflète la vitesse initiale (V_i) de la réaction enzymatique (figure M.2 A).

La vitesse initiale (V_i) utilisée pour le traitement des données à savoir la réalisation des doubles inverses : $\frac{1}{V_i} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ et des Eadie Hofstee : $V_i = f\left(\frac{V_i}{[S]}\right)$ (figures M.2 C et D) correspondant à la moyenne de 3 pentes obtenues sur 5 minutes pour chaque concentration de substrat testé.

L'activité enzymatique est définie en unité internationale, UA, correspondant à 1 µmol d'acide aminé libérée par minute, et les résultats seront donnés en activité spécifique (AS), en UI/mg d'enzyme ou en pourcentage d'activité résiduelle.

1. Cinétique d'activation

L'activation des enzymes CPBAg1 et CPBAg2 est réalisée par clivage du propeptide sous l'action de la Trypsine (Promega #V5111) et/ou de la Chymotrypsine (Sigma #C3142) respectivement à 37°C et à 30°C. L'incubation se fait aux ratios 1/20 ou 1/50 dans le tampon de cinétique (Cf. ci-dessus). Pour interrompre la digestion plusieurs procédés ont été comparés : le refroidissement brutal, sur glace ; doux, à température ambiante ou par dilution au cinquième des extraits dans du tampon Borate de Sodium 0,1 mM pH 7,6 glacé pour interrompre encore plus rapidement la digestion (Bown *et al.*, 2004). Ces tests ne révélant pas de différences entre les traitements, le refroidissement sur glace, plus pratique, a été utilisé. Des extraits prélevés en cinétique pendant l'incubation ont permis de montrer qu'une activation d'une heure et demie de traitement protéolytique était adéquate pour l'obtention de l'activité maximale quelque soit le traitement activateur et les CPBAg à activer.

L'activité enzymatique est mesurée à 25°C comme ci-dessus puis les échantillons sont récupérés afin d'analyser les masses moléculaires apparentes des produits d'activation, sur gel. Pour cela, les protéines sont précipitées au TCA (acide trichloroacétique) en ajoutant un équivolume de TCA 20% à l'échantillon protéique ([TCA] final 10%) ; le mélange est incubé 10 minutes sur glace puis centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 14 000 rpm ; le surnageant est retiré et le culot est lavé avec 300 µl d'Acétone 10 M froid. Après centrifugation à 14 000 rpm pendant

5 minutes à 4°C et élimination du surnageant, le culot est resuspendu directement dans le tampon de dépôt adéquat pour l'analyse sur gel. Avant chaque mesure d'activité enzymatique, l'activation enzymatique des CPBAg est vérifiée sur gel dénaturant coloré au bleu de coomassie ou par Western blot dans le but d'économiser la protéine.

2. Cinétique d'inhibition thermique

Pour différencier l'activité de chaque CPBAg sur des extraits *in vivo* leurs sensibilités à la chaleur ont été déterminées, cet outil pouvant servir à les discriminer. Après activation des CPBAg par la trypsine, les enzymes sont placées sur glace 15 minutes pour arrêter l'activation, puis elles sont incubées à différentes températures. Les deux CPBAg sont incubées respectivement à 45°C pendant 2 minutes, 4 minutes, 6 minutes, 8 minutes, 10 minutes, 15 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 heure et 2 heures. Pour caractériser plus finement la sensibilité à la chaleur de CPBAg1 cette même expérience est réitérée à 37°C, 40°C et 50°C. L'incubation est arrêtée en ajoutant un volume réactionnel équivalent à l'échantillon protéine de tampon de cinétique glacé. Afin de déterminer si l'état d'équilibre d'inactivation est modifié par ce refroidissement brutal, une autre série de tubes est mise à refroidir doucement à température ambiante permettant une heure de renaturation douce. Cette variation de protocole, n'influençant pas l'activité des CPBAg, le refroidissement brutal est conservé avant la mesure d'activité enzymatique des CPBAg à 25°C.

II. Les Immunisations

A. Chez la souris

Pour différencier les deux protéines sur gel, des anticorps dirigés contre chacune des deux protéines sont nécessaires. Disposant d'anticorps anti-CPBAg1 produit chez le lapin, la production d'anticorps dirigés contre la forme recombinante CPBAg2 a été réalisée chez la souris. Pour ce faire, des souris Balb/c, âgées de 3 à 4 semaines, ont été immunisées avec la protéine.

Pour chacune des manipulations, les souris sont anesthésiées avec 80 à 100 µl de « fait dodo » : solution de PBS 1X contenant 25% d'Imalgène 1000 (MERIAL) qui est de la kétamine anesthésiante ; 12,5% de Rompum et 2% de Xylazine (BAYER) : sédatif, analgésique, anesthésique et myorelaxant. Avant immunisation un prélèvement de sérum contrôle pré-immun (J0) est réalisé. Les injections d'antigène (CPBAg2r) sont réalisées au niveau des ganglions à la base de la queue des souris utilisées. D'autres souris servent de témoin, où la protéine CPBAg2 est remplacée par du PBS afin de mimer le stress dû à l'injection. Des prélèvements de sang sont réalisés pour analyser l'affinité et la spécificité des sérums en cours de production. Ils sont effectués en traversant le cartilage des sinus rétro-orbitaux en passant au coin des orbites des yeux des souris en utilisant une pipette pasteur. On récupère ainsi environ 100 µl de sang (équivalent à ≈ 50µl sérum) montant dans la pipette par capillarité. Les prélèvements s'effectuent sans héparine et sont laissés une heure à température ambiante puis conservés une nuit à 4°C. Après centrifugation (360 g, 15 min), le sérum correspondant à la phase supérieure est prélevé puis stocké à –20°C. Le sacrifice des souris est effectué par ponction cardiaque après ouverture du thorax par aspiration à l'aiguille d'un maximum de sang (≈ 1 ml) au niveau du ventricule gauche.

Après le même traitement que pour les prélèvements sanguin à l'œil, le volume de sérum récupéré par souris est de ≈ 450 µl.

Deux types de sérum ont été produits, le premier servant à discriminer les CPBAg sur gel alors que le second est utilisé pour déterminer la stabilité des propriétés bloquantes des anticorps.

Les premiers sérums sont réalisés par une série de 4 injections de la protéine recombinante purifiée produite en baculovirus, afin d'augmenter l'affinité des sérums. La première injection à J1 contenait 10 µg de protéine équivalent à 50 µl de protéine CPBAg2r additionné de 50 µl de l'adjuvant de Freund complet (CFA, Sigma #F4258) afin de stimuler la réponse immunitaire. L'émulsion entre la protéine et/ou le PBS avec le Freund est réalisée juste avant injection pour éviter que la viscosité de la solution ne bloque l'aiguille de la seringue d'injection. Les trois rappels à 22, 37 et 57 jours après le début du protocole d'immunisation contenaient 5 µg de protéine antigénique équivalent à 25 µl de protéine CPBAg2 additionnés de 25 µl de PBS 1X puis complétés à 100 µl avec 50 µl de l'adjuvant Freund incomplet (IFA, Sigma #F5506). Les souris sont ensuite prélevées à J35, entre les deux premiers rappels ; à J51 entre le deuxième et le troisième et un dernier à J72 juste avant le sacrifice des souris effectué 77 jours après le début de ce protocole d'immunisation.

Le second type de sérums produits déterminera si une injection suffit pour engendrer une protection contre l'infection parasitaire lorsqu'il est ajouté au repas sanguin infectant, et si oui, combien de temps cette protection persiste. Pour ce faire, une seule injection de 25 µg d'antigène CPBAg1 (produite en système baculovirus - cellules d'insectes), ou d'antigène CPBAg2 (produite

chez *P. pastoris*) ou des deux en combiné complémentées par du CFA au même ratio volumique ont été réalisés.

Des prélèvements sanguins étaient prévus à 21, 45, 90, 135 et 180 jours après la première injection. Cependant les résultats de titration des sérums prélevés 21 jours après le début du protocole, moment ou les IgG non spécifiques diminuent, augmentant le ratio des IgG spécifiques ont montrés de faibles niveaux de reconnaissance et une variabilité de la réponse. Cette démarche expérimentale n'a pas été poursuivie, le système se révélant inadapté pour répondre à la problématique.

B. Chez le lapin

La majeure partie de la protéine recombinante CPBAg2r produite chez *P. pastoris* a été utilisée pour obtenir différents sérums d'anticorps polyclonaux chez le lapin. La production et la purification de deux lots de sérums a été réalisé par la compagnie BioGene en utilisant une quantité final de 1,47 mg de protéine CPBAg2r comme antigène, injectée à trois reprises avec 15 jours d'intervalle entre chaque.

C. ELISA

En vue de titrer l'affinité des sérums mais aussi pour s'assurer de leurs spécificités pour l'analyse fonctionnelle, des ELISA sont réalisés sur les différents sérums produits chez le lapin.

Les protéines recombinantes sont immobilisées sur des plaques 96 puits (NUNC #439454) la nuit à 4°C a raison de 100 ng par puits, la dilution des protéines s'effectue dans du PBS 1X (Gibco #14190) pour obtenir un volume de 100 µl. Les puits sont ensuite saturés par 200 µl de PBS-lait 5% 1 heure à température ambiante. Puis, les différents sérums, dilués dans du PBS, Tween 0,05% et lait écrémé 2,5%, sont incubés dans chacun des puits 1 heure à température ambiante. Les dilutions réalisées sont sérielles de deux en deux, partant de la dilution 1/500ème jusqu'à la dilution 1/512000ème.Trois lavages au PBS Tween 0,1% sont ensuite réalisés grâce au washer PW41 (Biorad) avant incubation des anticorps secondaires anti-lapin (Promega #W401B) dilués au 1/3000ème dans du PBS Tween 0,1%, 1 heure à température ambiante. Font suite trois lavages comme précédemment avant la révélation, réalisés en utilisant le kit KPL (Kirkegaard et Perry Laboratory #507600) *via* un équivolume des solutions de TMB peroxydase substrate (#507610) et peroxydase substrate solution B (#506510) laissés 5 minutes à température ambiante avant que l'ajout d'acide phosphorique 1M n'arrête la réaction enzymatique. Les absorbances des sérums préimmuns sur les protéines sont soustraites à celles des sérums immuns.

En contrôle, les absorbances du PBS ±Tween ± lait sur des puits où la protéine est immobilisée ou non ainsi que celles des sérums immuns et préimmuns sur les puits sans protéine et celles engendrées uniquement par l'immobilisation des protéines sont observées pour chacune des plaques afin de s'affranchir des reconnaissances non spécifiques lors de la titration.

III. Le matériel biologique : les moustiques

Les expériences sont réalisées sur l'espèce *Anopheles gambiae,* souche Yaoundé (Tchuinkam *et al.*, 1993), collectée à Yaoundé au Cameroun. Les moustiques sont élevés à la plateforme CEPIA, dans un insectarium maintenu à 26°C avec un taux d'humidité relative de 80% et un cycle nycthéméral de 12 heures (alternance de lumière et d'obscurité toutes les 12 heures).

A. Gorgement et dissections (TD, ovaires, spermathèques)

Deux jours après leur émergence, les moustiques sont prélevés de l'élevage de masse et placés, à raison de 80 par pots, dans des pots de gorgement. Ils sont alors nourris d'eau sucrée, puis placés à jeun la veille du gorgement. Des femelles âgées de 5 jours sont mises en contact avec du sang qui se compose de globules rouges de sérotype et rhésus AB^+ complété au ratio 1/1 par du sérum O^+. Des gorgeurs en verre munis d'une membrane artificielle de parafilm étiré dans lequel est déposé le sang sont placés sur les pots de moustiques. Après 15 minutes, les femelles gorgées sont placées dans un incubateur ayant les mêmes caractéristiques que l'insectarium. Les femelles non gorgées ou partiellement gorgées sont écartées de l'expérience. Des moustiques non gorgés utilisés comme contrôle sont maintenus à jeun en parallèle.

A l'issue du gorgement, les moustiques sont disséqués en cinétique à différents temps selon les différentes expérimentations (15 minutes, 3 heures, 6 heures, 9 heures, 12 heures, 15 heures, 18 heures, 21 heures, 24 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures après le gorgement). Les moustiques sont préalablement endormis sur glace avant d'être placés sous une loupe pour être disséqués dans une goutte de PBS préalablement refroidie à 4°C. La dissection des tubes

digestifs (ou mésentérons) s'effectue en étirant la cuticule au niveau du septième segment de l'abdomen tout en maintenant le thorax. La cuticule rigide où exosquelette ainsi déchirée libère l'intestin associé aux tubes de Malpighi. Ces derniers sont disjoints et les tubes digestifs sont recueillis dans des tubes Eppendorf préalablement refroidis sur carboglace et conservés à -80°C avant l'extraction de la totalité des ARNm ou des protéines. D'autres tissus sont également conservés lors de ces dissections ; comme les carcasses qui incluent tout le corps du moustique sauf le tube digestif et, les abdomens qui incluent tout le corps sauf la tête et la moitié du thorax. Pour la dissection des ovaires, ceux ci sont prélevés en étirant de la même façon la cuticule mais en la maintenant encore plus à l'extrémité postérieure des moustiques ; ils sont placés dans du PBS glacé le temps de l'observation. Les spermathèques sont également prélevées des moustiques pour être observées entre lame et lamelle au microscope. La présence de spermatozoïdes à l'intérieur validera la fécondation de la femelle, requise pour inclure les moustiques dans les expériences sur la capacité reproductive des moustiques.

B. Les extractions

1. Des protéines

L'extraction des protéines se fait sur glace dans un tampon Tris HCl 25mM PH 7,8 à l'aide d'un piston en polypropylène vibrant dans un tube Eppendorf. Après centrifugation (15 min, 20 000 g, à 4°C), la fraction soluble excluant les débris cellulaires est récupérée et conservée à -20°C jusqu'à analyse.

2. De l'ADN génomique

Le principe d'extraction de l'ADN génomique est basé sur l'utilisation de Guanidine Thiocyanate. Dix moustiques sont transférés dans un tube contenant du DNAzol (Invitrogen #10503-027), puis broyés à l'aide d'un piston. Après deux centrifugations (10 min, 10400 rpm) et ajout d'éthanol, le surnageant est éliminé par décantation. Le culot est ensuite rincé à l'éthanol 75%, puis séché et repris dans de l'eau. Pour vérifier la qualité de l'ADN génomique, une PCR contrôle utilisant des amorces qui encadrent un intron du gène S7 est réalisé (ADN génomique 609 pb et ARN 460 pb). L'ADN génomique servira entre autre de contrôle positif pour la révélation par PCR de produits issus des transcriptions inverses.

3. Des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits par broyage des tissus dans du TriReagent (MRC) sur glace. Après incubation de 9 minutes à température ambiante, l'ajout de Bromo-chloro-propane (BCP) (Sigma #B9673), engendre après agitation la séparation de l'ADN, de l'ARN et des protéines. Après incubation à température ambiante (15 minutes) puis centrifugation, la phase supérieure est transférée dans un nouveau tube pour y ajouter de l'isopropanol (VWR #20839.297) qui précipitera l'ARN. Après 15 minutes d'incubation et centrifugation (15 min, 14000 g), le culot est lavé à l'éthanol 75% (ethanol absolute Merck #1.00983.1011 dilué dans de l'eau DEPC, Ambion #AM9906) puis séché. Pour éliminer le restant d'ADN des échantillons, ils sont traités à la DNase (Ambionturbo DNA-free #AM1907), avant d'être mis dans de l'eau DEPC traitée pour être dépourvue de RNases et RNAsin (Promega #N2515). Les ARN totaux ainsi extraits sont dosés au

nanodrop ou le ratio 260 nm / 280 nm révèle une contamination protéique et celui à 260 nm / 230 nm indique une contamination du solvant ici le phénol présent dans le BCP. Pour s'assurer qu'il ne reste pas d'ADN dans les échantillons, une PCR contrôle utilisant des amorces qui encadrent un intron du gène S7 est réalisé.

Les ARN totaux serviront de matrice dans les RT-(q)PCR pour l'analyse de l'expression des différents gènes et vérifier l'efficacité de leur inactivation dans les expériences de RNAi.

IV. Les procédures d'analyses

A. Analyse in silico

1. Alignement des séquences sur la structure secondaire de la carboxypeptidase B d'*Heliothis zea*

L'alignement de séquence superposé à la structure secondaire d'un homologue des CPBAg fut obtenu grâce au serveur ESPRIPT. Pour cela les séquences (les séquences proviennent de la base de données du NCBI : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) des deux CPBAg ont été alignées avec les carboxypeptidases B : d'*Heliothis zea*, de porc et avec la carboxypeptidase A2 humaine grâce au serveur clustalw (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). La sortie de l'alignement multiple et la structure de la carboxypeptidase B d'*Heliothis zea* ont alors servi de matrice pour le serveur ESPRIPT (http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/). Ce serveur superpose les résidus de l'alignement de la carboxypeptidase B d'*Heliothis zea* sur sa structure secondaire déterminée par son fichier pdb (ce fichier contient notamment l'information pour identifier les structures secondaires dans la séquence).

2. Superposition des séquences sur la structure 3D de la Carboxypeptidase A2 humaine

L'alignement de séquence superposé à la structure 3D d'un homologue des CPBAg a été réalisé afin d'obtenir une idée de l'homologie entre les carboxypeptidases au niveau tridimensionnel. Autrement dit, il s'agit de faire une cartographie des régions les plus conservée ou divergentes dans la structure. Afin de réaliser cette analyse, l'alignement multiple des carboxypeptidases obtenu précédemment a été employé sur le serveur consurf (consurf.tau.ac.il). Ce dernier convertit la colonne des facteurs de température du fichier pdb de la carboxypeptidase A2 humaine par le taux de conservation de chaque résidu avec les deux CPBAg. Le logiciel pymol fut utilisé pour visualiser en trois dimensions cette conservation représentant ainsi l'homologie existante entre la CPA2 humaine et chacune des CPBAg.

B. Analyse des protéines

1. Electrophorèse et coloration

La composition des échantillons protéiques est analysée par leur migration sur gel de poly-acrylamide dénaturant SDS PAGE. Deux types de gels ont été utilisés : soit des gels bis-tris précoulés à gradient 4-15% (Precast Criterion ™ XT Bio-Rad #345-0124) suivi d'une migration en tampon MOPS 1X (Biorad #161-0788), soit des gels de résolution 10% coulés au laboratoire à partir d'une solution d'Acrylamide 30%, selon le protocole de Laemmli suivi par une migration en tampon Tris-Glycine, SDS 1%. Les échantillons protéiques sont repris afin d'être en tampon dépôt

Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol, du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), du Tris et du bleu de bromophénol pour être dénaturés pendant 5 minutes à 95°C.

Les extraits de tube digestif les plus précoces de la cinétique de digestion sont emplis de sang très peu digéré qui engendre des problèmes lors de la migration et la révélation des extraits. La migration de ces derniers selon le protocole décrit précédemment prend 6 heures et le front de migration n'est pas horizontal. Après différentes conditions testées, les extraits seront déposés sur gel tris-glycine à gradient 4-15% (Precast Criterion ™ XT Bio-Rad #567-1084) pour migrer 2h30 en tampon tris-glycine SDS. La visualisation des protéines est réalisée soit directement par coloration du gel de migration au bleu de coomassie à l'aide du Bio-safe ™ (Bio-Rad #161-0786 et Fermentas #R0571) soit par Western Blot.

2. Western-Blot

Les protéines après migration sont transférées sur des membranes de PVDF (Hybond™-P, Amersham) ou de Nitrocellulose (BioTraceTMNT, Pall, Protran, Whatman #10 401180) par transfert humide en tampon Tris glycine, la nuit à 20V ou 4h à 70V suivant que les échantillons contiennent du sang ou non.

Après transfert, les membranes sont saturées en tampon PBS 1X-Tween 20 0,1% (PBS-T) et lait écrémé 5%, 1 heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées 1 heure à température ambiante puis la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dirigés contre CPBAg1r (IGg*55Ydé* purifié) à la dilution 1/1000 ou avec les anticorps contre la protéine CPBAg2r à la dilution 1/500 dans du PBS-T lait écrémé 0,5%.

Après plusieurs lavages, les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris marqués par différentes classes de conjugués : peroxydase, fluorophore ou à la phosphatase alcaline.

Les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase sont utilisés à 10 ng/mL final dans du PBS-T- lait écrémé 0,5% (PIERCE #1858413 et #1858415) puis leur fixation est révélée par autoradiographie après incubation avec un substrat chimioluminescent de la peroxydase (Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, PIERCE #34080).

Les anticorps secondaires couplés à des fluorophores émettent dans le vert : Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IGg ou dans le rouge : Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IGg (Invitrogen #A11034, #A11030). Ces anticorps secondaires sont utilisés à 1 µg/mL final dans du PBS-T-lait écrémé 0,5% puis détectés respectivement avec les filtres utilisés pour le FITC (longueur d'onde excitation : 490 nm (460-500) et d'émission : 520 nm (510-540)) et la Cyanine 3 (longueur d'onde excitation : 550 nm (530-560) et d'émission : 610 nm (580-640)) du Pharos FX, Bio-Rad.

Les anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline sont utilisés au 1/10 000 final dans du PBS-T-lait écrémé 0,5%. Le protocole utilisé suit les recommandations du fournisseur Promega (BCIP/NBT color development substrate #S3771) et le temps de révélation est de 20 minutes pour les anticorps anti-lapin (Promega #S3731) et de 3 heures pour ceux anti-souris (Promega #S3721).

Pour éviter les problèmes de reconnaissance aspécifique avec plusieurs outils utilisés pour la révélation en présence de sang, plusieurs modifications du protocole initial ont été réalisées. Les membranes ont engendré des problèmes de saturation non optimale; pour y pallier, les membranes de PVDF (GE Healthcare #RPN303F) et de nitrocellulose (PALL #P/N66485) ont été remplacées par celles en nitrocellulose (Whatman #10401180). Des reconnaissances aspécifiques du sang par

les anticorps primaires seuls ont été observées ; pour y pallier, les solutions sont préincubées sur des membranes issues de gels sur lesquels du sang avait été déposé dans le but d'épuiser les anticorps présentant des épitopes qui reconnaissent le sang parmi ces sérums polyclonaux. Les anticorps secondaires couplés à de l'HRP (anti-lapin : Promega #W4011, Zymed #61-4620, Invitrogen #624234 et anti-souris Promega #W4021, invitrogen #621040) et couplés à des fluorophores (anti-lapin : Invitrogen Alexa Fluor 488nm #A11034, 647nm #A21245 et anti-souris Invitrogen Alexa Fluor 488nm #A11029, 546 #A11030 et 594nm #A11005) reconnaissent également de façon aspécifique ces protéines du sang. Les révélateurs seuls du système HRP des marques Pierce (Pico #34080 et Femto #34096) et GE Healthcare (#RPN2232SK), reconnaissent également le sang des échantillons et ce phénomène est renforcé par l'utilisation de membranes autres que les Whatman. Pour limiter ces reconnaissances aspécifiques, les différentes solutions d'anticorps sont épuisées, comme ci-dessus, mais un changement de technique de révélation au profit de la révélation à la phosphatase alcaline a été indispensable pour révéler les extraits contenant du sang.

C. Analyse de l'expression des gènes

1. Transcription inverse (RT) et PCR semi-quantitative

Pour évaluer l'expression des différents gènes étudiés, des transcriptions inverses sont réalisées sur les ARN totaux extraits des différents tissus des moustiques. Pour ce faire, 400 ng à 1 µg d'ARN suivant les échantillons sont incubés à 42°C pendant 1 heure avec 10 U de transcriptase inverse MMLV (Invitrogen #28025-013RT). La réaction s'effectue dans un volume de 40 µl

contenant 2,5 µM de randomhexamers $pd(N)_6$, avant que l'action de la MMLV ne soit inactivée thermiquement 5 minutes à 95°C.

Pour s'affranchir des variations durant l'étape de transcription inverse, trois expériences menées en parallèle pour un même échantillon sont rassemblées puis aliquotées et conservées à -20°C, le temps de l'analyse de l'ADN complémentaire des extraits.

2. PCR quantitative selon la méthode des gammes étalons

Pour évaluer plus finement l'expression des gènes codant les CPBAg, les échantillons sont analysés en PCR quantitative selon la méthode des gammes étalons utilisant les recommandations du fournisseur Applied Biosystem (Syber green #4309155). Un pool d'ARN extrait d'abdomens non gorgés et prélevés 24 heures après la prise du repas-gorgement est réalisé pour servir de matrice à une RT-PCR. Les ADN complémentaires sont de suite aliquotés afin de servir de matrice aux gammes étalons de chacune des plaques qPCR réalisées. Des étapes préalables déterminant les concentrations optimales des différents couples d'amorces et de celle des ADNc sont nécessaires. Les courbes étalons sont établies de façon à avoir des efficacités d'amplification comparable entre les différents couples d'amorces et le gène S7 (gène ribosomale) exprimé constitutivement servant de référence d'expression. Les échantillons sont analysés via trois dilutions réalisées chacune en triplicats pour limiter les variations engendrées par le pipetage des différentes solutions.

Les valeurs de Ct obtenues des échantillons sont normalisées par rapport au gène S7, puis les données sont exprimées par rapport à un calibrateur qui, pour les expériences d'ARNi, sont les valeurs de Ct des échantillons de moustiques injectés par des ds GFP.

V. Les outils pour l'analyse fonctionnelle

A. Inactivation génique par ARN interférence transitoire

1. Synthèse des ARN double brins

L'inactivation génique par ARNi est obtenue par injection dans l'hémolymphe d'ARN double brin (dsARN), ciblant une région spécifique de chacun des gènes codant les CPBAg.

En contrôle, pour mimer l'impact de l'injection et de l'activation de la voie de l'ARN interférence du moustique due à la présence d'ARN double brin (dsARN), des *ds GFP* ne ciblant aucun gène du moustique sont injectés. Des fragments spécifiques de *cpbAg1*, *cpbAg2* et *GFP* sont produits par PCR utilisant des oligonucléotides possédant une extension T7 à leurs extrémités 5'. Après purification des matrices ADN par gel extraction (Quiagen #28704), les doubles brins d'ARN sont synthétisés selon le protocole recommandé par le kit MEGAscript RNAi d'Ambion grâce aux amorces :

T7-GFP-F: GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC ATGGTGAGCAAGGGCGAG
T7-GFP-R: GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC TTACTTGTACAGCTCGTC

T7-cpbAg1-F : TAATACGACTCACTATAGG GTGGATGAGCGAAGCAATG
T7-cpbAg1-R : TAATACGACTCACTATAGG GGCGATCCTCATGCGTACG

T7-cpbAg2-F : TAATACGACTCACTATAGG GCTGCTGAGGTTGAAGGGAC
T7-cpbAg2-R : TAATACGACTCACTATAGG CCCACGAACGTTTCCTTCACG

2. Procédure d'injection de moustiques

Les femelles *A. gambiae* âgées de 1 à 2 jours sont injectées après une brève anesthésie sur glace grâce à des microcapillaires en verre (Harvard apparatus, #GC100TF-10) fixés sur un nanoinjecteur (Nanoject II, Drummond Scientific, #3-000-205/206). Les solutions de *ds ARN* sont injectées dans l'hémolymphe du moustique au niveau du spiracle du thorax. Après l'injection les moustiques sont placés 24h en présence d'eau sucrée dans une atmosphère humide maintenue à 22°C limitant les infections dûes à la blessure. Ensuite les moustiques sont remis en condition optimisée d'élevage, à 26°C et 80% d'humidité le temps de la poursuite de l'expérience.

A mon arrivée au laboratoire, les conditions d'optimisation pour l'inactivation de l'expression de *cpbAg1* étaient déjà établies et efficaces ; *cpbAg1* nécessite 500 ng de dsARN pour que son expression soit inactivée. Pour déterminer la concentration requise et la région spécifique pour l'inactivation de l'expression de *cpbAg2*, deux constructions ciblant deux régions différentes de la séquence nucléotidique (Cf. figures R.II.5 et R.II.6) ont été injectées en utilisant une gamme de concentration variant de 200 ng à 1 µg. Une quantité de 800 ng de dsARN est requise pour éteindre l'expression de *cpbAg2* avec la séquence ciblant de la 879pb à la 1226pb du gène, nommé *ds cpbAg2-1*.

Pour s'affranchir des biais expérimentaux, une même quantité de *ds ARN* (1,3µg) à volume équivalent (2*69nL) est injectée quelque soit la condition d'inactivation. Au cours des doubles inactivations, les conditions *ds cpbAg1* sont établies par 500 ng de *dscpbAg1* additionné de 800 ng de *dsGFP* ; les conditions *dscpbAg2* sont établies par 800 ng de *dscpbAg2* additionné de 500 ng de *dsGFP* ; les conditions *dscpbAg1+2* sont établies par 500 ng de *dscpbAg1* additionné de 800 ng de *dscpbAg2* et les contrôles sont injectés avec 1,3 µg de *dsGFP*.

B. Test de l'effet bloquant des anticorps anti-CPBAg sur le développement de *P. falciparum*

Des anticorps dirigés contre chacune et contre les deux CPBAg ont été ajoutés aux repas sanguin infectant dans le but d'inactiver l'activité enzymatique des deux protéines ciblées. Le mélange utilisé pour les infections standard au laboratoire utilise une culture de l'isolat de la souche NF54 de *P. falciparum*. Après centrifugation, 600 µl de culot de globules rouges parasités additionnés de 1,5 ml de globules rouges O^+ frais et de 2,1 ml de sérum AB^+ sont complémenté avec les sérums d'intérêts, constituant ainsi le repas sanguin. Ce mélange est ensuite placé au contact des moustiques tout en conservant une température de 37°C pour éviter l'exflagellation des parasites avant leur arrivée dans le tube digestif des moustiques. L'ajout des sérums anti-CPBAg au repas sanguin infectant est réalisé aux dilutions 1/3, 1/6 et 1/9 du volume total de sérum humain.

VI. Les procédures de l'analyse fonctionnelle

A. Les infections d'*A. gambiae* avec *P. falciparum*

Des isolats de la souche NF54 de *P. falciparum* (Delemarre-van de Waal *et al.*, 1981; Chulay *et al.*, 1986) cultivés au CEPIA de l'Institut Pasteur sont utilisés pour infecter les moustiques *A. gambiae* comme décrit dans l'article de C. Mitri *et al*., en 2009. Les tubes digestifs sont disséqués 7 à 8 jours après l'infection, moment où le parasite *P. falciparum* est au stade oocyste. Le niveau d'infection est évalué sous microscope par le dénombrement des oocystes

colorés dans 0,4% de mercurochrome. La prévalence d'infection est la proportion de moustiques infectés sur le nombre total disséqué, où un moustique est considéré comme infecté à partir du moment où son tube digestif contient au moins un oocyste. L'intensité d'infection est le nombre d'oocystes par tube digestif infecté. Pour chaque expérience, un minimum de 40 moustiques par condition injectés et/ou gorgés est utilisé.

B. L'observation du développement ovarien d'*A. gambiae* en condition d'ARNi

Dès leur émergence, les femelles sont placées avec des mâles de 2 à 4 jours plus âgés au ratio 1/3 dans des grandes cages de $12,5.10^3$ cm^3 pour favoriser la copulation. Les injections d'ARN double brin sont effectuées 3 jours après l'émergence des femelles, puis les moustiques sont répartis à raison de 150 femelles pour 50 mâles dans des moyennes cages de 8.10^3 cm^3 laissées deux jours au contact d'eau sucrée à 21°C. Les moustiques sont ensuite privés de sucre, puis les femelles sont placées en pots et laissées à jeun jusqu'au gorgement. Ensuite les femelles gorgées sont replacées au même ratio avec les mâles, tandis que les non gorgées sont réservées pour la validation de l'inactivation génique.

L'inactivation génique est vérifiée en RT-qPCR sur un pool de tubes digestifs quelque soit les conditions d'ARNi. Pour chaque individu, la présence de spermatozoïde dans les spermathèques est observée au microscope objectif *100 (si elles n'en contiennent pas les moustiques sont écartés) et les ovaires sont observés et classifiés en fonction de l'avancement du développement des oocystes et/ou des œufs qu'ils renferment.

Résultats

Chapitre I

Chapitre I : Caractérisation biochimique de CPBAg1 et CPBAg2

Les carboxypeptidases de la famille B hydrolysent les liaisons peptidiques côté carboxy-terminal des polypeptides. Cette action catalytique libère les acides aminés basiques : lysine et arginine. Elles appartiennent à la classe des métalloprotéases M14, dépendante du zinc pour accomplir l'hydrolyse (Folk *et al.*, 1971). Chez *A. gambiae*, elles sont produites dans la lumière du tube digestif. La purification des carboxypeptidases d'*A. gambiae* (CPBAg1 et CPBAg2) endogènes étant une procédure trop lourde pour obtenir les quantités de protéines nécessaires pour les caractériser biochimiquement, elles ont été produites sous formes recombinantes (CPBAg1r et CPBAg2r).

Avant mon arrivée au laboratoire, la protéine CPBAg1r avait été produite dans un système procaryote utilisant une construction plasmidique contenant la séquence du gène codant CPBAg1, tronquée de son peptide signal. Cependant, la protéine CPBAg1 produite chez *Escherichia coli* s'est révélée non fonctionnelle. Un mauvais repliement de la protéine pouvant être à la base de cette absence de fonctionnalité, l'analyse de la conformation que peut adopter CPBAg1 a été réalisée. Elle expose trois cystéines : une dans la séquence de son peptide signal (C10) et deux autres (C252 et C272) dans son domaine protéase (Cf. Chapitre I § B.1.c). La comparaison d'homologie avec d'autres protéines d'insecte et de porc déjà cristallisées montre que la position dans l'espace des deux dernières cystéines de CPBAg1 est favorable à la création d'un pont disulfure entre elles. Sachant que les liaisons covalentes peuvent augmenter la stabilité des structures tertiaires des protéines, et que la structure spatiale d'une enzyme conditionne son activité, l'absence de formation de ponts disulfures ou leur réduction peut moduler l'activité enzymatique. Ce défaut de conformation native peut être expliqué par le potentiel réducteur du

cytoplasme d'*E. coli* qui empêcherait de ce fait la formation du pont disulfure intramoléculaire de CPBAg1. Pour conserver la formation du pont disulfure, une alternative du système de production utilisant le système cellules d'insecte-baculovirus a été opérée. La nouvelle forme de CPBAg1r ainsi produite est fonctionnelle permettant la caractérisation partielle de la protéine (Lavazec *et al.*, 2005). La quantité de CPBAg1r restait suffisante pour combler les besoins de l'ensemble du projet lors de mon arrivée au laboratoire.

Au même titre que CPBAg1, la structure primaire de CPBAg2 expose 3 cystéines : les deux premières (C249 et C272) présentant la même conservation structurale qu'énoncée ci-dessus à l'inverse de la troisième (C301) qui est atypique par rapport aux enzymes des autres espèces utilisées pour la modélisation structurale (Cf. Chapitre I § B.1.c). CPBAg2 comme CPBAg1 a de ce fait la possibilité de créer également un pont disulfure intramoléculaire. De ce fait, la production de la protéine CPBAg2r a été réalisée dans le système d'expression baculovirus-cellules d'insecte avec l'appui de la plateforme de production des protéines recombinantes de l'Institut Pasteur (PF5). La CPBAg2 recombinante ainsi produite s'est révélée fonctionnelle mais contaminée ; deux des trois conformations qu'elle peut adopter en condition « native » s'associent très fortement avec des protéines du baculovirus diminuant de façon drastique le rendement de production (rapport Master). Bien qu'en quantité insuffisante pour couvrir l'ensemble des besoins de la thèse, ce lot de CPBAg2r a toutefois permis la production d'un anticorps spécifique chez la souris (Cf. Chapitre II A.1.a). Pour optimiser la production de protéine recombinante, plusieurs possibilités étaient envisageables : améliorer la technique d'expression baculovirus-cellules d'insecte en optimisant les protocoles de production et de purification, ou changer de système d'expression. Ce changement pouvait s'opérer soit dans le système d'expression procaryote utilisant la sécrétion de la protéine produite dans le périplasme d'*E. coli* (environnement oxydant

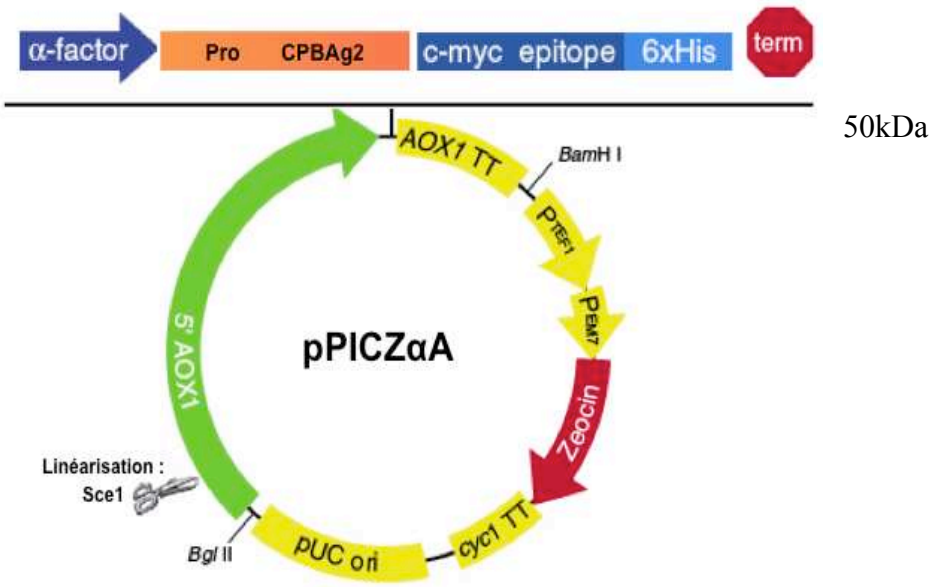
possédant les chaperons nécessaires à la formation de ponts disulfures), soit dans un système d'expression eucaryote utilisant la voie de sécrétion des levures. Nous avons retenu la sécrétion de la protéine dans le surnageant de culture de *Pichia pastoris,* plus facile à manipuler que les cellules d'insecte, cette technique facilitant de plus la purification de la protéine. D'autre part, ce système utilisant l'intégration stable de la séquence codant CPBAg2 dans le génome de *P. pastoris* a le bénéfice d'un fort rendement de production (jusqu'à 30% des protéines produites). Enfin, par rapport à d'autres systèmes d'expression utilisant les levures, les modifications post-traductionnelles engendrées par le système sont réduites. Par exemple, les hyperglycosylations des protéines sécrétées sont de 8 à 14 mannoses ajoutés sur chaque résidu asparagine lors des N-glycosylations de *P. pastoris* alors que 50 à 150 sont retrouvés chez *Saccharomyces cerevisiae.*

A. Production et purification de CPBAg2

1. Clonage et sélection

La banque de donnée Vector Base prédit un épissage alternatif de *cpbAg2*.

Afin de savoir si deux transcrits sont produits dans le tube digestif d'*A. gambiae*, différentes RT-PCR ont été réalisées sur des extraits de tube digestif non gorgé et en cinétique après l'ingestion de sang des moustiques. Malgré l'utilisation de la technique de RT-PCR classique, en touch-down, en gradient, et avec des doubles et triples nested avec différents couples d'amorces, ces expériences n'ont pas révélé d'expression de ce second transcrit dans notre tissu d'intérêt, son étude a ainsi été abandonnée. Plusieurs hypothèses peuvent cependant expliquer la contradiction des données, comme un problème dans le séquençage qui aurai pu engendrer un problème



Linéarisation du plasmide par digestion avec l'enzyme Sce1 afin de faciliter son intégration chez *Pichia pastoris.*

Figure R.I.1 : Clonage de *cpbAg2* dans le vecteur d'expression pPICZαA

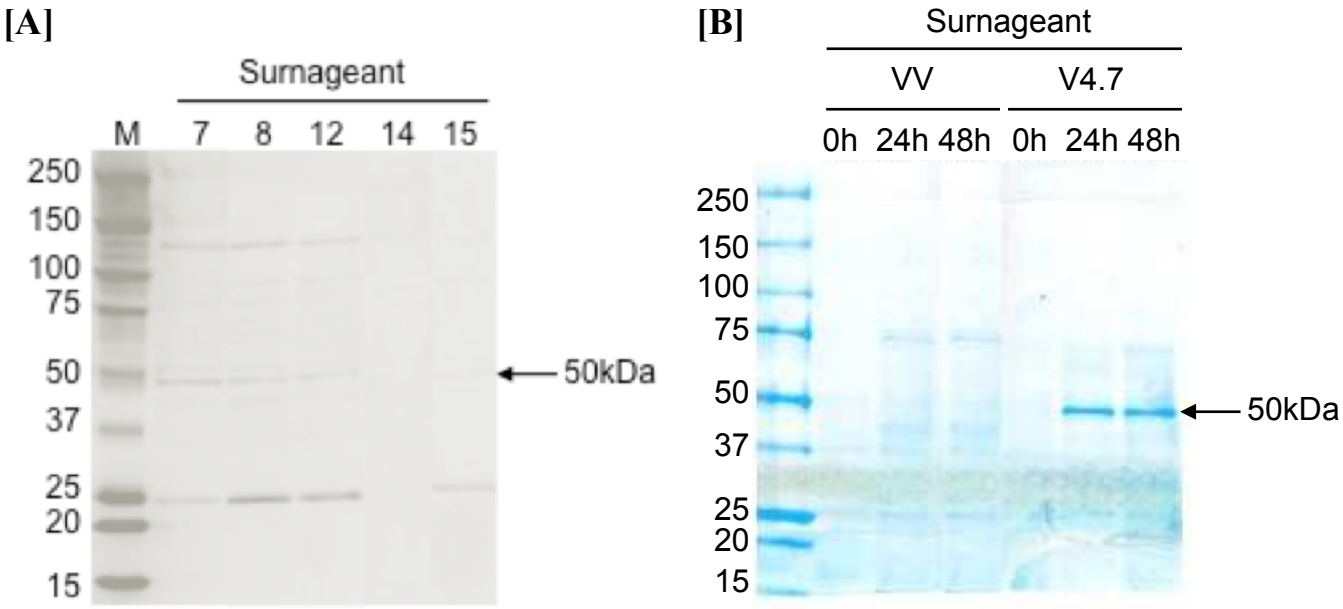


Figure R.I.2 : Comparaison de différents clones de CPBAg2r

[A]. Comparaison de 10µl de surnageant de culture (V = 100mL) de différents clones possédant la construction codant CPBAg2r, 24h après l'induction par le méthanol. Observation par western blot où l'étiquette polyhistidine côté carboxy-terminal de la protéine est révélée par la méthode HRP

[B]. Comparaison du clone le plus producteur sélectionné : 4.7 avec un clone contrôle possédant le vecteur vide (VV) sur gel coloré au bleu de Coomassie.

d'annotation, une expression ectopique de ce second transcrit ou le fait qu'il soit le reliquat d'une autre forme plus ancestrale du gène.

A partir d'un clone construit pour la production en système baculovirus (Boisson *et al.*, non publié), le gène codant CPBAg2, tronqué de son peptide signal, a été cloné dans le vecteur navette pPICZαA permettant son passage chez *E. coli* et *P. pastoris*. La séquence de *cpbAg2* a été introduite en fusion traductionnelle coté amino terminal avec le peptide signal α de *S. cerevisiae*. En ce qui concerne le coté carboxy-terminal, des étiquettes poly-histidine et C-myc ont été ajoutées (figure R.I.1). Après amplification chez *E. coli*, ce vecteur a été introduit par électroporation chez *P. pastoris*. L'utilisation de cette souche étant basée sur son caractère méthylotrophique qui sera utilisée lors de la production de la protéine recombinante.

Des séquences du gène AOX1 (alcool oxydase) de *P. pastoris*[*] encadrent la séquence de *cpbAg2* dans le vecteur *pPICZ*αA. C'est sous le contrôle de ce promoteur fort (l'ARN codé pouvant représenter jusqu'à 5% de la totalité des ARNpolyA), que la protéine CPBAg2r est produite, qu'il y ai eu ou non recombinaison homologue entre le vecteur d'expression et le génome de *P. pastoris*. S'il y a intégration de la construction dans le génome, la levure métabolisera le méthanol grâce au second gène codant l'alcool oxydase AOX2. La régulation de

---

[*] Gènes AOX 1 et 2 réalisant la réaction d'oxydation du méthanol :

$$CH_3OH + O_2 \xrightarrow{AOX} HCHO + H_2O_2$$

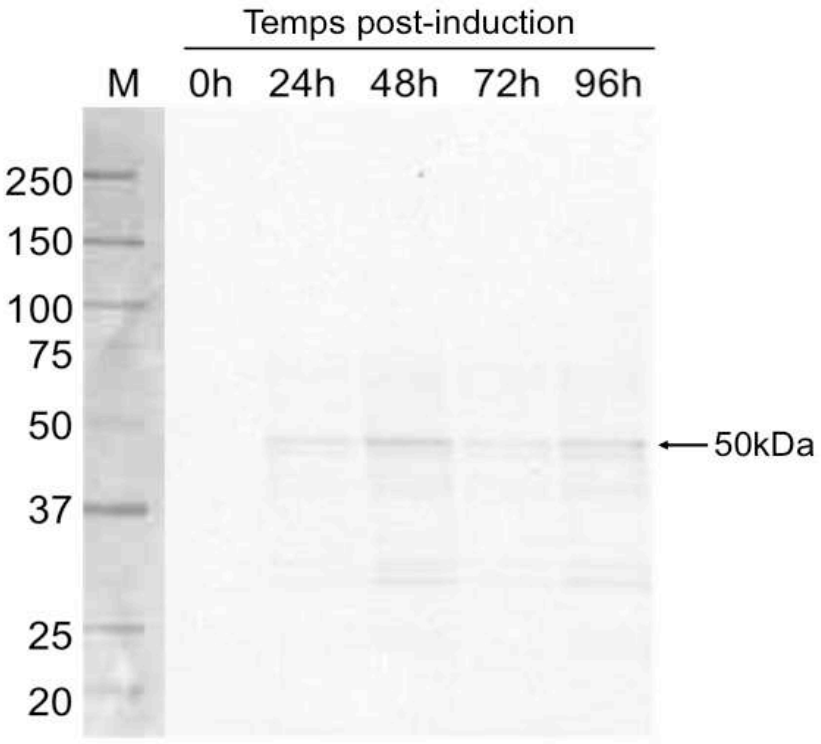


Figure R.I.3 : Détermination de la durée optimale d'induction de CPBAg2r
Cinétique d'induction de la protéine CPBAg2 par le clone 4.7 chez *Pichia pastoris.* 10µl de surnageant de culture ont été déposés sur gel SDS PAGE, observés par Western blot révélant le tag poly-histidine coté carboxy-terminal de CPBAg2r par la méthode HRP.

l'expression de CPBAg2r s'effectue au niveau transcriptionnel par induction de ce promoteur avec le méthanol.

Le clone 4.7 de *P. pastoris* comprenant la construction de cpbAg2 a été sélectionné sur la base du niveau de production de la protéine CPBAg2r en conditions standards (MGY et MM pour l'induction) (Cf. Matériels et Méthodes § I.A.2.c). Comme le montre la figure R.I.2, la quantité de CPBAg2r libérée dans le surnageant de culture est suffisante pour être détectable sur gel coloré au bleu de coomassie. Les activités enzymatiques des surnageants de culture de différents clones ont également été prises en compte pour la sélection du clone le plus producteur (Cf. Chapitre I § I.A.3.a.).

Les conditions de culture et les niveaux de production de protéines recombinantes pouvant varier d'une protéine à l'autre, plusieurs milieux et conditions ont été testés afin d'optimiser la production et la purification de CPBAg2r.

2. Optimisation de la production de CPBAg2r

Basé sur l'analyse des surnageants de culture après induction par le méthanol, plusieurs essais d'optimisation ont permis de sélectionner les conditions de culture suivantes : milieux enrichis (1% yeast extract, 2% peptone et 100mM phosphate de potassium ; BMGY et BMMY) par rapport à ceux utilisés classiquement (MGY et MM, Cf. Matériels et Méthodes § I.A.2.c).

Après l'obtention d'une biomasse conséquente en milieu glucosé : DO ≈ 12, les culots sont resuspendus pour obtenir une DO ≈ 4 en milieu méthanol 1% dans le but d'induire la production de CPBAg2r. L'expression de *cpbAg2* a continué d'être induite par l'ajout de 0,5% de méthanol dans le volume final de culture toutes les 24h après le début de l'induction.

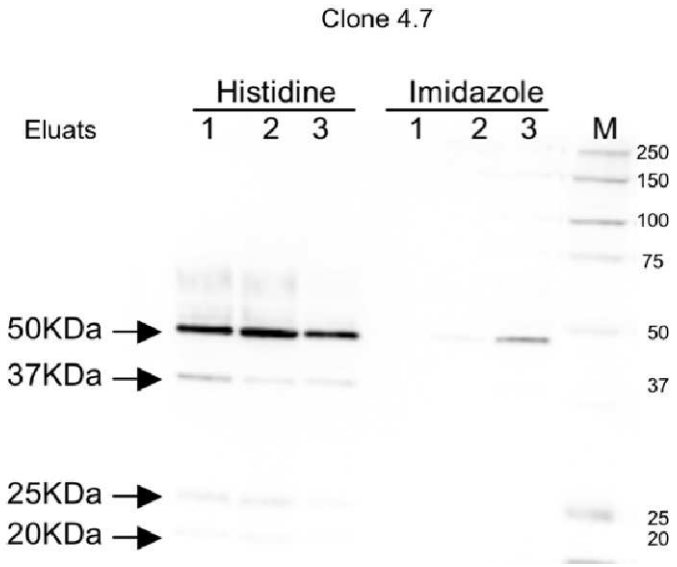


Figure R.I.4 : Comparaison des rendements protéiques des 3 éluats issus des élutions successives avec l'histidine et l'imidazole
La protéine CPBAg2r contenue dans 5µl du volume des élutions est observée par Western blot révélant le tag poly-histidine côté carboxy-terminal de CPBAg2r par la méthode HRP.

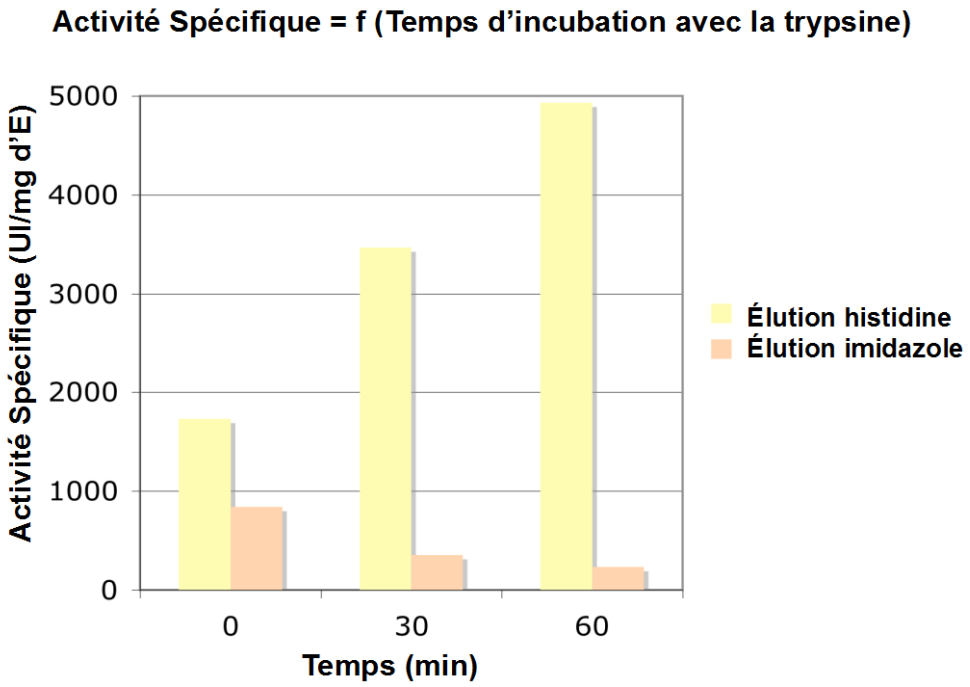


Figure R.I.5 : Comparaison de l'activité spécifique (AS) de CPBAg2 en fonction des traitements de purification
AS des éluats du clone 4.7 issus de la purification avec l'histidine ou avec l'imidazole en fonction de la durée d'activation par la trypsine au ratio 1/50.

Des cinétiques d'induction allant jusqu'à 96h après dilution en milieu méthanol ont permis de déterminer la durée nécessaire pour une expression optimale : 48h après l'induction (figure R.I.3). C'est à ce moment que les surnageants ont été recueillis.

3. Optimisation de la purification

La protéine recombinante possédant une étiquette polyhistidine en C-terminal a été purifié par chromatographie par affinité au nickel (N_i^{2+}), retenant la protéine sur la base d'une liaison par chélation avec ces ions, cette technique de purification est réalisée « en batch ».

a. Chromatographie d'affinité (N_i) en batch

Les surnageants de culture sont incubés la nuit à 4°C avec des billes d'agarose sur lesquelles du Nickel est fixé de manière covalente. Après lavage, deux éluants ont été comparés : l'histidine et l'imidazole. Le rendement d'élution est évalué à la fois sur western blot (figure R.I.4) et par la détermination de leur activité enzymatique après différents traitements d'activation par la trypsine (figure R.I.5). Pour rappel CPBAg2 étant produite sous sa forme de zymogène, une activation par la trypsine est nécessaire pour la détermination de l'activité enzymatique (Cf. Matériels et Méthodes et Introduction).

Comme le montre la figure R.I.4 comparant l'efficacité d'élution de l'imidazole et de l'histidine, l'élution avec l'histidine offre un rendement très supérieur. Ainsi CPBAg2r est éluée dès la première élution alors que CPBAg2r n'est détectable qu'à la suite d'une troisième élution en présence d'imidazole.

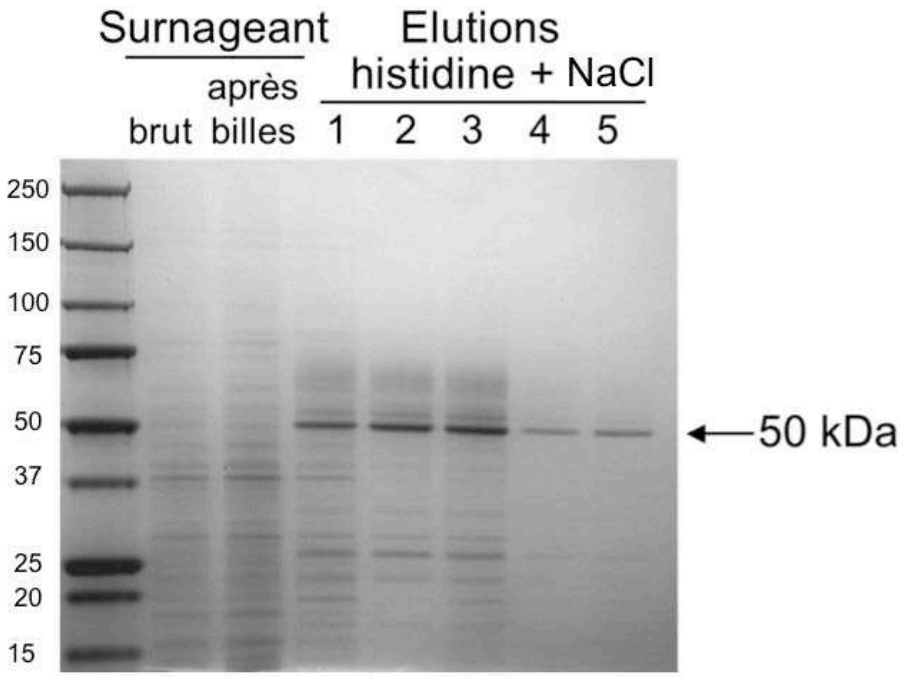


Figure R.I.6 : Comparaison des rendements de CPBAg2r issu d'élutions successives d'histidine

Dépôt sur gel coloré au bleu de coomassie de 5µl des 5 élutions successives du surnageant de culture du clone 4.7 de CPBAg2r obtenu avec l'éluant : 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 50mM histidine, pH6.

Les mesures des activités enzymatiques des élutions renforcent ce résultat, montrant une plus forte activité spécifique à l'issue de l'élution utilisant l'histidine par rapport à celle utilisant l'imidazole quelque soit la durée de l'activation préalable par la trypsine (figure R.I.5).

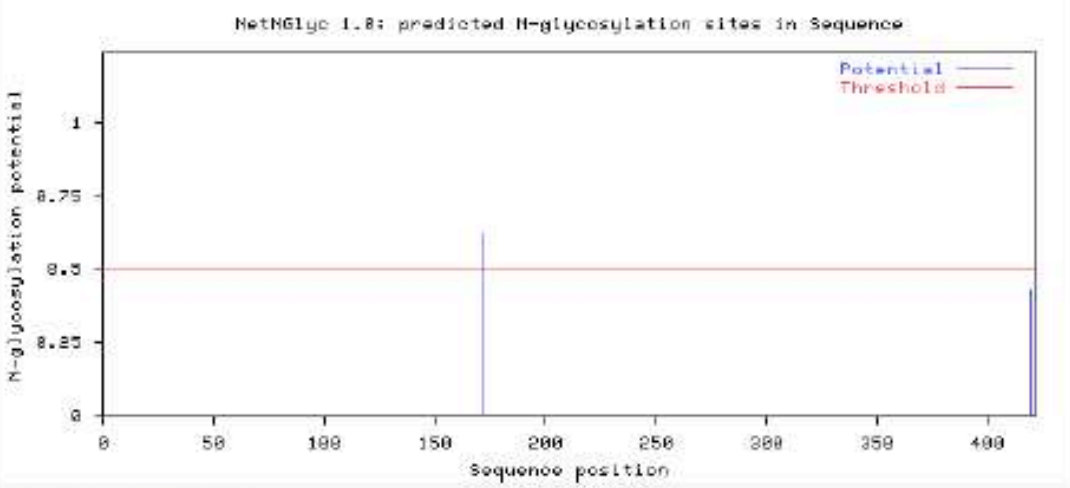
D'autre part, la mesure de l'activité enzymatique a été menée sur plusieurs clones en parallèle (données non présentées), permettant de confirmer le choix du clone 4.7 sur la base d'une plus forte activité enzymatique de la protéine issue de ce clone comparé à l'activité de celles issues des autres clones.

Une optimisation du protocole de purification basée sur le manuel d'utilisation des colonnes HiTrap de GE Healthcare (HiTrap-convenient protein purification, column guide) a conduit à ajouter du NaCl pour améliorer le rendement de purification. Toujours en vue d'optimiser le rendement, jusqu'à cinq élutions successives ont été réalisées montrant que les trois premières suffisent à décrocher des billes la quasi-totalité de CPBAg2r (figure R.I.6).

Dans toutes les conditions de purification, des formes de haut poids moléculaires, reconnues par les anticorps anti-CPBAg2 sont co-purifiées dans les fractions éluées. Souhaitant limiter l'impact de ces formes sur la détermination des caractéristiques biochimiques de CPBAg2, nous avons recherché s'il s'agissait de contaminants ou de modifications post-traductionnelles de la protéine.

```
Name:  Sequence          Length:  422
MRFPVLVAVSLAVIGGTAGRQSYSGYKLYSVEQNNQQQVDFLRELQQSAQDLDFWQLDRLVGSEARVLVPPAQLDYFRQL     80
LKAQKLRHRELIHDFERVQDDHLYGTKRVTPSQGLPLNKYLRYNEMIDYINTLAKKYSSFVTVAEIGKSYEGRPIPAVTI    160
QSPSLYKSHPNSSKPVVFVDAGIHAREWAAPAMAMYLISELVENAAQHQDLLAGLTWTIVPIANPDGYEYSHERERLWRK    240
TRRPGGRNCVGVDGNRNYDFHWAEVGASNQPCSDTYHGEQSFSEPETRAIRDELLRLKGRCKFYLSLHTYGQYLLYPWGW    320
TSELPEDWEKVDAVAQAGARAIEQATGSTYTVGSSTNVLYAAAGGSDDYAYAVADVPISMTMELPGGGSQGFNPPPTRIE    400
EIVKETFVGIRAMALEVARNYS
```

```
(Threshold=0.5)
-----------------------------------------------------------------------
SeqName      Position  Potential    Jury     N-Glyc
                                  agreement result
-----------------------------------------------------------------------
Sequence     171 NSSK   0.6218     (9/9)    ++
Sequence     420 NYS-   0.4293     (6/9)    -
-----------------------------------------------------------------------
```



Graphics in PostScript

Figure R.I.7: Prédiction des glycosylations potentielles de CPBAg2r. Analyse *in silico* de sa séquence par le logiciel NetNGlyc

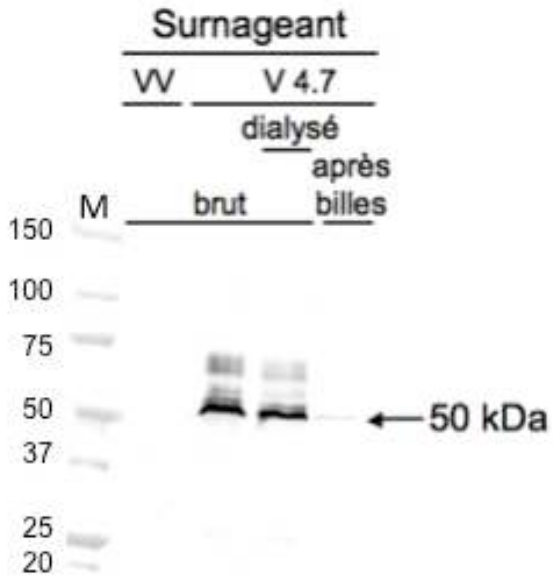


Figure R.I.8 : Validation des glycosylations prédites sur la séquence de CPBAg2r
Traitement à la concanavaline A d'une quantité déposée équivalente à 15µl de surnageant de culture du clone producteur de CPBAg2r comparé au clone contrôle ayant le vecteur vide (VV).

b. Analyse *in silico* des glycosylations potentielles sur la séquence de CPBAg2

Les modifications post-traductionnelles majoritaires du système d'expression *P. pastoris* étant des glycosylations (et plus précisément de type N : l'oligoside se lie à une asparagine), l'analyse *in silico* des sites potentiellement glycosylables sur la séquence peptidique de CPBAg2 a été réalisée.

Le serveur NetNGlyc. fut utilisé dans la recherche de séquons sur les séquences de CPBAg2. Les séquons sont des motifs de trois acides aminés consécutifs : Asn-X-Ser/Thr (où X est n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline). Ils permettent l'attachement de monosaccharides au niveau de l'azote de la chaine latérale de l'asparagine faisant une liaison de type N-glycosidique servant de pied d'encrage à des chaînes glucidiques courtes et ramifiées allant de 8 à 14 monosaccharides ajoutés en moyenne dans le système *P. pastoris* (Grinna *et al.*, 1989). Deux séquons situés au niveau du 171ème et du 420ème acide aminé de la séquence de CPBAg2 avec une plus forte probabilité de glycosylation sur le premier motif ont été prédits (figure R.I.7).

La séquence peptidique de CPBAg2 offrant la possibilité d'être N-glycosylée, nous avons testé l'hypothèse que les fractions de masse moléculaire apparente élevée correspondent à des formes glycosylées de CPBAg2r.

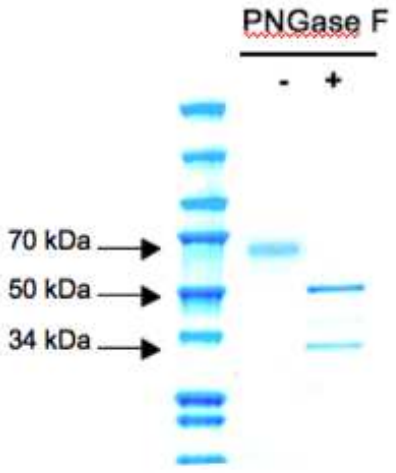


Figure R.I.9 : Traitement à la PNGaseF
Les formes de haut poids moléculaire (fractions fortements glycosilées) issues d'une des purifications par gel filtration sont traités à la PNGaseF. L'équivalent de 2µl de ces formes est déposé sur gel avant d'être coloré au bleu de coomassie pour révéler la protéine CPBAg2r.

c. Glycosylation de CPBAg2r produite chez *P. pastoris*

Pour vérifier que les espèces de haut poids moléculaire apparent observées lors de la purification de CPBAg2r correspondaient à des modifications post-traductionnelles de la protéine et non pas à des contaminants, deux tests *in vitro* ont été réalisés : un traitement à la concanavaline A et un traitement à la PNGaseF (Peptide-N4-(acetyl-α-glucosaminyl)-asparagine amidase, EC3.5.1.52).

Traitement à la concanavaline A : c'est une glycoprotéine de la famille des lectines fixant de façon spécifique les D-mannoses et D-glucoses. L'incubation sur billes de concanavaline retiendra sur ce principe les sucres et les protéines glycosylées présentes dans les échantillons. L'incubation des élutions issues des chromatographies d'affinité engendre la perte de plus de la moitié des protéines de l'échantillon (la quantité protéique est diminuée d'un facteur de 2,6), avec en parallèle la disparition des espèces de masse moléculaire apparente élevée (figure R.I.8). Ce test révèle que la forme la plus élevée observée dans les extraits correspond à la protéine sous forme glycosylé.

Traitement à la PNGaseF : Cette enzyme a la capacité de cliver les liaisons N-glycosidiques libérant les séquences peptidiques de toutes chaînes glucidiques. Son action sur les fractions de CPBAg2r devrait permettre d'enrichir la production en fraction « pure » de CPBAg2r équivalent à augmenter le ratio de protéine non glycosylée.

Après l'expérimentation de plusieurs conditions différentes de traitement à la PNGaseF, il s'avère que cette enzyme n'est efficace qu'en condition dénaturante, les protéines cibles devant probablement être sous forme linéaire pour que la PNGaseF soit efficace. Dans ces conditions, la disparition des espèces de haut poids moléculaire au profit d'une forme migrant à 50kDa est

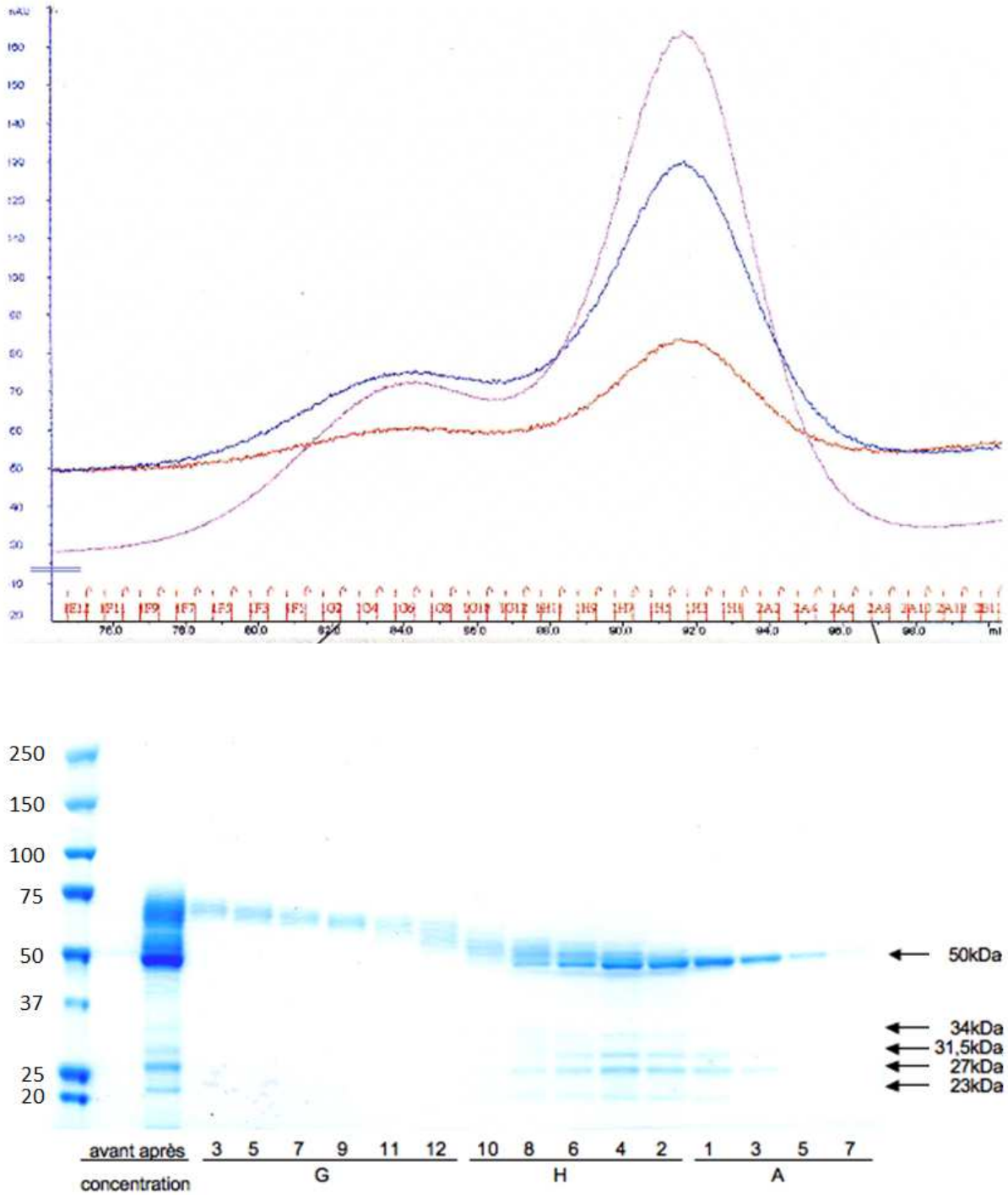


Figure R.I.10 : Purification de CPBAg2r produite chez *Pichia pastoris* par la 1ère gel filtration

Chromatogramme et gel associé colorés par bleu de Coomassie des fractions avant et après concentration ainsi que celles issues des différentes élutions obtenues de façon croissante de G3 à A7. Les couleurs des courbes du chromatogramme représentent les valeurs d'absorbance à 280nm (UV) pour la bleue, à 255nm pour la rouge et à 215nm pour la violette.

observée (figure R.I.9). Cependant les conditions dénaturantes engendrant la perte de l'activité enzymatique de CPBAg2r ont rendu inutilisable ce traitement pour son utilisation dans la caractérisation biochimique.

Ces tests mettent en évidence des modifications post-traductionnelles de type glycosylation sur la protéine CPBAg2r, excluant de ce fait la présence de contaminants reconnus par les anticorps anti-CPBAg2 dans les différents éluats de production. La confirmation des prédictions *in-silico* nécessiterait la mutation des asparagines potentielles prédites.

Pour s'affranchir des formes glycosylées de CPBAg2r et enrichir les quantités de forme protéique dite « pure » ayant une masse moléculaire apparente de 50kDa, des purifications par chromatographie sur colonne (échangeuse d'ions et exclusion) ont été réalisées.

d. Chromatographies sur colonne

Pour établir les paramètres enzymatiques de CPBAg2 et refléter au plus près son activité physiologique (la protéine endogène maturée migrant à 50kDa), la forme « pure » de CPBAg2r est privilégiée par rapport aux formes glycosylées qui peuvent altérer la structure tridimensionnelle de la protéine et donc son activité. Différentes méthodes ont été envisagées pour enrichir la production en fraction « pure » sans perte d'activité enzymatique : une chromatographie d'exclusion par la taille dite gel filtration ou tamis moléculaire et une échangeuse d'anion dite MonoQ.

En premier lieu, les échantillons doivent être concentrés, pour n'injecter qu'entre 1 à 2 ml d'échantillon à purifier sur les colonnes de type AKTA afin d'augmenter significativement la

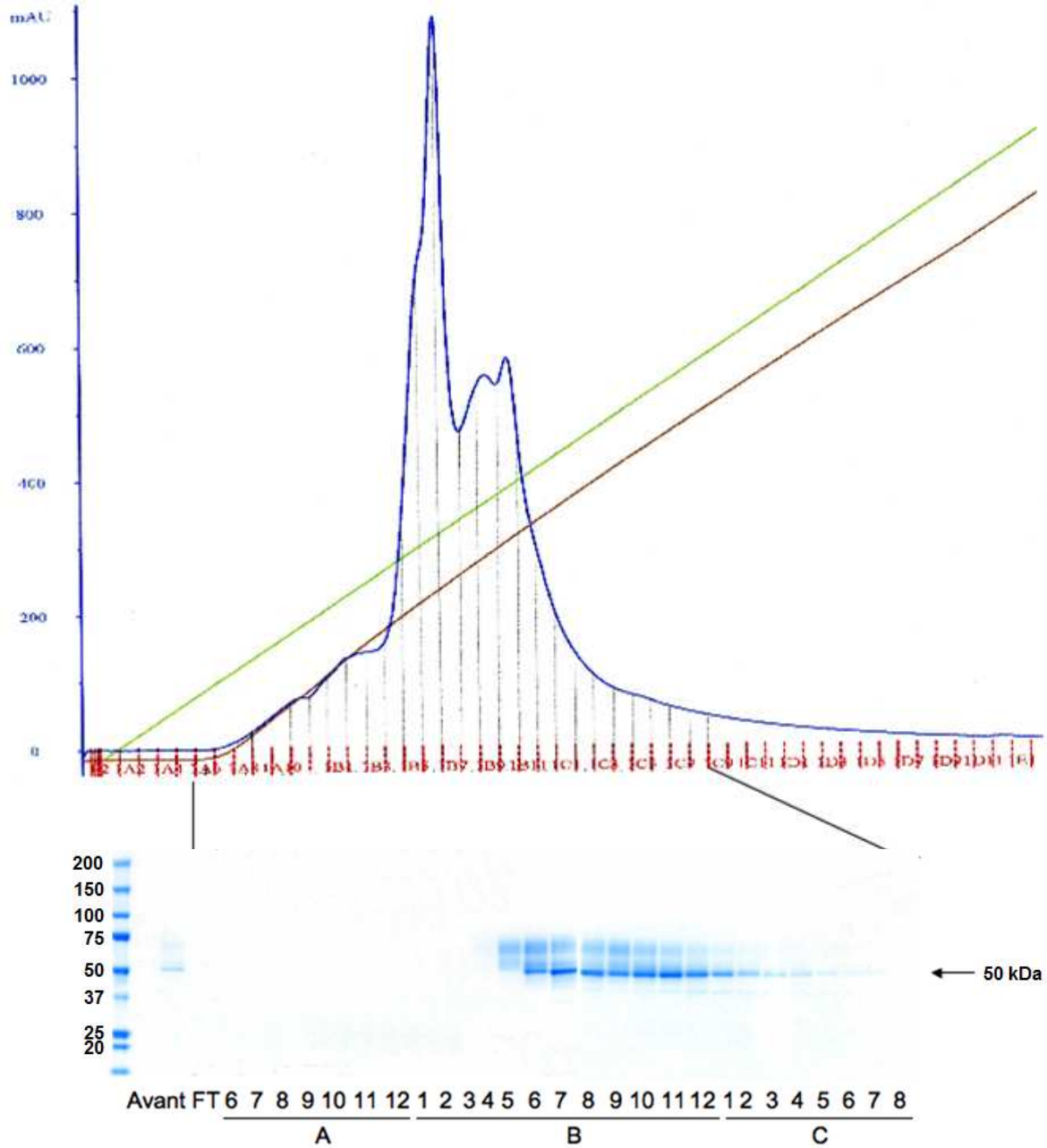


Figure R.I.11 : Purification de CPBAg2r produite chez *Pichia pastoris* par MonoQ

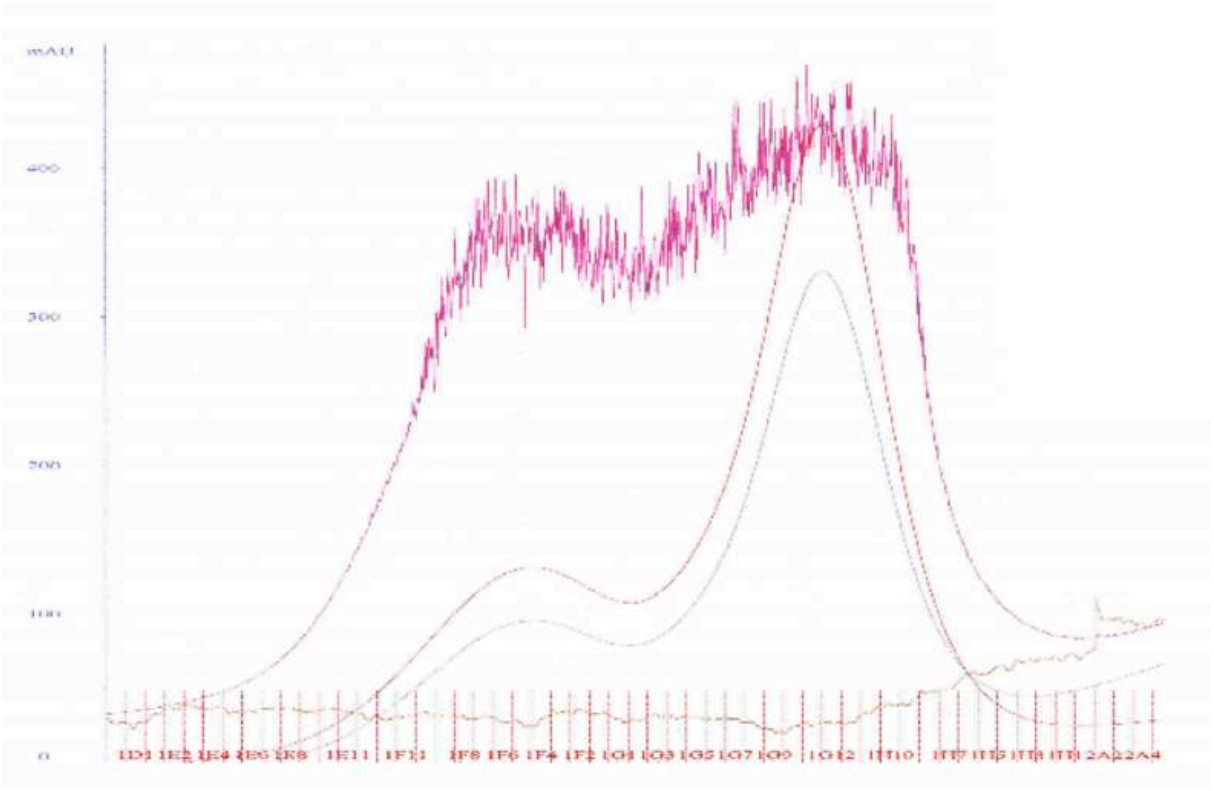
Chromatogramme et gel associé colorés par bleu de Coomassie des fractions avant purification, du Flow Through (FT) ainsi que celles issues des différentes élutions obtenues de façon croissante de A6 à C8. Les couleurs des courbes du chromatogramme représentent les valeurs d'absorbance à 280nm (UV) pour la bleue, à 255nm pour la rouge et à 215nm pour la violette.

résolution. Pour limiter les pertes en protéine, différents concentrateurs commerciaux ont été testés pour leur capacité à minimiser la rétention des protéines sur leurs membranes. Ces tests ont montré que CPBAg2r est 14,3% moins absorbée par les membranes hydrophobes des concentrateurs par rapport à celles en PES (polyéther-sulfone), ces premiers seront donc utilisés pour concentrer l'échantillon protéique.

Une fois la protéine concentrée, deux systèmes de purification ont été comparés : une chromatographie d'exclusion par la taille et une chromatographie échangeuse d'anion (MonoQ). La figure R.I.10 présente le chromatogramme et le gel coomassie de la première gel filtration réalisée. Les fractions sont séparées suivant leurs masses moléculaires apparentes équivalent probablement ici au nombre de glucides ramifiés à la protéine. Les élutions sont ensuite regroupées entre elles suivant qu'elles sont :

- fortement glycosylées (> 55kDa) équivalent aux fractions comprises entre G3 et H10,
- sous forme glycosylée-doublet équivalent aux fractions comprises entre H8 et H4, moins glycosylées que les premières,
- sous forme de doublet migrant à ~ 50kDa comme les fractions H2 et A1, équivalent à un mélange de forme légèrement glycosylées et non glycosylées.
- sous forme dite « pure », non glycosylées migrant à 50kDa équivalent aux fractions comprises entre A3 à A7 sur la figure R.I.10.

Par comparaison, la chromatographie échangeuse d'anion (figure R.I.11), ne permet pas une séparation de l'échantillon aussi fine que la première méthode, ne séparant qu'une infime quantité de fraction « pure » de tout l'échantillon. Comme la purification par gel filtration offre une meilleure résolution de l'échantillon que la MonoQ, les échantillons issus de la production à



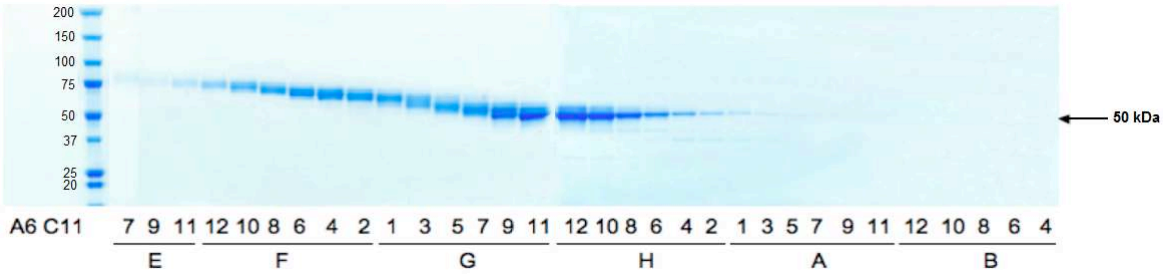


Figure R.I.12 : Purification de CPBAg2r produite chez *Pichia pastoris* par la 2ème gel filtration

Chromatogramme et gel associé colorés par bleu de Coomassie des fractions issues des différentes élutions obtenues de façon croissante de E7 à B4. Les couleurs des courbes du chromatogramme représentent les valeurs d'absorbance à 280nm (UV) pour la bleue, à 255nm pour la rouge et à 215nm pour la violette.

grande échelle de CPBAg2r seront purifiés par cette méthode avec une vitesse deux fois plus faible (0,5ml/min) que la première afin d'améliorer encore le pouvoir résolutif de la colonne (figure R.I.12).

Sur la base de ces résultats une production à partir de 1,2 litres de surnageant de culture a été entreprise. Pour la production à grande échelle de CPBAg2r, le protocole de pré-purification des surnageants de culture sur billes d'agarose couplées au nickel qui a été retenu conduit à l'association de trois élutions successives en présence d'histidine supplémentée en NaCl. Les éluats de la pré-purification ont été regroupés, concentrés *via* des concentrateurs à membrane hydrophobe puis purifiés par gel filtration.

Après rassemblement des fractions similaires issues des différentes purifications par gel filtration : 5mg de fraction glycosylée ; 5mg de fraction doublet ; 1,7mg de fraction glycosylée-doublet et 1,4mg de fraction « pure » ont été obtenues. Les trois premières fractions ont été réservées pour l'immunisation des souris et des lapins (Cf. Chapitre III) et la dernière fraction dite « pure » a été utilisée pour les tests biochimiques.

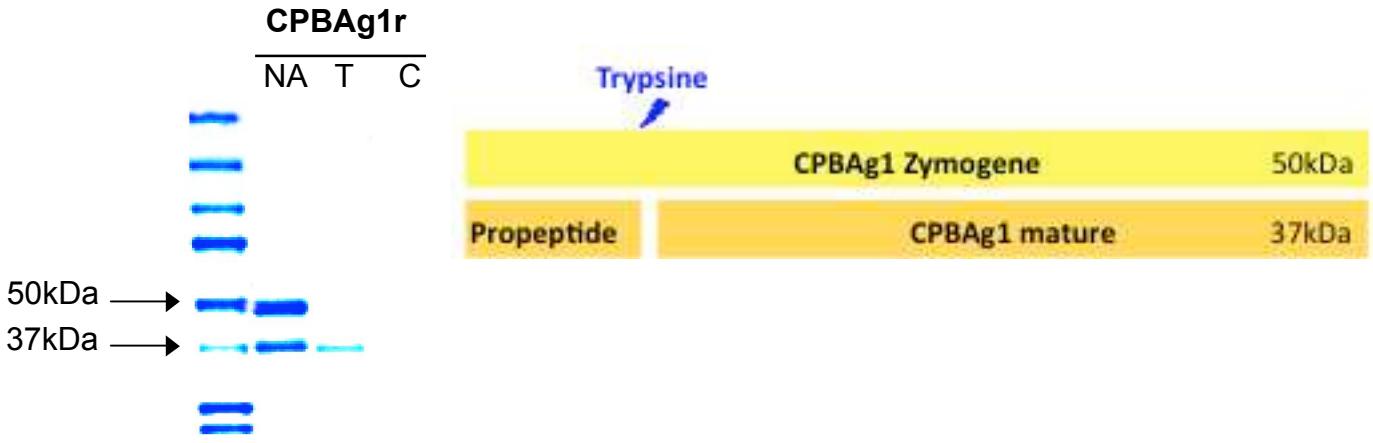


Figure R.I.13 : Maturation de CPBAg1r
Hydrolyse à la trypsine (T) et à la chymotrypsine (C) de 500ng de CPBAg1r révélé par coloration au bleu de coomassie associé à une représentation schématique de CPBAg1r. En contrôle, la protéine non activée est déposée (NA).

B. Propriétés biochimiques des CPBAg

Au même titre que de nombreuses enzymes digestives (*in* Rawlings *et al.*, 1998), CPBAg1 et CPBAg2 sont produites sous forme de zymogène inactif. La libération de leur propeptide respectif engendre leur maturation qui est indispensable pour révéler l'activité de ces deux métalloprotéines zinc-dépendantes. Le clivage des propeptides s'effectue soit par auto-activation soit par l'action d'endopeptidases.

1. Maturation des CPBAgr

De façon générale, les formes activées des pro-enzymes digestives sont produites par clivage à la trypsine (Neurath *et al.*, 1976) qui clive la liaison peptidique côté carboxylique des résidus arginine et lysine. La pro-enzyme CPBAg1r (produite en système baculovirus) est l'exemple type de ce processus d'activation. Le clivage de son propeptide par la trypsine, engendre la maturation de la pro-enzyme de 50kDa en forme active migrant à 37kDa (figure R.I.13). Ce site de clivage a été identifié par séquençage amino-terminal (Lavazec *et al.*, 2005).

Pour savoir si l'activation de la pro-enzyme CPBAg2 est régie selon le même processus, des analyses *in silico* et *in vitro* ont été effectuées.

a. Analyse *in silico* des sites potentiels de clivage des zymogènes

L'analyse *in silico* de la séquence zymogénique de CPBAg2 met en évidence de nombreux sites potentiels de clivage aussi bien par la trypsine que par la chymotrypsine.

La séquence peptidique de CPBAg2 expose 28 arginines (R) et 15 lysines (K) potentiellement tous clivables par la trypsine qui coupe la liaison peptidique côté carboxylique de ces résidus excepté lorsqu'ils sont suivis d'un résidu proline (P) (le cycle de ce radical empêchant le clivage). Ce cas de figure est observé à trois reprises : KP, observés à la position 174-175 et RP observées en positions 153-154 et 243-244 ramenant à 40 le nombre de sites potentiellement clivables par la trypsine sur la proCPBAg2.

La séquence peptidique de CPBAg2 expose également 12 Phénylalanines (F), 25 Tyrosines (Y) et 8 tryptophanes (W) potentiellement tous reconnaissables par la chymotrypsine qui coupe la liaison peptidique côté carboxylique de ces résidus, à l'exception de 2 bloqués par la proline : FP en position 3-4 et, YP en position 316-317, ramenant à 43 le nombre de sites potentiellement clivables par la chymotrypsine sur la proCPBAg2.

L'analyse *in silico* de la séquence zymogénique de CPBAg1 a été effectué pour mettre en évidence les sites potentiels de reconnaissance par la chymotrypsine, celui à la trypsine étant déjà connu (Cf. ci-dessus).

La séquence peptidique de CPBAg1 expose 16 Phénylalanines (F), 22 Tyrosines (Y) et 8 tryptophanes (W) potentiellement tous clivables par la chymotrypsine excepté lorsqu'ils sont suivis d'un résidu proline (P). Ce cas de figure est observé à deux reprises : FP en position 261-

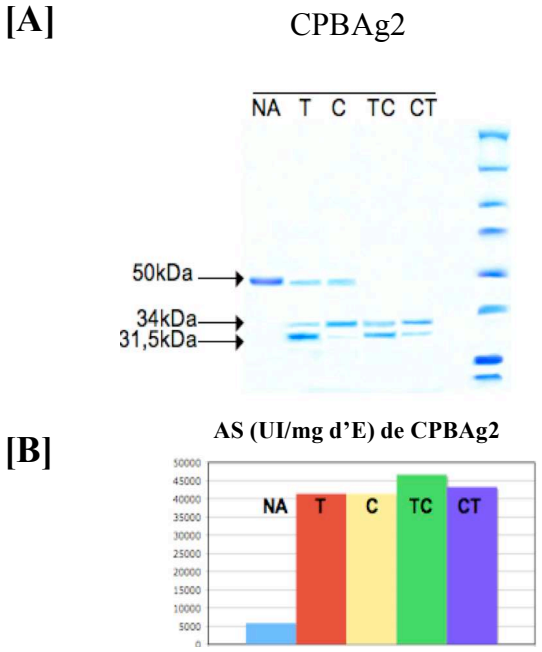
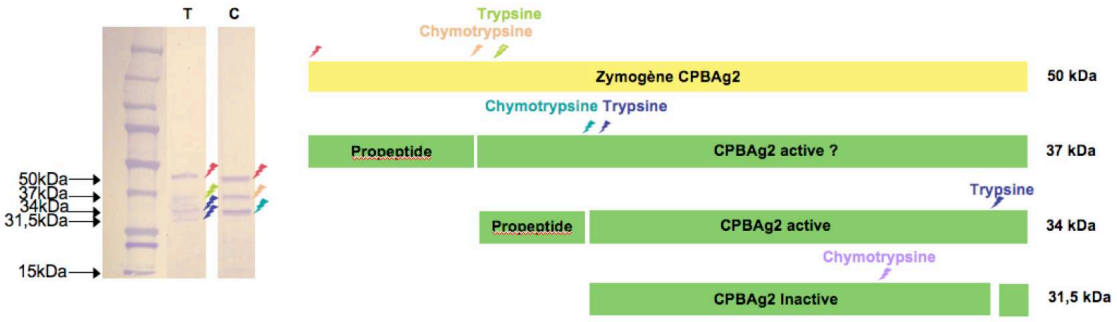


Figure R.I.14 : Comparaison des formes et activités de CPBAg2r après différents traitements d'activation

[A]. Hydrolyse de 500µg de CPBAg2r à la trypsine (ratio 1/50) et à la chymotrypsine (ratio 1/60), 30 minutes de traitement de façon indépendante (trypsine T, chymotrypsine C) ou successive (trypsine puis chymotrypsine TC, chymotrypsine puis trypsine CT) coloré au bleu de coomassie.

[B]. Activités spécifiques (AS) des fractions issues de ces différents traitements de maturation.



Séquences amino-terminales :
De la forme migrant à 37kDa engendrée par la trypsine : RVTPSQ…
De la forme migrant à 37kDa engendrée par la chymotrypsine : GTKRVT…
De la forme migrant à 34kDa engendrée par la trypsine : SHPNSS…
De la forme migrant à 34kDa engendrée par la chymotrypsine : KSHPNS…

Figure R.I.15 : Identification des sites de clivage engendrés par la maturation de CPBAg2r

15 minutes d'hydrolyse à la trypsine (T ; ratio 1/50) et à la chymotrypsine (C ; ratio 1/60) sur CPBAg2r associé à une représentation schématique des données de séquençage selon la méthode d'Edman.

262 et, WP en position 316-317, ramenant à 44 le nombre de sites potentiellement clivables par la chymotrypsine sur la proCPBAg1.

Comme la trypsine et la chymotrypsine sont présentes *in vivo* à la suite de la prise d'un repas sanguin par le moustique, différents tests de maturation ont été conduits afin d'identifier les sites de la séquence peptidique de CPBAg2 réellement clivés par ces enzymes.

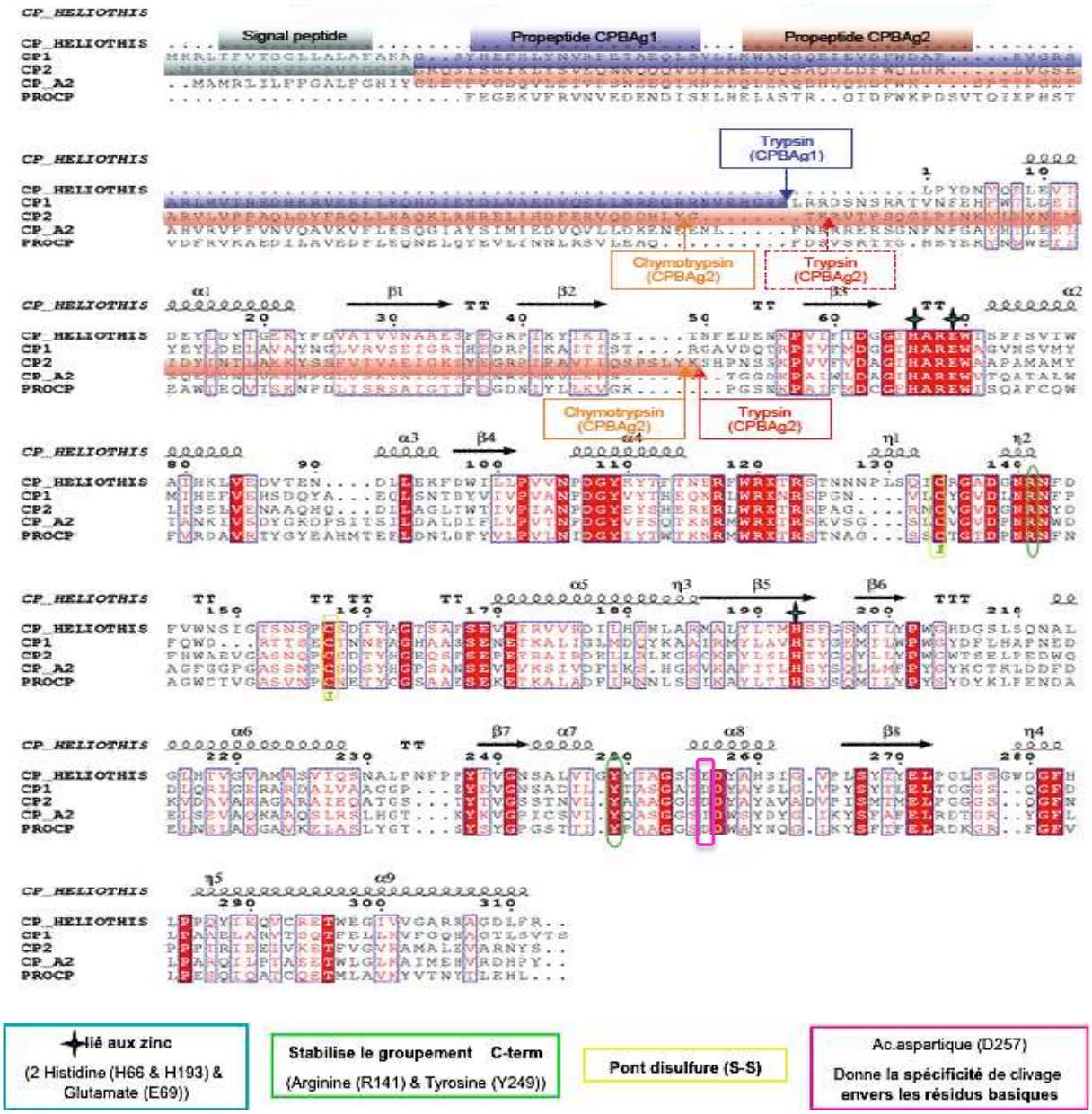
b. Activation de CPBAg2r par la trypsine et la chymotrypsine

En vue de connaître la sensibilité de CPBAg2 à la trypsine et à la chymotrypsine, des incubations de la pro-enzyme CPBAg2r ont été réalisées soit en parallèle soit successivement avec ces deux enzymes purifiées.

Ces incubations révèlent que la protéine CPBAg2r est clivée quelque soit l'enzyme d'activation. La trypsine engendre préférentiellement une forme migrant à 31,5kDa alors que la chymotrypsine engendre une forme à 34kDa de masse moléculaire apparente (figure R.I.14 [A]).

Le traitement successif par les deux enzymes, quelque soit l'ordre, trypsine puis chymotrypsine ou l'inverse conduit à un équilibre relatif entre les forme 34 kDa et 31,5kDa avec disparition totale de la forme zymogène.

Les activités spécifiques des formes maturées à l'issue de ces différents traitements sont comparables entre elles. A l'inverse, celle de la forme 50kDa non traitée c'est à dire lorsque la protéine est sous forme de zymogène est très faible. Le clivage du propeptide de CPBAg2r



Recherche de séquences (NCBI) : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Multi-alignement de séquence (TCOFFEE) : http://www.igs.cnrsmrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi
Analyse des alignements et traitements des données : http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
Superposition des alignements à la structure (ESPRIPT) : http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/

Figure R.I.16 : Alignement structurel de CPBAg1 et CPBAg2
Alignement des séquences de la carboxypeptidase d'*Heliothis zea ou Helicoverpa zea*, des carboxypeptidases B d'*Anopheles gambiae* : CPBAg1 et CPBAg2, de la carboxypeptidase A2 pancréatique humaine et de la carboxypeptidase B de porc.
La structure tridimensionnelle de la carboxypeptidase d'*Heliothis zea* (pdb : 2C1C) a été utilisée pour l'alignement structural (héliceα et feuilletβ).

apparait donc indispensable pour l'acquisition de l'activité biochimique de l'enzyme (figure R.I.14 [B]).

Ces expériences montrent que CPBAg2r est activable par les deux enzymes alors que CPBAg1r ne l'est que par la trypsine. En effet, le traitement de CPBAg1 par la chymotrypsine dégrade totalement la protéine (Cf. figure R.I.13).

c. Identification des sites effectifs de maturation de la pro-enzyme CPBAg2

De manière à identifier les sites de clivages effectifs sur la séquence peptidique de la pro-enzyme de CPBAg2 engendrés par les différents traitements de maturation, le séquençage amino-terminal selon la méthode d'Edman a été réalisé sur les fragments issus de l'action de la trypsine et de la chymotrypsine.

Afin d'obtenir une indication sur la dynamique de l'activation, une hydrolyse ménagée de CPBAg2 par chacune de ces deux enzymes a été réalisée. Comme le montre la figure R.I.15, l'hydrolyse ménagée par la trypsine engendre 4 formes de masse moléculaire apparente de 37kDa, 34kDa, 31,5kDa et 15kDa tandis que l'hydrolyse ménagée par la chymotrypsine engendre 3 formes de masse moléculaire apparente 37kDa, 34kDa et 15kDa.

Les formes maturées de CPBAg2r migrant à 37kDa observées quelque soit la digestion enzymatique réalisée, sont dues aux clivages respectifs de ces deux enzymes sur des sites distants de 3 aminoacides sur la séquence de CPBAg2 (figure R.I.16). De la même façon, les formes observées à 34kDa sont dues aux clivages respectifs de ces deux enzymes sur des sites distants de seulement 1 aminoacide sur la séquence de CPBAg2 (figure R.I.16).

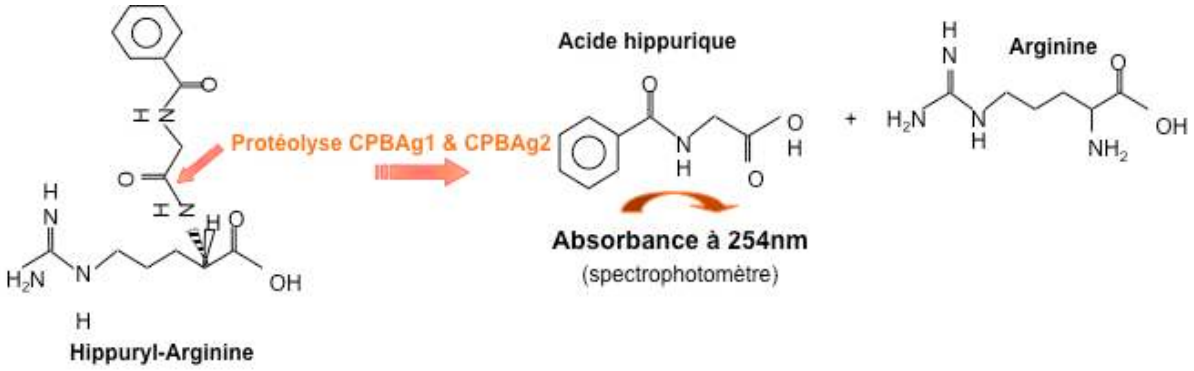


Figure R.I.17 : Schéma réactionnel de l'activité des CPBAg envers le substrat Hippuryl-arginine

Les données de séquençage révèlent que l'extrémité amino-terminale des formes de masses moléculaires apparentes de 34kDa, 31,5kDa et 15kDa engendrées par la trypsine est identique et se superpose à l'extrémité amino-terminale des fragments de 34kDa et 15kDa engendrés par la chymotrypsine. Les formes migrantes à 34kDa subissent donc vraisemblablement un autre clivage coté carboxy-terminal de la séquence peptidique. Une étude par spectroscopie de masse type MS/MS de ces formes permettrait d'identifier le ou les derniers sites de clivage.

Face à cette possibilité de maturation par la trypsine et la chymotrypsine de CPBAg2, nous avons ensuite déterminé si ces deux types de maturation pouvaient engendrer des variations sur l'activité enzymatique de CPBAg2 et ses caractéristiques biochimiques. Pour le savoir, des tests enzymatiques menant à la caractérisation des paramètres cinétiques (K_m, V_m...) ont été entrepris à l'issue de chacune de ces deux maturations.

2. Caractérisation biochimique des CPBAgr

a. Caractérisation des paramètres enzymatiques

In vivo, les carboxypeptidases de la famille B ont la spécificité de cliver les résidus basiques : arginine (R) et lysine (K) en position carboxy-terminale des peptides.

Les activités enzymatiques des CPBAgr sont de ce fait, mesurées grâce au clivage de substrats synthétiques tels que l'hippuryl-arginine et l'hippuryl-lysine libérant l'acide hippurique qui permet de visualiser l'avancement de la réaction (figure R.I.17). L'absorbance de l'acide hippurique (reflet de l'activité enzymatique), est mesurée à 254nm à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté à 25°C.

Enzymes	CPBAg1 Activation Trypsine		CPBAg2 Activation Trypsine		CPBAg2 Activation Chymotrypsine	
Substrate	Hip-Arg	Hip-Lys	Hip-Arg	Hip-Lys	Hip-Arg	Hip-Lys
K_m (mM)	0,897 ± 0,047	1,062 ± 0,057	0,317 ± 0,070	ND	0,440 ± 0,075	ND
Vm (µmol d'HA/L/min)	102 ± 2,17	55,3 ± 8,3	83,5 ± 0,15	ND	126,9 ± 0,15	ND
k_{cat} (s^{-1})	7,17 ± 0,15	7,81 ± 1,18	10,31 ± 1,82	ND	39,90 ± 4,55	ND
k_{cat}/K_m ($M^{-1}.s^{-1}$)	8402,04 ± 63,38	7402,65 ± 71,69	33542,42 ± 427,18	ND	70353,81 ± 1242,90	ND
R^2	0,98 0,98 0,99	1 0,99 0,98	0,99 0,96 0,99	ND	0,97 0,96 0,98	ND

Figure R.I.18 : Table des paramètres enzymatiques de CPBAg1 et CPBAg2 préalablement activées
ND : non détecté

Les tests enzymatiques sont effectués au pH physiologique du tube digestif des anophèles (pH = 7,6) (Billker *et al.*, 2000; pH = 7,58 pour *A. stephensi*,).

Pour s'affranchir au maximum du biais expérimental lors des prises de mesures biochimiques, les dosages enzymatiques s'effectuent sur une gamme de variation de quantité de substrat allant de 0,075mM à 0,9mM pour une concentration d'enzyme donnée, le test enzymatique ne permettant pas d'étendre plus largement la gamme de dilution. De plus, chaque mesure est « tripliquée » avec des lots d'enzymes activées et de substrats différents.

L'établissement des paramètres enzymatiques à savoir la vitesse de réaction maximale de l'enzyme (V_m) et la constante de Michaelis (K_m) reflet de son affinité par rapport aux différents substrats testés est obtenue par extrapolation sur les doubles inverses et les Eadie Hofstee (Cf. figure M.2 c et d). Les droites obtenues quelle que soit la représentation effectuée ont un coefficient de régression linéaire R^2 proche de 1 traduisant la significativité des résultats obtenus. L'extrapolation des paramètres enzymatiques à partir des représentations citées ci-dessus est présentée figure R.I.18.

Ces données permettent de mettre en évidence des différences importantes entre les deux enzymes CPBAg1 et CPBAg2 en terme :

- De spécificité de substrat :

- CPBAg2r clive l'arginine mais pas la lysine dans nos conditions expérimentales ($K_m^{\text{CPBAg2-tryps}}$ = 0,317 ± 0,070 mM ; $k_{\text{cat}}^{\text{CPBAg2-tryps}}$ = 10,31 ± 1,82 s^{-1} et $K_m^{\text{CPBAg2-chymo}}$ = 0,440 ± 0,075 mM ; $k_{\text{cat}}^{\text{CPBAg2-chymo}}$ = 39,90 ± 4,55 s^{-1}).

- CPBAg1r clive indifféremment les deux substrats ($K_m^{\text{CPBAg1-arg}}$ = 0,897 ± 0,047 mM ; $k_{\text{cat}}^{\text{CPBAg1-arg}}$ = 7,17 ± 0,15 s^{-1} et $K_m^{\text{CPBAg1-lys}}$ = 1,062 ± 0,057 mM ; $k_{\text{cat}}^{\text{CPBAg1-lys}}$ = 7,81 ± 1,18 s^{-1}).

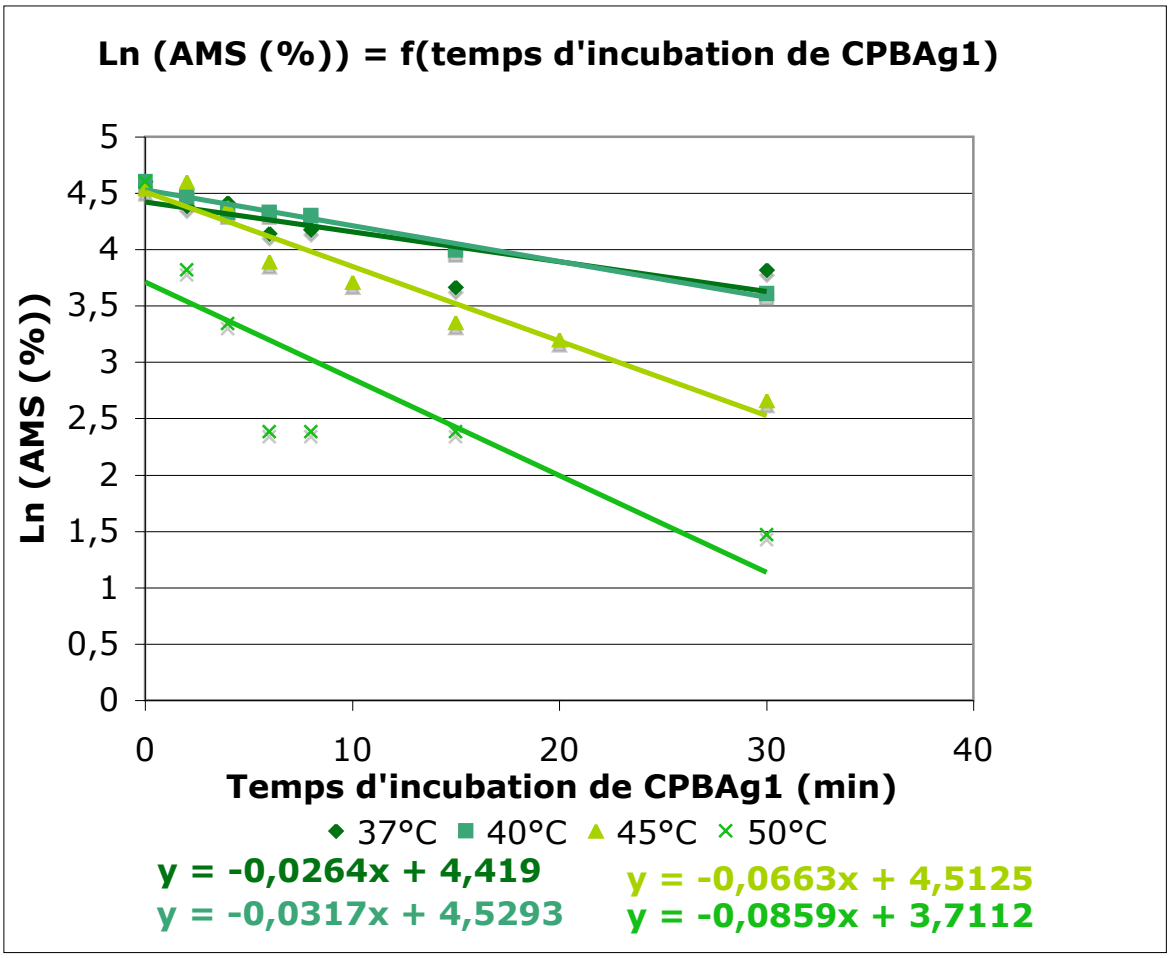


Figure R.I.19 : Caractérisation de la sensibilité à la chaleur de CPBAg1r
Caractérisation en fonction du temps d'incubation à 37°C, 40°C, 45°C et 50°C en minutes représenté par le logarithme népérien de l'activité moléculaire spécifique (AMS) en pourcentage d'activité résiduelle de CPBAg1 en fonction du temps d'incubation aux différentes températures en minutes.

Extrapolation des constantes d'inactivations K_{inact} aux différentes températures :

$K_{inact}^{37°C} = 0{,}0264/min$ $K_{inact}^{45°C} = 0{,}0663/min$
$K_{inact}^{40°C} = 0{,}0317/min$ $K_{inact}^{50°C} = 0{,}0859/min$

- D'affinité pour l'arginine : CPBAg2 est plus affine que CPBAg1 ($K_m^{\text{CPBAg2-tryps}}$ = 0,317 ± 0,070 mM ; $K_m^{\text{CPBAg2-chymo}}$ = 0,440 ± 0,075 mM et $K_m^{\text{CPBAg1-tryps}}$ = 0,897 ± 0,040 mM).

- De turn-over (équivalent aux nombres de cycles de l'enzyme, ici équivalent au nombre de clivages effectués /sec). Jusqu'à cinq fois plus important pour CPBAg2 ($k_{\text{cat}}^{\text{CPBAg2-tryps}}$ = 10,31 ± 1,82 s^{-1} et $k_{\text{cat}}^{\text{CPBAg2-chymo}}$ = 39,90 ± 4,55 s^{-1}) comparé à celui de CPBAg1 ($k_{\text{cat}}^{\text{CPBAg1-tryps}}$ = 7,17 ± 0,15 s^{-1}).

La maturation activatrice de CPBAg2r engendre également des différences : la vitesse de réaction qui est quadruplé lorsque la chymotrypsine est l'enzyme maturatrice ($k_{\text{cat}}^{\text{CPBAg2-tryps}}$ = 10,31 ± 1,82 s^{-1} et $k_{\text{cat}}^{\text{CPBAg2-chymo}}$ = 39,90 ± 4,55 s^{-1}). La différence d'affinité pour l'arginine est quand à elle négligeable quelque soit l'enzyme d'activation ($K_m^{\text{CPBAg2-tryps}}$ = 0,317 ± 0,070 mM et $K_m^{\text{CPBAg2-chymo}}$ = 0,440 ± 0,075 mM).

Pour conclure, la spécificité de CPBAg2 pour l'arginine (≠ CPBAg1 qui peut cliver l'arginine et la lysine) permettra de discriminer la contribution de chacune des CPBAg dans l'établissement de l'activité carboxypeptidasique globale *in vivo* chez le moustique. Ces différences de spécificité de substrat suggèrent un rôle fonctionnel potentiellement différent entre CPBAg1 et CPBAg2.

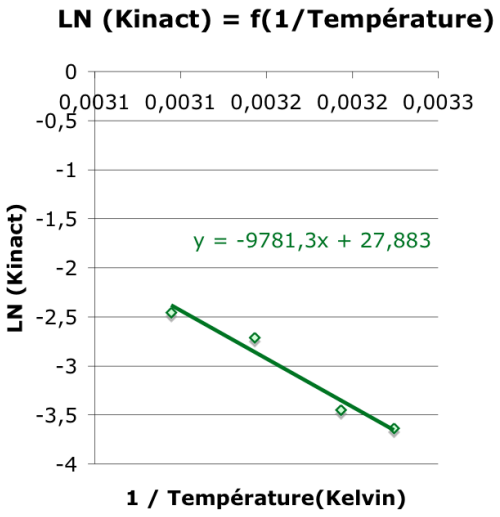


Figure R.I.20 : Détermination de l'énergie d'activation de CPBAg1r
Ln de K_{inact} en fonction de 1/ Température en Kelvin (Extrapolation de l'énergie d'activation : Ea = 81,3kJ/mol).

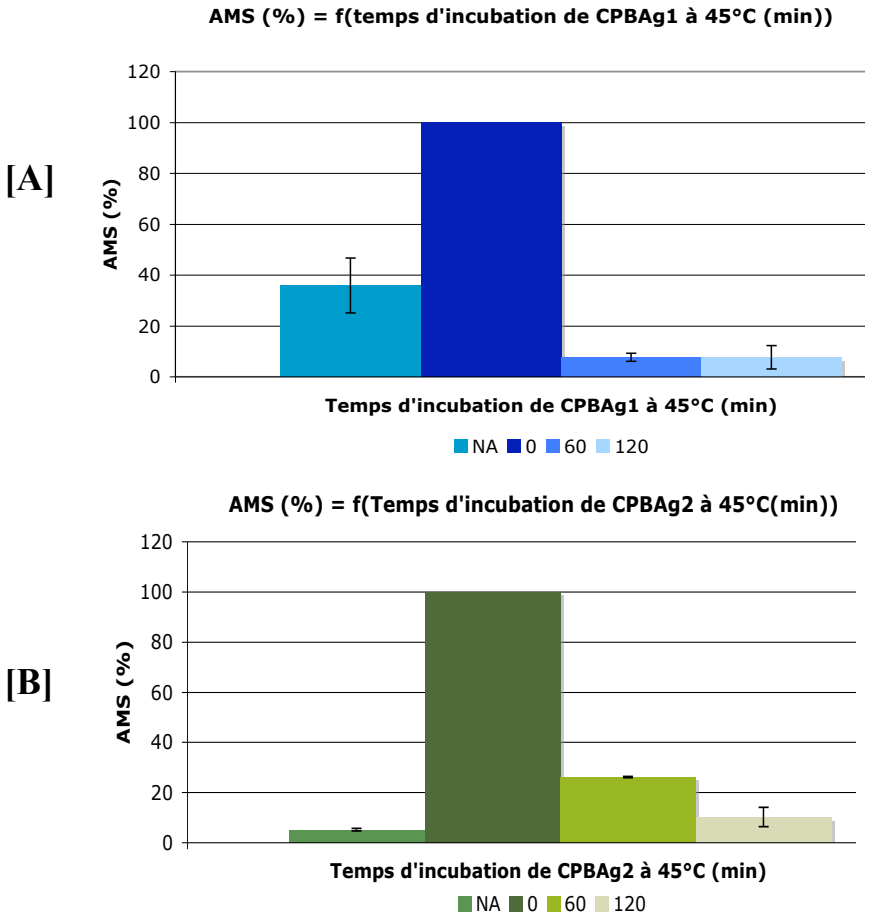


Figure R.I.21 : Comparaison des sensibilités thermiques des CPBAg
Activité Moléculaire Spécifique (AMS) de CPBAg1 [A] et CPBAg2 [B] en pourcentage d'activité résiduelle avant activation par la Trypsine (NA) et après activation (ratio 1/60) et incubation à 45°C pendant 0, 60 et 120 min.

b. Caractérisation des sensibilités à la chaleur

Des résultats précédents du laboratoire, suggéraient que les CPBAg avaient des sensibilités différentes à la chaleur, majoritairement observées à 45°C. Cette caractéristique devait permettre de discriminer l'activité respective de chaque CPBAg dans l'activité globale *in vivo*.

Une analyse plus fine a été réalisée en mesurant à 25°C l'activité moléculaire spécifique (AMS) de CPBAg1 préalablement activée après différentes cinétiques d'incubation à 37, 40, 45°C et 50°C, représenté figure R.I.19.

L'absence de récupération de l'activité maximale de la protéine après incubation révèle que son inactivation thermique se fait de façon irréversible et qu'elle suit une loi d'ordre 1, montrée par les droites obtenues sur la figure R.I.19 représentant ln (AMS) = f(t) équivalent à ln (Vi) = f(t). La valeur absolue de chacune des pentes ainsi représentées donne les constantes d'inactivations thermiques propres à chaque température. Par exemple, $K_{inact}^{45°C}$ = 0,06/min, équivalent à une inhibition de l'activité enzymatique de 6% par minute, si le système était idéal.

La réitération de l'expérience à différentes températures a permis de tracer : ln (K_{inact}) = f (1/T) représenté figure R.I.20 afin de déterminer l'énergie d'activation : Ea, équivalent à la valeur absolue de la pente que multiplie R : la constante des gaz parfaits.

Ici Ea = 81,3kJ/mol, reflétant la rapidité de la réaction enzymatique.

La sensibilité thermique de CPBAg2 a été étudiée de la même façon (figure R.I.21), montrant une plus grande résistance à ce traitement que CPBAg1, avec 26% d'activité résiduelle après une heure d'incubation à 45°C, contre seulement 6% pour CPBAg1. De plus, l'activité des CPBAg est d'autant plus inhibée que le temps d'inactivation a été long (figure R.I.21).

	CPBAg1		CPBAg2	
	% d' identité	% de similarité	% d' identité	% de similarité
Heliothis zea (2C1C)	35	54	38	54
CPB-porcine (1nsa)	31	51	29	51
CP-A2 humaine (1AYE)	31	54	31	54
Helicoverpa armigera (1jqgA)	33	55	34	53
CPBAg1	100	100	34	57
CPBAg2	34	57	100	100

Figure R.1.22 : Table des pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences protéiques utilisées pour l'alignement structural de la figure R.I.16

Code PDB entre (), Blast NCBI.

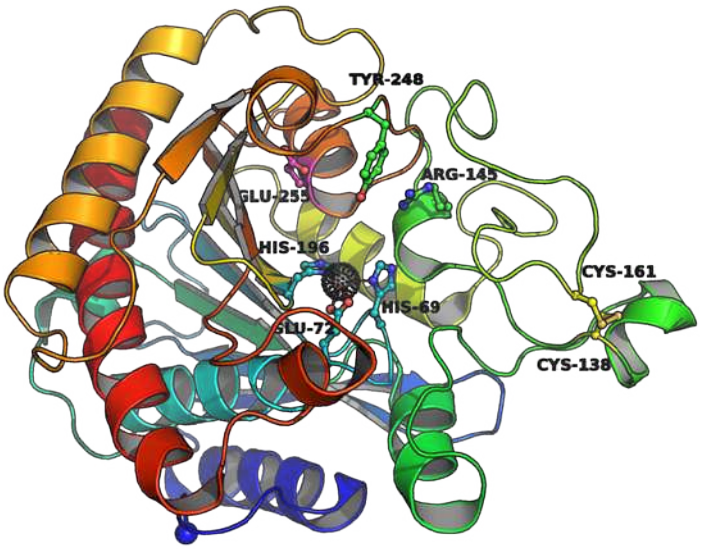
On remarque également que le fait de figer la réaction, en refroidissant les échantillons directement sur glace n'a pas d'incidence sur la perte d'activité par rapport à une renaturation douce, où les échantillons sont laissés à température ambiante avant le test d'activité.

La différence de sensibilité à la chaleur pourrait être utilisée comme outil permettant de discriminer la participation respective des deux enzymes dans l'activité carboxypeptidase globale lors de la digestion d'un repas sanguin par le moustique. Cependant, cette analyse nécessitant une quantité trop importante de matériel de départ, cet outil n'a pas été exploité.

c. Alignements structuraux et conformations tridimensionnelles de CPBAg1 et CPBAg2

Pour affiner la caractérisation des CPBAg non cristallisées à ce jour, l'identification d'homologies *in silico* a été réalisée sur la base de l'étude structure-fonction d'une carboxypeptidase de lépidoptère *Heliothis zea* (pdb : 2C1C) par Bayes *et al*., en 2005. La recherche de séquence homologue s'effectue sur NCBI où les pourcentages de similarité et d'identité sont reportés dans la figure R.I.22. Les séquences protéiques des carboxypeptidases B d'*H. zea*, de porc et la carboxypeptidase A2 humaine sont alignées avec les séquences des CPBAg à l'aide du serveur TCOFFEE. Après analyse et traitement des données, l'alignement des séquences est superposé à la structure secondaire de la CPB d'*H. zea* dont la structure est déjà connue (Cf. figure R.I.16). Dans cette figure, les acides aminés de fonction similaire sont en rouge sur fond blanc et ceux identiques en blanc sur fond rouge. Les différentes parties enzymatiques

A



B

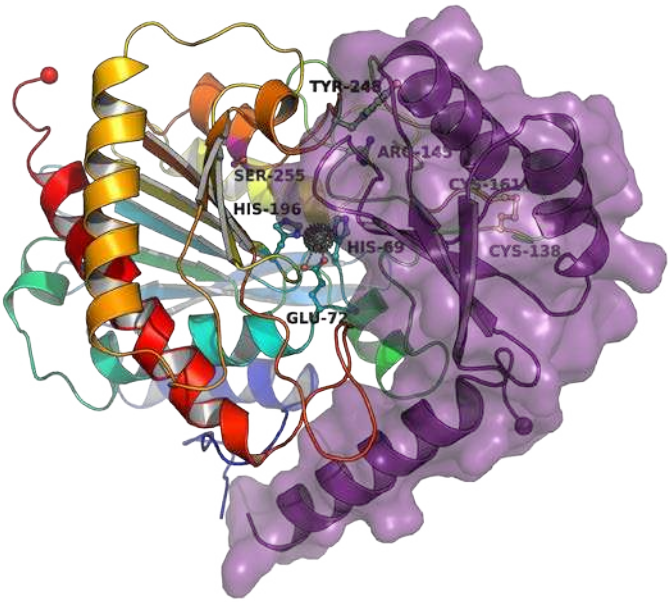


Figure R.I.23 : Structures tridimensionnelles des carboxypeptidases B

[A] : CPB d*H. zea* (2C1C)

[B] : CPB d*H. armigera* (1jqg)

Recherche des séquences sur NCBI, représentation et annotations des structures avec le logiciel Pymol.

des CPBAg sont mises en relief par surlignement en gris pour leurs peptides signal, et en violet et en rouge pour les propeptides respectifs de CPBAg1 et CPBAg2.

Les acides aminés importants sont regroupés suivant leurs rôles dans les sites actifs respectifs des enzymes. La chélation du zinc par deux histidines (H66 et H193) et un glutamate (E69) ; ceux stabilisant le groupement carboxy-terminal : 1 arginine (R141) et 1 tyrosine (Y249) ; et les 2 cystéines (C134 et C157) réalisant très probablement un pont disulfure, sont fortement conservés entre les différentes enzymes. Une cystéine supplémentaire est aussi observée dans chacune des séquences des deux CPBAg : au niveau du peptide signal de CPBAg1 en position 10 et en position 301 c'est à dire dans la région carboxy-terminale de CPBAg2. Ces cystéines ne sont pas conservées entre les différentes espèces à l'inverse des deux premières.

La fonction acide de l'aspartate (D256) donnant la spécificité de clivage envers les résidus basiques de la classe B est également conservée entre les CPBAg. Les sites de clivage des différentes enzymes maturatrices des CPBAg sont également indiqués par des flèches en bleu et rouge pour le clivage engendré par la trypsine respectivement sur CPBAg1 et CPBAg2, et en orange par ceux engendrés par la chymotrypsine.

Ces homologies reflètent la forte conservation à travers l'évolution des acides aminés vitaux pour la fonction catalytique responsables de la fonction et spécificité enzymatique des carboxypeptidases.

Pour avoir un aperçu de la structure tridimensionnelle que peuvent adopter les carboxypeptidases dans l'espace, le logiciel Pymol (Delano, 2002) a été utilisé sur les structures des carboxypeptidases B d'*H. zea* (2C1C) et d'*H. armigera* (1jqg) (figure R.I.23). Les structures cristallisées sous forme active (Apo, sans inhibiteur) pour la première et sous sa forme

zymogénique (Apo) pour la seconde révèlent l'encombrement stérique de l'entrée du site actif par le zymogène.

d. Conclusions

Pour conclure, ce chapitre a exploré les propriétés biochimiques des carboxypeptidases pour mettre en évidence des similarités et des différences entre les deux peptidases.

Ces protéines, toutes deux produites sous formes de zymogènes inactifs (forme migrant à 50kDa), peuvent être activées par maturation à la trypsine. La chymotrypsine quand à elle, active CPBAg2 mais dégrade totalement CPBAg1. Comme indiqué précédemment, le processus dynamique du métabolisme digestif du moustique produit en outre des trypsines et chymotrypsines dans le bolus intra-stomacal du moustique (Briegel *et al.*, 1975; Cf. Introduction). Si les données d'activation de CPBAg2r se confirment *in vivo*, la capacité d'activation et donc d'activité physiologique de CPBAg2 serait plus importante que celle de CPBAg1. De la même façon, un processus de régulation de l'activité de CPBAg1 est aussi suggéré par sa sensibilité à la chymotrypsine. De plus, l'existence de plusieurs trypsines et chymotrypsines dans le bolus intra-stomacal du moustique lors de la digestion pourrait également moduler l'activation et la sensibilité des CPBAg (Cf. Discussion § I.B). L'étude de leur cinétique d'apparition au cours de la digestion du repas sanguin (Cf. Chapitre II § A.1.b) permettra de comprendre la dynamique des deux protéines afin de les positionner dans la mécanistique du processus digestif.

Les paramètres enzymatiques des CPBAg présentent plusieurs différences, avec une affinité pour l'arginine plus forte de CPBAg2 comparée à celle de CPBAg1 et une vitesse de réaction allant jusqu'à 4 fois plus vite pour CPBAg2. Mais, la différence la plus notable entre les

enzymes est la spécificité de substrat de CPBAg2, ne clivant que l'arginine à l'inverse de CPBAg1 qui peut cliver les deux acides aminés basiques : lysine et arginine. Comme explicité précédemment, cette spécificité pourra servir d'outils pour discriminer l'activité respective de chacune des deux carboxypeptidases dans des extraits *in vivo*. Au niveau du moustique, de telles nuances pourraient engendrer l'implication des CPBAg dans des processus physiologiques différents, reflétant des rôles distincts pour chaque enzyme *in vivo*. L'exploration du ou des rôles fonctionnels des CPBAg *in vivo* (Cf. Chapitre II) tendra à vérifier cette hypothèse. En plus d'être des actrices incontestables de la digestion, l'analyse fonctionnelle des deux peptidases permettra de documenter leurs implications dans le développement ovarien, régulé par l'ingestion du repas sanguin, qui pourrait dépendre des ressources en lysine et/ou arginine libérées par les CPBAg.

Après avoir réalisé la caractérisation enzymatique des protéines *in vitro*, l'étude des CPBAg produites *in vivo* dans le tube digestif d'*Anopheles gambiae* a été réalisée. Comme énoncé précédemment l'exploration ciblera dans le chapitre II les rôles respectifs des CPBAg sur la physiologie du développement ovarien du moustique. Elle vise également à déterminer la contribution respective de chaque enzyme sur le développement de *P. falciparum*.

Les structures secondaires et tridimensionnelles modélisées sur la base d'homologie de séquences avec des CPB déjà cristallisées permettent d'obtenir un aperçu de la structure tridimensionnelle des peptidases globulaires que sont les CPB. La cristallisation des CPBAg engendrera un jeu de données permettant de connaître la structure réellement adoptée par chaque enzyme. Cet outil permettra le design d'inhibiteur spécifique et le crible de banque de données afin de sélectionner des molécules inhibitrices de chaque CPBAg.

Chapitre II

Chapitre II : Rôles biologiques de CPBAg1 et CPBAg2

Comme présenté dans l'introduction, l'image actuelle du processus digestif est une dynamique coordonnée de l'action d'endopeptidases et d'exopeptidases agissant au cours de deux phases majeurs de la digestion d'un repas sanguin: une première phase précoce suivie d'une seconde phase plus tardive. Les endopeptidases trypsine et chymotrypsine sont présentes au cours de ces deux phases. Pour rappel, parmi les 7 trypsines digestives identifiées chez *A. gambiae*, les deux 1ères sont précoces, les trypsines 3 et 7 sont tardives et la trypsine 4 est constitutive. De même, parmi les trois chymotrypsines identifiées chez *A. gambiae*, les deux 1ères sont précoces faisant suite aux trypsines 1 et 2 et la chymotrypsine 3 est tardive.

Parmi les exopeptidases, les données sur les aminopeptidases prédisent 3 ou 4 protéines selon les études (Dinglasan *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008). Les aminopeptidases sont présentes au cours de la seconde phase de digestion du repas sanguin, dite tardive. Les 5 carboxypeptidases de la famille A sont exprimées dans le tube digestif d'anophèle mais seule l'expression de la première a été documentée plus finement. Dès l'ingestion d'un repas et même s'il ne contient pas de protéine, le transcrit de la carboxypeptidase A1 est rapidement induit dès la distension du tube digestif (Edwards *et al.*, 1997). En ce qui concerne les carboxypeptidases B, l'expression de *cpbAg1* et *cpbAg2* a été étudiée après le repas sanguin et l'activité globale des protéines codées par ces gènes présente un pic 24h après l'ingestion de sang.

Cependant, la cinétique d'apparition des CPBAg restait inexplorée. D'après les données enzymatiques du chapitre I, des endopeptidases (trypsines et/ou chymotrypsines) sont requises pour la maturation et l'activité des CPBAg, leur activité pourraient donc faire suite aux trypsines précoces. Pour savoir à quel moment et sous quelle forme apparaissent chacune des deux CPBAg

		ST	EQ	MS	Formula	F%
W	Trp	12	79	204	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	1.3
F	Phe	9	63	165	$C_9H_{11}NO_2$	4.0
Y*	Tyr	9	57	181	$C_9H_{11}NO_3$	3.3
L	Leu	7	33	131	$C_6H1_3NO_2$	7.6
H	His	1	33	155	$C_6H_9N_3O_2$	2.9
V	Val	4	25	117	$C_5H_{11}NO_2$	6.8
C*	Cys	9	25	121	$C_3H_7NO_2S$	3.3
I	Ile	11	20	131	$C_6H_{13}NO_2$	3.8
K	Lys	10	19	146	$C_6H_{14}N_2O_2$	7.2
M	Met	9	19	149	$C_5H_{11}NO_2S$	1.8
R	Arg	10	18	174	$C_6H_{14}N_4O_2$	4.2
T	Thr	6	6	119	$C_4H_9NO_3$	6.2
S	Ser	3	15	105	$C_3H_7NO_3$	8.1
G	Gly	4	14	75	$C_2H_5NO_2$	7.4
A	Ala	1	13	89	$C_3H_7NO_2$	7.4
P	Pro	4	12	115	$C_5H_9NO_2$	5.0
Q	Glt	2	9	146	$C_5H_{10}N_2O_3$	3.7
E	Glu	1	8	147	$C_5H_9NO_4$	5.8
N	Asn	1	4	132	$C_4H_8N_2O_3$	4.4
D	Asp	1	1	133	$C_4H_7NO_4$	5.9

Table notes: Essential and conditionally essential amino acids are highlighted by a gray background; Amino acids are shown as 1 and 3-letters letter codes. ST, the numbers of enzymatic steps required for the synthesis in autotrophs. Data were summarized from (Boudko, 2010; Craig and Weber, 1998; Neidhardt et al., 1990); precursors and synthesis cost from(Stryer, 1989); EQ, total energy of synthesis in ATPs equivalents, estimated as ATP, NAD, NADPH yield + consumption; MS, molecular mass; F%, overage frequency per protein sequence residue; Y* and C*, are conditionally essential for which F and M, are essential metabolic precursors; Ur, indicates that part of essential arginine can be recycled via urea cycle intermediates.

Figure R.II.1 : Table des acides aminés nécessaires et indispensables au développement des insectes
Source : Boudko *et al*., 2012.

au cours de la digestion, ce deuxième chapitre explore la cinétique d'apparition des deux enzymes lors de la digestion du repas sanguin du moustique afin de les corréler aux processus et besoins physiologiques des moustiques.

Dans le tube digestif du moustique, les CPBAg libèrent l'arginine et la lysine des protéines et peptides du bolus sanguin. Elles enrichissent ainsi le contenu en acides aminés essentiels présents dans le sang ou libérés par l'action d'autres enzymes protéolytiques telles que les carboxypeptidases A et les aminopeptidases (figure R.II.1). L'arginine et la lysine sont impliqués dans des processus vitaux, tels que les défenses immunitaires avec l'oxyde nitrique NO (Nappi *et al.*, 2000), les mécanismes de réserve énergétique (*in* Clements, 1999) et la vitellogénèse (Hansen *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2007) des insectes.

D'autre part, le rôle essentiel de CPBAg1 a été établi à la fois sur le développement de *P. falciparum* et sur les capacités reproductives des moustiques (Lavazec *et al.*, 2007). Ces expériences ont été menées grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre CPBAg1 dont l'ingestion par le moustique conduit à une diminution de moitié de l'activité carboxypeptidase globale au sein du tube digestif des moustiques. Cependant, ces anticorps reconnaissent la forme dénaturée de CPBAg2r en Western Blot. De ce fait, la possibilité qu'ils reconnaissent également la forme endogène de CPBAg2 n'était pas à exclure.

Par ailleurs, les techniques de dosage enzymatique utilisées dans l'étude menée par C. Lavazec ne permettaient pas de distinguer l'activité associée uniquement à CPBAg1 de celle associée à CPBAg2 et inversement, ne donnant accès qu'à l'activité globale des carboxypeptidases. De ce fait, la participation respective de chaque CPBAg restait inconnue dans ces deux phénotypes c'est à dire à la fois sur le blocage du développement parasitaire et sur la diminution des capacités reproductives des moustiques. Les différences de spécificité enzymatique des CPBAg (CPBAg1 libérant l'arginine et la lysine et, CPBAg2 libérant exclusivement

l'arginine) présagent de potentielles différences *in vivo*, telles que leurs implications respectives dans des processus physiologiquement distincts.

Les rôles spécifiques de CPBAg1 et CPBAg2 sur les deux phénotypes énoncés précédemment, à savoir : le développement parasitaire et la mise en place des capacités reproductives des moustiques, seront de ce fait explorés. Cette étude fonctionnelle utilise la technique de « knock down » chez les moustiques par le biais de l'interférence ARN.

A. Les CPBAg in-vivo

1. Cinétique d'apparition des CPBAg à l'issue de la prise du repas sanguin non-infecté par le moustique

Les analyses *in silico* montrent que les masses moléculaires apparentes des CPBAg sont identiques. L'analyse biochimique (Cf. Chapitre I) montre que certaines formes des carboxypeptidases recombinantes de CPBAg1 et CPBAg2 ont la même masse moléculaire apparente (37 et 50 kDa). Compte tenu de ces données, et en vue de discriminer les deux protéines *in vivo* des anticorps spécifiques ont été produits grâce aux protéines recombinantes. La présence des deux protéines sera révélée en Western Blot grâce à la conjugaison d'anticorps spécifiques et d'anticorps secondaires spécifiques d'espèces.

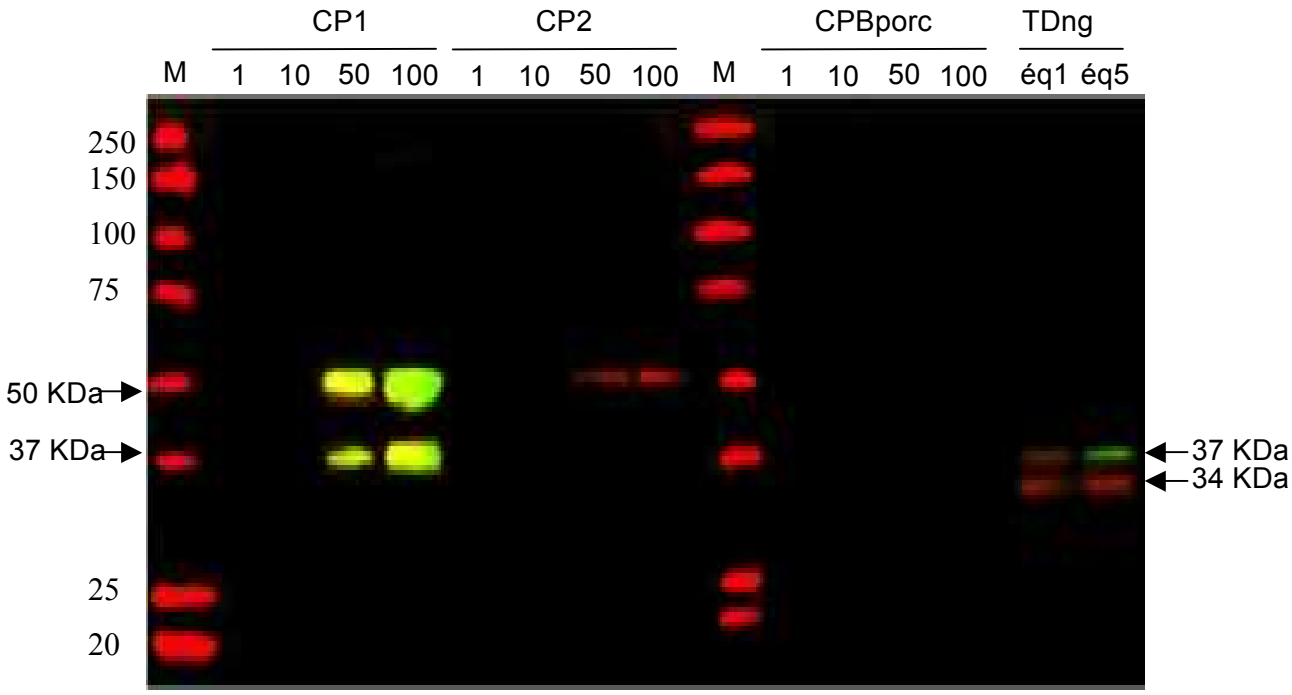


Figure R.II.2 : Evaluation de la spécificité de reconnaissance du sérum dirigé contre CPBAg2

Electrophorèse sur gel Criterion précoulé, migration en tampon MOPS suivi d'un Western Blot visualisé par fluorescence (quantité déposé en µg de protéine et équivalent de 1 et de 5 tubes digestifs non gorgés).

La superposition des membranes testées indépendamment révèle :

- en vert : le fluorophore couplé à l'anticorps secondaire anti-lapin, reconnaissant la protéine CPBAg1.
- en rouge : le fluorophore couplé à l'anticorps secondaire anti-souris, reconnaissant la protéine CPBAg2 et les marqueurs de tailles.

a. Evaluation de la spécificité des anticorps de souris

Au cours de mon Master II, CPBAg2r a été produite en système baculovirus/cellules d'insecte. Ce lot protéique a permis de produire des anticorps chez la souris. La spécificité de reconnaissance des sérums a été évaluée par Western Blot sur des gammes de concentrations allant de 1 à 100 ng de protéines recombinantes CPBAg1 et CPBAg2 mais aussi sur la Carboxypeptidase B commerciale de porc et sur des extraits de tubes digestifs d'*A. gambiae* non gorgés. La figure R.II.2 montre que l'un d'entre eux s'est révélé spécifique de CPBAg2r, ne reconnait ni CPBAg1r ni la carboxypeptidase de porc tout en reconnaissant en plus de la protéine recombinante la protéine endogène présente dans les extraits des tubes digestifs non gorgés.

Les données des séquences primaires indiquent que les formes zymogéniques des deux protéines ont la même masse moléculaire apparente (50kDa). De plus, les résultats de la maturation des CPBAgr montrent que certaines des formes activées ont également la même masse moléculaire apparente migrant à 37kDa. Cependant, les extraits de tubes digestifs non gorgés révèlent que les masses moléculaires apparentes des formes activées des CPBAg diffèrent, CPBAg1 migre à 37kDa alors que CPBAg2 migre à 34 kDa. Ces résultats permettent de discriminer par western Blot les formes physiologiques des CPBAg activées selon un critère de taille. L'analyse biochimique des formes recombinantes a montré que la forme 34kDa peut être issue de l'action des deux endopeptidases, trypsine et chymotrypsine, mais est préférentiellement issue d'un clivage à la chymotrypsine. Ces résultats suggèrent que l'activation de CPBAg2 endogène pourrait être majoritairement engendrée par un clivage protéolytique à la chymotrypsine. De plus, les extraits sont également dépourvus des formes de plus faible masse moléculaire apparente de 31,5kDa et de 15kDa. Or, elles étaient préférentiellement observées lors des analyses biochimiques du chapitre I après activation de CPBAg2 par de la trypsine. Ces

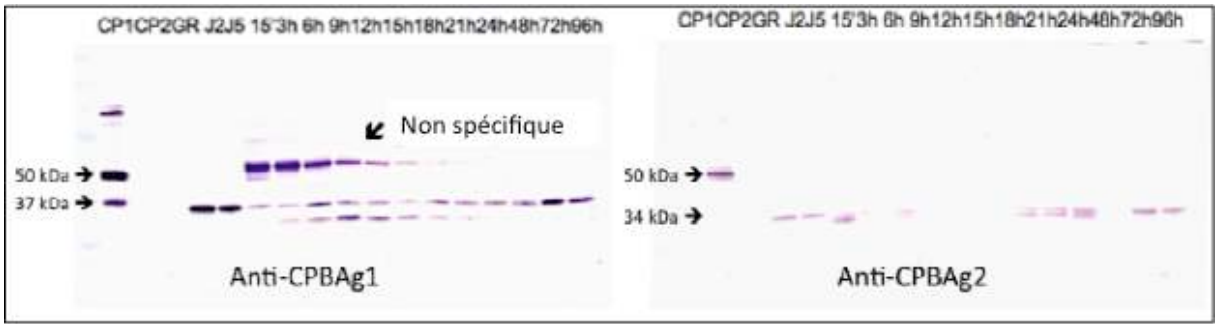


Figure R.II.3 : Cinétique d'apparition de CPBAg1 et CPBAg2 lors du processus digestif d'*A. gambiae*

Electrophorèse sur gel Citerions précoulé, migration en tampon MOPS suivi d'un Western Blot visualisé par détection à l'alcaline phosphatase.

Les quantités déposées sont 500ng pour CPBAg1r et 200ng pour CPBAg2r, l'équivalent de 3µl de globule rouge (GR) et l'équivalent de 3 tubes digestifs à deux et cinq jours post-émergence puis à 15 minutes, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h, 48h, 72h et 96h après l'ingestion du repas de sang.

formes sont donc soit non physiologiques, soit elles ne sont engendrées qu'après le gorgement, c'est à dire à l'initiation du processus digestif.

b. Cinétique d'apparition des CPBAg au cours de la digestion du repas sanguin

Pour positionner les protéines dans le métabolisme digestif, l'apparition des CPBAg a été suivie après la prise du repas sanguin du moustique. Pour ce faire, des extraits de tubes digestifs ont été disséqués toutes les 3 heures après l'ingestion du sang humain et aux points clefs de la digestion du moustique par rapport aux connaissances de la cinétique d'apparition des autres enzymes digestives (Cf. Introduction).

Cependant, le sang encore peu digéré dans le bol alimentaire du moustique lors des premiers points de cinétique a posé problème dans l'observation. Il provoque des reconnaissances aspécifiques avec les membranes de transfert, avec les anticorps secondaires et avec plusieurs techniques de révélation aussi bien à l'HRP qu'à la fluorescence. Après plusieurs tests d'optimisation, un changement de révélation utilisant la phosphatase alcaline a permis de suivre les protéines endogènes (figure R.II.3). CPBAg1r purifiée présente la forme zymogénique de 50kDa et la forme active de 37kDa. Les extraits de tubes digestifs non gorgés prélevés à 2 et 5 jours après émergence révèlent que CPBAg1 est présente uniquement sous forme active avant la prise du repas de sang du moustique. Dès les premiers instants de la digestion, dans les 15 premières minutes, la forme zymogénique de CPBAg1 est produite, et persiste jusqu'à 15h après l'ingestion de sang. La forme mature de la protéine (37kDa) persiste quand à elle tout au long de la digestion. Au moment où la digestion du bolus alimentaire est terminée, c'est à dire à 72h après la prise du repas sanguin, un pool de forme activée de CPBAg1 s'accumule dans le tube digestif.

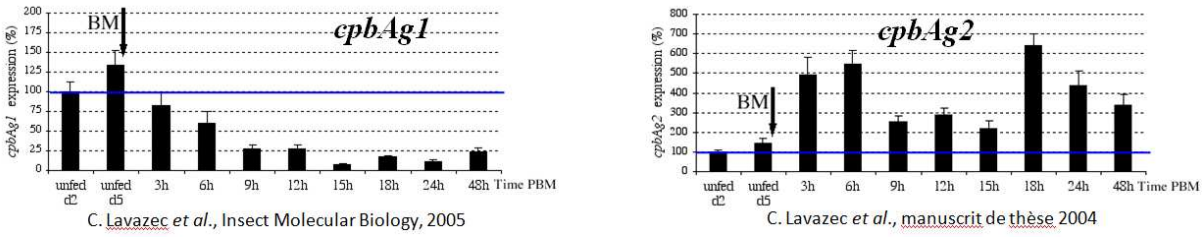


Figure R.II.4 : Cinétique d'expression des *cpbAg*
Expression de *cpbAg1* et *cpbAg2* à deux et cinq jours après l'émergence et à 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 24h et 48h après l'ingestion de sang par les moustiques *A. gambiae*.

Cette accumulation similaire aux extraits non gorgés est certainement mise en place en prévision de la digestion d'un second repas sanguin. Au même titre que CPBAg1, CPBAg2 est présente uniquement sous sa forme activée de masse moléculaire apparente de 34kDa dans les extraits non gorgés (figure R.II.3). Puis, lors de l'ingestion et la digestion, CPBAg2 est présente sans discontinuité sous forme de doublet activé migrant à 34kDa.

La dynamique d'apparition des CPBAg au cours de la digestion du repas sanguin du moustique a révélé des différences de cinétique entre les deux protéines. Ces dernières combinées aux données de spécificité biochimique laisse présager que les CPBAg pourraient être impliquées dans des processus physiologiques différents.

c. Corrélation avec l'expression génique

Les données de l'expression des *cpbAg* obtenues par Catherine Lavazec (Lavazec *et al.*, 2005 et manuscrit de thèse, 2004), sont présentées figure R.II.4. L'ARN codant *cpbAg1* s'accumule avant le repas sanguin, puis diminue après l'ingestion de sang. Les données sur l'apparition des protéines du paragraphe précédant montrent qu'il y a en parallèle accumulation de protéine sous forme activée. La présence de cette protéine avant le repas suggère un rôle précoce dans le processus digestif. Comme pour *cpbAg1*, l'ARN de *cpbAg2* s'accumule avant le gorgement et cela à des taux trois fois plus élevés que le niveau d'expression de *cpbAg1* au même stade d'après les valeurs quantitatives. A l'inverse de l'expression de *cpbAg1*, lors de la digestion du repas sanguin le profil d'expression de *cpbAg2* est biphasique, la quantité d'ARN augmente à 6h puis à 18h après l'ingestion du sang.

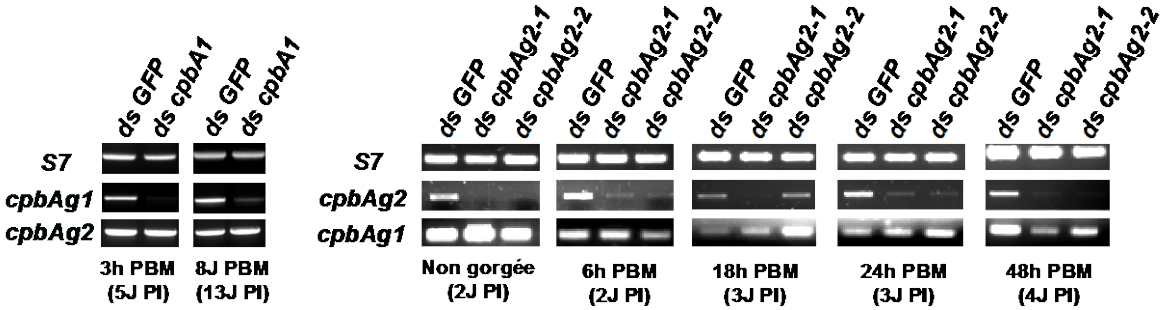


Figure R.II.5 : Validation des dsARN utilisés pour l'ARNi

Niveau d'expression des gènes *cpbAg1* et *cpbAg2* après injection de doubles brins d'ARN ciblant une région de *cpbAg1* (panneau de gauche) et deux régions différentes de la séquences de *cpbAg2* (panneau de droite) comparés au gène contrôle S7 constitutivement exprimé.

Les données protéiques du paragraphe précédent montrent une présence continue de la forme activée de CPBAg2 lors de la digestion, reflet de sa nécessité. L'expression biphasique de *cpbAg2* est ainsi vraisemblablement réalisée pour maintenir la présence de la protéine tout au long de ce processus métabolique.

B. Caractérisation fonctionnelle des CPBAg

Les données fonctionnelles obtenues grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre CPBAg1 montrent que CPBAg1 est impliquée dans le développement de *P. falciparum* et sur les capacités reproductives des moustiques (Lavazec *et al.*, 2007). Cependant du fait de la reconnaissance de CPBAg2 en western blot par ces anticorps, les participations spécifiques de chacune des deux protéines dans ces deux phénotypes restaient obscures. La caractérisation fonctionnelle de CPBAg1 et CPBAg2 a pour objectif de clarifier le ou les rôles spécifiques de chacune des deux protéines dans les deux phénotypes.

Pour ce faire, l'approche développée pour l'analyse fonctionnelle des CPB est l'inactivation génique par ARN interférence. Les phénotypes recherchés reposent sur le développement de *P.falciparum* chez le moustique, mesuré par la prévalence d'infection et la charge parasitaire, et, sur la capacité reproductive des moustiques *via* le développement ovarien et le nombre d'œufs produits par femelle.

Une seconde stratégie a également été développée en parallèle : l'ajout d'anticorps dirigés contre les CPBAg dans le repas sanguin pour bloquer leurs activités enzymatiques dans le tube digestif de l'insecte. Certaines des données encore parcellaires sont présentées au chapitre III.

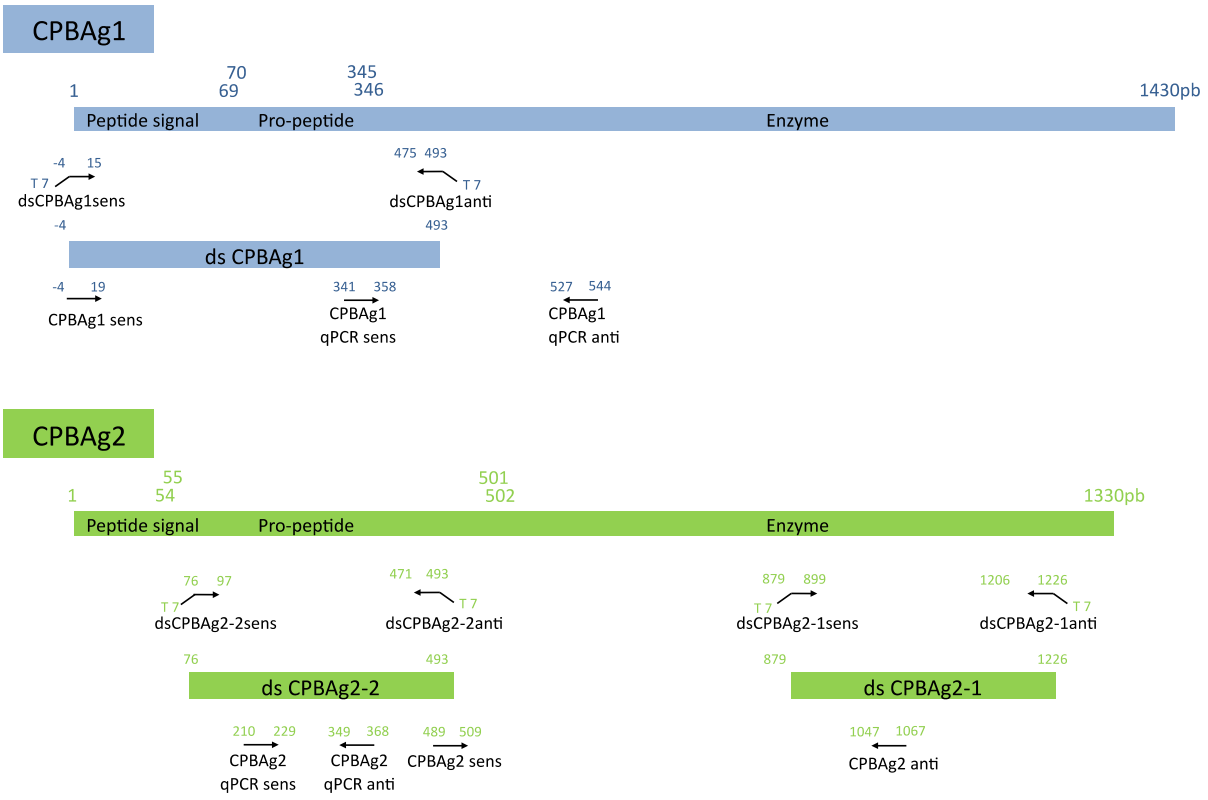


Figure R.II.6 : Positionnement schématique des amorces sur les séquences des *cpbAg*
Amorces utilisées pour la synthèse des doubles brins d'ARN pour l'ARNi (ds) et celles utilisées pour l'analyse de l'expression des *cpbAg* au cours de la digestion par PCR semi-quantitative ou quantitative (qPCR).

1. Validation de l'ARN interférence

L'objectif est d'inactiver l'expression de chaque *cpbAg* et ce de façon spécifique malgré leurs fortes homologies (25,6% d'identité de séquence génique).

a. Optimisation de l'inactivation de *cpbAg2*

L'expression de *cpbAg1*, régulée au niveau traductionnel avec une diminution concomitante de son ARN, dès la prise du repas sanguin a facilité l'établissement de son inactivation génique (figure R.II.5). À l'inverse, l'expression de *cpbAg2* fortement induite pendant la digestion, a nécessité le crible de plusieurs régions pour sélectionner un double brin d'ARN (dsRNA) permettant son inactivation spécifique et stable pendant la digestion. Les résultats de l'évaluation de leurs efficacités respectives réalisées par PCR semi quantitative sur des extraits de tubes digestifs en cinétique après le repas sanguin sont représentés figure R.II.5.

Pour plus de clarté, les amorces utilisées pour la synthèse des doubles brins lors de l'ARN interférence (avec extension T7) sont positionnées schématiquement sur les séquences des cpbAg (figure R.II.6). Ces résultats montrent que l'expression de *cpbAg2* est moindre lors de l'utilisation du premier double brin d'ARN comparé à la deuxième séquence ciblée. Le *ds cpbAg2-1* sera donc utilisé pour l'inactivation génique. Les doses de dsRNA injectées ont été mises au point grâce à des gammes de concentration de 200ng à 1µg de dsRNA injecté par moustique. Une quantité de *dsARN* de 500ng pour *cpbAg1* suffit pour inactiver l'expression de ce gène alors que 800ng de *dsARN* ciblant *cpbAg2* sont requis pour engendrer son inactivation. Pour mettre en évidence de potentiels effets synergiques de l'inactivation conjointe des *cpbAg*, les conditions de la double inactivation génique ont également été mises au point.

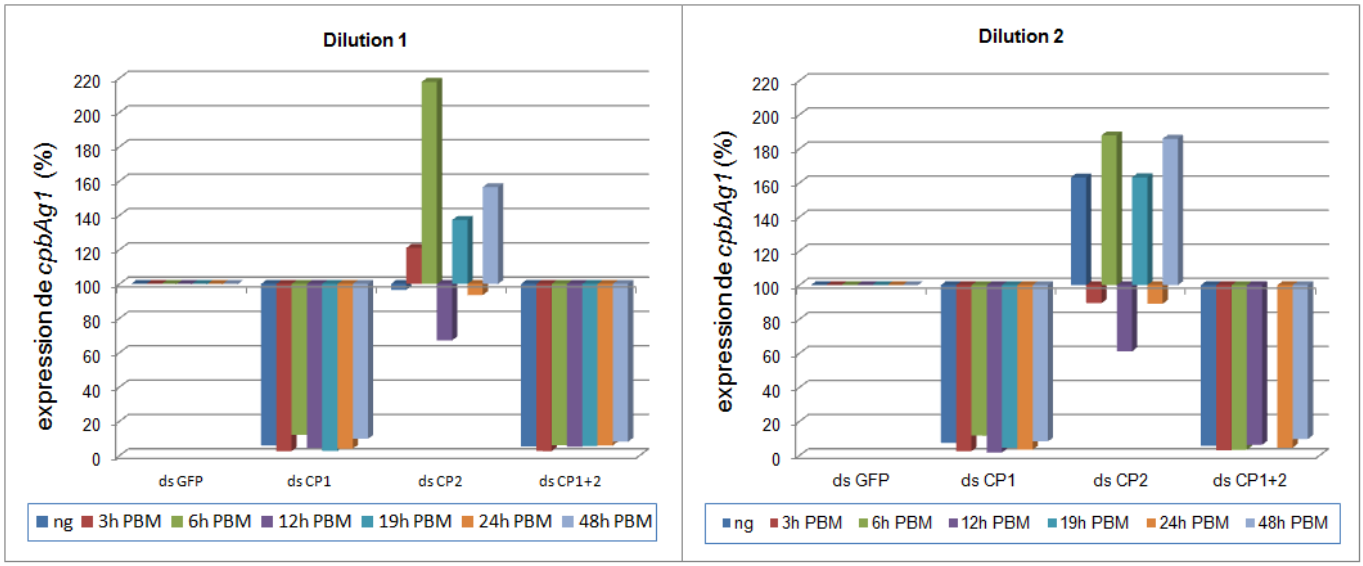


Figure R.II.7a : Expression de cpbAg1 (%) en fonction des différents traitements d'inactivation génique

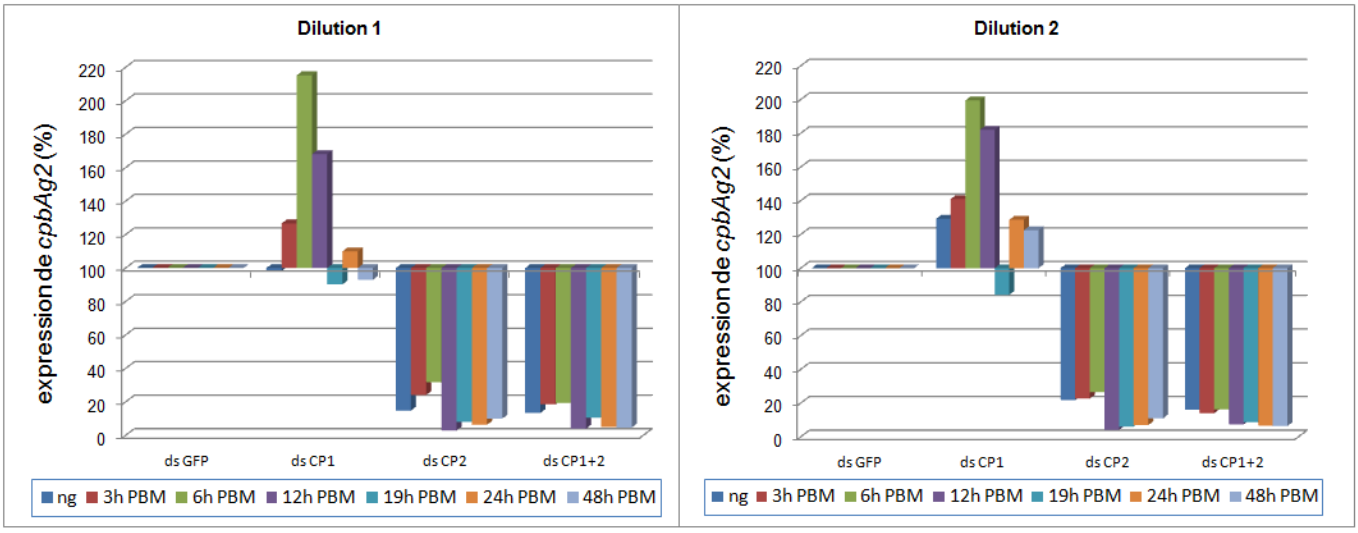


Figure R.II.7b : Expression de cpbAg2 (%) en fonction des différents traitements d'inactivation génique

Figure R.II.7 : Expression des *cpbAg* en fonction des différents traitements d'inactivation

Condition d'ARNi pour *cpbAg1* (dsCP1), pour *cpbAg2* (dsCP2) et des deux *cpbAg* (dsCP1+2) rapportées au contrôle dsGFP.

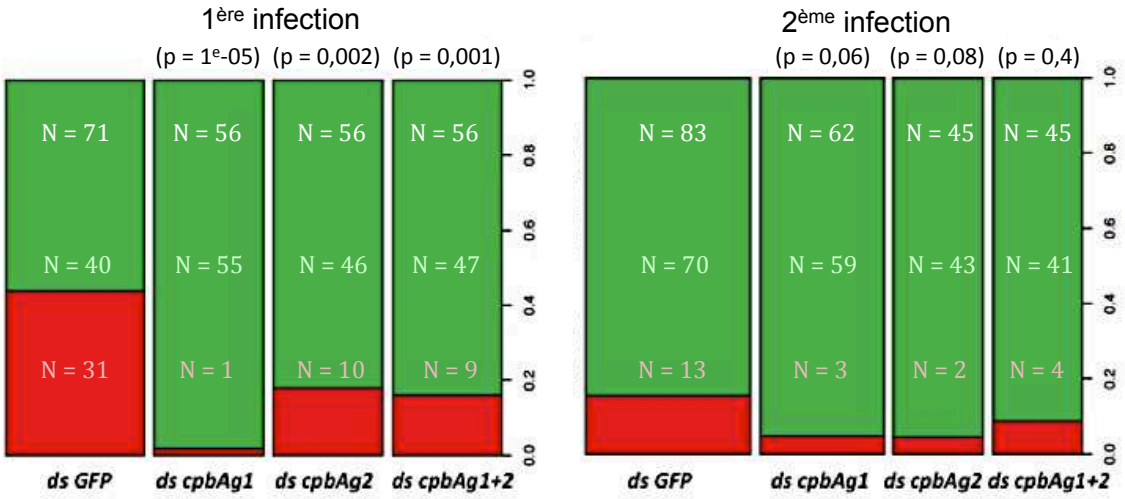
Expression observée sur des extraits d'ADNc de tube digestif d'*A. gambiae* disséqué avant (ng) ou 3h, 6h, 12h, 19h, 24h et 48h après la prise d'un repas sanguin non infectant.

b. Expression en condition d'inactivation

Les méthodes classiques de RT-PCR semi-quantitative n'étant pas assez résolutives pour évaluer la spécificité de l'inactivation de chacun des gènes, en particulier du fait de leur induction en présence de *P.falciparum* (Lavazec *et al*., 2007), l'expression des *cpbAg* à l'issue de simples ou doubles inactivations géniques a été analysée par RT-PCR quantitative (RT-qPCR). La figure R.II.7a montre l'expression de *cpbAg1* dans les différentes conditions d'inactivation génique normalisée par celle obtenue en condition contrôle dsGFP. Deux dilutions différentes de matrice d'ADN complémentaire d'extrait de tube digestif prélevé en cinétique après la prise du repas sanguin sont présentées. Ces résultats montrent en premier lieu l'efficacité de la technique. *CpbAg1* n'est plus exprimé lorsqu'il est ciblé par simple ou double inactivation. De la même façon, l'expression de *cpbAg2* a été analysée dans ces mêmes échantillons et présentée figure R.II.7b. Comme pour *cpbAg1*, l'inactivation génique de *cpbAg2* est efficace, l'expression de *cpbAg2* étant abolie lorsqu'elle est ciblée par simple ou double inactivation.

A l'instar du gène AOX2 qui prend le relais pour l'oxydation du méthanol lorsque AOX1 n'est plus fonctionnel (Cf. Matériels et Méthodes §I.A.2.a), des phénomènes de régulation compensatoire peuvent exister entre des enzymes de fonction similaire. Pour savoir si les CPBAg, des paralogues codant des enzymes de fonction similaire avec une identité d'acides aminés importante de leurs sites actifs, peuvent être soumis à un tel phénomène, l'expression de *cpbAg1* a été analysée en contexte ds*cpbAg2* et inversement.

Les figures R.II.7a et R.II.7b montrent que lorsque l'ARN interférence cible *cpbAg2*, *cpbAg1* est deux fois plus exprimé 6h après la prise du repas sanguin comparé au contrôle *dsGFP*. Cette surexpression pourrait refléter une régulation compensatoire de l'expression de *cpbAg1* en



Non infecté
Infecté

P-values pour les prévalences d'infections
(Méthodes de Fisher's)

	1er réplica	2ème réplica	Combiner
ds cpbAg1	$1e^{-05}$	0,06	$9e^{-06}$
ds cpbAg2	0,002	0,08	0,002
ds cpbAg1+2	0,001	0,4	0,004

Figure R.II.8 : Prévalence d'infection traduisant le nombre de moustiques infectés en fonction des différentes conditions d'inactivation génique
Analyse statistique par test χ^2 avec 10^5 permutations.

absence de *cpbAg2*. De façon analogue, *cpbAg2* est deux fois plus exprimé lorsque l'inactivation génique cible *cpbAg1*. Ces résultats révèlent des phénomènes compensatoires entre les *cpbAg*, surexprimant l'un lorsque l'autre est inactivé. Ce mécanisme révèle une régulation réciproque et dynamique de leurs expressions. Les compensations de chacun des deux gènes observées de façon significative 6h après le repas sanguin sont inexistantes lorsque l'inactivation cible les deux gènes à la fois.

2. Evaluation de la contribution respective des CPBAg sur le développement de *Plasmodium falciparum*

a. Sur la prévalence d'infection

Afin d'évaluer le rôle des CPBAg sur le développement de *Plasmodium falciparum* plusieurs séries de moustiques inactivés génétiquement pour l'expression de *cpbAg1*, *cpbAg2* et pour les deux gènes en même temps ont été infectées par des gamétocytes produits *in vitro* par le CEPIA. Huit jours après l'infection, la présence d'oocystes dans les tubes digestifs d'*A. gambiae* a été évaluée.

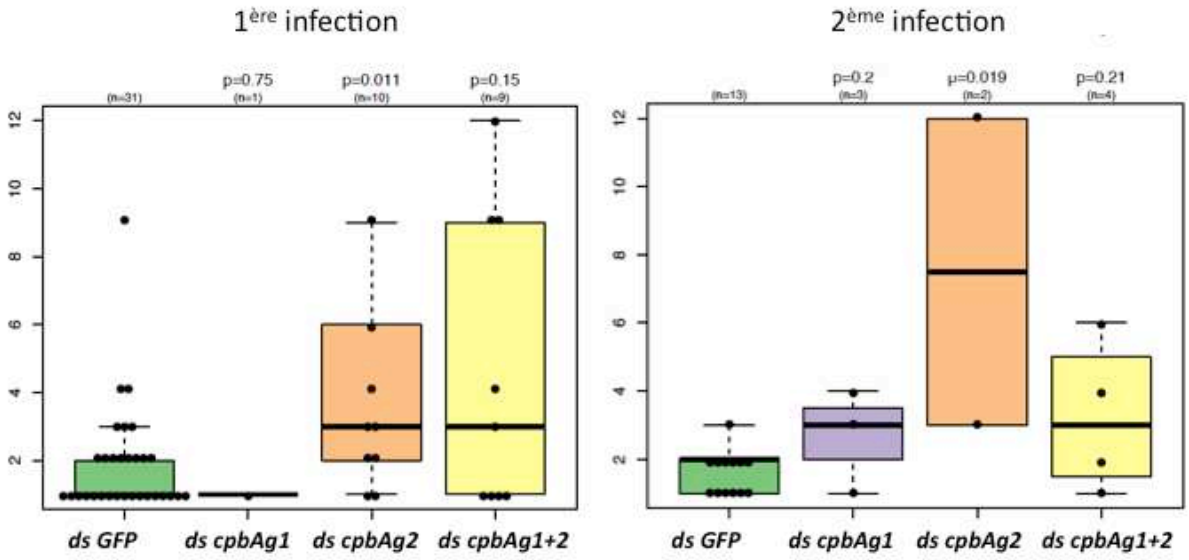
Les résultats de prévalence d'infection de deux expériences indépendantes sont présentés figure R.II.8. Iles montrent les différences obtenues sur la prévalence d'infection (qui traduit le nombre de moustiques infectés) entre les moustiques inactivés pour l'expression de *cpbAg1* et/ou *cpbAg2* et ceux injectés de *ds* GFP utilisés comme contrôle mimant l'effet de l'injection sur les moustiques. L'analyse statistique des données utilise un test χ^2 avec 10^5 permutations.

Les résultats de la première infection présentés figure R.II.8 montrent une baisse du nombre de moustiques infectés quelque soit la condition d'inactivation avec des taux très

significatifs lorsque *cpbAg1* est inactivé. La seconde infection présente un phénotype moins prononcé que la première du fait probable d'un taux d'infection faible chez le contrôle.

Cette expérience montre que le développement plasmodial est absent lorsque *cpbAg1* est inactivé et cela même si *cpbAg2* est surexprimé reflet de la dépendance du parasite envers l'activité de la 1ère CPBAg. Or d'après les données enzymatiques du chapitre I, CPBAg1 contribue à la source d'arginine et de lysine lors du processus digestif alors que CPBAg2 n'augmente que le pool d'arginine. C'est donc soit l'absence de lysine qui bloque le développement de *P. falciparum* chez *A. gambiae* soit l'arginine engendré par la seule activité de CPBAg2 qui ne comble pas les besoins parasitaires. Du fait de la surexpression du transcrit de *cpbAg2* par rapport à celui de *cpbAg1* et que la protéine CPBAg2 possède une vitesse d'action et une meilleure affinité pour l'arginine, la dépendance métabolique du parasite semble être accrue envers la lysine, indispensable au bon déroulement du cycle parasitaire chez son hôte moustique.

Lorsque l'expression de *cpbAg2* est inactivée, la prévalence diminue même si *cpbAg1* est surexprimé d'après les données qPCR. Cependant, la significativité du phénotype est moindre que celle observé en contexte *ds cpbAg1*. L'effet de *ds cpbAg2* semble être plus prononcé dans l'infection où le taux de prévalence de l'infection contrôle est plus faible. Alors que l'on pouvait s'attendre aux mêmes résultats qu'en contexte d'inactivation de *cpbAg1* seul, lorsque l'expression des deux gènes est inactivée simultanément les résultats obtenus sont plus ambigus. Ils montrent une diminution plus faible de la prévalence d'infection similaire à celle trouvée en contexte d'inactivation de ds *cpbAg2* seul pour la 1ère infection. Dans le cas de la seconde infection la prévalence est même supérieure à celle obtenue chez les moustiques inactivés pour l'un ou l'autre gène. D'autres mécanismes compensant la perte de ces ressources d'acides aminés doivent certainement prendre le relais pour combler les besoins en acides aminés des moustiques dépourvus de carboxypeptidase. Les aminopeptidases d'*A. stephensi* peuvent libérer entre autres



Combined p-values for intensity (Fisher's method)

	16/03/12	27/03/12	combined
dscpbAg1	0.8	0.2	0.4
dscpbAg2	0.01	0.02	0.002
dscpbAg1+2	0.2	0.2	0.1

Figure R.II.9 : Intensité d'infection traduisant le nombre d'oocystes par tube digestif de moustiques infectés en fonction des différentes conditions d'inactivations
Analyse statistique par le test de Wilcoxon, Man, Whitney et Rank sum avec 10^5 permutations
Combinaison des p-value des réplicats par la méthode de Fischer.

de l'arginine et de la lysine, bien que leur spécificité première soit à l'encontre des résidus hydrophobes. Si les mêmes caractéristiques biochimiques sont respectées chez *A. gambiae*, leurs inductions pourraient compenser un défaut d'arginine. Chez le moustique la voie de biosynthèse d'arginine à partir de proline et de glutamate et/ou d'ornithine pourrait également augmenter en efficacité.

Cependant, comme les prévalences du contrôle dsGFP diffèrent d'une infection à l'autre, la comparaison des réplicats impose une méta-analyse par la méthode de Fischer qui combine les p-value des différents réplicats. La comparaison des deux infections révèle un blocage significatif du développement parasitaire engendré par l'inactivation de *cpbAg1* et une tendance allant dans le même sens pour l'inactivation génique de *cpbAg2* et des deux gènes en combiné.

b. Sur l'intensité d'infection

A la suite de l'analyse des prévalences d'infections dans les différentes conditions d'inactivation des *cpbAg* décrites ci-dessus, l'intensité d'infection reflétant le nombre d'oocystes par tube digestif infecté a été également analysée. Les résultats ont été traités par le test statistique de Wilcoxon, Man, Whitney et Rank sum avec 10^5 permutations. Pour analyser les deux infections et pour les mêmes raisons que celles citées ci-dessus, une méta-analyse par la méthode de Fischer combinant les p-value des différents réplicats a été utilisée. Le nombre de moustiques infectés étant faible (figure R.II.9), cette expérience ne permet pas d'observer un phénotype significatif sur le développement parasitaire mais suffisant pour dégager néanmoins une tendance dans ces résultats.

Les résultats obtenus lorsque *cpbAg1* est inactivé semble être contradictoires entre les deux infections. Les tendances observées montrent une diminution de l'intensité d'infection dans la première et une augmentation de celle ci dans la seconde. Plusieurs possibilités pourraient expliquer ce résultats : soit que *cpbAg1* n'a pas d'influence sur l'intensité d'infection, soit qu'en fonction de la prévalence la dépendance des besoins parasitaires diffèrent, soit que la surexpression compensatoire de *cpbAg2* suffit pour engendrer un complément en acide aminé libre pour combler les besoins du parasite. Ces résultats reflètent bien la complexité du système d'étude. Ces données suggèrent également une augmentation de l'intensité d'infection lorsque *cpbAg2* est inactivé. Comme dans ce contexte *cpbAg1* est surexprimé, la dépendance parasitaire en lysine et/ou arginine libéré par l'activité de CPBAg1 pourrait ainsi influencer l'intensité d'infection en augmentant le nombre d'oocystes dans les tubes digestifs infectés. En contexte de double inactivation, l'intensité d'infection semble augmenté par rapport au control, ceci suggère l'existence d'un mécanisme compensatoire qui semble se mettre en place lorsque le moustique est privé de l'apport d'acides aminés basiques engendré par l'activité des CPBAg.

Pour résumer, ces résultats montrent que *cpbAg1* est nécessaire au développement plasmodial reflet probable d'une dépendance métabolique accrue envers la lysine comparé à l'arginine. Les résultats sur l'inactivation de *cpbAg2* moins significatif, pourraient être due à un effet moindre de l'activité de cette protéine sur le parasite soit que la surexpression de *cpbAg1* masque l'effet de son inactivation sur le développement parasitaire. De plus, des différences de phénotype en fonction du taux d'infection ne sont également pas à exclure. La surexpression compensatoire de *cpbAg2* lorsque *cpbAg1* est inactivé observée lors de l'étude de l'expression des gènes en condition d'interférence ARN n'a donc aucun effet sur le développement de *Plasmodium falciparum*, preuve de la faible influence de *cpbAg2*.

3. Evaluation de la contribution respective des CPBAg sur la capacité reproductive des moustiques

Les capacités reproductives des moustiques peuvent être évaluées par l'observation du développement ovarien et du développement des œufs ou par le nombre d'œufs pondus par femelle. Classiquement, les œufs commencent leur développement dès l'émergence des moustiques où ils resteront bloqués au stade pré-vitellogénique jusqu'au repas de sang. Ce dernier déclenche la maturation vitellogénique achevant la production d'ovocytes matures, c'est l'achèvement du premier cycle gonotrophique (*in* Clements, 1992; Cf. Introduction). Bien que les conditions environnementales peuvent moduler la reprise et la cinétique de ce métabolisme (Cf. Introduction), de façon générale, les moustiques *A. gambiae* digèrent le repas de sang en 48h terminant la maturation de leurs œufs, pour les pondre 72h après l'ingestion du repas. De nombreux facteurs peuvent moduler la fécondité et la fertilité des moustiques. La taille des moustiques directement proportionnelle aux volumes et donc à la quantité de sang ingéré modulent les apports énergétiques indispensable à l'oogenèse. L'un des facteurs critiques de l'oogenèse des moustiques est la composition et richesse protéique du sang ingéré dont jusqu'à 13% peuvent être utilisés pour la synthèse de protéines YOLK (Briegel *et al.*, 1990). Chez *A. aegypti*, les niveaux des ressources en acides aminés libres contribuent de manière importante à la vitellogénèse (Roy *et al.*, 2011), dont les quantités présentes intrinsèquement dans le bolus ingéré sont augmentées par la dégradation des protéines le constituant. En effet, chez les insectes, 10 acides aminés sont considérés comme essentiels pour la synthèse de protéines (Akov *et al.*, 1962 ; Golberg *et al.*, 1948 ; Singh *et al.*, 1957). Les besoins nutritifs des moustiques nécessitent ainsi d'être comblés en acides aminés aromatiques (Phe, Trp et His), aliphatiques (Leu, Ile, Val et Thr), basiques (Arg et Lys) et en acides aminé sulfuré (Met). Les deux acides aminés : Cys et Tyr

n’étant que conditionnellement essentiels en tant que précurseurs. Cependant, une balance entre l’acquisition d’éléments essentiels et leur toxicité existe car une augmentation de la concentration d’acides aminés (> 0,9-1,4% w/v) peut être toxique aussi bien pour la viabilité du stade larvaire que pour la vigueur du stade adulte des moustiques (Dadd *et al.*, 1978 ; Merritt *et al.*, 1992).

Les CPBAg en leur capacité de libérer la lysine et l’arginine lors de la digestion du repas sanguin du moustique augmentent le pool d’acides aminés intrinsèquement présents dans le sérum. Les besoins métaboliques des moustiques pour les ressources en acides aminés basiques sont ainsi comblés. L’implication respective des *cpbAg* dans l’oogenèse des moustiques restait également à clarifier, leurs implications ayant été montrée avec les anticorps anti-CPBAg1 (Lavazec *et al.*, 2007). L’analyse du développement ovarien d’*A. gambiae* a pour objectif de montrer l’implication respective de chaque CPBAg dans ce processus physiologique. Les résultats obtenus permettront de connaître la participation des acides aminés basiques : lysine et arginine proportionnelle aux rôles des CPBAg dans ce processus physiologique.

Figure R.II.10 : Cinétique de maturation ovarienne d'*A. gambiae* dans les conditions expérimentales du laboratoire
Représentation photographique des ovaires disséqués avant (NG) puis toutes les 24 heures après le gorgement d'*A. gambiae*, observé au macroscope objectif x20.

a. Caractérisation de la cinétique de maturation ovarienne chez *A. gambiae*

Pour étudier le rôle des CPBAg dans la vitellogénèse des moustiques, le développement ovarien dans les conditions optimisées d'élevage des moustiques du laboratoire a été observé. Il servira de base de référence du degré de développement de l'oogenèse dans les conditions expérimentales du laboratoire.

Le développement des ovaires des moustiques *A. gambiae* souche *Yaoundé* a ainsi été observé par dissection des ovaires toutes les 24h après l'ingestion du repas sanguin (figure R.II.10). Avant le gorgement (NG : non gorgé), les ovaires sont au stade pré-vitéllogénique où le nombre d'oocytes présents est dépendant de la qualité nutritive et environnementale de l'élevage du stade larvaire des moustiques. Le repas déclenchant la reprise de la vitellogénèse, permet la maturation des oocytes. 24h après le gorgement, les oocytes augmentent en taille, devenant rond et opalescent, la phase d'initiation de la vitellogénèse commençant avec le repas laisse place à la phase de synthèse de la période vitellogénique ou phase trophique.

Ensuite, à 48h après l'ingestion de sang, la maturation des ovaires continue, la taille des oocytes augmente et leur forme s'allonge, la phase trophique continue. Enfin, la période vitellogénique se termine, les œufs augmentent encore en taille entre 48h et 72h après la prise du repas sanguin, c'est la phase post-trophique où les œufs sont prêts à être pondus par les femelles. A ce stade, le premier cycle gonotrophique des femelles est accompli et la ponte des œufs se produira environ 72h après l'ingestion de sang si un gîte de ponte se présente aux femelles.

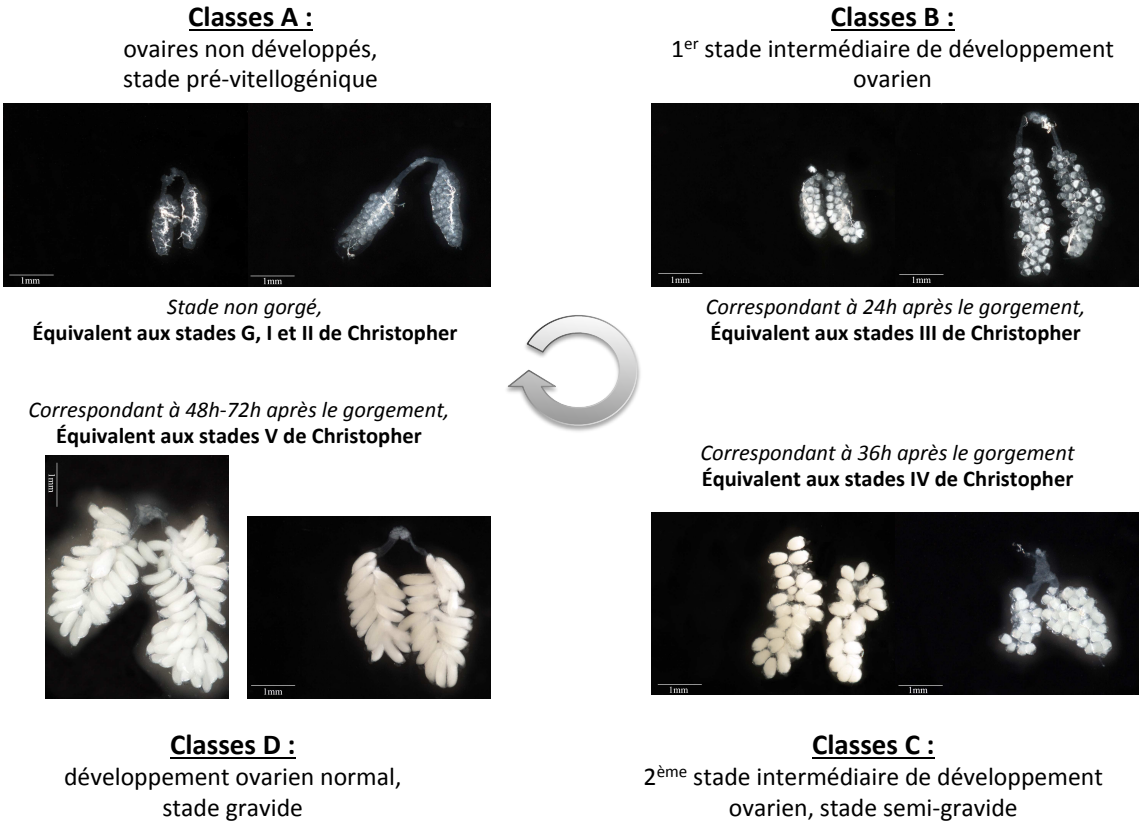


Figure R.II.11 : Représentation photographique des différents stades de développement ovarien en fonction de la taille des anophèles

b. Caractérisation des rôles spécifiques des *cpbAg* dans le développement ovarien

i. Impact sur le développement ovarien

Pour étudier le rôle des CPBAg dans le développement ovarien, la mesure de la capacité reproductive des moustiques a été étudiée en observant l'avancement du développement ovarien des femelles à 48h, 72h et 96h après l'ingestion d'un repas sanguin en contexte ARN interférence. En effet, pour prendre en compte l'effet de l'injection, des moustiques contrôles sont injectés de ds GFP, ne ciblant aucun gène du moustique mais ces ds contrôles induisent la voie de l'ARN interférence prenant en charge les doubles brins d'ARN chez le moustique. Comme certaines simulations immunitaires (parasitaire ou bactérienne) peuvent engendrer l'apoptose des follicules ovariens d'*A. gambiae* (Ahmed *et al.*, 2006), ce paramètre a été contrôlé dans les conditions d'ARNi du laboratoire. Les moustiques *dsGFP* comparés aux moustiques non injectés voient retarder de 24h le développement de leurs œufs, c'est pourquoi l'observation n'a été conduite qu'à partir de 48h en contexte d'ARNi. L'observation du développement des oocytes a conduit à définir 4 classes de développement quelque soit la condition d'inactivation : A, le moins développé équivalent au stade prévitellogénique à D, développé avec des œufs morphologiquement développés équivalent à l'accomplissement du cycle gonotrophique complet.

Le contenu calorique des femelles *A. gambiae* varie drastiquement en fonction de leur taille ce qui influence le volume de sang prélevé lors du repas. Or, 1,9 µl de sang (équivalent à 1,3 cal) est requis pour initier la maturation des œufs chez cette espèce de moustiques (Briegel *et al.*, 1990). Ne sachant pas si les femelles de petite taille peuvent ingérer cette quantité de sang même en étant complètement gorgées, les expériences incluent la même variabilité morphologique des

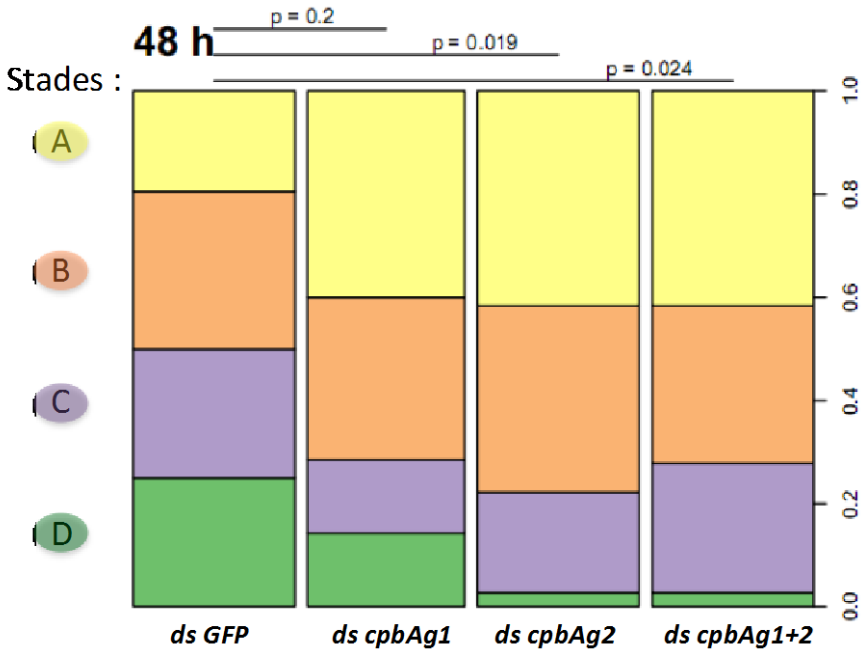


Figure R.II.12 : Effet de l'ARNi des *cpbAg* sur le développement ovarien répartis en 4 classes

Développement ovarien observé à 48h après l'ingestion de sang par le moustique *A. gambiae*. A : stade pré-vitellogénique, B : stade intermédiaire, C : stade semi-gravide et D : œufs développés. Analyse statistique par test χ^2 avec 10^5 permutations.

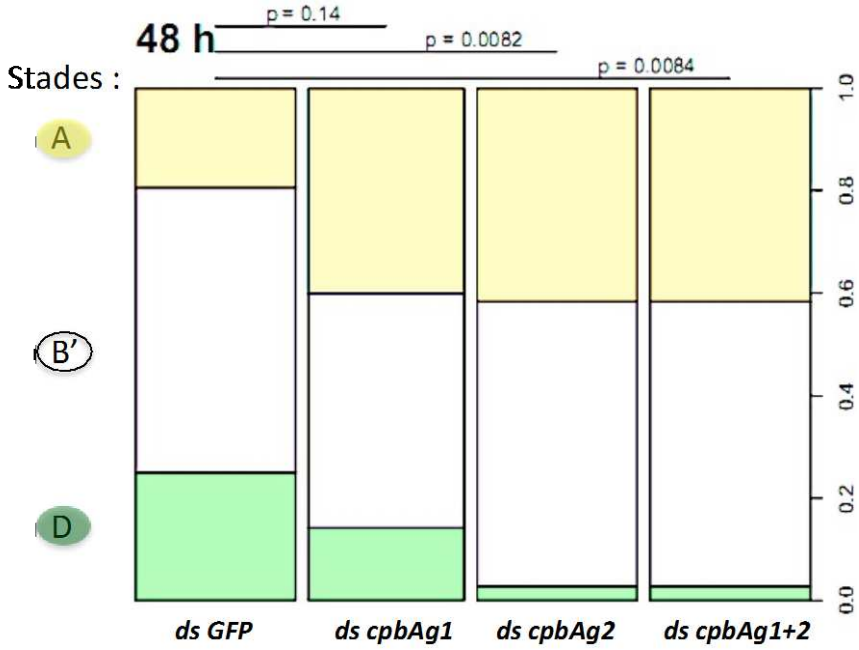


Figure R.II.13 : Effet de l'ARNi des *cpbAg* sur le développement ovarien répartis en 3 classes

Développement ovarien observé 48h après l'ingestion de sang par le moustique *A. gambiae*. A : stade pré-vitellogénique, B' : stade intermédiaire (précédemment B) et stade semi-gravide (précédemment C) et D : œufs développés. Analyse statistique par test χ^2 avec 10^5 permutations.

individus quelques soit la condition d'ARN interférence. Les stades de développement ovarien de femelles de tailles différentes sont illustrés figure R.II.11. Les ovaires sont plus ou moins gros et remplis d'oocytes en fonction de la taille des femelles, évaluée à l'œil.

Les résultats des observations du développement ovarien observé 48h après l'ingestion de sang par les moustiques contrôles et inactivés pour les *cpbAg* sont synthétisés dans l'histogramme figure R.II.12.

En contexte d'inactivation de *cpbAg1*, il n'y a pas de différence significative dans la répartition des stades d'avancement du développement ovarien avec le contrôle. *CpbAg1* n'aurait de ce fait pas d'effet ou un effet mineur sur la capacité reproductive des moustiques. Lorsque l'inactivation cible *cpbAg2*, une diminution du nombre d'ovaires développés (classe D) associée à une augmentation de ceux restant au stade prévitellogénique (classe A) est observée. Ces résultats montrent que *cpbAg2* à un impact sur le développement ovarien d'*A. gambiae*. L'inactivation conjointe des deux *cpbAg* est comparable à l'inactivation de *cpbAg2* seul. CPBAg1 n'est donc pas impliquée dans l'apport de ressources nécessaires à la reprise du cycle gonotrophique d'*A. gambiae*, sa libération précoce lors du processus digestif pourrait expliquer ce résultat.

Pour augmenter la significativité des résultats, la répartition de l'avancement du développement est regroupée en trois classes : les deux classes B et C : intermédiaires et semi-gravide fusionnent pour être représentées en une seule classe, B', et les deux classes extrêmes de développement, à savoir les ovaires restés au stade pré-vitellogénique (classe A) et ceux présentant des œufs développés (classe D), sont conservées. Les données ainsi analysées sont représentées figure R.II.13.

Lorsque l'expression de *cpbAg1* est inactivée, l'impact sur le développement ovarien reste limité, les différences avec le *ds GFP* n'étant pas significatives. D'un autre coté, lorsque *cpbAg2* est inactivé l'impact sur le développement est d'autant plus significatif avec cette répartition.

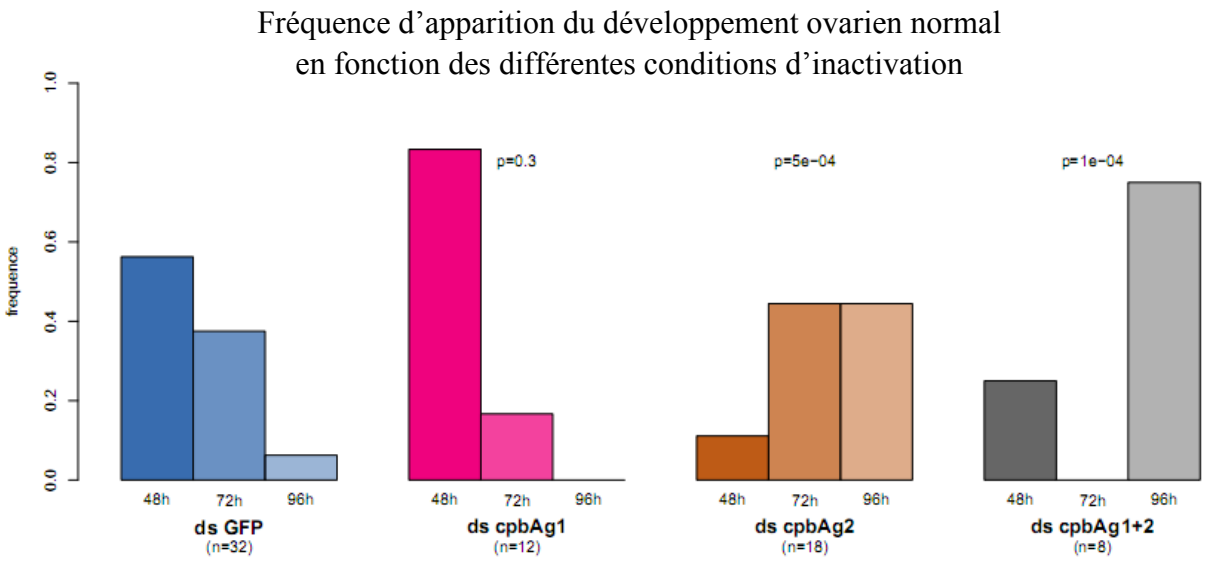


Figure R.II.14 : Effet de l'ARNi des *cpbAg* sur la cinétique d'apparition des œufs développés

Histogramme représentant l'effet de l'inactivation génique de *cpbAg1*, *cpbAg2* et *cpbAg1*+2 sur la fréquence d'apparition du développement ovarien normal des moustiques, les femelles sont dites gravides (classe A) à 48h, 72h et 96h après la prise du repas sanguin d'*A. gambiae*.

Comme précédemment, le profil de l'inactivation conjointe des CPBAg mime celui de CPBAg2 renforçant le fait que seule la deuxième des CPBAg serait impliquée dans le développement ovarien des moustiques *A. gambiae*. Pour rappel CPBAg2 libère uniquement l'arginine, et la forme activée de la protéine endogène est observée sans discontinuité au cours du processus digestif et même au delà allant jusqu'à 96h après l'ingestion du repas sanguin (Cf. Chapitre II § A.1.b). De ce fait, l'arginine fruit de son activité enzymatique semble nécessaire au processus métabolique qui conduit au développement ovarien du moustique.

ii. Impact sur la cinétique d'apparition des œufs développés

Pour affiner les données, l'analyse s'est focalisée sur la fréquence d'apparition des ovaires présentant des œufs développés (classe D), seule classe conduisant à la ponte effective d'œufs. La figure R.II.14 représente leurs apparitions à 48h, 72h et 96h après l'ingestion du repas sanguin pour les différents contextes d'inactivation génique des *cpbAg*.

Le développement normal des ovaires apparait majoritairement à 48h après l'ingestion de sang dans les contrôles *dsGFP*. Dans le contexte où *cpbAg1* est inactivé, il n'y a pas de décalage significatif de l'apparition des ovaires développés, apparaissant en majorité 48h après le repas. L'inactivation de l'expression de *cpbAg1* n'a donc vraisemblablement pas non plus d'effet ou un effet minime qui engendrerait un retard de développement ovarien.

A l'inverse, l'inactivation génique de *cpbAg2* induit un décalage dans le temps de la fréquence d'observation des ovaires développés, la majorité des individus composant cette classe apparaissant à 72h et 96h après le repas sanguin. Dans le contexte ou les deux cpbAg sont

inactivés conjointement, ce décalage dans le temps est d'autant plus observé que la majorité de la classe D apparait 96h après l'ingestion du repas. De ce fait, une contribution vraisemblable de *cpbAg1* dans ce processus physiologique n'est pas à exclure malgré l'absence de décalage significatif dans le contexte où *cpbAg1* seul est inactivé. La participation de *cpbAg1* dans le développement ovarien pourrait ainsi n'être effective que lorsque *cpbAg2* est inactivé compensant la perte de l'autre carboxypeptidase.

Le retard de développement ovarien lorsque les *cpbAg* sont inactivés pourrait permettre soit d'allonger la durée du cycle gonotrophique qui aura pour conséquence la diminution de la fréquence de prélèvement de repas sanguin par les moustiques, soit d'engendrer la prise d'un second repas sanguin pour augmenter la quantité des ressources nécessaires pour achever le cycle gonotrophique des moustiques.

Pour conclure, CPBAg1 qui apparait précocement lors de la digestion du repas sanguin par le moustique n'interfère pas dans le processus métabolique qui conduit au développement ovarien des moustiques. A l'inverse, CPBAg2 présente sans discontinuité lors de la digestion interfère dans la mise en place des capacités reproductives des moustiques en retardant et diminuant le développement ovarien. CPBAg2 contribue au pool d'arginine pouvant être libéré en continu tout au long de la digestion (de 15 minutes à 96 heures) nécessaire à l'élaboration d'œufs de taille et forme normale chez le moustique ; son inactivation génique augmente la fréquence des ovaires non développés tout en diminuant celles des ovaires complètement développés. L'arginine libéré par l'activité enzymatique de CPBAg2 est donc nécessaire à l'établissement des processus métaboliques qui conduisent à la maturation ovarienne et à l'accomplissement du cycle gonotrophique d'*A. gambiae*.

En conclusion, ce chapitre a permis de savoir que seule CPBAg1 est impliquée dans le développement de *P. falciparum* à l'inverse de CPBAg2 qui n'a pas d'effet sur le cycle biologique du parasite. La cinétique d'apparition précoce de CPBAg1 lors de la digestion, moment où le parasite est encore dans la partie intrastomacale du moustique pouvant expliquer cette différence de phénotype entre les *cpbAg*. Une dépendance plus accrue du parasite envers la lysine n'est également pas à exclure.

Lors du ciblage des deux CPBAg le développement parasitaire et les capacités reproductives donc vectoriel des moustiques seront réduites rendant attractives ces deux protéines pour être les cibles de stratégies de contrôle de l'agent éthiologique responsable du paludisme.

Chapitre III

Chapitre III : Données immunologiques

Ce chapitre rassemble différents résultats obtenus au cours de l'étude des CPBAg. Il se compose de deux parties : la première montre l'utilisation d'anticorps pour caractériser la fonction des CPBAg et la deuxième évalue la stabilité de production d'anticorps anti-CPBAg après une seule inoculation dans une stratégie de vaccin bloquant la transmission de *P. falciparum*.

A. Validation d'anticorps pour l'analyse fonctionnelle des CPBAg

Deux approches ont été utilisées en parallèle pour mener à bien la caractérisation fonctionnelle des CPBAg : l'ARN interférence présentée chapitre II et l'ajout d'anticorps contre les CPBAg au repas sanguin infectant des moustiques. L'expérimentation de ce deuxième outil nécessite une quantité importante de sérum reconnaissant spécifiquement chacune des deux CPBAg. Des anticorps de lapin dirigés contre CPBAg1 étaient déjà disponibles au laboratoire. Au cours de ma thèse, grâce à la production de CPBAg2r, des anticorps dirigés contre CPBAg2 ont été produits dans la même espèce facilitant l'analyse et l'interprétation de la comparaison des différents sérums. Deux lots de sérum provenant de l'immunisation de deux lapins ont été produits par la société Biogenes (Allemagne), utilisant la forme doublet de CBPAg2r (Cf. chapitre I § A.3.d)

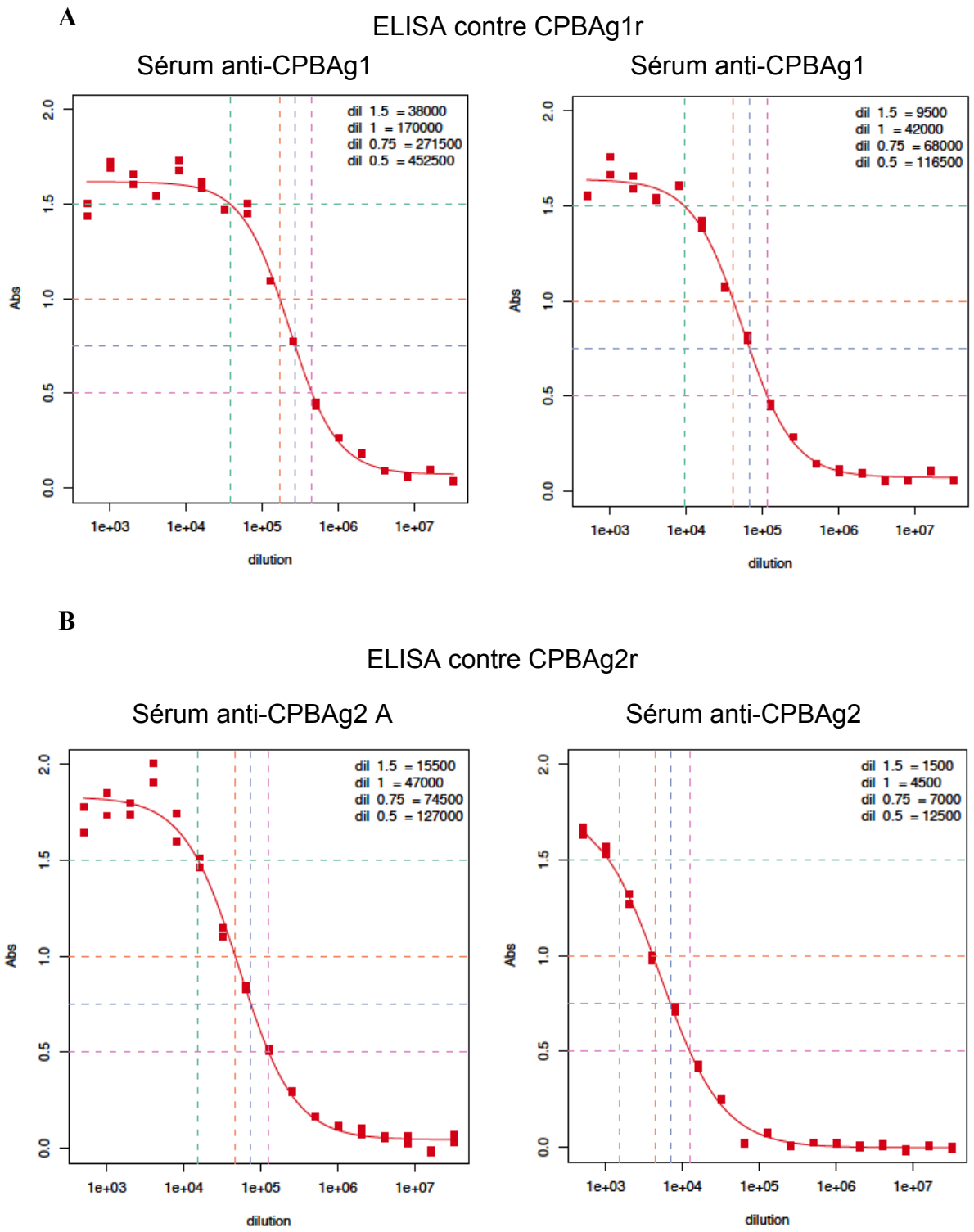


Figure R.III.1 : Évaluation de l'affinité et de la spécificité des sérums de lapin dirigés contre CPBAg1 et CPBag2

A : ELISA contre CPBAg1r des deux lots de sérum de lapin dirigés contre CPBAg1r.
B : ELISA contre CPBAg2r des deux lots de sérum de lapin dirigés contre CPBAg2r.

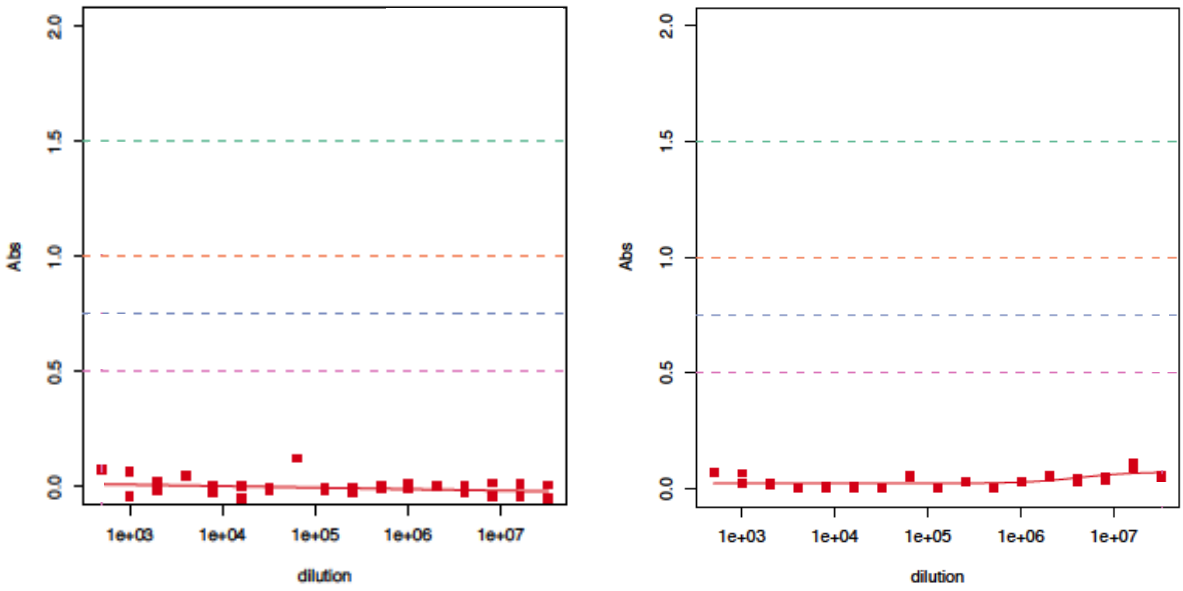
1. Evaluation de la spécificité des anticorps par ELISA

L'ajout d'anticorps contre CPBAg1 au repas sanguin contenant des gamétocytes de *P. falciparum* avait permis de connaître son implication sur le développement parasitaire (Lavazec *et al.*, 2007). Cependant comme ces anticorps reconnaissent la forme dénaturée de CPBAg2r en Western Blot, l'implication de CPBAg2 dans ce phénotype ne pouvait être exclue. Afin de tester cette hypothèse, la spécificité des sérums anti-CPBAg1 a été évaluée en utilisant les protéines recombinantes CPBAg1r et CPBAg2r dans leur conformation native, par ELISA. De manière similaire la spécificité des sérums dirigés contre CPBAg2 a été déterminée.

Les résultats présentés figure R.III.1 montrent la réactivité des réponses immunogéniques des sérums contre les protéines utilisées pour l'immunisation CPBAg1 (figure R.III.1A) et CPBAg2 (figure R.III.1B). De manière essentielle, les titrations réciproques des différents sérums (antiCPBAg1 contre CBPAg2r et antiCPBAg2 contre CPBAg1r) en condition non dénaturante montrent l'absence de réaction croisée à l'inverse de ce qui est observé en Western Blot sur les formes protéiques dénaturées. Deux des quatre profils très similaires sont présentés figure R.III.1C. Ce résultat permet d'établir que les données obtenues par C. Lavazec *et al*., en 2007, montrant que l'effet bloquant du développement de *P. falciparum*, dû aux anticorps anti-CPBAg1, était bien le fait de l'inhibition de CPBAg1 seule. Il confirme également les données obtenues par RNAi qui montrent le rôle principal de CPBAg1 dans ce phénotype. Par contre, le phénotype observé sur le développement ovarien sous l'effet de l'ingestion des anticorps anti-CPBAg1 (Lavazec et al, 2007) renvoie à la complexité du système. En effet, l'absence d'effet significatif de *ds cpbAg1* sur ce phénotype suggère une indépendance physiologique envers la première carboxypeptidase. Néanmoins, une légère contribution de CPBAg1 dans le développement ovarien n'est pas à exclure d'après les résultats de double inactivation génique du chapitre II.

C

ELISA contre CPBAg2r



D

Paramètres / Echantillons	Dilution pour l'Abs = 1,5	Dilution pour l'Abs = 1	Dilution pour l'Abs = 0,75	Dilution pour l'Abs = 0,5	ED50 ± SD (Point d'inflexion)
Sérum anti-CPBAg1 A	38 000	170 000	271 500	452 500	228 206,95 ± 15 296,13
Sérum anti-CPBAg1 B	9 500	42 000	68 000	116 500	55 404,43 ± 2 756,86
Sérum anti-CPBAg2 A	15 500	47 000	74 500	127 000	52 367,07 ± 3 846,57
Sérum anti-CPBAg2 B	1 500	4 500	7 000	12 500	5 165,63 ± 314,26

Figure R.III.1 : Évaluation de l'affinité et de la spécificité des sérums de lapin dirigés contre CPBAg1 et CPBag2

C : ELISA dit « croisé » contre CPBAg2r des deux lots de sérum de lapin dirigés contre CPBAg1r.

D : Table récapitulative des valeurs des ED50 et des différentes dilutions des sérums pour une Absorbance à 1,5 ; 1 ; 0,75 et 0,5 des différents sérums de lapin dirigés contre CPBAg1 et CPBAg2.

Les variations des ED50 (dose effective moyenne produisant 50% de l'effet) des différents sérums sont résumées figure R.III.1D. Ces résultats permettent de définir les doses à utiliser pour engendrer une reconnaissance réciproquement similaire envers les CPBAg. De plus, le sérum anti-CPBAg1 B et le sérum anti-CPBAg2 A ont, vis à vis de la protéine contre laquelle ils ont été produits, des taux de reconnaissance quasis similaires (ED50 ≈ 55 000), facilitant la comparaison de leurs effets respectifs attendus dans l'étude fonctionnelle. Même si les ordres de grandeurs des ED50 sont similaires entre les différents sérums, la variation immunogène de CPBAg2 semble être plus forte que celle engendrée par CPBAg1 ; les ED50 des deux lapins immunisés contre CPBAg1 diffèrent d'un ratio de 4 alors que ceux immunisés contre CPBAg2 diffèrent d'un ratio de 10. De plus, le pouvoir immunogène de CPBAg2 semble être inférieur à celui de CPBAg1, la valeur de l'ED50 de son meilleur sérum étant équivalente à celle du sérum le moins affin de ceux immunisés contre CPBAg1 (anti-CPBAg1 B et anti- CPBAg2 A).

2. Evaluation de la contribution respective des CPBAg sur le développement de *Plasmodium falciparum* par l'ajout d'anticorps dans le repas sanguin

L'ajout d'anticorps dirigés contre CPBAg1 au repas sanguin infectant permettra de reproduire en système laboratoire les résultats obtenus par le biais d'expériences menées sur le terrain (Lavazec *et al.*, 2007), validant le résultat et nos conditions expérimentales. L'objectif est également de déterminer si des anticorps dirigés contre CPBAg2 bloquent le développement de *P. falciparum* chez *A. gambiae*. Cette approche permettra de s'affranchir du phénomène de

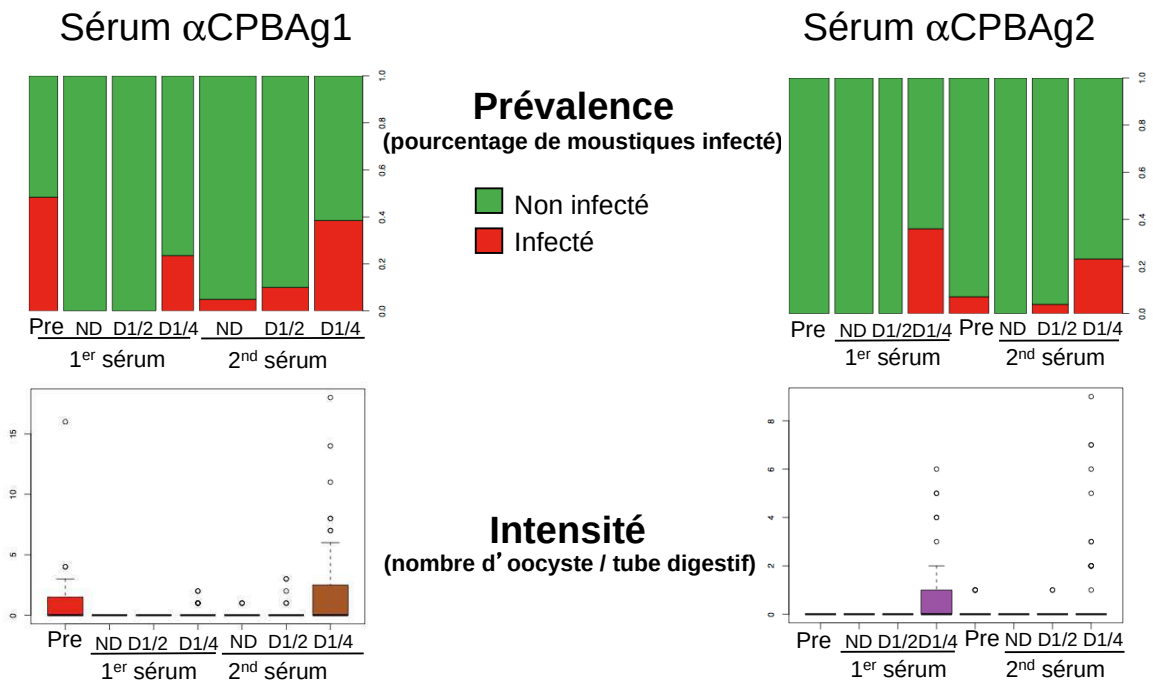
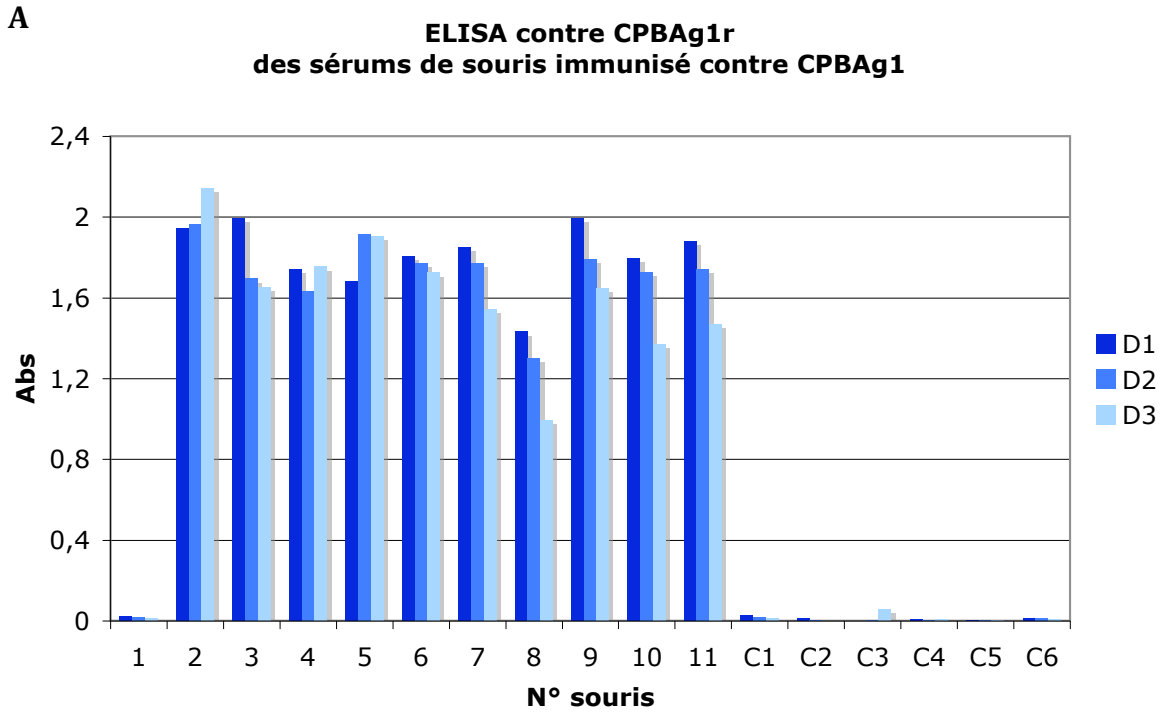


Figure R.III.2 : Prévalence d'infection traduisant le nombre de moustiques infectés et intensité d'infection traduisant le nombre d'oocystes par tube digestif de moustiques infectés en fonction des différentes dilutions des anticorps anti-CPBAg ajoutés dans le repas sanguin infectant.

Pre : sérums préimmuns, ND : sérums immuns non dilués, D1/2 : sérums immuns dilués au ½ dans un mélange de sérums humain et D1/4 : sérums immuns dilués au ¼ dans un mélange de sérums humain.

« surexpression compensatoire » de *cpbAg1* observée en condition d'inactivation génique de *cpbAg2*. L'existence d'une synergie d'inhibition du développement parasitaire, lorsque le repas sanguin infectant contient des anticorps dirigés contre chacune des deux CPBAg, sera également étudiée.

L'effet sur la prévalence et la charge parasitaire de l'ajout d'anticorps dirigés respectivement contre chacune des CPBAg dans le repas sanguin est représenté figure R.III.2A & 2B, figure obtenue à l'issue d'une seule expérience. Un effet dose réponse est observé pour les deux sérums dirigés contre CPBAg1, confirmant, dans le système d'interaction disponible au laboratoire (*A. gambiae* Yaoundé – *P. falciparum* NF54), les données publiées du terrain. La première expérience utilisant les sérums dirigés contre CPBAg2, représentée à titre indicatif sur la figure R.III.2B, a révélé une toxicité pour le parasite des sérums préimmuns, ne permettant donc aucune conclusion sur l'implication potentielle de CPBAg2 sur le développement de *P. falciparum*. Tous les lots de sérums anti-CPBAg2 ont donc été purifiés sur colonne de protéine A par la Plateforme 5 de l'Institut Pasteur. Néanmoins, ce volet de l'analyse fonctionnelle n'a pas encore été poursuivi compte-tenu des différents problèmes techniques rencontrés et des données obtenues par RNAi montrant l'absence d'effet de CPBAg2 sur le développement parasitaire. Néanmoins de telles expériences seront reprises pour établir définitivement le rôle de CPBAg2 avec une technique moins invasive que le RNAi et à l'abri probable des phénomènes de surexpression compensatoire décrits précédemment.



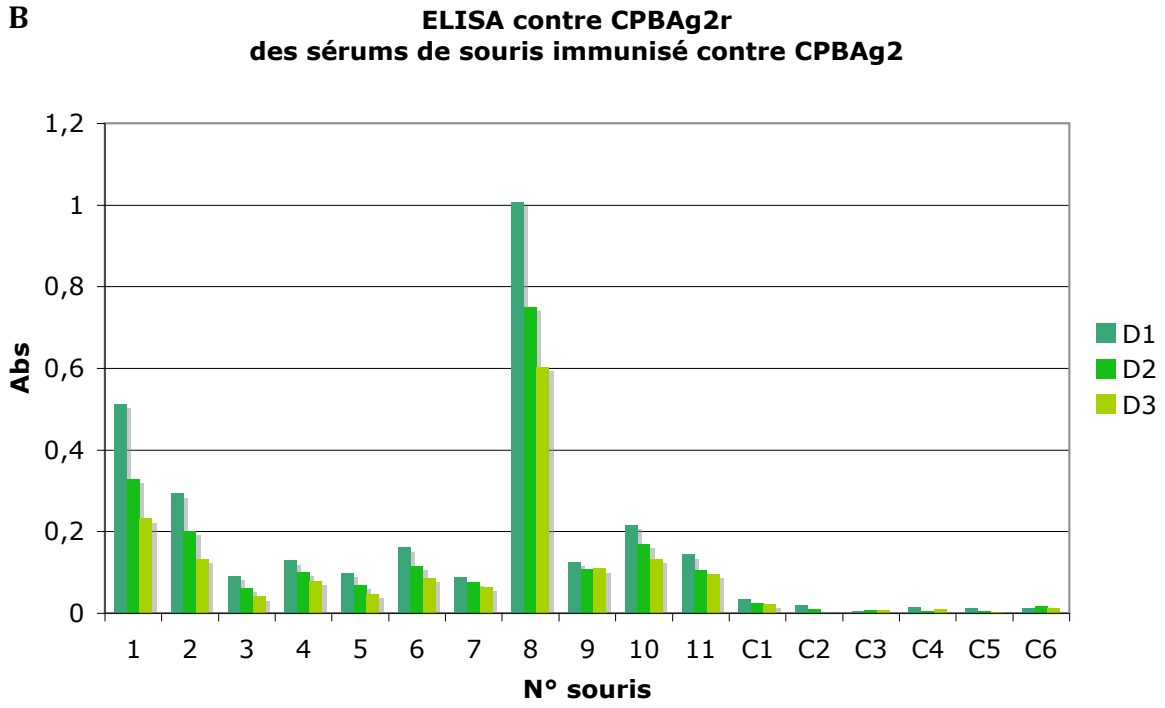


Figure R.III.3 : Évaluation de l'affinité des anticorps produits chez la souris à J21 post immunisation par CPBAg1 et CPBAg2 et la combinaison des deux protéines

Les sérums sont évalués par dilution au 1/500ème (D1), au 1/1000ème (D2) et au 1/2000ème (D3) sur 50ng de protéine. Les données d'Absorbance des ELISA sont présentées sous forme d'histogramme représentant celles obtenues contre CPBAg1r en bleu et contre CPBAg2r en vert.

A : Les souris numérotées de 1 à 11 sont celles du groupe immunisé contre CPBAg1r et celles qui sont numérotées de C1 à C6 sont les souris contrôles.

B : Les souris numérotées de 1 à 11 sont celles du groupe immunisé contre CPBAg2r et celles qui sont numérotées de C1 à C6 sont les souris contrôles.

B. Evaluation de la réponse immunitaire (protection) à long terme issue d'une seule injection d'antigène, synergie de blocage ?

Pour renforcer l'intérêt porté sur les CPBAg, comme les cibles potentielles d'un vaccin bloquant la transmission de *P. falciparum*, il est apparu important de démontrer la stabilité des anticorps bloquants dirigés contre les CPBAg suite à une immunisation unique. Pour ce faire, des immunisations contre les deux CPBAg, servant d'antigène de façon respective et conjointe ont été réalisées dans le modèle souris. Compte tenu de la durée de l'expérimentation, celle-ci a été initiée avant d'avoir réalisé les tests d'analyse fonctionnelle de CPBAg2.

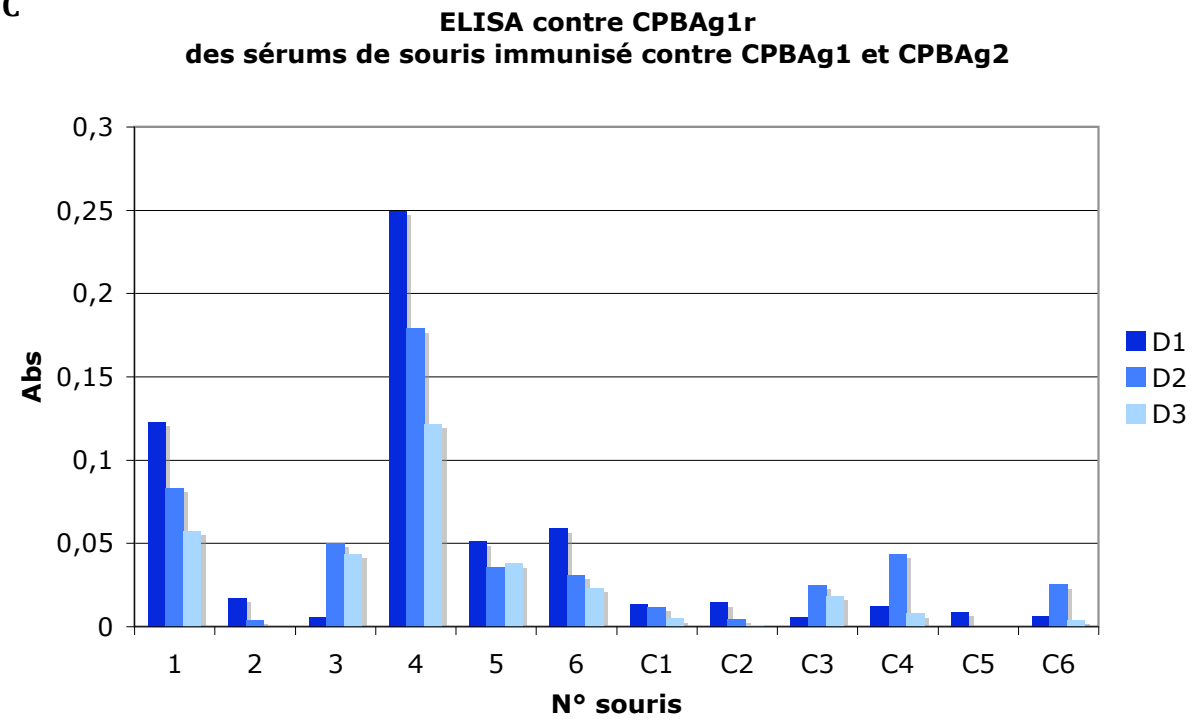
Une cohorte de 17 souris par condition à raison de 6 contrôles et 11 injectées pour CPBAg1 et CPBAg2 (forme doublet et glycosilée-doublet) et 6 pour les deux antigènes combinés ont ainsi été injectées avec 25µg d'antigène final en intra péritonéale au ratio ½ dans l'adjuvent Freund complet.

Les taux de reconnaissance des sérums, 21 jours après l'immunisation, vis à vis de la protéine contre laquelle ils ont été produits ont été évalués par ELISA (figure R.III.3). Ces données montrent que CPBAg1 est immunogène après une seule injection (Panneau A) alors que CPBAg2 ne l'est pas (Panneau B). En condition d'injection des deux protéines simultanément (Panneaux C et D), la production d'anticorps spécifiques à l'une ou l'autre des protéines est très faible, sans doute due à la quantité moitié moindre d'antigène respectif injecté.

Face à ce résultat, l'analyse des prélèvements au delà de 21 jours après l'injection n'a pas été poursuivie sauf pour la cohorte CPBAg1.

La disparité des profils associée aux faibles reconnaissances observées dans les cohortes immunisées contre CPBAg2 et contre les deux protéines en même temps, suggèrent qu'une seule injection d'antigène n'est pas suffisante pour engendrer un taux conséquent et

C



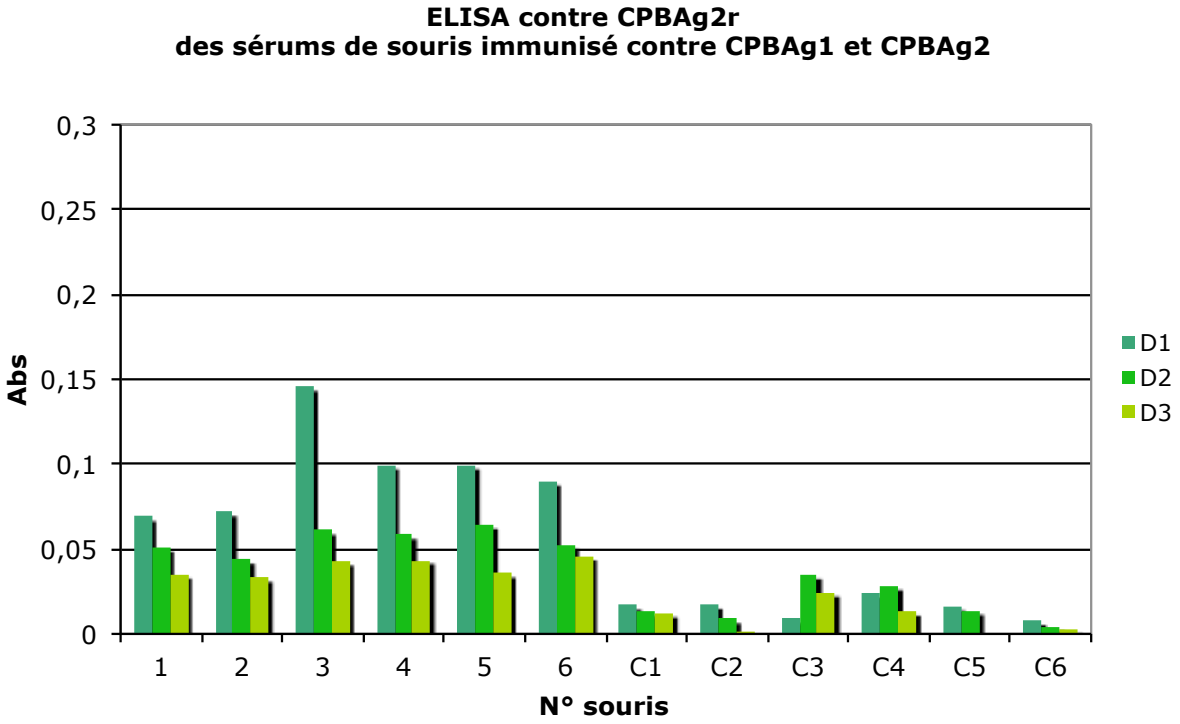


Figure R.III.3 : Évaluation de l'affinité des anticorps produits chez la souris à J21 post immunisation par CPBAg1 et CPBAg2 et la combinaison des deux protéines

Les sérums sont évalués par dilution au 1/500ème (D1), au 1/1000ème (D2) et au 1/2000ème (D3) sur 50ng de protéine. Les données d'Absorbance des ELISA sont présentées sous forme d'histogramme représentant celles obtenues contre CPBAg1r en bleu et contre CPBAg2r en vert.

C : les souris numérotées de 1 à 6 sont celles du groupe immunisé contre CPBAg1r et CPBAg2r et celles numérotées de C1 à C6 sont les souris contrôles.

persistant d’anticorps contre CPBAg2, à l’inverse de CPBAg1 qui est immunogène avec une seule injection.

Figure de synthèse

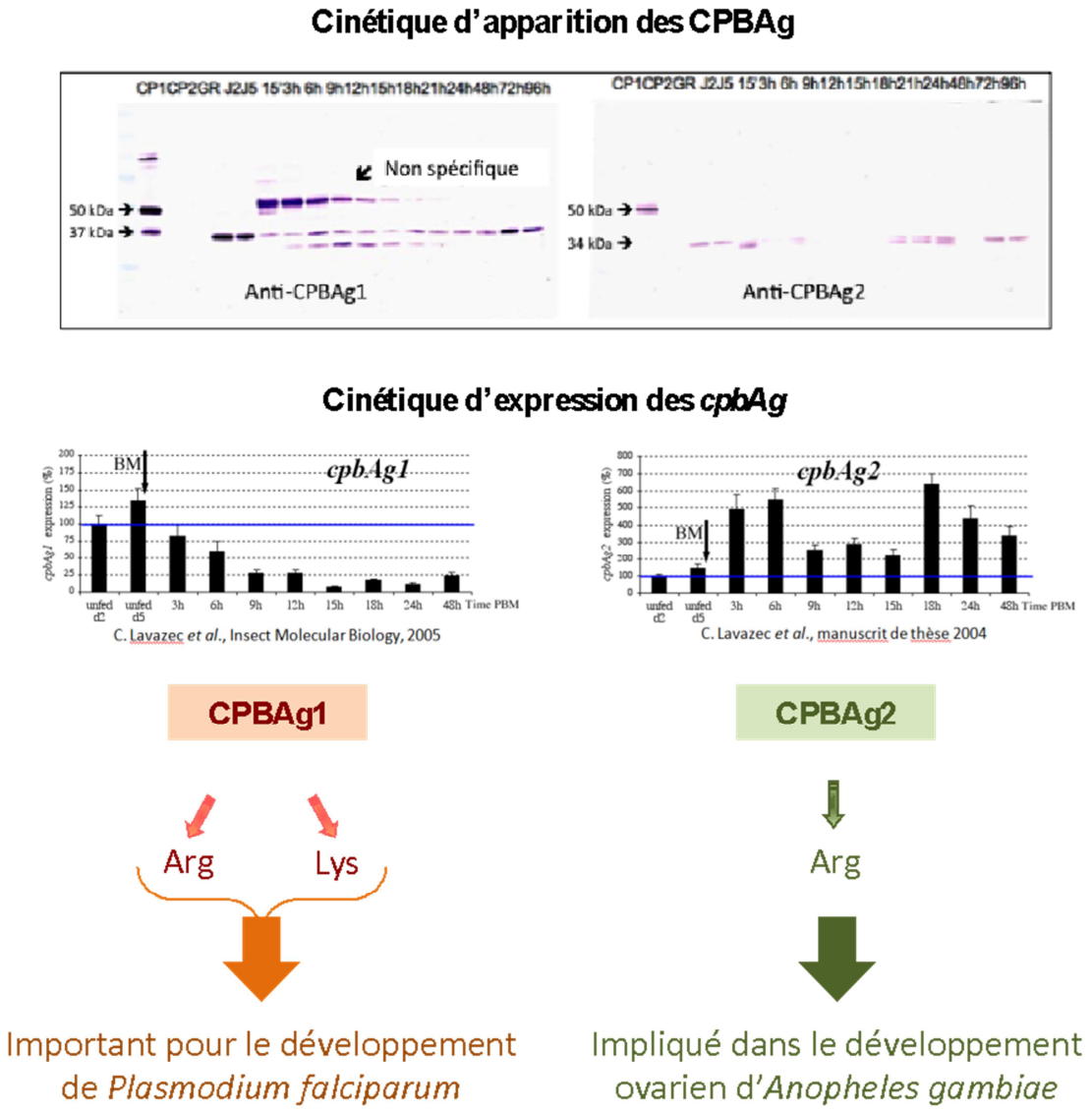


Figure de synthèse : Récapitulatif des résultats majeurs obtenus

Cinétique d'apparition des CPBAg et cinétique de l'expression de leur gène après la prise du repas sanguin *A. gambiae*. Cela associé à la représentation schématique des résultats obtenus lors de l'analyse biochimique de CPBAg1 (Arg et Lys) et de CPBAg2 (Arg), et de l'analyse fonctionnelle.

Discussion

L'identification des carboxypeptidases (Bonnet *et al.*, 2001), et leur partielle caractérisation (Lavazec *et al.*, 2005; Lavazec *et al.*, 2007) a montré un rôle de CPBAg1 dans le développement de *P. falciparum* et dans la production des œufs chez les moustiques. Cependant, la technique utilisée pour l'analyse fonctionnelle, à savoir : l'ajout d'anticorps anti-CPBAg1 aux repas sanguins infectant en vue de limiter l'activité enzymatique de la protéine, ne permettait pas de connaître le rôle de chacune des deux CPBAg dans les phénotypes observés. Mon projet de thèse était donc de différencier les deux CPBAg (34% d'identité et 57% de similarité) dans le but de discriminer leurs participations respectives à la fois sur le développement de *P. falciparum* chez *A. gambiae* et dans le développement ovarien du moustique. Cela nécessitait la caractérisation de l'autre protéine : CPBAg2 inexplorée jusqu'alors.

Grâce aux outils développés (protéines, anticorps et ARNi), j'ai montré que les CPBAg possèdent des caractéristiques biochimiques différentes et sont impliquées dans des processus différents. CPBAg1, hydrolysant la lysine et l'arginine et libérée précocement lors de la digestion, est indispensable au développement de *P. falciparum* alors que CPBAg2, hydrolysant uniquement l'arginine et présente en continu, est nécessaire au développement ovarien d'*A. gambiae*. Ces résultats engendrent des réflexions sur le rôle des deux acides aminés basiques tant sur le développement du parasite que sur le métabolisme du moustique. Cependant, l'absence d'efficacité totale de la technique d'ARNi sur les deux gènes, la compensation d'expression de l'un lorsque l'autre est inactivé et des données antérieures non publiées nuancent ces résultats.

A. Les CPBAg possèdent des propriétés enzymatiques différentes

Les points majeurs mis en évidence au niveau des propriétés enzymatiques des CPBAg sont leur spécificité de substrats et leur capacité d'activation : CPBAg2 est activée par la trypsine et la chymotrypsine alors que CPBAg1 est activée par la première mais dégradée par la seconde.

S'inscrivant dans la continuité de l'analyse biochimique et fonctionnelle des CPBAg, quelques points nécessitent d'être discutés. L'hypothèse d'un effet de la présence de leur propeptide sur leur activité enzymatique respective sera évoquée. Les deux enzymes seront également repositionnées dans le processus digestif du moustique afin d'expliquer les différences de sensibilité enzymatique des deux enzymes. Le fait que cette sensibilité puisse être l'objet d'un outil discriminant l'activité respective des deux protéines *in vivo* sera également évoqué.

1. Rôles des zymogènes sur l'activité des CPBAg

Généralement les formes zymogéniques des protéines permettent de prévenir la dégradation des protéines et/ou de réguler leur activité spatiale et temporelle par le biais d'autres enzymes endoprotéolytiques. Comme suggéré dans la partie biochimie (Chapitre I), l'entrée des sites actifs respectifs des deux CPBAg est très probablement masquée par leur propeptide respectif, même si seule la cristallisation de chacune des deux enzymes permettra de vérifier cette hypothèse.

Après des traitements doux à la trypsine, les propeptides respectifs des deux CPBAgr ont été observés sur gel coloré au bleu de coomassie ou au nitrate d'argent, mais pas en Western Blot. Cette absence de reconnaissance des propeptides par Western Blot est probablement liée à

l'absence d'anticorps possédant des épitopes dirigés contre les propeptides des CPBAg dans les sérums poly-clonaux utilisés.

Le propeptide de CPBAg1 est rapidement dégradé (absent dès la 5ème minute) alors que celui de CPBAg2 perdure à environ 15 kDa jusqu'au dernier point de cinétique analysée (2h de digestion). Corrélé à l'activité, CPBAg1 n'est pleinement active qu'à partir de ces 5 minutes de traitement. De façon analogue à la carboxypeptidase d'*H. armigera* où son activité maximale n'est observée qu'en absence de son propeptide (Bown *et al*., 2004), la présence du propeptide de CPBAg1 semble inhiber son activité protéolytique. A l'inverse, le propeptide de CPBAg2 présent tout au long du traitement n'influence pas l'activité protéique de la seconde CPBAg.

Comme l'utilisation de propeptides inhibant l'activité de protéases endogènes a déjà été efficace au niveau du tube digestif des moustiques, cette démarche pourrait permettre d'inhiber les CPBAg. En effet, l'ajout du propeptide inhibiteur de chitinase de moustique à un repas sanguin infectant bloque le développement parasitaire de *P. falciparum* chez *A. gambiae* et de *P. gallinaceum* chez *A. aegypti* (Bhatnagar *et al*., 2003). Une telle approche permettrait de confirmer le rôle inhibiteur potentiel du propeptide de CPBAg1 sur sa propre activité. Son impact sur l'activité de CPBAg2 ne pouvant être exclue, l'effet croisé du propeptide de CPBAg1 sur CPBAg2 et/ou additionné à celui du propeptide de CPBAg2 serait intéressant à analyser. Si cet outil s'avère pertinent, il permettrait d'inhiber efficacement la CPBAg1 ou les deux protéines.

2. Sensibilité enzymatique et cinétique d'apparition des protéines

CPBAg1 disparaît totalement vers la 20ème heure de digestion. Ceci peut être dû à la traduction de la totalité des transcrits, à une durée de vie courte de la protéine ou à l'action des chymotrypsines 1 et 2 produites de façon croissante entre la 12ème et la 48ème heure (Cf. Introduction). Corrélé à la présence de ces deux enzymes, les quantités de CPBAg1 endogène reconnaissables sur gel deviennent infimes à partir de la 15ème heure de digestion. Le processus dynamique du métabolisme digestif d'*A. gambiae* pourrait ainsi confiner l'activité de CPBAg1 dans les premiers instants de la digestion.

Faisant suite à leur activation par la ou les trypsines endogènes, les CPBAg prennent le relais des peptides clivés par les trypsines, exposants une extrémité basique en C-terminale. En plus de la trypsine, l'activité de CPBAg1 est vraisemblablement régulée par l'activité d'une ou des deux chymotrypsines endogènes. Alors que CPBAg2 est vraisemblablement activée par les deux classes d'endopeptidases : trypsine et chymotrypsine. La présence des CPBAg à l'issue d'un repas de sang additionné d'inhibiteur de trypsine et/ou chymotrypsine permettrait de confirmer cette hypothèse.

B. Le développement de *P. falciparum* chez *A. gambiae* dépend des acides aminés basiques ou seulement de la lysine ?

Les deux CPBAg peuvent libérer de l'arginine mais seule CPBAg1 peut libérer de la lysine. C'est pourquoi la dépendance métabolique du parasite semble être accrue envers ce dernier acide aminé.

Les données sur les voies métaboliques conduisant à la synthèse de ces deux acides aminés, l'arginine ne pouvant être exclue, a donc été explorée chez le parasite. Leur identification permettrait de les cibler par des approches combinatoires ciblant plusieurs intéractants d'une même voie métabolique pour en augmenter l'impact. Ces approches multi-cibles permettraient d'anéantir totalement les ressources en acides aminés basiques en vue de bloquer le développement du parasite chez le moustique.

Les parasites développent des mécanismes pour exploiter leur hôte afin de survivre et de compléter leur cycle de vie. La plupart des données sur le métabolisme de *Plasmodium* proviennent d'études sur son stade érythrocytaire (Lang-Unnasch *et al.*, 1998). Au cours de ce stade de développement sexué, le parasite échange de nombreux métabolites avec son hôte humain (Olszewski *et al.*, 2009).

Les acides aminés nécessaires à la biosynthèse des protéines de *Plasmodium* sont obtenus par trois voies différentes : la biosynthèse d'acides aminés grâce aux ressources carbonées, l'assimilation d'acides aminés libres présents dans le plasma, les cellules hôtes ou grâce à la protéolyse de l'hémoglobine (stade érythrocytaire), (Goldberg *et al.*, 1993 ; Sherman *et al.*, 1977). En effet, lors de son évolution co-adaptative avec ses hôtes, le parasite a perdu la plupart des voies

de biosynthèse des acides aminés ne conservant que celles qui synthétisent l'asparagine, l'aspartate, le glutamate, la glutamine, la glycine et la proline (Payne *et al.*, 2006). Cependant, au stade érythrocytaire le parasite nécessite un minimum de 5 acides aminés (cystéine, glutamate, glutamine, méthionine et isoleucine) pour assurer sa croissance à court terme (Divo *et al.*, 1985). Certaines de ces voies de biosynthèse sont donc insuffisantes pour assurer la quantité nécessaire à la croissance parasitaire (glutamate). Les deux acides aminés d'intérêt, lysine et arginine ne peuvent donc pas être synthétisés par le parasite. Le métabolisme parasitaire étudié par l'incorporation d'acides aminés marqués au ^{14}C révèle que la majorité d'arginine et de lysine mise en contact avec le parasite *P. lophurae* sont incorporées dans ses protéines (Sherman *et al.*, 1977), reflétant la nécessité de ces acides aminés pour son développement. Le parasite doit donc utiliser des transporteurs membranaires d'acides aminés qui lui permettent d'incorporer dans ses protéines ceux qu'il est incapable de synthétiser. 2,5% du génome parasitaire code des transporteurs ou pores n'ayant pour la plupart pas de fonction physiologique associée (Martin *et al.*, 2009). Dans Plasmo DB, 5 protéines de *P. falciparum* sont annotées comme étant des transporteurs d'acides aminés putatifs. Cependant, les données de leur expression aux stades de développement parasitaire chez le moustique viennent à manquer. Le parasite ne pouvant synthétiser la lysine et l'arginine, il a cependant conservé une exopeptidase capable de libérer ces acides aminés. En effet, PfAMP1 est une aminopeptidase de *P. falciparum* qui est exprimée, en plus des stades sanguins, au cours des stades du développement parasitaire chez le moustique (Florent *et al.*, 2002). Cette protéine est la seule protéine parasitaire caractérisée à ce jour comme étant capable de libérer, entre autre, de la lysine et de l'arginine lors du développement parasitaire chez le moustique. Les constantes Mikaëliennes de cette enzyme à l'encontre de deux substrats synthétiques : Km (L-Lys-AMC) = 40µM et Km (L-Arg-AMC) = 100µM (Allary *et al*., 2002) révèlent une plus forte affinité de cette enzyme pour la lysine comparé à l'arginine. Ces données renforcent celles obtenues lors

de l'analyse fonctionnelle des CPBAg qui mettent en évidence une dépendance plus forte du parasite envers CPBAg1, seule à libérer la lysine parmi les deux CPBAg. Après son développement intrastomacal, le parasite traverse la membrane de l'épithélium digestif pour continuer son développement entouré de l'hémolymphe du moustique. Des échanges d'acides aminés sont donc probables entre le parasite et ce milieu biologique.

La présence de *P. berghei* double la quantité d'arginine présente dans l'hémolymphe d'*A. stephensi* 4 jours après l'infection (69,6 µg/ml => 122,7µg/ml) et 11 jours après l'infection (67,8 µg/ml => 171,4µg/ml) (Mack *et al.*, 1979). Des transporteurs d'arginine, qui pourraient être analogues aux transporteurs SLC7 d'*Aedes aegypti* présents dans les membranes des cellules du corps gras (Carpenter *et al.*, 2012), sont ainsi suggérés (Cf. Discussion § II.A).

La présence de *P. berghei* module également les concentrations de lysine dans l'hémolymphe (Mack *et al.*, 1979). 4 jours après l'infection sa concentration diminue de 18% (131,4 µg/ml => 107,3µg/ml) alors qu'elle augmente de 28%, 11 jours après l'infection (172.3 µg/ml => 222,0µg/ml).

La surexpression de CPBAg1 en présence du parasite aurait du augmenter le ratio de lysine après le repas infectant. Cette diminution suggère l'utilisation de la lysine par le parasite lors des premiers stades de son cycle de vie chez le moustique. A l'inverse, l'augmentation observée 11 jours après l'infection, reste à mon sens inexplicable à ce jour. Il serait intéressant d'étudier plus finement la capture de cet acide aminé lors du développement de *P. falciparum* chez *A. gambiae*.

Des substrats synthétiques d'arginine et de lysine, marqués par des fluorophores discriminants, permettraient de suivre *in vivo* leur métabolisme chez le parasite mais également chez le moustique.

Les résultats obtenus privilégient le caractère indispensable de la lysine par rapport à l'arginine pour le développement parasitaire. Cependant, des données de C. Lavazec (Thèse 2004)

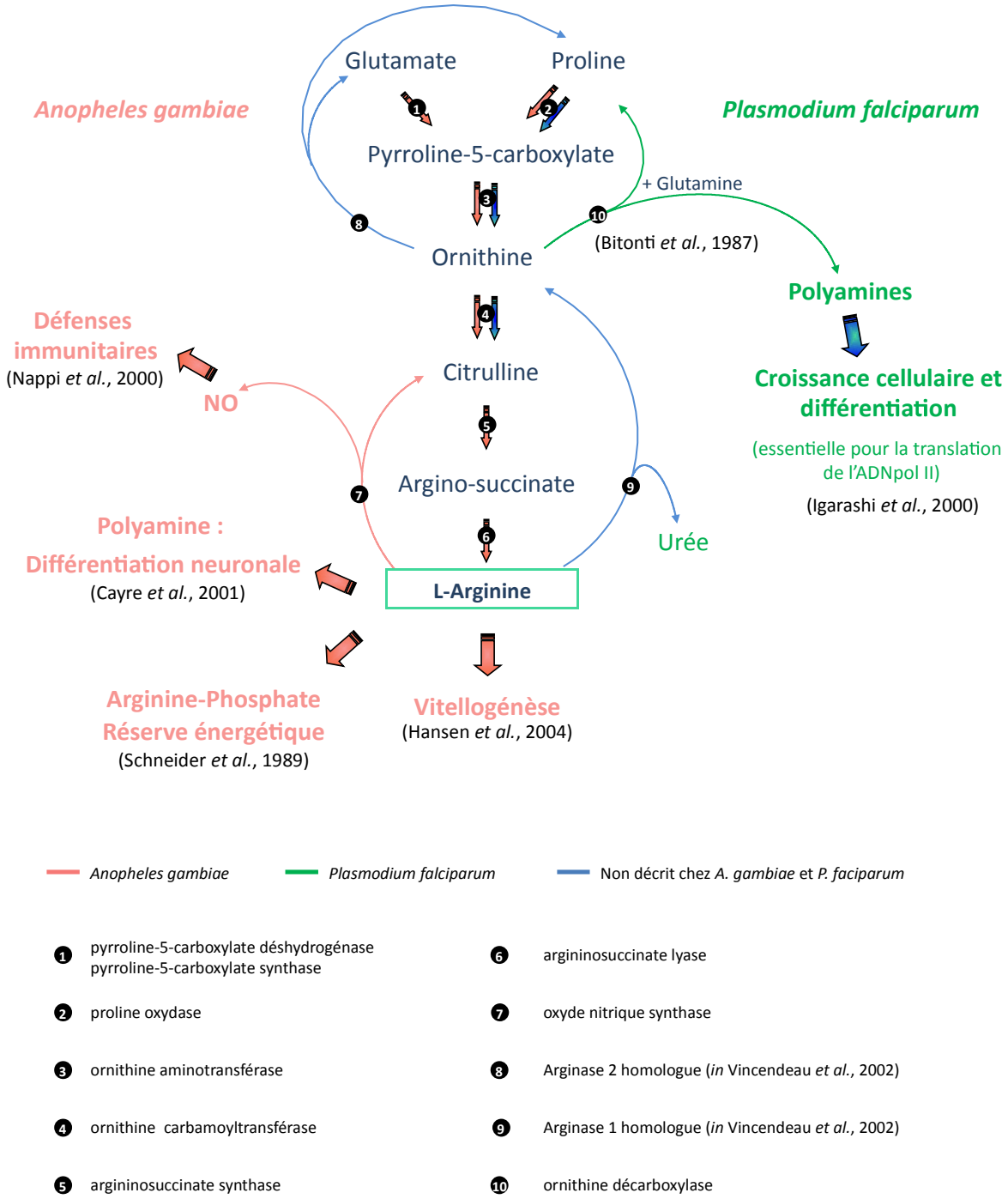


Figure D.1 : Les voies métaboliques conduisant à la synthèse d'Arginine chez *A.gambiae* et *P. falciparum* et représentation schématique de l'implication de cet acide aminé chez les insectes

montrent un rôle non négligeable de l'arginine de part sa libération après clivage du substrat synthétique Hippuryl-arginine, ajouté dans le repas sanguin infectant. Ces données montrent que les deux acides aminés basiques par clivage de leurs deux substrats synthétiques respectifs améliorent considérablement la prévalence d'infection. La lysine et l'arginine sont donc tous deux nécessaires au développement parasitaire, où les relations de dépendance du parasite envers chacune d'elles méritent d'être plus approfondies. A savoir, si un des deux acides aminés basiques est privilégié par le parasite et par le moustique, à quel stade de développement est-il le plus indispensable ? Est-ce que certaines conditions influencent la dépendance métabolique ? Est-ce que le nombre de parasites peut influencer la réciprocité des besoins ?

1. Existe-t-il une compétition métabolique entre le parasite et le moustique pour les ressources en acides aminés basiques?

Les rôles des acides aminés chez les moustiques sont aussi diversifiés qu'importants pour le cycle de vie des moustiques. Ils contrôlent par exemple la digestion du sang. L'augmentation de la concentration d'acides aminés engendre la traduction de l'ARNm codant pour la trypsine précoce (Noriega *et al.*, 1999). Ils sont nécessaires à l'oxydation et à l'accumulation de ressources énergétiques : glucogenèse et lipogenèse (Zhou *et al.*, 2004). Ils sont impliqués dans le processus vitellique en étant des précurseurs de l'activation de la voie TOR dans les cellules du corps gras (Raikhel *et al.*, 2002) de part leur internalisation dans ce tissu (Carpenter *et al.*, 2012).

Les voies métaboliques conduisant à l'arginine, acide aminé central pour le moustique, sont schématisées en parallèle de celles connues chez le parasite (figure D.1.). Les données

concernant la lysine, encore trop parcellaire dans la littérature, ne pouvant conduire à une analyse analogue, ne seront pas abordées ici.

Chez les moustiques, comme chez les mammifères (Morris *et al.*, 2010), l'arginine est un acide aminé central. Il interfère dans de nombreuses voies métaboliques, aussi disparates qu'importantes pour leur cycle biologique. L'arginine peut constituer un réservoir énergétique dans la synthèse d'arginine phosphate, source de l'énergie musculaire nécessaire au vol de l'insecte (Schneider *et al.*, 1989). L'arginine peut également interagir avec les polyamines en activant la différenciation neuronale des insectes (Cayre *et al.*, 2001). Cet acide aminé est également impliqué dans la vitellogénèse en activant la voie TOR (Hansen *et al.*, 2004) de part son intégration (en plus de la lysine et de l'histidine) de l'hémolymphe vers les cellules du corps gras, grâce à des récepteurs SLC7 de type CAT (Carpenter *et al.*, 2012). L'arginine est également l'un des éléments centraux du système immunitaire des insectes, qui sous l'action de NOS libère du NO et de la citrulline (Nappi *et al.*, 2000). La proline et le glutamate sont deux acides aminés qui peuvent conduire chez le moustique à la synthèse d'arginine (in Lavazec, 2004) en passant par l'intermédiaire de l'ornithine qui a une durée de vie courte (Cf. figure D.1.).

P. falciparum possède une ornithine décarboxylase (Bitonti *et al.*, 1987) qui engendre des polyamines (avec de la glutamine et de la proline) à partir d'ornithine. Les polyamines, nécessaires à la translation de l'ADN polymérase parasitaire (Bachrach *et al.*, 1990), sont impliquées dans la croissance et la différenciation parasitaire.

La quantité d'ornithine disponible pourrait être directement modulée par la présence d'arginine. Des arginases homologues à celles décrite par Vincendeau *et al.*, en 2012 (qui étudie l'interaction de trypanosome chez l'homme), pourraient à la fois convertir l'arginine en ornithine et en urée et convertir l'ornithine en glutamate et en proline. Ce type d'enzymes, non documentées dans la littérature pour *A. gambiae* et *P. falciparum*, sont l'objet d'études au laboratoire.

Des substrats synthétiques d'arginine marqués par des fluorophores permettraient de caractériser la proportion d'entre eux qui sont utilisés pour : induire la réponse immunitaire, induire la voie TOR, activer des neurohormones dans le cerveau ou être le ligand de récepteurs hémocytaires. Ceci permettant d'enrichir les connaissances sur la physiologie du moustique et d'enrichir les cibles potentielles aussi bien chez le moustique que chez le parasite.

2. La dépendance métabolique d'*A. gambiae* envers l'arginine

Les moustiques anautogènes nécessitent un repas sanguin pour le développement de leurs œufs. 10 acides aminés sont essentiels pour la vie larvaire et la production d'œuf chez *Aedes* (espèce plus largement documentée que les *Anopheles*): l'arginine, la lysine, la leucine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane, la valine, l'histidine et la méthionine (*in* Clements, 1992). Chez ce même insecte, la présence d'acides aminés ajoutés au repas sanguin engendre la rétention de protéines non digérées dans le lumen (Caroci *et al*., 2003), comme si la présence d'acides aminés induisait un message de « satiété » indiquant au moustique de ne plus dépenser d'énergie pour synthétiser les enzymes digestives qui lui sont nécessaires à l'obtention de nutriments qu'il a déjà à sa disposition.

Le pool d'arginine disponible, diminuant lors de l'inactivation de *cpbAg2*, ralentit et diminue le développement ovarien d'*A.gambiae.* En effet, l'arginine induit la voie TOR (Target Of Rapamycin) (Hansen *et al*., 2004) qui active entre autre la transcription de la vitellogénine dans les cellules du corps gras des moustiques.

D'autre part, une étude récente décrivant des gènes d'autophagie (ATG) impliqués dans la maturation des œufs chez *Aedes* (Bryant *et al*., 2011) montre une hyperinduction de la voie TOR

qui induit la production massive de vitellogénine lorsque ces gènes sont éteints par ARNi. Cette hyperinduction permettrait au moustique de terminer la maturation de ce premier lot d'oocytes, au détriment de l'initiation du second cycle gonotrophique qu'elle est incapable de compléter.

Même si la transposition entre les vecteurs *Aedes* et *Anopheles* n'est pas toujours adéquate, la réapparition tardive de femelles gravides lorsque *cpbAg2* est inactivé pourrait être régi par des phénomènes de « survie » homologue qui complètent la maturation du premier cycle gonotrophique des *Anopheles* en sur-activant la voie TOR.

L'expression de la vitellogénèse en contexte d'ARNi pour les *cpbAg,* évalué par qPCR, permettra de répondre à cette hypothèse, identifiant auquel cas chez *Anopheles* des mécanismes homologues à ceux observés par l'équipe de Raïkhel chez *Aedes*. Ceci afin de cibler les acteurs de ces voies de signalisation, en plus des CPBAg dans des stratégies limitant la transmission, en limitant et/ou en interrompant les cycles gonotrophiques des vecteurs.

L'analyse de l'expression des *cpbAg*, l'effet de leur inactivation sur le développement parasitaire et la finalisation du second cycle gonotrophique ainsi que l'initiation du troisième, seraient également intéressants à observer à l'issue d'un second repas de sang au même titre que l'expression des protéines.

C. L'utilisation des CPBAg comme cible d'une stratégie limitant la transmission parasitaire.

Les rôles respectifs des CPBAg en font des cibles potentielles de stratégies limitant la transmission. De nombreuses stratégies sont envisageables et une liste non exhaustive évoquera les TBV (Transmission Blocking Vaccine) ou vaccins altruistes, et les moustiques transgéniques.

1. Les TBV ou vaccins altruistes

Ce concept proposé par Huff en 1950 repose sur l'injection d'antigènes qui engendre la production d'anticorps bloquant le développement parasitaire chez le moustique. Une personne vaccinée pourrait donc être infectée mais à l'issue de la prise des anticorps contenus dans son sang, le développement parasitaire sera limité ou bloqué chez le moustique, le rendant incapable de disséminer à nouveau l'agent pathogène.

De nombreuses cibles ont été étudiées, coté parasite, les protéines des stades sexués du parasite (Pfs25) et des protéines parasitaires exprimées dans les glandes salivaires du moustique (anti-GS) sont les principales pistes. En ce qui concerne les moustiques, des broyats de tubes digestifs ont été testés ainsi que des anticorps dirigés contre les trypsines, aminopeptidases, et carboxypeptidases (in Lavazec, 2008).

Des anticorps générés chez l'homme pourraient ainsi bloquer l'activité des CPBAg après leur absorption par le moustique. Cependant les enzymes digestives, dont la fonction est comparable entre espèces, pourraient engendrer des reconnaissances de ces mêmes anticorps

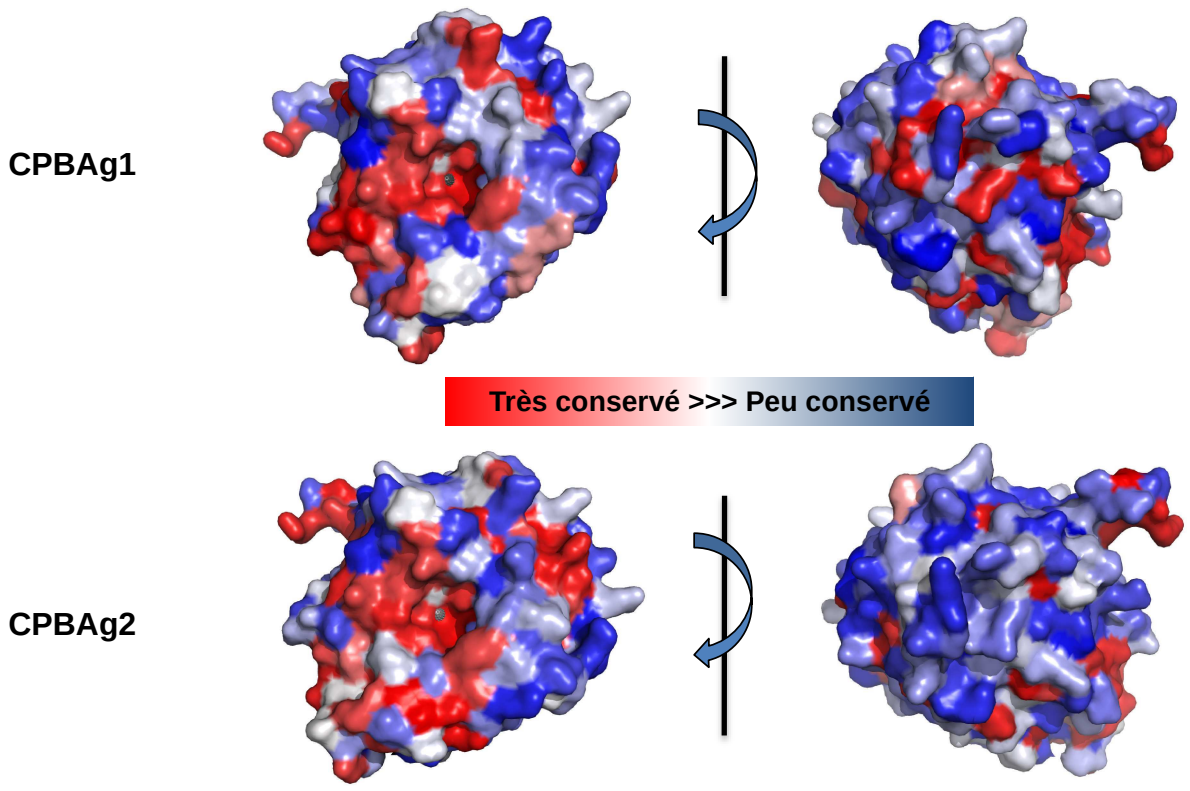


Figure D.2 : Identification des régions protéiques conservées entre les CPBAg et la CPA2 humaine

Les similarités des séquences de chaque CPBAg avec la CPA2 humaine sont apposées sur la structure de CPA2 (code pdb : 2BOA). Les régions les plus conservées sont annotées en rouge alors que celles qui présentent le moins d'homologie sont en bleu.

envers des carboxypeptidases humaines comme la carboxypeptidase U dite « CPB-like plasmatique » qui peut s'accrocher aux macroglobulines sanguines (Valnickova *et al.*, 1996)[*].

Cependant, c'est la carboxypeptidase A 2 humaine qui a le plus d'homologies avec les deux carboxypeptidases B d'*A. gambiae*. Pour parer à d'éventuels phénomènes toxiques pour l'organisme lors du ciblage des CPBAg par cette approche, la similarité des séquences respectives des deux protéines ont été apposées à la structure de la carboxypeptidase A2 humaine (figure D.2.). Les zones à cibler par les inhibiteurs, représentées par celles présentant le moins d'homologie avec la CPA humaine, sont en bleu.

De plus, la variabilité d'immunogénicité engendrée à l'occasion des différentes immunisations contre les CPBAg chez la souris (Cf. Chapitre III § B) se reproduisant chez l'homme, une autre stratégie sera favorisée. Cependant les données obtenues par immunisation de souris avec CPBAg1 (Lavazec *et al.*, 2007) indiquent une absence d'effet secondaire chez ces animaux, suggérant qu'une approche vaccinale avec CPBAg1 pourrait être envisagée.

---

[*] Suspectée d'être à l'origine des reconnaissances aspécifiques des anticorps anti-CPBAg observé sur les extraits contenant le plus de sang.

D. Les moustiques transgéniques

Le lâcher de moustiques transgéniques modifiés contre les CPBAg pourrait anéantir leur activité en évitant les problèmes de reconnaissances croisées que peuvent engendrer les TBV.

En effet, de tels moustiques transgéniques pourraient conférer une inactivation stable et héréditaire des *cpbAg* à leurs descendants. Par le biais de la surexpression d'ARN antisens sous contrôle d'un promoteur fort du tube digestif, l'expression endogène des *cpbAg* sera abolie. Ceci aurait pour conséquence un impact à la fois sur le développement de *P. falciparum* et d'*A. gambiae*. La technique φC31 chez *A. gambiae* est aujourd'hui efficace (Meredith *et al.*, 2011), promettant de nombreuses applications de modification site spécifique évitant les problèmes de variégations des techniques d'intégration aléatoire.

Cependant, l'abolition stable de *cpbAg2* dans les descendants des moustiques transgéniques laisse présager des défauts dans le développement ovarien des moustiques au moins aussi important que ceux observés en condition d'injection de dsARN pouvant conduire à l'absence de ponte des femelles. Pour y parer, en plus de l'expression d'un ARN antisens des *cpbAg*, les moustiques transgéniques pourraient exprimer une forme mutée de *cpbAg2*. Par exemple, des modifications du site actif pourraient conférer une variation d'affinité, qui diminuera le pool d'arginine engendré par CPBAg2, mais sans l'anéantir totalement, limitant une toxicité éventuelle de la transgénèse chez les moustiques.

Néanmoins, avant toute tentative d'inhibition des CPBAg, leur cristallisation est indispensable, permettant l'obtention d'un jeu de données qui, après raffinement, permettra de connaître plus précisément la structure tridimensionnelle adoptée par chacune des deux enzymes nécessaire pour les cibler spécifiquement.

1. La technique d'ARNi est-elle adéquate ?

De récents travaux remettent en question la technique d'ARNi utilisée pour l'analyse fonctionnelle chez *A. gambiae* (Nsango *et al*., 2012). De plus, l'observation d'expression compensatoire d'un des *cpbAg* lorsque l'autre est inactivé (et inversement) ainsi que l'apparition ectopique de CPBAg2 dans les carcasses des individus inactivés (données non présentées) ont conduit à analyser les données qPCR différemment.

Ainsi, les données de qPCR sur l'expression des deux *cpbAg*, à l'issue d'une simple injection de ds GFP ne faisant qu'induire la prise en charge de l'*ARN* et la réponse de l'insecte face à la blessure et à la potentielle entrée de flore microbienne, bactérienne ou virale, ont été comparées à celles obtenues sur les moustiques non injectés. Les résultats montrent que lorsque les moustiques sont injectés de *ds GFP*, le profil d'expression de *cpbAg1* est modifié et que celui de *cpbAg2* est décalé dans le temps. En effet, le profil d'expression des deux *cpbAg* devient biphasique avec deux pics d'expression à 12h et 24h après l'ingestion de sang. L'expression de *cpbAg2* est également largement surexprimée par rapport à la condition témoin. Ces résultats nécessitent cependant d'être répliqués afin de conclure sur un lien potentiel entre la digestion et la réparation de la blessure occasionnée par l'injection et/ou l'induction de l'immunité par de potentiels pathogènes.

2. L'arginine un ligand aux multiples facettes, est elle un senseur de l'immunité ?

Des récepteurs VKR (Venus Kinase Receptors) appartenant à la famille des tyrosines kinase sont exprimés au niveau des gonades des femelles Anopheles (Ahier *et al.*, 2009) et sont activés par l'arginine qui est leur liguant préférentiel au même titre que le récepteur GPRC6A des mammifères (Wellendorph *et al.*, 2005) ou le OR5.24 des poissons (Alioto *et al.*, 2005). Leur expression suggère une implication dans les mécanismes d'oogenèse mais leur position précise dans les voies métaboliques qui conduisent à la synthèse de la vitellogénèse reste à clarifier.

La participation des VKR dans l'immunité des moustiques sera discutée grâce à la récente identification de son expression constitutive dans une lignée cellulaire hémocytaire d'*A. gambiae* (SuA5B) (http://www.theses.fr/2011LIL2S034). Ce récepteur pourrait ainsi intégrer les aminoacides de l'hémolymphe aux hémocytes ce qui pourrait engendrer un signal activateur de l'immunité.

Grâce à des anticorps anti-VKR, les immuno-marquages de ces récepteurs chez *A. gambiae* permettraient de les localiser physiologiquement dans l'optique de clarifier la potentielle induction directe des hémocytes par l'arginine. L'observation de l'expression des principaux intéractants du système immunitaire dans le contexte, où les ressources en arginine disponibles pour le moustique varieraient, serait également intéressante à mener. Et l'arginine pourrait être identifié comme étant un senseur de l'immunité d'*A. gambiae*.

3. Les autres variabilités et interactions du système *Anopheles-Plasmodium*

Les interactions génotypes/génotypes du moustique avec les différents pathogènes pourraient par exemple privilégier des voies métaboliques, ou induire de nouveaux gènes spécifiques des réponses engendrées par les interactions du système naturel, leur coévolution pouvant également moduler ces processus. A l'instar des différences de susceptibilité des moustiques ayant le même fond génétique, *A. gambiae* de forme M est plus susceptible à *P. falciparum* au Cameroun alors que c'est la forme S qui est la plus susceptible au Sénégal (Ndiath *et al.*, 2011) et qu'il n'existe pas de différences significatives de susceptibilité des moustiques situés au Mali (Trout-Fryxell *et al.*, 2012). Les compétences vectorielles sont donc contrôlées par des facteurs externes en plus des coadaptations évolutives entre le moustique et le parasite. La flore bactérienne des moustiques dont la composition varie en fonction des ressources d'eau du stade larvaire de développement, peut moduler la susceptibilité des moustiques (Boissière *et al.*, 2012). En effet, l'abondance de bactéries de type *Enterobacteriaceae* dans la flore intestinale des moustiques à un effet protecteur contre l'infection de *P. falciparum*.

En plus des effets engendrés par son microbiotome, la réponse à l'infection parasitaire des moustiques peut également être modulée en fonction des espèces en interactions. Il serait intéressant d'étudier le rôle des CPBAg sur d'autres espèces plasmodiales telles que *P. vivax* et *P. knowlesi* et mais aussi sur d'autres *Anopheles* tel que *A. stephensi* et *A. albimanus*.

Références Bibliographiques

(2011). "World Malaria Report." World Health Organization.

Ahier, A., Rondard, P., Gouignard, N., Khayath, N., Huang, S., Trolet, J., Donoghue, D. J., Gauthier, M., Pin, J. P. and Dissous, C. (2009). "A new family of receptor tyrosine kinases with a venus flytrap binding domain in insects and other invertebrates activated by aminoacids." PLoS One, e5651.

Ahmed, A. M. and Hurd, H. (2006). "Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in Anopheles gambiae via follicular apoptosis." Microbes Infect, 308-315.

Akov, S. (1962). "A qualitative and quantitative study of the nutritional requirements of *Aedes aegypti* L. larvae." Journal of Insect Physiology, 319-335.

Alioto, T. S. and Ngai, J. (2005). "The odorant receptor repertoire of teleost fish." BMC Genomics, 173.

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

Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L. and Corbellino, M. (2012). "Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi." Mediterr J Hematol Infect Dis, e2012013.

Bachrach, U. and Abu-Elheiga, L. (1990). "Effect of polyamines on the activity of malarial alpha-like DNA polymerase." Eur J Biochem, 633-637.

Baer, K., Klotz, C., Kappe, S. H., Schnieder, T. and Frevert, U. (2007). "Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature." PLoS Pathog, e171.

Barillas-Mury, C. V., Noriega, F. G. and Wells, M. A. (1995). "Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito, Aedes aegypti." Insect Biochem Mol Biol, 241-246.

Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. (1998). Handbook of Proteolytic Enzymes. London, Academic Press.

Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. (2004). Handbook of Proteolytic Enzymes, Elsevier.

Baton, L. A. and Ranford-Cartwright, L. C. (2005). "Spreading the seeds of million-murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito." Trends Parasitol, 573-580.

Bayes, A., Comellas-Bigler, M., Rodriguez de la Vega, M., Maskos, K., Bode, W., Aviles, F. X., Jongsma, M. A., Beekwilder, J. and Vendrell, J. (2005). "Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A, 16602-16607.

Beier, J. C. (1998). "Malaria parasite development in mosquitoes." Annu Rev Entomol, 519-543.

Berner, R., Rudin, W. and Hecker, H. (1983). "Peritrophic membranes and protease activity in the midgut of the malaria mosquito, Anopheles stephensi (Liston) (Insecta: Diptera) under normal and experimental conditions." J Ultrastruct Res, 195-204.

Bhatnagar, R. K., Arora, N., Sachidanand, S., Shahabuddin, M., Keister, D. and Chauhan, V. S. (2003). "Synthetic propeptide inhibits mosquito midgut chitinase and blocks sporogonic development of malaria parasite." Biochem Biophys Res Commun, 783-787.

Billingsley, P. F. and Hecker, H. (1991). "Blood digestion in the mosquito, Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and alpha-glucosidase in the midgut." J Med Entomol, 865-871.

Billingsley, P. F. and Rudin, W. (1992). "The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of Plasmodium species." J Parasitol, 430-440.

Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R. E. and Morris, H. R. (1998). "Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito." Nature, 289-292.

Billker, O., Miller, A. J. and Sinden, R. E. (2000). "Determination of mosquito bloodmeal pH in situ by ion-selective microelectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis." Parasitology, 547-551.

Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G. and Sinden, R. E. (1997). "The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei in vitro." Parasitology, 1-7.

Bischoff, E. (2001). "Etude de deux membres de la superfamille multigénique Pf60/VAR de *Plasmodium falciparum,* exprimés par recodage traductionnel programmé." PhD

Bitonti, A. J., McCann, P. P. and Sjoerdsma, A. (1987). "Plasmodium falciparum and Plasmodium berghei: effects of ornithine decarboxylase inhibitors on erythrocytic schizogony." Exp Parasitol, 237-243.

Blanford, S., Shi, W., Christian, R., Marden, J. H., Koekemoer, L. L., Brooke, B. D., Coetzee, M., Read, A. F. and Thomas, M. B. (2011). "Lethal and pre-lethal effects of a fungal biopesticide contribute to substantial and rapid control of malaria vectors." PLoS One, e23591.

Boete, C. and Koella, J. C. (2003). "Evolutionary ideas about genetically manipulated mosquitoes and malaria control." Trends Parasitol, 32-38.

Boissiere, A., Tchioffo, M. T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S. E., Shahbazkia, H. R., Awono-Ambene, P. H., Levashina, E. A., Christen, R. and Morlais, I. (2012). "Midgut microbiota of the malaria mosquito vector Anopheles gambiae and interactions with Plasmodium falciparum infection." PLoS Pathog, e1002742.

Bolognesi, R., Terra, W. R. and Ferreira, C. (2008). "Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency. Theoretical and experimental models." J Insect Physiol, 1413-1422.

Bonnet, S., Prevot, G., Jacques, J. C., Boudin, C. and Bourgouin, C. (2001). "Transcripts of the malaria vector Anopheles gambiae that are differentially regulated in the midgut upon exposure to invasive stages of Plasmodium falciparum." Cell Microbiol, 449-458.

Boudko, D. Y. (2012). "Molecular basis of essential amino acid transport from studies of insect nutrient amino acid transporters of the SLC6 family (NAT-SLC6)." J Insect Physiol, 433-449.

Bown, D. P. and Gatehouse, J. A. (2004). "Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (Helicoverpa armigera) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues." Eur J Biochem, 2000-2011.

Briegel, H. (1990). "Fecundity, metabolism, and body size in Anopheles (Diptera: Culicidae), vectors of malaria." J Med Entomol, 839-850.

Briegel, H. and Lea, A. O. (1975). "Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes." J Insect Physiol, 1597-1604.

Bryant, B. and Raikhel, A. S. (2011). "Programmed autophagy in the fat body of Aedes aegypti is required to maintain egg maturation cycles." PLoS One, e25502.

Caroci, A. S. and Noriega, F. G. (2003). "Free amino acids are important for the retention of protein and non-protein meals by the midgut of Aedes aegypti females." J Insect Physiol, 839-844.

Carpenter, V. K., Drake, L. L., Aguirre, S. E., Price, D. P., Rodriguez, S. D. and Hansen, I. A. (2012). "SLC7 amino acid transporters of the yellow fever mosquito Aedes aegypti and their role in fat body TOR signaling and reproduction." J Insect Physiol, 513-522.

Carter, R. and Gwadz, R. W. (1980). Infectiousness and gamete immunization in malaria. New York, Malaria Academic Press.

Catteruccia, F. (2007). "Malaria vector control in the third millennium: progress and perspectives of molecular approaches." Pest Manag Sci, 634-640.

Cayre, M., Malaterre, J., Strambi, C., Charpin, P., Ternaux, J. P. and Strambi, A. (2001). "Short- and long-chain natural polyamines play specific roles in adult cricket neuroblast proliferation and neuron differentiation in vitro." J Neurobiol, 315-324.

Christophides, G. K. (2005). "Transgenic mosquitoes and malaria transmission." Cell Microbiol, 325-333.

Chulay, J. D., Schneider, I., Cosgriff, T. M., Hoffman, S. L., Ballou, W. R., Quakyi, I. A., Carter, R., Trosper, J. H. and Hockmeyer, W. T. (1986). "Malaria transmitted to humans by mosquitoes infected from cultured Plasmodium falciparum." Am J Trop Med Hyg, 66-68.

Clements, A. (1992). In The Biology of Mosquitoes : Development, nutrition and reproduction.

Clements, A. (1999). In The biology of mosquitoes : Sensory reception and behaviour.

Cox-Singh, J., Hiu, J., Lucas, S. B., Divis, P. C., Zulkarnaen, M., Chandran, P., Wong, K. T., Adem, P., Zaki, S. R., Singh, B. and Krishna, S. (2010). "Severe malaria - a case of fatal Plasmodium knowlesi infection with post-mortem findings: a case report." Malar J, 10.

Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. and Higgins, D. R. (2000). "Recombinant protein expression in Pichia pastoris." Mol Biotechnol, 23-52.

Dadd, R. H. (1978). "Amino acid requirements of the mosquito Culex pipiens: asparagine essential." J Insect Physiol, 25-30.

DeLano, M. C. and Cao, Y. (2002). "High b-value diffusion imaging." Neuroimaging Clin N Am, 21-34.

DeLano, W. L. (2002). "Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges." Curr Opin Struct Biol, 14-20.

Delemarre-van de Waal, H. A. and de Waal, F. C. (1981). "[A 2d patient with tropical malaria contracted in a natural way in the Netherlands]." Ned Tijdschr Geneeskd, 375-377.

Devenport, M., Fujioka, H. and Jacobs-Lorena, M. (2004). "Storage and secretion of the peritrophic matrix protein Ag-Aper1 and trypsin in the midgut of Anopheles gambiae." Insect Mol Biol, 349-358.

Diabate, A., Yaro, A. S., Dao, A., Diallo, M., Huestis, D. L. and Lehmann, T. (2011). "Spatial distribution and male mating success of Anopheles gambiae swarms." BMC Evol Biol, 184.

Dinglasan, R. R., Devenport, M., Florens, L., Johnson, J. R., McHugh, C. A., Donnelly-Doman, M., Carucci, D. J., Yates, J. R., 3rd and Jacobs-Lorena, M. (2009). "The Anopheles gambiae adult midgut peritrophic matrix proteome." Insect Biochem Mol Biol, 125-134.

Dinglasan, R. R., Kalume, D. E., Kanzok, S. M., Ghosh, A. K., Muratova, O., Pandey, A. and Jacobs-Lorena, M. (2007). "Disruption of Plasmodium falciparum development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen." Proc Natl Acad Sci U S A, 13461-13466.

Divo, A. A., Geary, T. G., Davis, N. L. and Jensen, J. B. (1985). "Nutritional requirements of Plasmodium falciparum in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuous growth." J Protozool, 59-64.

Doumbo, O. (2007). "[Erythrocyte polymorphism in Mali: epidemiology and resistance mechanisms against severe Plasmodium falciparum malaria]." Bull Acad Natl Med, 783-784.

Edwards, M. J., Lemos, F. J., Donnelly-Doman, M. and Jacobs-Lorena, M. (1997). "Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito Anopheles gambiae." Insect Biochem Mol Biol, 1063-1072.

Farenhorst, M., Mouatcho, J. C., Kikankie, C. K., Brooke, B. D., Hunt, R. H., Thomas, M. B., Koekemoer, L. L., Knols, B. G. and Coetzee, M. (2009). "Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes." Proc Natl Acad Sci U S A, 17443-17447.

Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacci, J. B., Tabb, D. L., Witney, A. A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M. J., Holder, A. A., Sinden, R. E., Yates, J. R. and Carucci, D. J. (2002). "A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle." Nature, 520-526.

Folk, J. E. (1971). "2 Carboxypeptidases B." The enzymes, Hydrolysis : Peptide Bonds, 57-79.

Fougere, A. (2008). "Caratérisation des rôles respectifs des carboxypeptidases B d'*Anopheles gambiae* : CPBAg1 et CPBAg2 dans le développement de *Plasmodium falciparum*." Paris. Master II

Freyvogel, T. A. and Staeubli, W. (1965). "The Formation of the Peritrophic Membrane in Culicidae." Acta Trop, 118-147.

Goldberg, D. E. (1993). "Hemoglobin degradation in Plasmodium-infected red blood cells." Semin Cell Biol, 355-361.

Goldberg, L. and Demeillon, B. (1948). "The nutrition of the larva of *Aedes aegypti* linnaeus. 4. protein and amino acid requirements." Biochemical Journal, 379-387.

Goldstein, M. A. and Burdette, W. J. (1971). "Striated visceral muscle of drosophila melanogaster." J Morphol, 315-334.

Gouignard, N. (2011). "Caractérisation moléculaire des Récepteurs Venus Kinase : étude fonctionnelle chez le parasite Schistosoma mansoni." Lille. Doctorat

Grinna, L. S. and Tschopp, J. F. (1989). "Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, Pichia pastoris." Yeast, 107-115.

Gueirard, P., Tavares, J., Thiberge, S., Bernex, F., Ishino, T., Milon, G., Franke-Fayard, B., Janse, C. J., Menard, R. and Amino, R. (2010). "Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host." Proc Natl Acad Sci U S A, 18640-18645.

Hansen, I. A., Attardo, G. M., Park, J. H., Peng, Q. and Raikhel, A. S. (2004). "Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny." Proc Natl Acad Sci U S A, 10626-10631.

Hansen, I. A., Attardo, G. M., Roy, S. G. and Raikhel, A. S. (2005). "Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito." J Biol Chem, 20565-20572.

Hansen, I. A., Sieglaff, D. H., Munro, J. B., Shiao, S. H., Cruz, J., Lee, I. W., Heraty, J. M. and Raikhel, A. S. (2007). "Forkhead transcription factors regulate mosquito reproduction." Insect Biochem Mol Biol, 985-997.

Hillyer, J. F., Barreau, C. and Vernick, K. D. (2007). "Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel." Int J Parasitol, 673-681.

Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., Wincker, P., Clark, A. G., Ribeiro, J. M., Wides, R., Salzberg, S. L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W. H., Rusch, D. B., Lai, Z., Kraft, C. L., Abril, J. F., Anthouard, V., Arensburger, P., Atkinson, P. W., Baden, H., de Berardinis, V., Baldwin, D., Benes, V., Biedler, J., Blass, C., Bolanos, R., Boscus, D., Barnstead, M., Cai, S., Center, A., Chaturverdi, K., Christophides, G. K., Chrystal, M. A., Clamp, M., Cravchik, A., Curwen, V., Dana, A., Delcher, A., Dew, I., Evans, C. A., Flanigan, M., Grundschober-Freimoser, A., Friedli, L., Gu, Z., Guan, P., Guigo, R., Hillenmeyer, M. E., Hladun, S. L., Hogan, J. R., Hong, Y. S., Hoover, J., Jaillon, O., Ke, Z., Kodira, C., Kokoza, E., Koutsos, A., Letunic, I., Levitsky, A., Liang, Y., Lin, J. J., Lobo, N. F., Lopez, J. R., Malek, J. A., McIntosh, T. C., Meister, S., Miller, J., Mobarry, C., Mongin, E., Murphy, S. D., O'Brochta, D. A., Pfannkoch, C., Qi, R., Regier, M. A., Remington, K., Shao, H., Sharakhova, M. V., Sitter, C. D., Shetty, J., Smith, T. J., Strong, R., Sun, J., Thomasova, D., Ton, L. Q., Topalis, P., Tu, Z., Unger, M. F., Walenz, B., Wang, A., Wang, J., Wang, M., Wang, X., Woodford, K. J., Wortman, J. R., Wu, M., Yao, A., Zdobnov, E. M., Zhang, H., Zhao, Q., Zhao, S., Zhu, S. C., Zhimulev, I., Coluzzi, M., della Torre, A., Roth, C. W., Louis, C., Kalush, F., Mural, R. J., Myers, E. W., Adams, M. D., Smith, H. O., Broder, S., Gardner, M. J., Fraser, C. M., Birney, E., Bork, P., Brey, P. T., Venter, J. C., Weissenbach, J., Kafatos, F. C., Collins, F. H. and Hoffman, S. L. (2002). "The genome sequence of the malaria mosquito Anopheles gambiae." Science, 129-149.

Idro, R., Marsh, K., John, C. C. and Newton, C. R. (2010). "Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome." Pediatr Res, 267-274.

Igarashi, K. and Kashiwagi, K. (2000). "Polyamines: mysterious modulators of cellular functions." Biochem Biophys Res Commun, 559-564.

James, A. A. (2005). "Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road." Trends Parasitol, 64-67.

Kaslow, D. C., Bathurst, I. C., Isaacs, S. N., Keister, D. B., Moss, B. and Barr, P. J. (1992). "Induction of Plasmodium falciparum transmission-blocking antibodies by recombinant Pfs25." Mem Inst Oswaldo Cruz, 175-177.

Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S. E. and Sachs, J. (2004). "A global index representing the stability of malaria transmission." Am J Trop Med Hyg, 486-498.

Knols, B. G., Bukhari, T. and Farenhorst, M. (2010). "Entomopathogenic fungi as the next-generation control agents against malaria mosquitoes." Future Microbiol, 339-341.

Krotoski, W. A., Krotoski, D. M., Garnham, P. C., Bray, R. S., Killick-Kendrick, R., Draper, C. C., Targett, G. A. and Guy, M. W. (1980). "Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary note." Br Med J, 153-154.

Kumar, S., Gupta, L., Han, Y. S. and Barillas-Mury, C. (2004). "Inducible peroxidases mediate nitration of anopheles midgut cells undergoing apoptosis in response to Plasmodium invasion." J Biol Chem, 53475-53482.

Lahondere, C. and Lazzari, C. R. (2012). "Mosquitoes cool down during blood feeding to avoid overheating." Curr Biol, 40-45.

Lambrechts, L., Halbert, J., Durand, P., Gouagna, L. C. and Koella, J. C. (2005). "Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to Plasmodium falciparum." Malar J, 3.

Lang-Unnasch, N. and Murphy, A. D. (1998). "Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host." Annu Rev Microbiol, 561-590.

Lavazec, C. (2004). "Les carboxypeptidases B d'*Anopheles gambiae* impliquées dans le développement de *Plasmodium falciparum*." Paris. Doctorat

Lavazec, C., Bonnet, S., Thiery, I., Boisson, B. and Bourgouin, C. (2005). "cpbAg1 encodes an active carboxypeptidase B expressed in the midgut of Anopheles gambiae." Insect Mol Biol, 163-174.

Lavazec, C., Boudin, C., Lacroix, R., Bonnet, S., Diop, A., Thiberge, S., Boisson, B., Tahar, R. and Bourgouin, C. (2007). "Carboxypeptidases B of Anopheles gambiae as targets for a Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine." Infect Immun, 1635-1642.

Lavazec, C. and Bourgouin, C. (2008). "Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting Plasmodium development." Microbes Infect, 845-849.

Lehane, M. J. (1997). "Peritrophic matrix structure and function." Annu Rev Entomol, 525-550.

Lehmann, T., Dao, A., Yaro, A. S., Adamou, A., Kassogue, Y., Diallo, M., Sekou, T. and Coscaron-Arias, C. (2010). "Aestivation of the African malaria mosquito, Anopheles gambiae in the Sahel." Am J Trop Med Hyg, 601-606.

Lemos, F. J., Cornel, A. J. and Jacobs-Lorena, M. (1996). "Trypsin and aminopeptidase gene expression is affected by age and food composition in Anopheles gambiae." Insect Biochem Mol Biol, 651-658.

Lensen, A., Bril, A., van de Vegte, M., van Gemert, G. J., Eling, W. and Sauerwein, R. (1999). "Plasmodium falciparum: infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes." Exp Parasitol, 101-103.

Lizcano, J. M., Alrubaie, S., Kieloch, A., Deak, M., Leevers, S. J. and Alessi, D. R. (2003). "Insulin-induced Drosophila S6 kinase activation requires phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B." Biochem J, 297-306.

Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, L. and Rosenberg, R. (1998). "The mosquito Anopheles stephensi limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A, 5700-5705.

Lynd, A. and Lycett, G. J. (2012). "Development of the bi-partite Gal4-UAS system in the African malaria mosquito, Anopheles gambiae." PLoS One, e31552.

Mack, S. R., Samuels, S. and Vanderberg, J. P. (1979). "Hemolymph of Anopheles stephensi from uninfected and Plasmodium berghei-infected mosquitoes. 2. Free amino acids." J Parasitol, 130-136.

Marrelli, M. T., Li, C., Rasgon, J. L. and Jacobs-Lorena, M. (2007). "Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on Plasmodium-infected blood." Proc Natl Acad Sci U S A, 5580-5583.

Martin, R. E., Ginsburg, H. and Kirk, K. (2009). "Membrane transport proteins of the malaria parasite." Mol Microbiol, 519-528.

Meredith, J. M., Basu, S., Nimmo, D. D., Larget-Thiery, I., Warr, E. L., Underhill, A., McArthur, C. C., Carter, V., Hurd, H., Bourgouin, C. and Eggleston, P. (2011). "Site-specific integration and expression of an anti-malarial gene in transgenic Anopheles gambiae significantly reduces Plasmodium infections." PLoS One, e14587.

Merritt, R. W., Dadd, R. H. and Walker, E. D. (1992). "Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes." Annu Rev Entomol, 349-376.

Metselaar, D. and Van Thiel, P. H. (1959). "Classification of malaria." Trop Geogr Med, 157-161.

Miller, L. H. and Greenwood, B. (2002). "Malaria--a shadow over Africa." Science, 121-122.

Miron, M., Lasko, P. and Sonenberg, N. (2003). "Signaling from Akt to FRAP/TOR targets both 4E-BP and S6K in Drosophila melanogaster." Mol Cell Biol, 9117-9126.

Mitri, C., Jacques, J. C., Thiery, I., Riehle, M. M., Xu, J., Bischoff, E., Morlais, I., Nsango, S. E., Vernick, K. D. and Bourgouin, C. (2009). "Fine pathogen discrimination within the APL1 gene family protects Anopheles gambiae against human and rodent malaria species." PLoS Pathog, e1000576.

Mitri, C., Thiery, I., Bourgouin, C. and Paul, R. E. (2009). "Density-dependent impact of the human malaria parasite Plasmodium falciparum gametocyte sex ratio on mosquito infection rates." Proc Biol Sci, 3721-3726.

Mitri, C. and Vernick, K. D. (2012). "Anopheles gambiae pathogen susceptibility: the intersection of genetics, immunity and ecology." Curr Opin Microbiol, 285-291.

Mittal, P. K. (2003). "Biolarvicides in vector control: challenges and prospects." J Vector Borne Dis, 20-32.

Mnyone, L. L., Koenraadt, C. J., Lyimo, I. N., Mpingwa, M. W., Takken, W. and Russell, T. L. (2010). "Anopheline and culicine mosquitoes are not repelled by surfaces treated with the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana." Parasit Vectors, 80.

Morris, S. M., Jr. (2010). "Arginine: master and commander in innate immune responses." Sci Signal, pe27.

Muller, G. C., Beier, J. C., Traore, S. F., Toure, M. B., Traore, M. M., Bah, S., Doumbia, S. and Schlein, Y. (2010). "Successful field trial of attractive toxic sugar bait (ATSB) plant-spraying methods against malaria vectors in the Anopheles gambiae complex in Mali, West Africa." Malar J, 210.

Muller, H. M., Catteruccia, F., Vizioli, J., della Torre, A. and Crisanti, A. (1995). "Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in Anopheles gambiae." Exp Parasitol, 371-385.

Muller, H. M., Crampton, J. M., della Torre, A., Sinden, R. and Crisanti, A. (1993). "Members of a trypsin gene family in Anopheles gambiae are induced in the gut by blood meal." EMBO J, 2891-2900.

Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. and Carton, Y. (2000). "Nitric oxide involvement in Drosophila immunity." Nitric Oxide, 423-430.

Ndiath, M. O., Cohuet, A., Gaye, A., Konate, L., Mazenot, C., Faye, O., Boudin, C., Sokhna, C. and Trape, J. F. (2011). "Comparative susceptibility to Plasmodium falciparum of the molecular forms M and S of Anopheles gambiae and Anopheles arabiensis." Malar J, 269.

Neurath, H. and Walsh, K. A. (1976). "Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review)." Proc Natl Acad Sci U S A, 3825-3832.

Niare, O., Markianos, K., Volz, J., Oduol, F., Toure, A., Bagayoko, M., Sangare, D., Traore, S. F., Wang, R., Blass, C., Dolo, G., Bouare, M., Kafatos, F. C., Kruglyak, L., Toure, Y. T. and Vernick, K. D. (2002). "Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population." Science, 213-216.

Nijhout, M. M. and Carter, R. (1978). "Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro." Parasitology, 39-53.

Noriega, F. G., Colonna, A. E. and Wells, M. A. (1999). "Increase in the size of the amino acid pool is sufficient to activate translation of early trypsin mRNA in Aedes aegypti midgut." Insect Biochem Mol Biol, 243-247.

Noriega, F. G., Shah, D. K. and Wells, M. A. (1997). "Juvenile hormone controls early trypsin gene transcription in the midgut of Aedes aegypti." Insect Mol Biol, 63-66.

Noriega, F. G. and Wells, M. A. (1999). "A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of Aedes aegypti." J Insect Physiol, 613-620.

Nsango, S. E., Abate, L., Thoma, M., Pompon, J., Fraiture, M., Rademacher, A., Berry, A., Awono-Ambene, P. H., Levashina, E. A. and Morlais, I. (2012). "Genetic clonality of Plasmodium falciparum affects the outcome of infection in Anopheles gambiae." Int J Parasitol, 589-595.

Olszewski, K. L., Morrisey, J. M., Wilinski, D., Burns, J. M., Vaidya, A. B., Rabinowitz, J. D. and Llinas, M. (2009). "Host-parasite interactions revealed by Plasmodium falciparum metabolomics." Cell Host Microbe, 191-199.

Park, S. S. and Shahabuddin, M. (2000). "Structural organization of posterior midgut muscles in mosquitoes, Aedes aegypti and Anopheles gambiae." J Struct Biol, 30-37.

Payne, S. H. and Loomis, W. F. (2006). "Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole-genome sequences." Eukaryot Cell, 272-276.

Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Williams, T. N., Weatherall, D. J. and Hay, S. I. (2010). "Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis." Nat Commun, 104.

Raikhel, A. S., Brown, M. R. and Belles, X. (2005). Hormonal control of reproductive process. Oxford, Gilbert, L.I.
Iatrou, K.
Gill, S. S.

Raikhel, A. S., Kokoza, V. A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S. F., Li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmer, N. and Attardo, G. (2002). "Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity." Insect Biochem Mol Biol, 1275-1286.

Richards, A. G. and Richards, P. A. (1977). "The peritrophic membranes of insects." Annu Rev Entomol, 219-240.

Riehle, M. M., Markianos, K., Niare, O., Xu, J., Li, J., Toure, A. M., Podiougou, B., Oduol, F., Diawara, S., Diallo, M., Coulibaly, B., Ouatara, A., Kruglyak, L., Traore, S. F. and Vernick, K. D. (2006). "Natural malaria infection in Anopheles gambiae is regulated by a single genomic control region." Science, 577-579.

Robert, V., Read, A. F., Essong, J., Tchuinkam, T., Mulder, B., Verhave, J. P. and Carnevale, P. (1996). "Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of Plasmodium falciparum to Anopheles gambiae." Trans R Soc Trop Med Hyg, 621-624.

Rodhain, F. a. P., C (1985). In Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Paris.

Romoser, W. S. and Cody, E. (1975). "The formation and fate of the peritrophic membrane in adult Culex nigripalpus (Diptera: Culicidae)." J Med Entomol, 371-378.

Roy, S. G. and Raikhel, A. S. (2011). "The small GTPase Rheb is a key component linking amino acid signaling and TOR in the nutritional pathway that controls mosquito egg development." Insect Biochem Mol Biol, 62-69.

Rudin, W., Billingsley, P. F. and Saladin, S. (1991). "The fate of Plasmodium gallinaceum in Anopheles stephensi Liston and possible barriers to transmission." Ann Soc Belg Med Trop, 167-177.

Schneider, A., Wiesner, R. J. and Grieshaber, M. K. (1989). "On the role of arginine kinase in insect flight muscle." Insect Biochem Mol Biol, 471-480.

Scholte, E. J., Knols, B. G. and Takken, W. (2006). "Infection of the malaria mosquito Anopheles gambiae with the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae reduces blood feeding and fecundity." J Invertebr Pathol, 43-49.

Scholte, E. J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., Killeen, G. F. and Knols, B. G. (2005). "An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes." Science, 1641-1642.

Scott, T. W. and Takken, W. (2012). "Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission." Trends Parasitol, 114-121.

Service, M. W. and Townson, H. (2002). The *Anopheles* vector. London, UK, in Essential Malariology.

Shahabuddin, M. and Kaslow, D. C. (1994). "Plasmodium: parasite chitinase and its role in malaria transmission." Exp Parasitol, 85-88.

Shao, L., Devenport, M. and Jacobs-Lorena, M. (2001). "The peritrophic matrix of hematophagous insects." Arch Insect Biochem Physiol, 119-125.

Shen, Z., Edwards, M. J. and Jacobs-Lorena, M. (2000). "A gut-specific serine protease from the malaria vector Aanopheles gambiae is downregulated after blood ingestion." Insect Mol Biol, 223-229.

Shen, Z. and Jacobs-Lorena, M. (1998). "A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector Anopheles gambiae binds to chitin. Cloning, expression, and characterization." J Biol Chem, 17665-17670.

Sherman, I. W. (1977). "Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites." Bull World Health Organ, 265-276.

Sinden, R. E., Alavi, Y. and Raine, J. D. (2004). "Mosquito--malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness." Insect Biochem Mol Biol, 625-629.

Sinden, R. E. and Croll, N. A. (1975). "Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in Plasmodium yoelii nigeriensis." Parasitology, 53-65.

Singh, K. and Brown, A. (1957). "Nutritional requirements of *Aedes aegypti* L." Journal of Insect Physiology, 199-220.

Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Burkot, T. R., Harbach, R. E. and Hay, S. I. (2012). "A global map of dominant malaria vectors." Parasit Vectors, 69.

Staubli, W., Freyvogel, T. A. and Suter, J. (1966). "Structural modifications of the endoplasmatic reticulum of midgut epithelial cells of mosquitoes in relation to blood intake." J Microscopie, 189–204.

Swevers, L., Morou, E., Balatsos, N., Iatrou, K. and Georgoussi, Z. (2005). "Functional expression of mammalian opioid receptors in insect cells and high-throughput screening platforms for receptor ligand mimetics." Cell Mol Life Sci, 919-930.

Tahar, R., Boudin, C., Thiery, I. and Bourgouin, C. (2002). "Immune response of Anopheles gambiae to the early sporogonic stages of the human malaria parasite Plasmodium falciparum." EMBO J, 6673-6680.

Tchuinkam, T., Mulder, B., Dechering, K., Stoffels, H., Verhave, J. P., Cot, M., Carnevale, P., Meuwissen, J. H. and Robert, V. (1993). "Experimental infections of Anopheles gambiae with Plasmodium falciparum of naturally infected gametocyte carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes." Trop Med Parasitol, 271-276.

Tellam, R. L., Wijffels, G. and Willadsen, P. (1999). "Peritrophic matrix proteins." Insect Biochem Mol Biol, 87-101.

Thomas, M. B., Godfray, H. C., Read, A. F., van den Berg, H., Tabashnik, B. E., van Lenteren, J. C., Waage, J. K. and Takken, W. (2012). "Lessons from agriculture for the sustainable management of malaria vectors." PLoS Med, e1001262.

Tiburcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P. A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P. H., Hardeman, M., Vernick, K. D., Sauerwein, R. W., Preiser, P. R., Mercereau-Puijalon, O., Buffet, P., Alano, P. and Lavazec, C. (2012). "A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages." Blood, e172-180.

Trout Fryxell, R. T., Nieman, C. C., Fofana, A., Lee, Y., Traore, S. F., Cornel, A. J., Luckhart, S. and Lanzaro, G. C. (2012). "Differential Plasmodium falciparum infection of Anopheles gambiae s.s. molecular and chromosomal forms in Mali." Malar J, 133.

Valnickova, Z., Thogersen, I. B., Christensen, S., Chu, C. T., Pizzo, S. V. and Enghild, J. J. (1996). "Activated human plasma carboxypeptidase B is retained in the blood by binding to alpha2-macroglobulin and pregnancy zone protein." J Biol Chem, 12937-12943.

Vincendeau, P., Gobert, A. P., Daulouede, S., Moynet, D. and Mossalayi, M. D. (2003). "Arginases in parasitic diseases." Trends Parasitol, 9-12.

Vizioli, J., Catteruccia, F., della Torre, A., Reckmann, I. and Muller, H. M. (2001). "Blood digestion in the malaria mosquito Anopheles gambiae: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins." Eur J Biochem, 4027-4035.

Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A. and Kafatos, F. C. (2006). "The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes." Curr Opin Genet Dev, 384-391.

Wellendorph, P., Hansen, K. B., Balsgaard, A., Greenwood, J. R., Egebjerg, J. and Brauner-Osborne, H. (2005). "Deorphanization of GPRC6A: a promiscuous L-alpha-amino acid receptor with preference for basic amino acids." Mol Pharmacol, 589-597.

Wolinska, J. and King, K. C. (2009). "Environment can alter selection in host-parasite interactions." Trends Parasitol, 236-244.

Yuval, B. (2006). "Mating systems of blood-feeding flies." Annu Rev Entomol, 413-440.

Zhang, H., Stallock, J. P., Ng, J. C., Reinhard, C. and Neufeld, T. P. (2000). "Regulation of cellular growth by the Drosophila target of rapamycin dTOR." Genes Dev, 2712-2724.

Zhang, R., Hua, G., Andacht, T. M. and Adang, M. J. (2008). "A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for Bacillus thuringiensis Cry11Ba toxin in the mosquito Anopheles gambiae." Biochemistry, 11263-11272.

Zhou, G., Pennington, J. E. and Wells, M. A. (2004). "Utilization of pre-existing energy stores of female Aedes aegypti mosquitoes during the first gonotrophic cycle." Insect Biochem Mol Biol, 919-925.

Zieler, H., Garon, C. F., Fischer, E. R. and Shahabuddin, M. (1998). "Adhesion of Plasmodium gallinaceum ookinetes to the Aedes aegypti midgut: sites of parasite attachment and morphological changes in the ookinete." J Eukaryot Microbiol, 512-520.