HAL
open science

Identification et caractérisation des inhibiteurs de type 2 et 3 de la phosphatase de type 1 chez Plasmodium falciparum

Aline Fréville

To cite this version:

Aline Fréville. Identification et caractérisation des inhibiteurs de type 2 et 3 de la phosphatase de type 1 chez Plasmodium falciparum. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S030 . tel-00868793

HAL Id: tel-00868793

https://theses.hal.science/tel-00868793

Submitted on 2 Oct 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.

Université Lille Nord de France

N° d'ordre :

THESE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Discipline : Parasitologie

Présentée et Soutenue publiquement par

ALINE FREVILLE

Le 16 novembre 2012

Identification et caractérisation des inhibiteurs de type 2 et 3 de la phosphatase de type 1 chez *Plasmodium falciparum*

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur **El Moukhtar ALIOUAT**	Président
Madame le Docteur **Isabelle TARDIEUX**	Rapporteur
Madame le Docteur **Blandine FRANKE-FAYARD**	Rapporteur
Madame le Docteur **Isabelle LANDRIEU**	Membre invité
Madame le Docteur **Katia CAILLIAU**	Membre invité
Monsieur le Docteur **Jamal KHALIFE**	Directeur de thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Inserm 1019-CNRS 8204, Equipe 2
Université de Lille II-Institut Pasteur de Lille

TABLE DES MATIERES

Chapitre 1 : INTRODUCTION 5

I) Généralités sur le paludisme 6

1. Introduction 6

2. Les symptômes et les différentes formes d'accès palustre..... 8

2.1 La forme simple 8

2.2 La forme grave..... 9

2.3 Le paludisme de la femme primipare..... 9

2.4 Le paludisme chronique de l'enfant..... 10

3. L'impact économique, le diagnostic, la prévention et le traitement ..10

3.1 L'impact économique..... 10

3.2 Le diagnostic..... 11

3. 3 La prévention..... 11

3.4 Le traitement..... 12

3.5 Les mécanismes d'action des anti-malariques et les..... 13

phénomènes de résistances..... 13

3.6 L'approche vaccinale..... 16

II) Plasmodium..... 18

1. Introduction phylogénétique.....18

2. Génome, Transcriptome et Protéome chez *P.falciparum*.....20

3. Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum*.....22

3.1 Le cycle sexué 22

3.2 Le cycle asexué 22

3.2.1 La phase hépatique 22

3.2.2 La phase érythrocytaire..... 24

III) La Phosphorylation 27

1. Introduction 27

2. Les Kinases 28

2.1 Introduction 28

2.2 Les Kinases chez Plasmodium falciparum 30

2.2.1 : Le kinôme de *P.falciparum* 30

2.2.1 : Le groupe des CK1 34

2.2.2 : Le groupe des CMCG 34

2.2.2.1 Les CDKs 34

2.2.2.2 Les MAPKs 35

2.2.2.3 Les GSK3s 35

2.2.3 : Le groupe des AGC 35

2.2.3.1 La PfPKA 35

2.2.3.2 La PfPKB 36

2.2.4 : Le groupe des OPK 36

2.2.4.1 Les NIMA-related kinases (NEK) 36

2.2.4.2 Les Aurora kinases 37

2.2.5 : Les FIKKs 37

2.2.6 : Le phospho-protéome de *P.falciparum* 38

3. Les phosphatases 39

3.1 Généralités et classification 39

3.2. La protéine phosphatase de type 1 42

3.2.1 : Introduction 42

3.2.2 : Les fonctions pléiotropiques de la phosphatase 43

de type 1, focus sur l'implication dans le cycle 43

cellulaire: 43

3.2.3 : Séquence et structure de la PP1 44

3.2.3.1. Introduction 44

3.2.3.2. Le domaine catalytique : PP1c 44

3.2.4 : La conformation invariante de PP1 46

3.2.5 : Mécanisme d'inhibition des toxines de PP1 47

3.2.6 : La protéine phosphatase de type 1 chez *P.falciparum* 48

3.2.6.1. Séquences, conservation de séquence et de fonction 48

3.2.6.2. Fonction 49

3.3. Les régulateurs de la protéine phosphatase de type 1 51

3.3.1 : Caractéristiques générales des sous unités régulatrices de la Protéine Phosphatase de type 1 52

3.3.1.1 Les motifs d'interaction avec la protéine phosphatase de type 1 52

a. le motif « RVxF » 52

b. Autres motifs d'interaction 54

3.3.1.2 Propriétés générales du « code de fixation » à la PP1 56

3.3.1.3 Similarités structurales entre les différentes sous-unités régulatrices. 56

3.3.2 : Classification et détail des fonctions d'un panel de sous-unités régulatrices 58

3.3.2.1 Les sous-unités substrats 58

3.3.2.2 Les sous-unités régulatrices impliquées dans la localisation subcellulaire 58

3.3.2.3 Les régulateurs appartenant à la famille des inhibiteurs 61

a. Introduction générale: 61

b. L'inhibiteur de type 2 : 65

- Introduction : 65
- Structure et mécanisme d'inhibition : 65
- Phosphorylation et régulation de fonction : 68
- Implication de l'inhibiteur 2 dans le cycle cellulaire : 70

Rôle du complexe CDK2-cycline B: 70

Rôle du complexe Neck2/PP1/I2 : 70

Rôle des kinases Aurora : 70

Rôle du prolyl cis/transisomérase: 71

- Implication dans l'embryogenèse : 73
- Conclusion: 73

c. L'inhibiteur de type 3 : 74

- Introduction: 74
- Séquence, motifs et holoenzymes de PP1 impliquant l'inhibiteur 3: 74
- Implication dans le cycle cellulaire: 75
- Implication dans le développement embryonnaire chez les plantes: 75
- Implication dans l'apoptose: 76
- Conclusion: 77

Chapitre 2 : OBJECTIFS DE LA THESE.....78

Chapitre 3 : RESULTATS 81

Article 1 : Identification et caractérisation de l'inhibiteur 3 de P.falciparum. 82

Article 2 : Identification et caractérisation de l'inhibiteur 2 de P.falciparum. 84

Article en préparation: 85

Chapitre 4 : DISCUSSION GENERALE/PERSPECTIVES..... 109

I) Discussion générale.....110

1) Introduction 110

2) PfI2 : une protéine mitotique indispensable au cycle cellulaire de P.falciparum? 111

3) PfI3 : indispensable au cycle cellulaire de Pf ?.....117

4) Conclusion.....117

II) Perspectives 119

1) Approfondissement de l'étude de la structure/fonction PfPP1/PfI2. 119

2) Mise en place d'une stratégie de ciblage et d'inhibition des complexes PfPP1/régulateurs. Utilisation de peptides inhibiteurs (Revue en Annexe 2) 119

3) Etude de la relation PfI2/kinases ainsi que des complexes holoenzymatiques PfPP1/PfI2/kinases de *P.falciparum.* 122

4) Identification du ou des substrats ainsi que d'éventuels partenaires des complexes PfI2/PfPP1 et PfI3/PfPP1. 123

ANNEXES 124

Annexe 1 :Tableau récapitulatif de l'interactome de PP1 chez l'homme 125

Annexe 2 : Inhibition of protein-protein in *P.falciparum* : Future drug targets.....134

BIBLIOGRAPHIE 135

Chapitre 1 :

INTRODUCTION

I) Généralités sur le paludisme

1. Introduction

Le paludisme ou malaria tient son nom de l'Italien « mal'aria » signifiant mot à mot « le mauvais air ». Cette dénomination provient de l'association précoce faite entre la maladie et les régions marécageuses où l'infection était courante.

Le paludisme est une maladie très ancienne dont on retrouve la trace sur des momies égyptiennes datant de plus de 5200 ans. La première description connue des symptômes de l'infection est retrouvée dès l'antiquité dans certains traités égyptiens comme le papyrus d'Ebers dont l'origine est estimée à 1550 avant notre ère (**Ebers GM & Stern L. 1875**). Plus tard, vers le 4^{éme} siècle avant JC, le médecin helléniste Hippocrate décrivit les fièvres palustres dont souffraient certains patients dans « le livre des Epidémies » et « la consultation ».

C'est en 1880, que le médecin officier français Charles Louis Alphonse Laveran, mobilisé dans la région de Constantine en Algérie, observa les premiers protozoaires *Plasmodium falciparum* dans les globules rouges de patients souffrants de ce que l'on appelait à l'époque la fièvre des marais. Il remarqua également que cet agent pathogène, qu'il nomma Oscillerai malariae, disparaissait après l'administration de quinine (Figure 1(**Laveran CL. 1982**)).

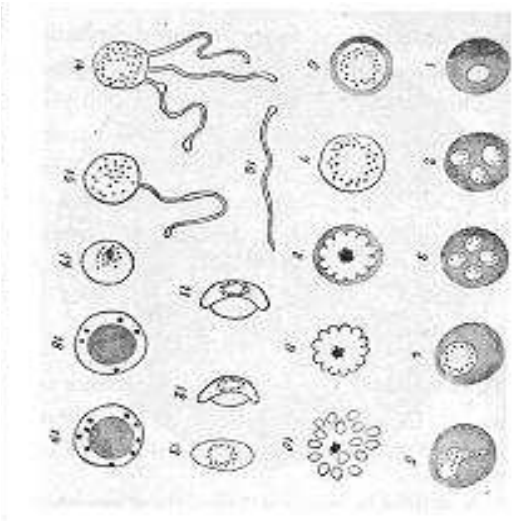


*Figure : 1. Illustration provenant de la première publication de Laveran et représentant les parasites responsables de la malaria (**Laveran CL. 1982**).*

En 1885, les chercheurs italiens Marchiafava et Celli confirmèrent la découverte du français après l'observation et la description d'un organisme amiboïde responsable de la maladie. Ils le nommèrent *Plasmodium.* Ce terme est encore utilisé de nos jours. En 1886 et 1889, ils décrivirent avec Golgi trois des cinq espèces endémiques pour l'homme. En 1897, le Dr Donald Ross, un officier de l'armée anglaise posté aux Indes, fut le premier à proposer l'anophèle comme l'agent vecteur de l'infection. Son travail de dissection de moustiques nourris de sang infecté lui permit d'observer distinctement différentes formes de développement du parasite : des oocystes sur la paroi de l'estomac et des sporozoïtes au niveau des glandes salivaires (**Ross R. 1897**). Enfin, le professeur Italien Giovanni Battista Grassi identifia le moustique du genre *Anopheles* comme vecteur unique de la forme humaine de la maladie. Avec ses confrères Bastiani et Bignami, il décrivit en 1899 le cycle complet de *Plasmodium* chez l'anophèle. En 1902 et 1907, les prix Nobel de

médecine furent décernés respectivement à Ronald Ross et Charles Louis Alphonse Laveran pour l'ensemble de leurs travaux sur la malaria.

La moitié de la population mondiale, soit près de 3 milliards d'individus, est exposée à la malaria à travers 106 pays et territoires endémiques. Le paludisme est responsable d'environ 216 millions de cas cliniques et 655 000 morts par an, faisant de cette maladie la première parasitose mondiale en termes de décès (WHO, 2011). La malaria est endémique dans presque toutes les régions tropicales et sub-tropicales du globe. On la retrouve en Asie, en Amérique Latine mais l'Afrique reste le territoire le plus durement touché (Figure 2). On estime que ce continent accumule 81% de tous les épisodes cliniques et 91% des décès. (WHO, 2011; WHO World malaria report 2010, http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalariareport2010.pdf).

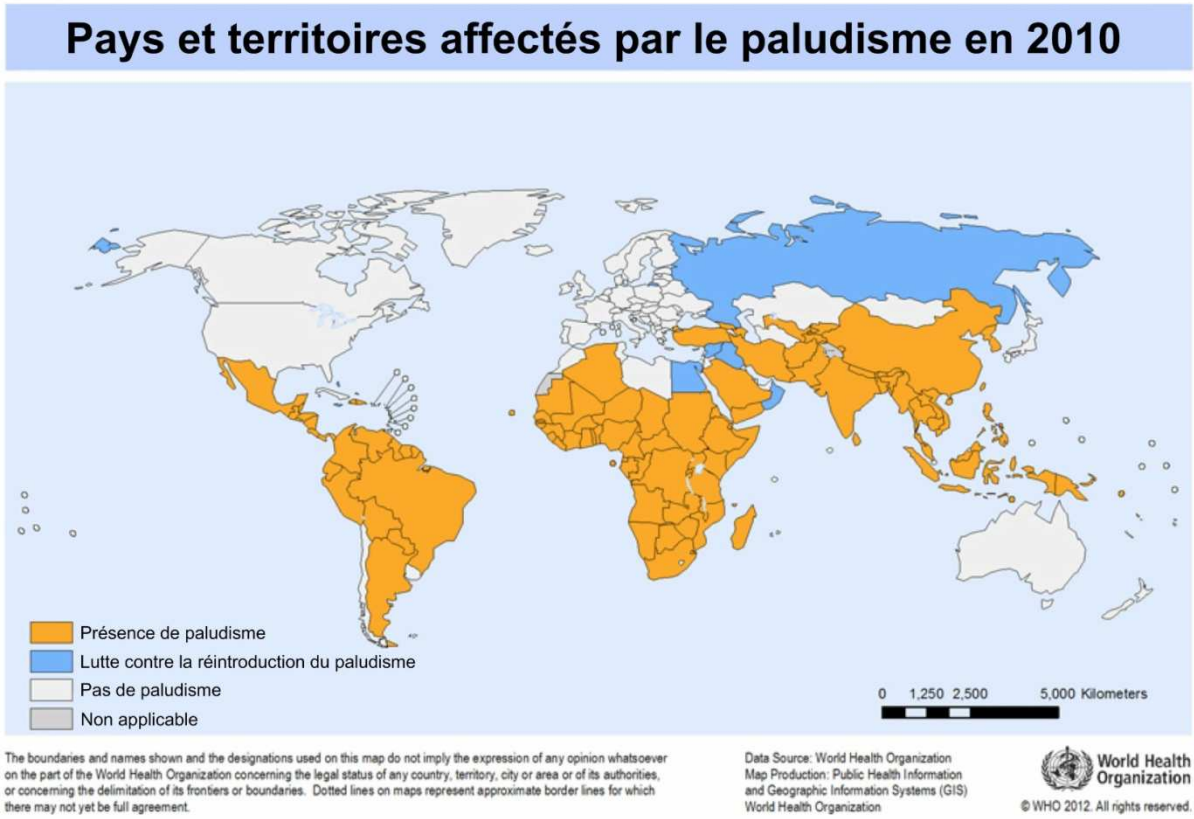


Figure : 2. Répartition de la Malaria à travers le globe (source : OMS 2012)

2. Les symptômes et les différentes formes d'accès palustre

C'est au cours du développement érythrocytaire du parasite qu'apparaissent les manifestations cliniques de la maladie. La gravité de l'affection dépend de l'espèce parasitaire impliquée, de la quantité de parasites dans le sang et du statut immunologique de l'individu atteint. Les personnes n'ayant pas acquis d'immunité (les jeunes enfants, les expatriés ou les voyageurs) sont particulièrement sensibles à la maladie. Les personnes vivant en zone d'endémie qui, à force d'infestations répétées, ont gagné un certain degré d'immunité présenteront plus rarement des accès palustres.

2.1 La forme simple

La primo-infection se caractérise par une phase d'incubation asymptomatique d'une durée variable pouvant aller de quelques jours à quelques mois. Apparaissent ensuite les premiers signes, peu évocateurs, de la maladie qui coïncident avec la multiplication des parasites dans le sang. On observe alors une fièvre modérée (38°C-38.5°C), sans périodicité particulière, parfois accompagnée de maux de tête, de douleurs musculaires, de troubles digestifs, de vomissements, de diarrhées, et d'un affaiblissement généralisé. La maladie évolue ensuite vers une période d'état, qui, sans traitement spécifique, se caractérise par la succession d'accès palustres marqués par une phase de frissons intenses (pendant plusieurs heures, le patient souffre d'hypothermie, et est incapable de se réchauffer), une phase d'augmentation de la température corporelle (qui peut atteindre 41°C), et enfin, une phase de sueurs annonçant la fin de la crise et s'accompagnant d'une sensation de bien-être. On observe parfois une splénomégalie associée à de l'anémie. Ces accès fébriles correspondent à l'éclatement des globules rouges parasités. Leurs rythmes dépendent de l'espèce parasitaire impliquée et de la durée de son cycle : deux jours pour *P.falciparum* ou *P.vivax* (fièvre tierce), trois pour *P.malariae* (fièvre quarte).

Chez une personne, non traitée, atteinte de *P.falciparum* et plus exceptionnellement de *P.vivax*, la maladie peut évoluer vers une forme plus grave, caractérisée par une détresse respiratoire et une défaillance rénale. Une forte hypoglycémie accompagnée d'acidose sont alors des symptômes de gravité de l'infection.

2.2 La forme grave

Le neuropaludisme (ou accès pernicieux) est la conséquence de l'obstruction de capillaires cérébraux par des hématies parasitées qui adhérent à l'endothélium de ces vaisseaux. Cette pathologie, complexe, se manifeste principalement par une hypoglycémie sévère, une acidose, des vomissements, d'importantes convulsions suivies d'une perte de conscience d'au moins trente minutes (**Mishra SK. 2007**) aboutissant parfois à un coma. Chez le jeune enfant non traité, le pronostic de cette forme est sévère : la mortalité peut atteindre 15% et même en cas de survie, des séquelles neurologiques apparaissent dans 5 à 20% des cas (**Murphy SC & Breman JG. 2001**). Même si quelques cas provoqués par *P.vivax* ont été décrits, *P.falciparum* reste le principal responsable du neuropaludisme (**Ozen M. 2006, Thapa R. 2007**). Les raisons de l'apparition de cette complication ne sont pas connues précisément. Elles sont probablement multifactorielles et font probablement intervenir des composantes immunologiques, un dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique et/ou une réaction inflammatoire exacerbée.

2.3 Le paludisme de la femme primipare

L'infection à *P.falciparum* chez une femme primipare entraine la séquestration massive de parasites au niveau de l'endothélium placentaire. Ce paludisme se caractérise par son extrême gravité à la fois pour la femme et l'enfant. L'infestation altère profondément les échanges entre la mère et le fœtus et peut entraîner la mort de la mère gestante, du fœtus, une prématurité à l'accouchement et/ou un petit poids de naissance (qui augmente le risque de mortalité périnatale, et entraîne des retards de développement physique et intellectuel) (**Rogerson SJ,Hviid L,. 2007**).

L'accumulation et la séquestration de parasites infectant les érythrocytes présents dans le cœur, le cerveau, les poumons, les reins, les tissus sous-cutanés et le placenta sont caractéristiques de l'infection à *Plasmodium falciparum*. Cette séquestration est le résultat de l'interaction de protéines parasitaires présentes à la surface de l'érythrocyte infecté et un certain nombre de protéines de l'hôte exprimées à la surface de cellules endothéliales, placentaires ou d'érythrocytes sains (**Baruch DI. 1999**). Dans le cas d'une infection placentaire, l'implication de certains récepteurs comme l'acide hyaluronique ou la chondroine sulfate A (CSA) a pu être démontrée tout comme celle de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) lors de la malaria cérébrale (**Miller LH. 2002, Newbold C. 1999, Ockenhouse CF. 1991**).

2.4 Le paludisme chronique de l'enfant

Cette forme, causée par *P. falciparum* ou *P.vivax,* est également appelée paludisme viscéral évolutif. Elle survient chez des personnes dont l'immunité n'est pas ou peu développée ou exposées à des ré-infestations répétées. Le paludisme chronique se caractérise par une fièvre légère (37.5°C-38°C), une anémie, une pâleur, une dyspnée fréquente, de l'asthénie et une splénomégalie. Les accès fébriles sont séparés par des phases apyrétiques pendant lesquelles il est possible d'observer des parasites dans le sang des patients. L'anémie est l'une des conséquences les plus graves, elle peut conduire à une surmortalité, une aggravation de la dénutrition et enfin une cachexie (**Onwuamaegbu ME. 2004**). Il est important de noter que la sous alimentation est un facteur aggravant de la malaria. Les décès liés au paludisme sont multipliés par 2 chez les enfants partiellement sous-alimentés et par 9 chez les enfants sévèrement sous-alimentés (**Caulfield LE. 2004**).

3. L'impact économique, le diagnostic, la prévention et le traitement

3.1 L'impact économique

Au delà de sa létalité, l'infection est à l'origine de nombreuses incapacités chez les patients survivants (le plus souvent des enfants en bas âge et des femmes enceintes) et d'invalidités chez les adultes lors des épisodes infectieux. La malaria entraîne une anémie qui augmente la mortalité infantile et peut fortement diminuer les capacités de travail des adultes touchés. Les conséquences sur l'évolution du développement et la production des régions touchées sont dramatiques. La maladie entraîne des pertes économiques énormes pouvant correspondre, dans les zones les plus atteintes, à une baisse de près de 1.3% du PIB. Les coûts sanitaires qui englobent à la fois les dépenses individuelles et publiques (prévention et traitements) sont immenses. Dans certaines régions fortement touchées, le paludisme représente 30 à 50% des hospitalisations, 60% des consultations externes et jusqu'à 40% des dépenses de santé publique. Même si les chiffres récents, comparés à ceux de 2000, annoncent une diminution globale de la mortalité de 25% et de 33% dans la région Africaine. Le paludisme reste la 1ère parasitose mondiale et un facteur de pauvreté très important dans les pays concernés (OMS, Paludisme, aide mémoire, Avril 2012, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/index.html).

3.2 Le diagnostic

Le diagnostic de la maladie se fait en combinant les observations cliniques et l'étude de l'historique des patients aux tests diagnostiques. Ces tests consistent le plus souvent en l'observation microscopique de sang (**Bell D & Peeling RW. 2006**). Idéalement, les échantillons doivent être prélevés lors des pics de température, c'est à ce moment que la probabilité d'observer un grand nombre de parasites est la plus importante. La technique de la goutte épaisse est utilisée en routine. Ce protocole permet de détecter jusqu'à un parasite par 200µl de sang. Des kits de diagnostic rapides sont également disponibles. Il s'agit de petites bandelettes permettant la détection en quelques minutes d'antigènes malariques présents dans une goutte de sang. Les résultats obtenus à l'aide de cette technique, rapide mais couteuse, sont toujours confirmés par un frottis sanguin. Seul un diagnostic à *P.falciparum* peut être établi. Il est en effet impossible de distinguer *P.ovale*, *P.malariae*, ou *P.vivax* en utilisant ce système. Trois jours consécutifs de tests n'aboutissant à aucune détection de parasites permettent de rejeter la suspicion de malaria.

3. 3 La prévention

La lutte anti-vectorielle reste le moyen le plus efficace de réduire la transmission du pathogène au sein de la communauté. On peut alors tenter de diminuer la population de vecteur et de protéger contre les piqûres de moustique. Au niveau de l'individu, la seconde stratégie représente le premier moyen de défense contre la maladie.

L'une des méthodes utilisées consiste à assécher les points d'eau stagnante qui permettent le développement des larves d'anophèles. Historiquement, le paludisme a ainsi été éradiqué de certaines régions d'Europe tempérées et d'Amérique du Nord. Cette technique n'est pas applicable dans les régions tropicales, particulièrement dans la zone équatoriale, où les précipitations et la végétation abondante favorisent l'apparition de niches écologiques avantageuses aux larves. Les populations de vecteurs (larves et adultes) peuvent cependant être détruites par l'utilisation d'insecticides organochlorés comme le DTT. Malheureusement, la course au développement de ces produits (successivement organochloré, organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides) s'est accompagnée de l'acquisition, puis de l'accroissement de résistances (**Cui F. 2006, Dabire KR. 2008**).

La protection contre les piqûres inclut, entre autres, l'utilisation de moustiquaires métalliques à l'entrée des maisons, le port de vêtements longs, imprégnés d'insecticides et l'utilisation de répulsifs. Cependant, les deux méthodes les plus efficaces restent la destruction des moustiques dans les habitations par pulvérisation ou diffusion de pesticides domestiques et l'utilisation conjointe de moustiquaires imprégnées d'insecticides à base de pyréthrinoides à longue

durée d'action (**Beier JC. 2008**). Cette technique est très efficace et peu chère. Elle a permis de réduire la mortalité globale de 33% et la survenue de paludisme grave chez 44% des enfants de moins de 5 ans (**Nevill CG. 1996**).

Il est intéressant de noter que la malaria peut également être prévenue au moyen d'antipaludiques (pour plus de détails voir le paragraphe 3.4). Les voyageurs peuvent se protéger grâce à une prophylaxie adaptée qui cible le développement de la forme clinique de la maladie. L'OMS recommande le traitement préventif intermittent par de la sulfadoxine-pyriméthamine des nourrissons et de la femme enceinte atteignant les 2^{éme} et 3^{éme} trimestres et vivant en zone de forte transmission (OMS, Paludisme, aide mémoire, Avril 2012).

3.4 Le traitement

Le paludisme est une maladie curable si elle est prise en charge rapidement et efficacement. Des traitements ancestraux comme la quinine, extraite de l'écorce de l'arbre andou *Chinchona*, furent découverts et utilisés comme antipaludique bien avant que les causes même de la maladie ne furent connues. Près de 400 ans après la première description de ses effets thérapeutiques, ce composé est encore utilisé et représente un anti-malarique important. Il reste, malgré ses effets secondaires et l'émergence de molécules alternatives, largement utilisé en cas de grossesse ou de malaria sévère (**Parija SC & Praharaj I. 2011**). Les composés anti-malariques actuellement utilisés appartiennent à trois grandes familles de molécules répertoriées dans le tableau 1. Les chloroquines et autres quinolines comme la méfloquine ou la primaquine ont été pendant longtemps les molécules les plus abordables et les plus abondamment utilisées lors d'infection à *Plasmodium (**Parija SC & Praharaj I. 2011**)*. L'artémisine, obtenue à partir de la plante *Artemisia annua*, et certains de ses dérivés comme l'artesunate ou l'arteether restent des traitements rapides et efficaces (**White NJ. 2009**).

Famille de molécules	Noms des molécules
	Chloroquine/Quinine
Aryl amino alcohol	Méfloquine/Amodiaquine
	Primaquine/Lumefantrine/Halofantrine
	Pyrimethamine
Antifolates	Trimethoprime
	Proguanil
	Artemisine
Dérivés des artémisines	Dihydroartemisine
	Artesunate/Arteether

Tableau : 1 .Tableau récapitulatif reprenant les différents anti-malariques actuellement disponibles.

3.5 Les mécanismes d'action des anti-malariques et les phénomènes de résistances.

Plasmodium possède une capacité d'adaptation très importante à son environnement et développe de nombreuses résistances rendant une partie des molécules actuellement disponibles obsolètes dans de nombreux territoires endémiques. Bien que la plupart de ces composés soient connus depuis longtemps, leurs modes d'action ne sont pas complètement élucidés. Les quinolines, tout comme les chloroquines sont des bases faibles et se concentrent dans la vacuole digestive du parasite. A ce niveau, elles agissent probablement au niveau de l'hème et empêchent sa dimérisation. Le mécanisme de dimérisation est essentiel à la survie du parasite et le protège contre les effets toxiques de son propre métabolisme (**Slater AF. 1993**). Les résistances de *P.falciparum* à la chloroquine sont attribuées à la mutation du gène *PfCRT* codant pour un transporteur vacuolaire (**White NJ. 2004, Djimde A. 2001**). Certaines mutations de ce gène (comme celle en position 76 par exemple) sont à mettre en relation avec l'émergence de résistance à cette drogue ; les parasites mutés expulsant le composé bien plus efficacement que les parasites sauvages (**Foley M & Tilley L. 1997**). D'autres mutations situées au niveau de *PfMDR1* ont également été mises en relation avec la résistance *in vitro* à *P.falciparum* (**Dorsey G. 2001**).

Les pyrimethamines et les sulfonamides agissent en inhibant la voie métabolique des folates. La pyrimethamine intervient au niveau de la dihydrofolate réductase (DHFR) alors que les sulphonamides comme la sulfadoxine inhibent la dihydropteroate synthetase (DHPS). Certaines mutations de *dhfr* entraînent une diminution de l'affinité du complexe enzymatique aux antifolates. Par ailleurs, l'association, au niveau de ce gène, de plusieurs points de mutation séquentiels, explique la résistance des parasites à ces composés (**Imwong M. 2003**).

Le mécanisme d'action des artémisines et de ses dérivés est encore sujet à débat. Deux modes de fonctionnement ont été proposés. Le premier, et plus communément accepté, porte sur la génération de radicaux libres entraînant l'alkylation des protéines. Une seconde hypothèse récente suggère que l'artémisine agit en inhibant l'ATPase du réticulum sarco-endoplasmique du parasite (**Krishna S. 2006**).

Des études montrent que l'utilisation de certains produits comme l'antihypertenseur Verapamil ou l'antidépresseur Desipramil permet de lever certaines résistances à *P.falciparum in vitro*. Ces travaux préliminaires, très prometteurs ouvrent une voie intéressante dans la lutte contre la résistance aux parasites (**Rosenthal PJ. 2003**).

Afin de surmonter ces problèmes et de prolonger la durée de vie des traitements, les molécules sont de plus en plus souvent employées en combinaison. Les associations médicamenteuses permettent d'augmenter le nombre de guérison et de diminuer la probabilité d'émergence de nouvelles résistances dues à la pression médicamenteuse (**Eastman RT & Fidock DA. 2009**). Depuis 2001, l'organisation mondiale de la santé recommande un traitement des cas de malaria sans complication à base d'artémisine en association (ACT : artemisin-based combination therapies). On retrouve des traitements associant l'artesunate et la méfloquine, l'artesunate et la sulfadoxine-pyrimethane, l'artesunate et l'amodiaquine ou l'artemether et la lumefantine (OMS, 2010). Le choix de l'ACT varie en fonction des résistances aux drogues partenaires observées sur le terrain. Ce mode de prescription est particulièrement utilisé dans les régions présentant des résistances parasitaires à la chloroquine (**Dondorp AM. 2009**). Il permet de diminuer le nombre d'échecs observés lors de monothérapie, et de pallier à la faible durée de vie des artémisines en leurs associant une molécule à demi-vie plus longue (**Eastman RT & Fidock DA. 2009, Woodrow CJ & Krishna S. 2006**). Malgré leur relative efficacité, des cas d'échecs à ces traitements on été reportés au sud du Cambodge et à la frontière avec la Thaïlande (**Rogers WO. 2009**).

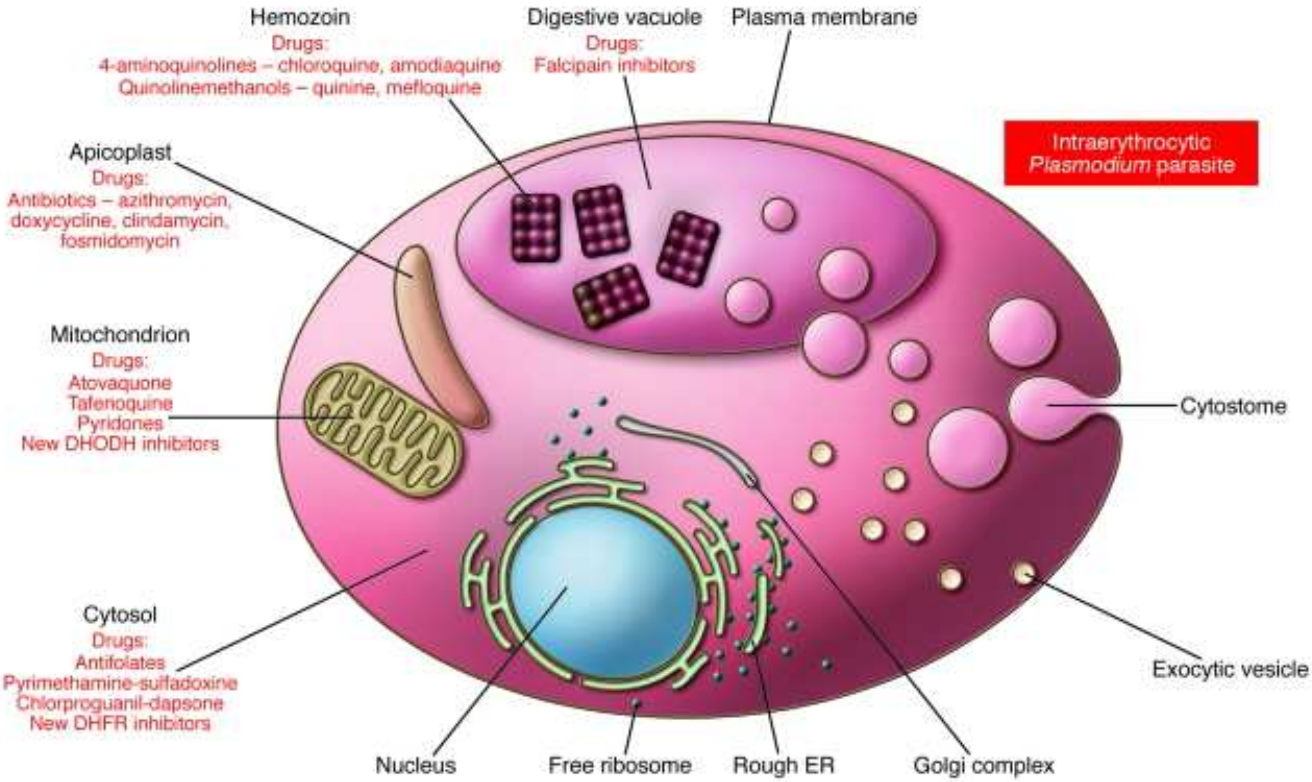


*Figure 3. Schéma récapitulatif du mode d'action des anti-malariques. Les composés déploient leurs effets en interrompant plusieurs procédés et voies métaboliques situés au sein de différents organelles. Les 4-aminoquinoline (incluant la chloroquine et l'amodiaquine), les quinolineméthanols (incluant la quinine et la méfloquine) se concentrent au niveau de la vacuole digestive où ils se fixent à la β-hématine et interférent avec la détoxification de l'hème. Les inhibiteurs de la falcipaine (en développement) ciblent les protéases qui participent à la dégradation de l'hémoglobine de la vacuole digestive. Certains antibiotiques tels que l'azithromycine, la doxycycline et la clindamycine agissent au sein de l'apicoplaste où ils inhibent la traduction protéique entrainant la mort des progénies des parasites traités. L'atovaquone et d'autres composés inhibent le transport des électrons dans la mitochondrie. Les antifolates empêchent la synthèse de novo du folate au niveau du cytosol. Les sites d'action des autres composés, incluant l'artémisine et ses dérivés restent mal connus et font l'objet de travaux de recherche (**Greenwood BM. 2008**).*

3.6 L'approche vaccinale

Il n'existe actuellement aucun vaccin homologué contre le paludisme ou contre aucun autre parasite humain. Pourtant, les études visant à sa mise au point se sont succédées depuis 30 ans (2400 articles publiés entre 1971 et 2001) avec relativement peu de résultats. La première tentative de vaccin synthétique, leSP166, développé par l'équipe de Manuel Elkin Patarroyo ne présentait peu ou pas d'efficacité contre *P.falciparum.* Les essais qui ont suivis ont tous échoué. Ce faible taux de réussite peut s'expliquer, au moins en partie, par le cycle de vie complexe du parasite qui présente au cours de son développement un polymorphisme antigénique impressionnant. L'une des conséquences principale est l'apparition, chez l'homme, d'une immunité particulière qui est lente à s'établir, incomplète (elle n'est jamais totale ni stérilisante, et ne protège jamais absolument) et instable (elle nécessite des ré-inductions fréquentes).

Actuellement, trois types de stratégie sont en développement. Elles visent à cibler différents antigènes issus de différentes formes parasitaires. La première, a pour but d'empêcher la pénétration et le développement du sporozoïte dans les hépatocytes (vaccin anti-stade exo-érythrocytaire). La seconde (vaccin anti stade sanguin), vise à empêcher les mérozoïtes de pénétrer et de se développer dans les hématies. Enfin, la dernière, tente de bloquer la transmission en induisant, chez le moustique, la création d'anticorps empêchant la maturation des stades sexués.

L'une des études les plus avancées, et prometteuses, concerne la mise au point d'un vaccin anti-sporozoïte, le RTS, S/AS02 qui se trouve au stade III des essais cliniques et est actuellement évalué dans 7 pays d'Afrique. Différentes combinaisons de ce produit apportent une immunité protectrice partielle chez des adultes naïfs (**Stoute JA. 1997, Kester KE. 2007, Kester KE. 2009**) et seraient efficaces chez des adultes et des enfants vivant en zone d'endémie (**Bojang KA. 2001, Bojang KA. 2006, Alonso PL. 2004, Aponte JJ. 2007, Bejon P. 2008, Sacarlal J. 2008, Bojang K. 2009, Polhemus ME. 2009, Sacarlal J. 2009**). Les résultats définitifs de l'essai clinique sont attendus en 2014 et une recommandation de l'OMS relative à l'utilisation ou non de ce vaccin sera formulée en 2015 (OMS, Paludisme aide mémoire, 2012).

En l'absence de stratégie thérapeutique efficace, la résistance aux traitements, que l'on observe depuis les années 50, et qui se développe à la fois chez l'Anophèle et chez *Plasmodium* est un véritable obstacle à l'efficacité des programmes de lutte globale antipaludique. L'utilisation d'insecticides et de traitements antiparasitaires à bas coût (qui sont les plus intéressants pour les populations concernées) est de moins en moins efficace. L'extension de la résistance à certaines molécules bien établies comme la chloroquine et les anti-folate explique la recrudescence du

paludisme dans de nombreuses parties du monde. Ce constat, associé à l'observation *in vitro* de résistances à l'artémisine, rend indispensable la mise en place de nouveaux moyens de lutte contre *Plasmodium (**Parija SC & Praharaj I. 2011**)*. Aujourd'hui, les efforts de la recherche médicale concernant la malaria se concentrent autour de l'élaboration de nouveaux inhibiteurs ciblant des enzymes chromatiniennes ou mitochondriales et certaines voies métaboliques (Co enzyme A ou transporteurs parasitaires (**Fidock DA. 2008**). Malgré ces avancées, nos connaissances limitées concernant la biologie fondamentale de *Plasmodium* et le nombre toujours faible de cibles potentielles identifiées s'opposent à la mise en place de nouveaux protocoles thérapeutiques. Dans ce contexte, le développement de médicaments passe par l'exploration de nouvelles voies et paradigmes ciblant le cycle de vie du pathogène et/ou en utilisant des stratégies diminuant le risque de sélectionner des souches résistantes.

II) Plasmodium

1. Introduction phylogénétique

Le genre *Plasmodium* appartient au phylum des *Apicomplexa*, au groupe des Alveolata et au super goupe des Chromoalveolata (**Adl SM. 2007, Adl SM. 2005, Dacks JB. 2008**)

Les apicomplexes sont des parasites protozoaires intracellulaires obligatoires. Ils se caractérisent par la présence d'une structure juxta nucléaire apparentée au chloroplaste : l'apicoplaste qui résulte d'une symbiose ancestrale entre un organisme phagotrophique et une algue apparentée aux algues rouges (**Keeling PJ. 2009**). Les apicomplexes possèdent un ensemble d'organites sécrétoires (micronèmes, rhoptries et granules denses) qui libèrent leur contenu de façon séquentielle lors de l'invasion (**Baum J. 2008**), d'un anneau polaire apical servant de centre organisateur des microtubules, et d'un glideosome qui assure la motilité des parasites infectants et participe à l'invasion de la cellule hôte (**Soldati-Favre D. 2008, Daher W & Soldati-Favre D. 2009**) (Figure 4).

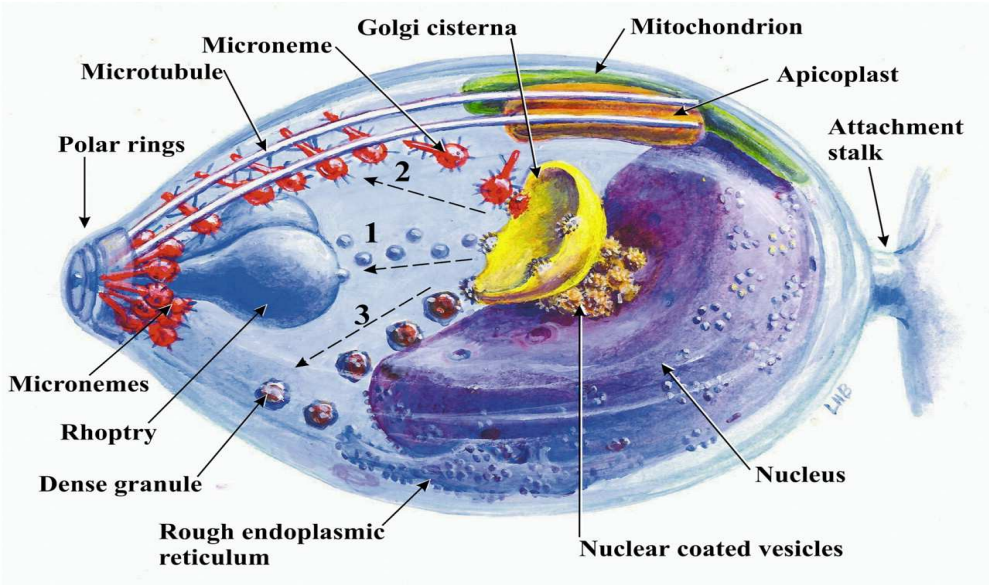


Figure : 4.
*Schéma de P.falciparum au stade mérozoïte. Sont représentées par des numéros les trois voies principales de sécrétion des organelles. Les flèches 1 et 3 correspondent respectivement à la sécrétion des rhoptries et des vésicules Golgiennes. La seconde représentant la voie de sécrétion des micronèmes dépendante des microtubules. Certains organites comme le noyau, l'apicoplaste ou la mitochondrie sont également représentés (**Bannister LH. 2003**).*

Le genre *Plasmodium* est composé de près de 200 espèces regroupées en deux taxons principaux, le premier est spécifique des mammifères, le second se rapporte aux oiseaux et lézards. *P.falciparum* et *P. reichenowi* (le parasite du chimpanzé) appartiennent au 1er taxon et forme un sous taxon, le second sous taxon regroupe les autres espèces de *Plasmodium* humains, simiens et de rongeurs. Le parasite se transmet par la piqûre de moustiques Culicidés, il est intéressant de noter que l'émergence des *Plasmodium* chez les mammifères est liée à l'adoption de l'anophèle comme agent vecteur (**Martinsen ES. 2008**).

Cinq espèces de *Plasmodium* infectent l'homme : *Plasmodium falciparum*, *P.vivax*, *P. malariae*, *P.ovale* et *P.knowlesi*. Ces parasites présentent de nombreuses variations au niveau de leur morphologie, de leur distribution géographique, ainsi qu'au niveau de leur réponse aux traitements anti-malariques. *Plasmodium falciparum*, est l'agent de la forme la plus sévère et potentiellement mortelle de la maladie. Il est responsable de la majorité des décès de jeunes enfants en Afrique (**Snow RW. 2004**). Une étude récente attribue l'origine de la forme humaine du parasite à un événement unique de transmission inter-espèce entre le gorille et l'homme (**Liu W. 2010**).

2. Génome, Transcriptome et Protéome chez *P.falciparum*

La publication du génome complet du clone 3D7 de *Plasmodium falciparum* en 2002 (**Gardner MJ. 2002**) représenta une avancée majeure dans le domaine de la biologie fondamentale du parasite. Ces données ont permis d'identifier un nombre important de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et de gènes impliqués dans la biologie et la pathogénicité du parasite. Les informations génomiques concernant *P.falciparum* ou toutes autres espèces de *Plasmodium* est disponible en libre accès sur internet (http://www.plasmodb.org, http://ww.genedb.org).

Le génome de *P.falciparum* s'organise en 14 chromosomes couvrant environ 23 paires de megabases, il est extrêmement riche en adénine et en thymine. Le pourcentage moyen en A/T est d'environ 81%, chiffre atteignant même 90% dans les régions intergéniques (**Gardner MJ. 2002**). *P.falciparum* possède également un génome plastidial et un génome mitochondrial linéaire (**Bozdech Z. 2003**). Près de 5300 gènes ont été annotés, cependant un nombre relativement restreint a pu être identifié comme codant une enzyme. Les régions près des extrémités chromosomiques sont particulièrement intéressantes, on y trouve des gènes codant pour des protéines de surface ou des antigènes reconnus par le système immunitaire humain. Cependant, ces régions sont particulièrement sensibles aux échanges de matériel génomique. Ce phénomène représente pour le parasite un formidable moyen d'augmenter sa diversité antigénique et d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

L'analyse du génome a permis de mettre en évidence l'existence d'orthologues de gènes impliqués dans de nombreux phénomènes cruciaux tels que l'initiation de la transcription, la réplication, la réparation, et la recombinaison de l'ADN (**Gardner MJ. 2002, Chen Q. 2000**). Cependant, plusieurs produits clefs du métabolisme sont manquants. Parmi eux on peut citer certains éléments impliqués dans la synthèse des 20 acides aminés, la synthèse des purines, le complexe NADH déhydrogénase ainsi que certaines protéines mitochondriales appartenant à l'ATP synthétase (**Gardner MJ. 2002**). Des travaux similaires ont permis l'identification d'une nouvelle famille de protéines impliquées dans l'invasion érythrocytaire (**Cowman AF. 2002, Crabb BS & Cowman AF. 2002**). Certaines voies métaboliques impliquées dans la synthèse d'acide gras, de précurseurs isopropanoides ou de l'hème semblent localisées au niveau de l'apicoplaste. Cet organite, indispensable à la survie du parasite possède un génome propre d'environ 35Kb codant pour seulement 57 protéines (**Fichera ME & Roos DS. 1997, He CY. 2001**). Pourtant, on estime que 10% des protéines codées dans le noyau se destinent à cet organite (**Waller RF. 2000**).

Des analyses transcriptomiques ont permis de montrer qu'au cours de la phase érythrocytaire, 60% du génome était actif et qu'au moins 75% des gènes étaient exprimés au moins une fois. Le parasite possède un mode de régulation de la transcription en cascade. Ce mécanisme, très spécialisé et assez inhabituel, se caractérise par l'expression en premier lieu de gènes codant pour des mécanismes généraux (synthèse protéique) et se termine par l'expression de gènes plus spécifiques au parasite (impliqués dans l'invasion érythrocytaire) (**Bozdech Z. 2003**).

Des études de spectrométrie de masse réalisées sur le clone 3D7 de *P.falciparum* ont permis de montrer que le protéome des trophozoïtes, merozoites, et gamétocytes était composé en grande partie de protéines communes aux trois stades et étaient pour la plupart des protéines ribosomales, des facteurs de transcription, des histones ou des protéines du cytosquelette (**Florens L. 2002**). Au contraire, le génome du sporozoïte est remarquablement différent. Plus de la moitié des protéines qui le composent sont uniques à ce stade. Le génome de *Plasmodium falciparum* code pour un nombre important de protéines uniques dont certaines pourraient être impliquées dans les interactions hôte/pathogène. Les protéines ne possédant pas d'homologues connus chez d'autres organismes représentent de bons candidats pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques (**Florens L. 2002**). D'autre part, certaines analyses ont montré que les séquences de *Plasmodium* sont la plupart du temps plus longues que celles des autres organismes. Même si le rôle de ces inserts reste incertain, ils représentent un bon espoir d'identifier des caractères spécifiques aux fonctions biologiques fondamentales du parasite (**Pizzi E & Frontali C. 2001**).

3. Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

P. falciparum possède un cycle de vie complexe comportant deux hôtes : un hôte invertébré, l'anophèle où se déroule la phase sexuée du cycle et un hôte vertébré, l'homme où se déroule la phase asexuée (Figure 6).

3.1 Le cycle sexué

Lors du repas de sang, l'anophèle ingère le parasite sous la forme d'un gamétocyte mâle (le microgamétocyte) ou femelle (le macrogamètocyte). Le parasite rejoint ensuite l'estomac de l'insecte où, en quelques minutes, il subit trois cycles rapides de synthèse d'ADN suivis de mitoses permettant la génération de 8 gamètes mâles haploïdes qui se rassemblent à la surface de la cellule mère. Un petit nombre de ces parasites fusionnent aux gamètes femelles (formées dans le même compartiment). Cette union aboutit à la formation d'un zygote diploïde qui se métamorphose ensuite en oocinéte. Ces oocinètes, mobiles, s'intègrent à la lame basale des cellules épithéliales et prennent le nom d'oocyste (**Shahabuddin M. 1998, Aly AS. 2009**). A ce stade le parasite subit entre 10 et 11 cycles de synthèse d'ADN/mitose, permettant la création d'une cellule syncytiale, le sporoblaste. Après un épisode massif de cytokinèse, des centaines de sporozoïtes haploïdes se regroupent à la surface de la cellule mère et pourront, après migration dans les glandes salivaires de l'anophèle, être transmis à l'hôte vertébré.

Selon la température extérieure et l'espèce de *Plasmodium,* le cycle sporogonique peut durer jusqu'à 20 jours. Il est essentiel à la pérennisation du parasite et représente un goulot d'étranglement dans sa transmission. Seuls 5 % des macrogamétocytes parviennent au stade oocyste et seuls 25% des sporozoïtes libérés atteignent les glandes salivaires du moustique (**Baton LA & Ranford-Cartwright LC. 2005**).

3.2 Le cycle asexué

3.2.1 La phase hépatique

Lors du repas de sang, un petit nombre de sporozoïtes sont transmis par l'insecte. Les parasites mobiles se déplacent alors plusieurs heures entre et aux travers des cellules dermiques (**Yamauchi LM. 2007**). Une partie de la population (jusqu'à 50%) finit par s'immobiliser et mourir. Une partie des survivants (20%) atteint un vaisseau lymphatique puis un ganglion et sera en grande partie détruite. Les derniers 30% rejoignent un vaisseau sanguin et commencent leur migration vers

le foie (**Amino R. 2006, Amino R. 2007**). Les sporozoïtes, enfermés dans une vacuole, pénètrent l'espace de Disse en traversant une cellule de Kupffer (**Yuda M & Ishino T. 2004, Baer K,Roosevelt M,. 2007**) et arrivent au contact des hépatocytes. Ils en traversent un certain nombre, terminent leur maturation et sont alors aptes à l'invasion (**Mota MM. 2004**). L'infestation des cellules du foie se caractérise par la formation d'une vacuole parasitophore (**Frevert U. 2004**). A ce niveau, le parasite entame une réorganisation de la cellule hôte (**Bano N. 2007**) et se développe pendant 5 à 7 jours. Il subit de nombreuses divisions cellulaires comprenant 13 à 14 cycles de synthèse d'ADN suivis de mitoses. Le parasite, après un passage sous forme trophozoïte (1n) se métamorphose en une cellule syncytiale, le schizonte hépatique qui contient plusieurs milliers de mérozoïtes, la forme infectieuse érythrocytaire. Après éclatement du schizonte, les mérozoïtes (1n) sont libérés directement dans la circulation sanguine ou sous la forme de mérosomes qui, après circulation dans le sang, libèrent les formes infectantes lorsqu'ils atteignent les capillaires pulmonaires (**Baer K,Klotz C,. 2007**) (Figure 6).

Chez *P.vivax* et *P .ovale*, certains sporozoïtes se séquestrent dans le foie. Cette forme quiescente, appelée hyponozoite peut rester dormante plusieurs semaines voire plusieurs années. Elle est, lors de son réveil, responsable des accès palustres retardés.

3.2.2 La phase érythrocytaire

Les mérozoïtes libérés dans le sang infectent les hématies. Ils engagent un cycle asexué érythrocytaire d'environ 48 heures chez les plasmodies humaines et de 3 jours chez *P.malariae*. Le processus d'invasion de l'hématie est complexe ; il fait intervenir un certain nombre de protéines de surface parmis lesquelles on retrouve les MSP (Merozoite Surface Protein) (**Haldar K & Mohandas N. 2007**). Après l'infestation des globules rouges, le parasite entouré d'une vacuole parasitophore, se développe en anneau (1n) (**Bannister LH. 2000**), puis en trophozoïte (1n) qui digère le contenu de la cellule hôte. L'hémoglobine est alors internalisée dans une vacuole digestive. A ce stade, le parasite subit plusieurs phases de synthèse d'ADN, de mitoses et de divisions nucléaires qui aboutissent à la formation d'un schizonte possédant entre 16 et 32 noyaux et présentant une forme caractéristique de rosace. Après une étape de division synchrone, la vingtaine de cellules haploïdes (les mérozoïtes filles) se regroupent à la surface du schizonte mère. Ces parasites, après leur libération, envahissent de nouveaux globules rouges et bouclent ainsi le cycle schizogonique érythrocytaire (Figures 5 et 6).

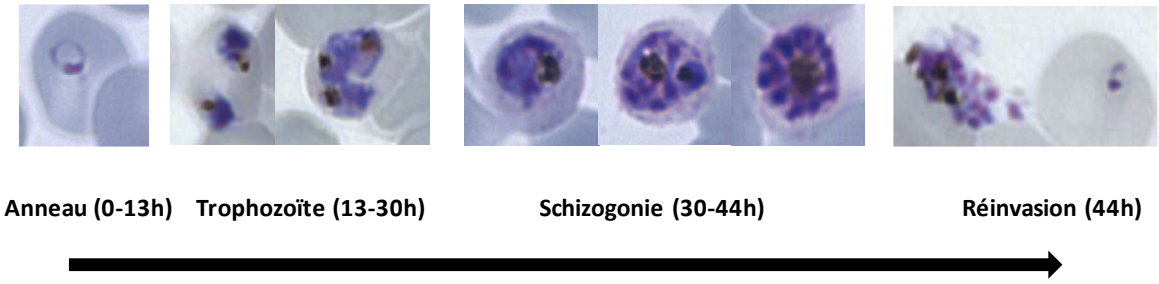


Figure : 5 .Le Cycle érythrocytaire de Plasmodium falciparum.

La phase clinique de l'infection chez l'homme correspond à l'invasion des globules rouges sanguins par les mérozoïtes. C'est au cours de l'éclatement des hématies infectées que se manifestent les symptômes de l'accès palustre. Le stade hépatocytaire est quant à lui asymptomatique. Après l'invasion des globules rouges, certains mérozoïtes se séquestrent dans la rate ou la moelle osseuse. Ils se différencient en gamétocytes mâles ou femelles. Cette étape, appelée gamétocytogenèse, se déroule en parallèle du cycle érythrocytaire. (**Day KP. 1998, Talman AM. 2004**). Les facteurs expliquant cette différenciation ne sont pas encore bien connus (**Trager W. 2005**). Après 7 à 15 jours, les parasites sont libérés dans le sang humain. Ils poursuivront leur développement chez l'anophèle.

Le cycle de développement et de différenciation du parasite est extrêmement complexe. Il implique de nombreuses étapes finement régulées et l'expression d'un panel important de protéines spécialisées dans sa survie intra- et extracellulaire, dans l'invasion de différents types cellulaires et

dans l'échappement du système immunitaire des hôtes (**Tuteja R. 2007**). Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans sa régulation semble être une étape indispensable à l'amélioration de nos connaissances concernant la biologie du parasite. Pourtant, peu de protéines impliquées dans le cycle cellulaire de *Plasmodium falciparum* sont connues de façon approfondie (**Chakrabarti D. 2002, Doerig C. 2002a**).

Très récemment, 4 orthologues de centrines (PfCEN1, 2, 3 ,4) ont été identifiés chez *P. falciparum*. Ces protéines appartenant au cytosquelette sont connues pour intervenir dans la division cellulaire et plus particulièrement dans la duplication des centrosomes. L'expression épisomique de PfCEN3 est capable de restaurer partiellement la croissance d'un clone de *Leishmania donovani* présentant une sévère diminution de son taux de multiplication après extinction d'un gène codant pour une centrine (**Mahajan B. 2008**).

Des études récentes d'analyse bioinformatiques ont permis de mettre à jour un certain nombre de protéines de *Plasmodium* présentant des homologies de séquence avec des protéines connues pour leur implication dans la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, on a pu identifier dans le génome de *Plasmodium falciparum* plusieurs CDKs (cyclin dependant kinase), NIMA (never in mitosis gene a), centrines, Aurora-related kinases, kinases et autres phosphatases (**Doerig C. 2009, Doerig C. 2002b, Halbert J. 2010, Kozlov S. 2010, Mahajan B. 2008, Reininger L. 2009**). L'action coordonnée de kinases et de phosphatases semble donc permettre l'équilibration de la balance phosphorylation/déphosphorylation responsable, au moins en partie, de la régulation du cycle du pathogène.

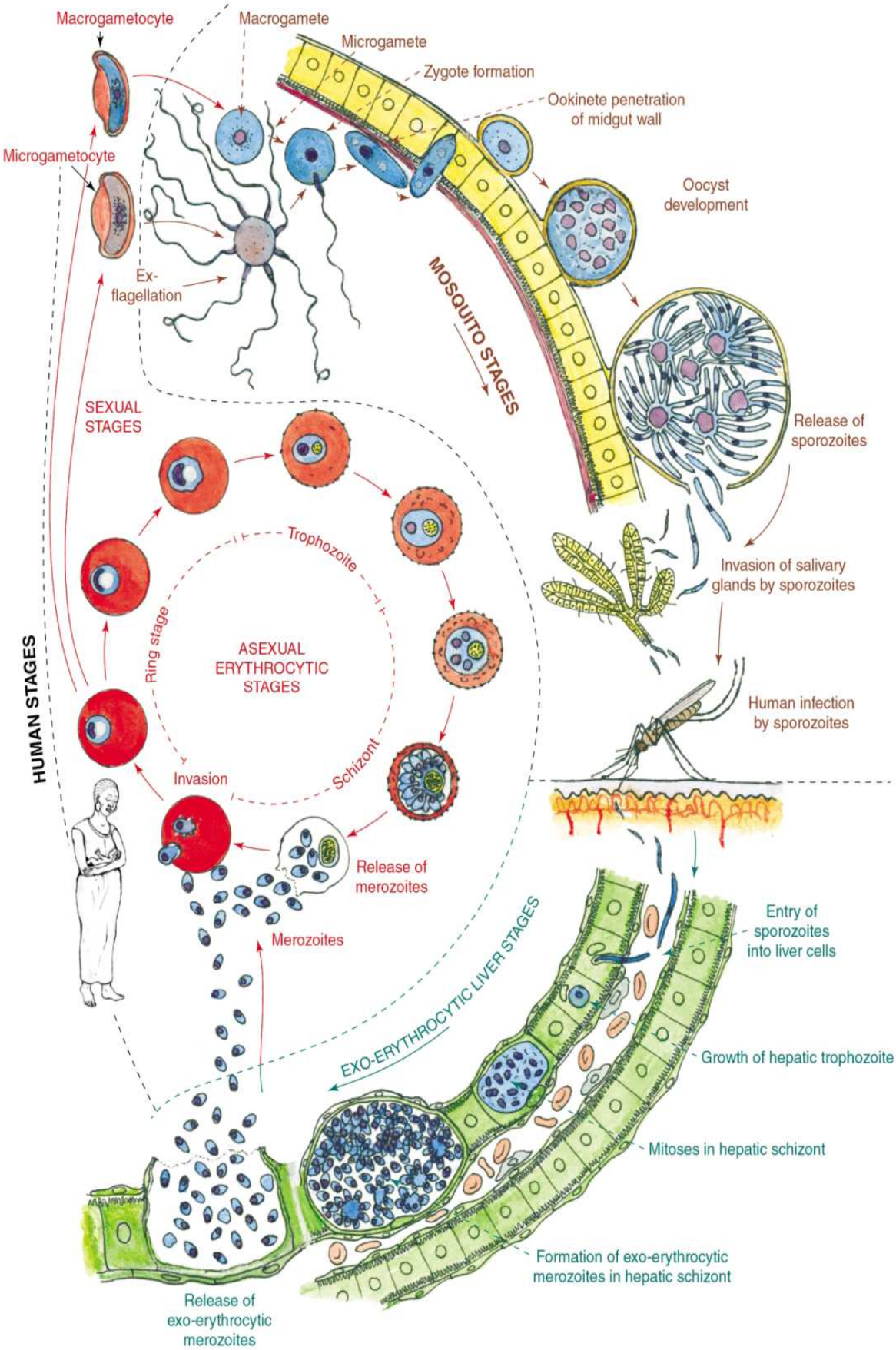


*Figure : 6. Cycle de vie de Plasmodium falciparum (**Bannister L & Mitchell G. 2003**).*

III) La Phosphorylation

1. Introduction

Les modifications protéiques post traductionnelles, au nombre d'une centaine environ, explique en grande partie la diversité du protéome. La phosphorylation est la modification la plus communément retrouvée. Ce processus, connu depuis plus d'un siècle, (**Levene PA & Alsberg CL. 1906**) régule la fonction de 30 à 70% des protéines eucaryotes (**Olsen JV. 2010, Ubersax JA & Ferrell JE, Jr. 2007**). C'est au 19^{éme} siècle que l'on comprit que les phosphatases possédaient la capacité de se fixer aux protéines. Pendant presqu'un siècle après leur découverte, on pensa que l'intérêt de ces « phosphoprotéines », le plus souvent observées dans le lait (la caseine) ou les jaunes d'œufs (la phosvitine), se limitait à leur apport nutritif. Ce n'est qu'en 1954 que l'on observa pour la première fois le transfert par une kinase d'un groupement phosphate d'une protéine à une autre. Un an plus tard, Fisher, Krebs (**Fischer EH & Krebs EG. 1955**), Wosilait et Sutherland (**Sutherland EW, Jr. & Wosilait WD. 1955**) montrèrent qu'une protéine impliquée dans le métabolisme du glycogène pouvait être régulée par l'addition ou le retrait d'un phosphate. L'idée émergea alors que les phosphoprotéines pouvaient être des régulateurs clefs de la survie cellulaire. La phosphorylation correspond au transfert d'un groupement phosphate γ d'un ATP donneur sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine de la chaine latérale d'une protéine. Cette réaction est le résultat de l'action antagoniste de deux enzymes : les kinases, qui ajoutent l'élément phosphate et les phosphatases qui, à l'inverse, le retirent (Figure 7).

2. Les Kinases

2.1 Introduction

Il existe deux grands types de protéines kinases. Le premier type se compose de protéines phosphorylant des résidus tyrosines, le second est spécifique de modifications au niveau de résidus sérines et/ou thréonines (Figure 7). La grande majorité des kinases partage un mode de fonctionnement similaire et une structure commune impliquant, au niveau des lobes N^t et C^t, respectivement, un feuillet β qui se fixe à l'ATP et une hélice α prédominante qui s'associe au substrat peptidique. Lors de la fixation, les enzymes subissent un ensemble de modifications conformationnelles associées au transfert rapide du groupement phosphate et à la libération du produit modifié (Figure 8) (**Brautigan DL. 2012**).

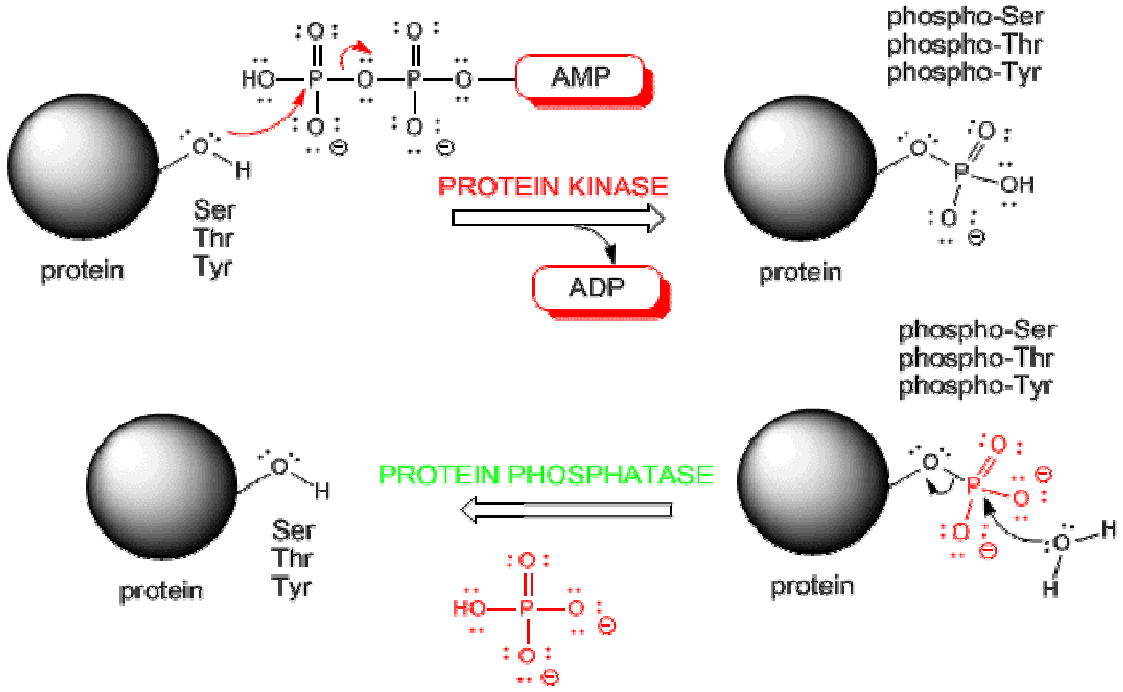


Figure 7 : Schéma explicatif reprenant les mécanismes de phosphorylation protéique ainsi que les résidus impliqués

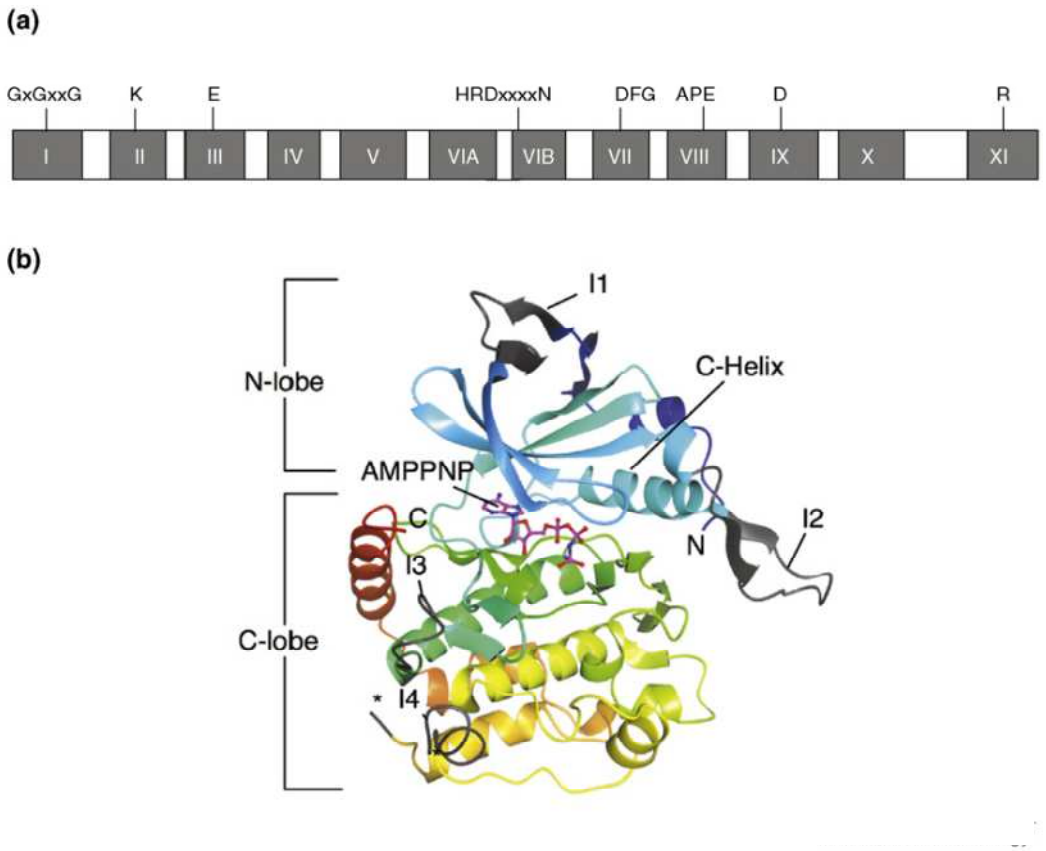


Figure 8 : Structure des Protéines Kinases eucaryotes (ePK).
(a) Domaine catalytique des ePK. Le domaine catalytique est caractérisé par une grande conservation des amino-acides distribués en 11 sous-domaines. Les résidus représentés sur le schéma sont : 3 résidus glycines (GxxGxxG) formant une épingle permettant le maintien de la molécule d'ATP au niveau du sous-domaine I, une lysine, au niveau du sous-domaine II qui permet l'orientation de ATP vers les phosphatases α et β, un glutamate (E) qui permet la formation d'un pont salin avec le résidu précédent, un aspartate (D) et une asparagine (N) à l'intérieur du motif HRDXXXXN spécifique des ePKs et se situant au niveau du domaine VIB dans lequel D correspond au résidu catalytique agissant comme un accepteur de base, D, l'aspartate situé au niveau du motif DFG (sous-domaine VII) qui se fixe à un cation (Mg2+ ou Mn2+) associé à l'ATP, le glutamate (E) dans le sous-domaine VIII qui forme un pont salin avec l'arginine (R) du sous-domaine XI et apporte de la stabilité au lobe Ct, et enfin, l'aspartate du sous domaine IX est impliqué dans la stabilité de la boucle catalytique du sous domaine VI par des fixations hydrogènes avec la structure de la protéine.
*(b) Structure de ePKs (exemple de la PfPK7). La structure bilobée des ePKs se caractérise par un lobe Nt riche en feuillets β et un lobe Ct riche en hélice α. Entre les deux, on retrouve la fente catalytique (AMPPNP, un analogue de l'ATP en magenta), est également indiqué l'hélice C qui forme le dos de la fente de fixation à l'ATP) (D'après (**Doerig C. 2008**). Structure PfPK7 : (**Merckx A,Echalier A,. 2008**))*

2.2 Les Kinases chez Plasmodium falciparum

2.2.1 : Le kinôme de *P.falciparum*

Deux analyses génomiques de *P.falciparum* réalisées indépendamment ont permis de mettre en évidence l'existence de 86 (**Ward P. 2004**) ou 99 (**Anamika. 2005**) cadres ouvert de lecture codant pour une protéine kinase et correspondant à 1.1 - 1.6% du génome complet. Parmi ces gènes putatifs, 65 s'apparentent à la famille des kinases eucaryotes (ou ePK, Figure 8). La plupart d'entre elles se trouvent associées à l'un des groupes suivants retrouvés chez l'homme :

- Les caséines kinases 1 (CK1)
- Les CMGC comprenant les CDKs (cyclin-dependant kinases), les MAPKs (mitogen-activated protein kinases), la GSK3 (glycogen syntethase kinase 3) et les CLKs (CDK-like kinases)
- Les AGC comprenant les PKA (cyclic-adenosine-monophosphate-dependent protein kinase), les PKG (cyclic-guanosine-monphosphate-dependent protein kinase), les PKC (protéine kinase C) et les protéines apparentées.
- Les CamK (calcium/calmodulin-dependant kinases)
- Les OPK (Other protein kinase, rassemblent les kinases n'appartenant à aucun des groupes cités plus haut)

En dépit de leurs grandes similarités, les kinomes humains et de *Plasmodium falciparum* présentent quelques divergences. Ainsi, certaines protéines parasitaires ne possèdent pas d'orthologues clairement identifiés chez l'hôte humain. C'est le cas des calcium-dependant kinases (ou CDPKs) qui se rapportent à une protéine retrouvée chez les plantes dont le domaine kinase se serait fusionné à un domaine calmoduline-like (**Zhang XS & Choi JH. 2001**) ou encore à des FIKKs (nommée ainsi à cause du motif Phe-Ile-Lys-Lys que l'on retrouve au niveau Nt de leur domaine kinase) qui, restreintes au phylum des apicomplexes forment avec ses 21 membres le plus grand groupe de kinases retrouvé chez le parasite (**Ward P. 2004, Schneider AG & Mercereau-Puijalon O. 2005**).

Une étude globale de génétique inverse visant à interrompre l'ensemble des gènes du kinôme a permis de mettre en relief l'importance que revêtent ces protéines lors du développement asexué du pathogène. Ce travail montre que sur les 65 ePKs que compte cet organisme, la moitié, au moins, est essentielle au maintien de sa viabilité (Tableau 3). Cependant, ces résultats impliquent l'existence de redondances fonctionnelles pour un peu

moins de la moitié de ces protéines. La réalité semble donc assez loin de l'idée simple selon laquelle à une kinase correspond un substrat (**Solyakov L. 2011b**).

La suite de ce chapitre s'oriente vers la description plus détaillée des mécanismes biologiques régulés par les kinases de *Plasmodium falciparum*.

Nom	Groupe/Famille Kinase	Référence	Nom	Groupe/Famille Kinase	Référence
PfTKL2	Tyrosine kinase-like	(**Solyakov L. 2011b**)	**Pf11-0239**	CamK	**(Solyakov L. 2011)**
PfTKL4	Tyrosine kinase-like	**(Solyakov L. 2011)**	**PF14_0227**	CamK	**(Solyakov L. 2011)**
PfeiK1	eIF2α kinase	(**Fennell C. 2009**)	**PfPKRP**	CamK	**(Solyakov L. 2011)**
PfeiK2	eIF2α kinase	(**Schneider AG & Mercereau-Puijalon O. 2005**)	**PFB0665w**	CamK	**(Solyakov L. 2011)**
Pfnek-3	NimA	**(Solyakov L. 2011)**	**MAL7P1.18**	CamK	**(Solyakov L. 2011)**
Pfnek-2	NimA	**(Reininger L.. 2009)**	**Pf11_0060**	CamK	**(Solyakov L. 2011)**
Pfnek-4	NimA	**(Solyakov L.2011)**	**PfPK8**	Orpheline	**(Solyakov L. 2011)**
MAL13P1.196	CMGC/CDK	**(Solyakov L. 2011)**	**PfI1280c**	Orpheline	**(Solyakov L. 2011)**
Pfcrk-5	CMGC/CDK	**(Solyakov L.2011)**	**Pf14_0392**	Orpheline	**(Solyakov L. 2011)**
Pfmap-2	CMGC/MAPK	**(Dorin-Semblat D. 2007)**	**MAL7P1.78**	Orpheline	**(Solyakov L. 2011)**
PfPK1	CMGC/GSK3	**(Solyakov L. 2011)**	**PF14_0476**	Orpheline	**(Solyakov L. 2011)**
PfCDPK7	CDPK	**(Solyakov L.2011)**	**PfPK7**	Orpheline	**(Dorin-Semblat D. 2008)**
PfCDPK4	CDPK	(Kato N.2008)	**PFL2280w**	Orpheline	**(Solyakov L.2011)**

*Tableau 2: Tableau récapitulatif des protéines kinases de Plasmodium falciparum non indispensable à son développement érythrocytaire (**Solyakov L. 2011b**).*

Nom	Groupe/Famille Kinase	Référence	Nom	Groupe/Famille Kinase	Référence
PfCK1	Caseine Kinase 1	**(Solyakov L. 2011)**	**PfCLK2**	CMGC/CDK-like	**(Agarwal S. 2011)**
PfTKL3	Tyrosine kinase-like	**(Abdi A. 2010)**	**PfPK2**	CamK	**(Solyakov L.2011)**
PfTKL1	Tyrosine kinase-like	**(Solyakov L. 2011)**	**PfCDPK1**	CDPK	**(Kato N. 2008)**
PfK4	eIF2α kinase	**(Solyakov L. 2011)**	**PfCDPK5**	CDPK	**(Dvorin JD. 2010)**
Pfnek-1	NimA	**(Dorin-Semblat D. 2011)**	**PfCDPK2**	CDPK	**(Solyakov L.2011)**
Pfcrk-4	CMGC/CDK	**(Solyakov L. 2011)**	**PfCDPK3**	CDPK	**(Solyakov L.2011)**
PfK6	CMGC/CDK	**(Solyakov L. 2011)**	**PfARK1**	Aurora	**(Reiniger L. 2011)**
Pfcrk-3	CMGC/CDK	**(Halbert J. 2010)**	**PfARK2**	Aurora	**(Solyakov L.2011)**
PfPK5	CMGC/CDK	**(Solyakov L. 2011)**	**PfARK 3**	Aurora	**(Solyakov L.2011)**
Pfmrk	CMGC/CDK	**(Solyakov L. 2011)**	**Pf11-0464**	AGC-related	**(Solyakov L.2011)**
Pfcrk-1	CMGC/CDK	**(Solyakov L. 2011)**	**Pf11-0227**	AGC-related	**(Solyakov L.2011)**
Pfmap-2	CMGC/CDK	**(Dorin-Semblat D. 2007)**	**PfPKG**	AGC	**(Taylor HM. 2010)**
PfCK2	CMGC/CK2	**(Holland Z. 2009)**	**PfPKB**	AGC	**(Solyakov L,2011)**
MAL13P1.84	CMGC/GSK3	**(Solyakov L. 2011)**	**PfPKA**	AGC	**(Solyakov L.2011)**
PfGSK3	CMGC/GSK3	**(Solyakov L. 2011)**	**PfEST**	Orpheline	**(Solyakov L.2011)**
PfCLK3	CMGC/CDK-like	**(Solyakov L. 2011)**	**Pf11_0488**	Orpheline	**(Solyakov L.2011)**
PfCLK1	CMGC/CDK-like	**(Agarwal S. 2011)**	**PfKIN**	Orpheline	**(Solyakov L.2011)**
PfCLK4	CMGC/CDK-like	**(Solyakov L. 2011)**	**PfPK9**	Orpheline	**(Solyakov L.2011)**

*Tableau 3: Tableau récapitulatif des protéines kinases de Plasmodium falciparum indispensables à son développement érythrocytaire (**Solyakov L. 2011b**) .*

2.2.1 : Le groupe des CK1

Bien que cette famille soit abondamment représentée chez de nombreux organismes (80 membres chez les nématodes), *Plasmodium falciparum* ne possède qu'un membre de ce groupe au sein de son génome. L'enzyme, produite sous la forme d'une protéine recombinante, phosphoryle *in vitro* un certain nombre de protéines contenues dans des extraits parasitaires (**Barik S. 1997**).

2.2.2 : Le groupe des CMCG

2.2.2.1 Les CDKs

Bien que le développement de *P.falciparum* soit unique et complexe, on peut s'attendre à ce que chez le parasite, des protéines apparentées à la sous famille des cyclines dépendantes kinases (CDK) présentent des caractéristiques similaires à celle de leurs homologues eucaryotes et soient des éléments clefs du cycle cellulaire. Parmi les candidats apparentés à la famille des CMGC (à laquelle appartiennent les CDKs et les MAPs kinases) PfPK5 semble être un élément intéressant. Cette protéine nucléaire, la première CDK-like kinase identifiée chez *P.falciparum,* présente une homologie de séquence de 60% avec la CDK1 humaine et une structure se rapprochant de celle de la CDK2 humaine. Elle s'exprime lors du stade schizonte érythrocytaire, son pic d'activité survient environ 36 heures après l'invasion (**Ross-Macdonald PB. 1994, Graeser R,Wernli B,. 1996, Graeser R,Franklin RM,. 1996**).

D'autres protéines présentant des caractéristiques de CDK ont également pu être mises en évidence. Ainsi, nous pouvons citer PFMRK (**Li JL. 1996**), un homologue de la kinase activatrice Mo15/CDK7, ou PFCRK 1, 3 et 5 (**Doerig C. 2002b**). *In vitro*, PFMRK sous sa forme monomérique ne présente qu'une faible activité kinase mais est activée par l'addition de PFCYCLIN-1, de la cycline humaine H (**Le Roch K. 2000, Waters NC. 2000**) ou de l'homologue de la PFMAT1 lui-même mis en présence de cycline et ce de façon similaire au complexe eucaryote CDK7/cyclinH-MAT (**Chen Y. 2006**). PFCRK 1, quant à elle, bien qu'elle ne semble pas être un homologue fonctionnel des CDK1/2 eucaryotes, appartient à la famille des gènes p58GTA, connus pour leur action négative sur la croissance cellulaire (**Doerig C. 1995**). Cette protéine, indispensable à la mise en place du cycle asexué parasitaire, présente un pic d'expression au stade gamétocytaire (**Rangarajan R. 2006**).

L'analyse du génome de *P.falciparum* a permis de mettre en évidence quatre homologues de cyclines : PFCYC 1, PFCYC 2, PFCYC 3 et PFCYC 4 (**Le Roch K. 2000, Merckx A. 2003**). PFCYC 1 présente une forte homologie avec la famille des cyclines H activatrices des CDK7. Ainsi, PFCYC 1 active PFMRK (**Waters NC. 2000**). De façon plus inattendue, la protéine active également l'homologue parasitaire de la CDK7 eucaryote : PfPK5 (**Le Roch K. 2000**). Les protéines de la famille des cyclines H n'ont

jamais été décrites comme des activateurs de CDK1 ou CDK5 (avec laquelle PfPK5 présente la plus forte homologie), ce mécanisme semble donc spécifique au fonctionnement du parasite. Les autres cyclines identifiées sont toutes trois associées à l'activité kinase de l'histone H1, Pfcyc3 permet, de plus, l'activation *in vitro* de PfPK5.

2.2.2.2 Les MAPKs

Les MAP kinases (mitogène-activated protein) jouent un rôle central et coordonnent les activités d'un grand nombre de médiateurs intracellulaires. Des études d'interruption génétique ont permis de montrer que l'un de ses orthologues : *Pfmap-2* était essentiel à la croissance asexuée du parasite (**Dorin-Semblat D. 2007**).

Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas dans le génome de *Plasmodium falciparum* d'orthologues de MAP kinase kinase (MAPKK ou MEK) clairement identifiables. Cependant, une protéine d'apparence chimérique, appelée PfPK7, possède une région C-ter présentant des homologies de séquences avec certaines MEKs (**Dorin-Semblat D. 2008**) mais également de structure avec la TAO2 kinase, une MAP3KKK. D'un point de vue fonctionnel, les parasites déficients pour cette protéine présentent un ralentissement de croissance associé à une diminution du nombre de mérozoïtes et à un défaut de production d'oocystes (**Dorin-Semblat D. 2008**).

2.2.2.3 Les GSK3s

Le groupe des GSK3 regroupe trois séquences chez *Plasmodium falciparum*, l'une d'elle a fait l'objet d'une étude montrant sa localisation au niveau des fissures de Maurer). PfGSK3 semble donc au moins en partie, impliquée dans l'exportation de protéines vers l'érythrocyte (**Droucheau E. 2004**).

2.2.3 : Le groupe des AGC

2.2.3.1 La PfPKA

Le nucleotide monophosphate AMPc synthétisé par l'adenylate cyclase (PfAC) est un second messager indispensable au bon fonctionnement des cellules eucaryotes. L'une de ses fonctions est d'activer la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) en se fixant à sa sous-unité régulatrice PKAr. Chez *Plasmodium falciparum*, les unités catalytiques (PKAc) (**Syin C. 2001**) et régulatrices (PKAr) ont pu être caractérisées. L'addition de PfPKAr ou sa surexpression en *trans* entraîne une diminution de la conductance anionique des érythrocytes infectés associée à une baisse de la croissance des

cellules hôtes. Ce phénomène peut être corrigé par une augmentation du taux d'AMPc intra-cellulaire (**Merckx A,Nivez MP,. 2008**). Des études pharmacologiques réalisées sur des cultures de parasites ont montré l'implication de la voie cAMP-PKA dans la régulation du taux calcique cytosolique ainsi de son implication dans la régulation de la maturation du pathogène (**Beraldo FH. 2005**).

2.2.3.2 La PfPKB

Chez les mammifères, PKB est régulée par l'action de phosphoinositides (ou Pis) interagissant au niveau du domaine PH de la kinase (**Marte BM & Downward J. 1997**). De façon tout à fait surprenante, PfPKB ne possède pas de domaine PH et est activée par une calmoduline via un domaine CBD (calmodulin-binding domain) présent au niveau de sa région N^t (**Vaid A & Sharma P. 2006, Kumar A. 2004**). Certaines données expérimentales indiquent que cette nouvelle voie de signalisation caractérisée par l'activation de PfPKB via le calcium et la calmoduline pourrait être impliquée dans l'invasion érythrocytaire du parasite (**Vaid A. 2008**).

2.2.4 : Le groupe des OPK

2.2.4.1 Les NIMA-related kinases (NEK)

Les NIMA-related Kinases (ou NEKs), protéines principalement connues chez les eucaryotes pour leur implication dans la progression du cycle cellulaire (**O'Connell MJ. 2003**), sont retrouvées au nombre de quatre dans le génome de *Plasmodium falciparum* et sont exprimées principalement au stade gamétocytaire (**Le Roch KG. 2003**). Des études portant sur l'homologue parasitaire de *Neck-3*, protéine décrite chez les eucaryotes pour son implication dans la transtion G2/M (**Osmani SA. 1988**) ont montré qu'elle était capable *in vitro* d'activer par phosphorylation PfMAP2. Cette caractéristique avait été observée précédemment pour PFNEK-1 (**Lye YM. 2006, Dorin D. 2001**). Cette dernière, exprimée dans les gamétocytes mâles et lors du cycle érythrocytaire, est nécessaire à la mise en place de la phase asexuée (**Dorin-Semblat D. 2011**).

Deux gènes de *Plasmodium*, décrits chez *P.falciparum* et *P.berghei* ont un rôle défini dans le cycle cellulaire, ils codent pour les NEK-2 et 4 et sont tous les deux indispensables à la réplication précédant la méiose chez le zygote. L'interruption de *Neck-2* et *Neck-4* n'a pas d'influence sur les mitoses érythrocytaires mais empêchent le développement du parasite lors des stades sexués (**Reininger L. 2005, Reininger L. 2009**).

2.2.4.2 Les Aurora kinases

Chez les eucaryotes supérieurs, Aurora-A est un régulateur important de la maturation et de la stabilisation des centres organisateurs de microtubules (MOTCs). Récemment, la PFARK1, une Aurora-A-related kinase, identifiée chez *P.falciparum* comme étant essentielle à son développement érythrocytaire a été observée au niveau des pôles du réseau mitotique lors de l'entrée du parasite en phase M de mitose (**Reininger L. 2011**).

2.2.5 : Les FIKKs

Ce groupe particulier, restreint aux apicomplexes est constitué de 21 enzymes (Ward *et al*, 2004 ; Anamika *et al*, 2005). Elles possèdent un motif d'export PEXEL (**Schneider AG & Mercereau-Puijalon O. 2005**). En effet, certaines de ces enzymes présentent une localisation érythrocytaire (**Nunes MC. 2007**).

2.2.6 : Le phospho-protéome de *P.falciparum*

L'ensemble de ces kinases jouent un rôle essentiel et pléiotropique dans la biologie de *Plasmodium falciparum*. Cette notion peut être facilement illustrée par la nature diverse des protéines parasitaires phosphorylées. Une étude globale de phospho-protéomique a permis de mettre en évidence l'existence chez le pathogène de 650 protéines modifiées et de 1223 sites individuels de phosphorylation. Ce travail a également permis de montrer l'implication d'une partie de ces protéines dans des mécanismes biologiques généraux tels que le métabolisme, la réplication de l'ADN ou la transcription génique. Pourtant, une partie non négligeable d'entre elles sont associées à des mécanismes plus spécifiques tels que, par exemple, l'adhésion aux cellules hôtes, phénomène essentiel de la pathogénicité (Figure 9). Il est intéressant de noter qu'en dépit du manque d'identification claire de tyrosine kinase dans le protéome de *P.falciparum*, on retrouve, lors de l'étude de son phospho-protéome des protéines phosphorylées au niveau de résidus tyrosines (**Solyakov L. 2011b, Treeck M. 2011**). Cette idée illustre bien la complexité de la régulation de la balance phosphorylation/déphosphorylation existant chez ce parasite. Ces résultats montrent l'importance et la spécificité que revêtent les protéines kinases et les protéines phosphatases dans la mise en place de la biologie de ce pathogène.

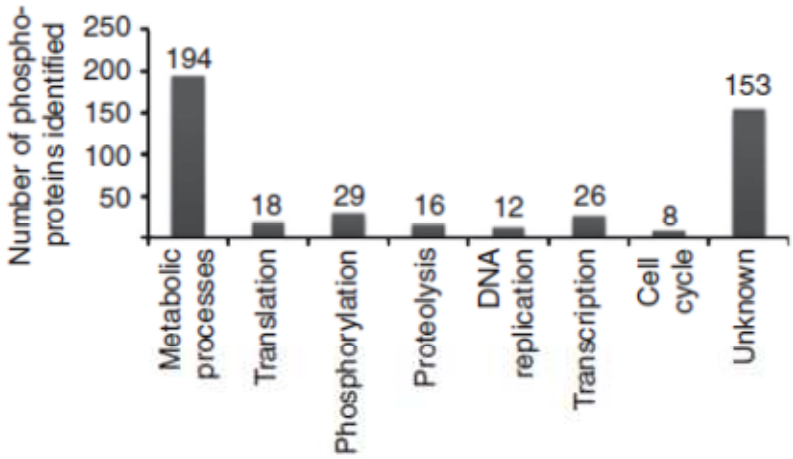


*Figure 9 : Analyse globale du phospho-protéome de Plasmodium falciparum au stade schizonte. Histogramme représentant la distribution des phospho-protéines en fonction du groupe fonctionnel auquel elles appartiennent (**Solyakov L. 2011b**).*

3. Les phosphatases

3.1 Généralités et classification

Contrairement aux protéines kinases, les phosphatases présentent des mécanismes biochimiques divers. Elles varient, entre autres, au niveau de leur structure, de leurs sites actifs ou de leurs mécanismes d'hydrolyse. Les protéines phosphatases se classent en deux grandes familles : les Sérine-Thréonine Phosphatases (PSPs) et les Tyrosines Phosphatases (PTP) (Figure 10).

Certaines phosphatases possèdent la propriété particulière de déphosphoryler à la fois les résidus tyrosines, sérines et thréonines. Ces protéines, appelée DUSP (pour Dual-specificity phosphatase), partagent avec les PTP un intermédiaire phosphoenzymatique commun impliquant un résidu cystéine au niveau du site actif. On retrouve ce mécanisme d'hydrolyse caractéristique chez la myotubarine, la CDC25, ou certaines phosphatases impliquées dans le métabolisme lipidique comme les PIP phosphatases (les PTENs).

Les Sérine/Thréonine Phosphatases se subdivisent en de multiples sous familles. La plus importante d'entre elles se compose des PhosphoProtein Phosphatases (ou PPP) qui possèdent, entre espèces, l'un des degrés de conservation les plus haut observé pour une enzyme (de l'ordre de 80%). Les séquences des PPP présentent quelques distinctions permettant un classement en différents sous-types. On y retrouve alors la phosphatase de type 1 (PP1), de type2A (PP2A), la PP3 (PP2B ou calcineurine), la PP4, PP5, PP6 et PP7 (**Cohen PT. 1997, Shi Y. 2009**). Ces protéines possèdent un centre catalytique très conservé du point de vue structural et mécanistique. Ces enzymes diffèrent au niveau des boucles extérieures, exposées aux solvants, qui font varier la forme ainsi que la charge de la surface et modulent l'affinité aux ligands (**Egloff MP. 1995, Goldberg J. 1995**).

Les protéines homologues appartenant à un même sous-type sont extrêmement conservées au niveau fonctionnel. Chez un organisme donné, il est possible de complémenter la perte de l'une de ces protéines en induisant l'expression d'un de ses orthologues appartenant au même sous-type. Ainsi, le phénotype déficient du mutant de levure *sit4* peut être restauré par l'induction de l'expression de la PP6 humaine, de ses orthologues Ppe1 (*S.pombe*) ou PPV (drosophile) (**Mann DJ. 1993, Bastians H & Ponstingl H. 1996**).

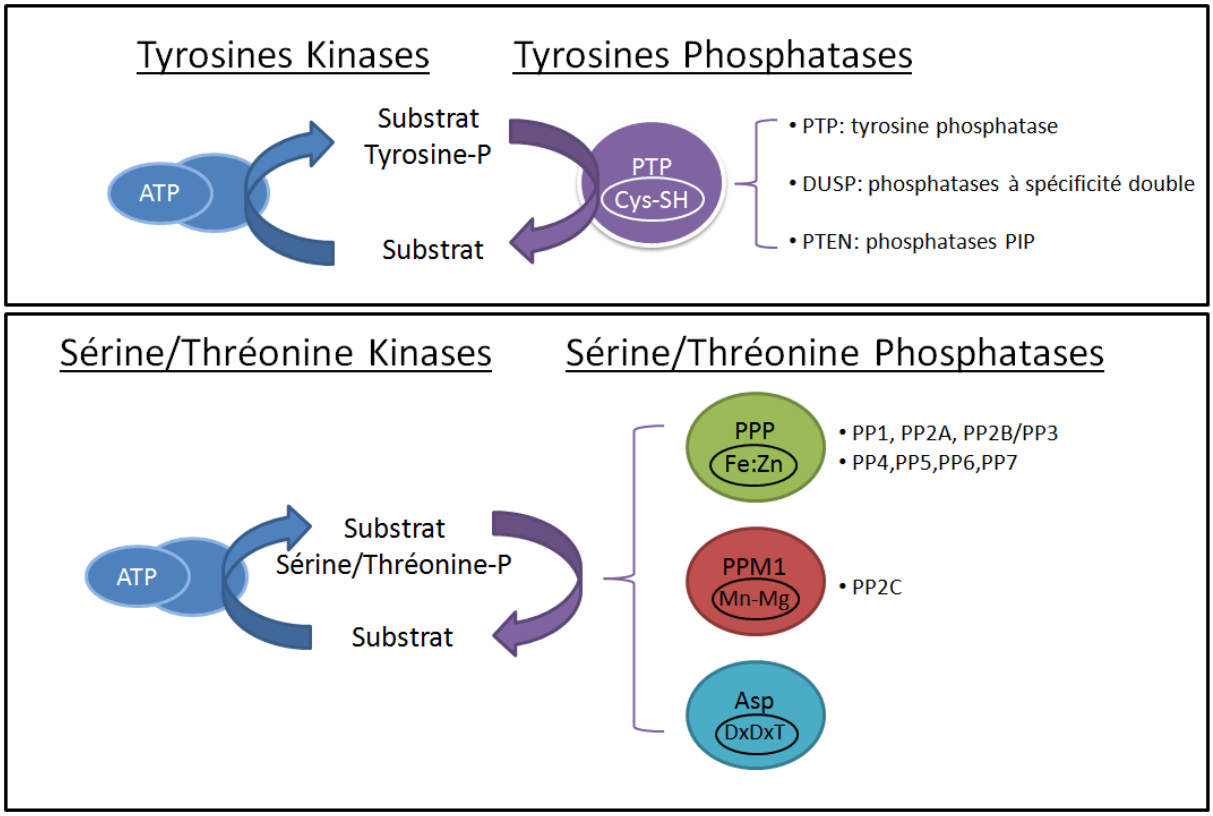


Figure : 10. Classification des protéines Kinases et Phosphatases.
*Les protéines kinases se répartissent en deux groupes : les tyrosines Kinases et Sérines/Thréonine Kinases (schémas bleus à gauche). Elles se composent de deux lobes : un lobe Ct se fixant à l'ATP et un lobe Nt s'associant au substrat. Les protéines phosphatases se regroupent en quatre familles, la première, la PTP (schéma mauve cadre du haut à droite) possède un site actif contenant une cystéine. Elle se subdivise en différents groupes : Les PTP, les DUSP et les PTEN. Les Sérine/Thréonine Phosphatases (cadre du bas, à droite) se répartissent en trois sous-familles : la première, composée des phosphatases PPP, possède un site actif contenant les deux ions métalliques Fer/Zinc. La seconde, regroupant les PPM1, présente un site actif contenant soit un ion manganèse soit un ion magnésium. La dernière, la famille des phosphatases asparagine, utilise, lors de l'hydolyse un intermédiaire asparagine phosphorylé (**Brautigan DL. 2012**).*

L'utilisation de divers inhibiteurs naturels ciblant les sites actifs tels que l'acide okadaique (**Maynes JT. 2001**), isolé de l'éponge marine *Halichondria*, la calyculine A (**Kita A. 2002**), la microcystine (**Goldberg J. 1995**) ou la tautomycine (**Kelker MS. 2009**) montre, chez ces phosphatases, l'existence d'une grande proximité structurale. Ces petites toxines bloquent très efficacement les activités de la plupart des PPP (PP1, PP2A, PP4-6) mais ne présentent aucune action sur les autres membres de la famille des Sérine-Thréonine ou Tyrosine Phosphatases. Ces composés exercent leurs effets cytotoxiques en inhibant principalement la PP1 et la PP2A. Elles entrainent le déséquilibre de la balance phosphorylation/déphosphorylation d'un grand nombre de protéines cellulaires, causant une dérégulation ou une dégénérescence cellulaire. Ces protéines ont acquis une importance considérable concernant l'étude de la structure et de l'activité des phosphatases. L'une d'entre elles,

l'acide okadaique, possède la particularité d'inhiber la PP2A avec une IC50 inférieure au nanomolaire (IC50 : 1nM) alors qu'une concentration 10 à 100 fois supérieure est requise pour l'inhibition de la PP1 (IC 50 : 60-500nM). Cette molécule a donc été utilisée comme un outil biochimique afin de discriminer les évènements biologiques dépendant de l'une ou de l'autre de ces phosphatases (**Dautzenberg FM. 1993**). En combinaison avec la calyculine, l'acide okadaique a, par exemple, permis de montrer l'implication des PP1/2A dans la réduction de la longueur synaptique lors de la sénescence de la cellule neuronale (**Norris CM. 1998**).

Dans le génome humain, il existe plus de 420 gènes responsables de l'expression de Sérine-Thréonine Kinases ce chiffre explique 98.2% des évènements de phosphorylation. Pourtant, seuls 40 gènes codant pour une sérine/thréonine phosphatase ont pu être retrouvés (**Peti W. 2012b**). Ce nombre, relativement faible, ne peut expliquer à lui seul l'ensemble des évènements de déphosphorylation survenant au sein de la cellule. Des phénomènes de régulation parallèle semblent donc indispensables à la mise en place de leurs actions pléthoriques. Les phosphatases PP1 et PP2A sont responsables, à elles seules, de près de 90% des phénomènes de déphosphorylation (**Moorhead GB. 2007, Virshup DM & Shenolikar S. 2009**). Ce sont, également, les phosphatases les plus abondamment étudiées. Des données récentes suggèrent l'existence de près de 650 complexes formés de la phosphatase de type 1, contre 70 pour la PP2A (**Janssens V. 2008**). PP1 semble être donc l'enzyme majeure de la déphosphorylation cellulaire. Nous consacrerons donc la suite de cet exposé à l'étude détaillée de cette phosphatase.

3.2. La protéine phosphatase de type 1

3.2.1 : Introduction

La protéine phosphatase de type 1 ou PP1, également connue sous le nom de phosphorylase phosphatase est étudiée depuis les années 1940. Elle est alors décrite pour son implication dans le métabolisme glycogénique et son rôle dans la conversion de la phosphorylase a (active) en phosphorylase b (inactive)(**Cori CF. 1945**) (Figure 11). La mise en évidence de l'action phosphatase de PP1 est contemporaine de la découverte de la phosphorylase kinase (**Keller PJ. 1955, Sutherland EW, Jr. & Wosilait WD. 1955**) et marque le début de l'étude de la phosphorylation protéique comme système de régulation cellulaire. Durant les décennies suivantes, les recherches concernant la phosphorylase de type 1 se sont concentrées autour de l'étude de sa structure et de son rôle enzymologique. A ce jour, l'ensemble de ces travaux restent d'actualité, PP1 continuant d'apporter surprises et questionnements concernant ses fonctions cellulaires (**Fardilha M. 2010**).

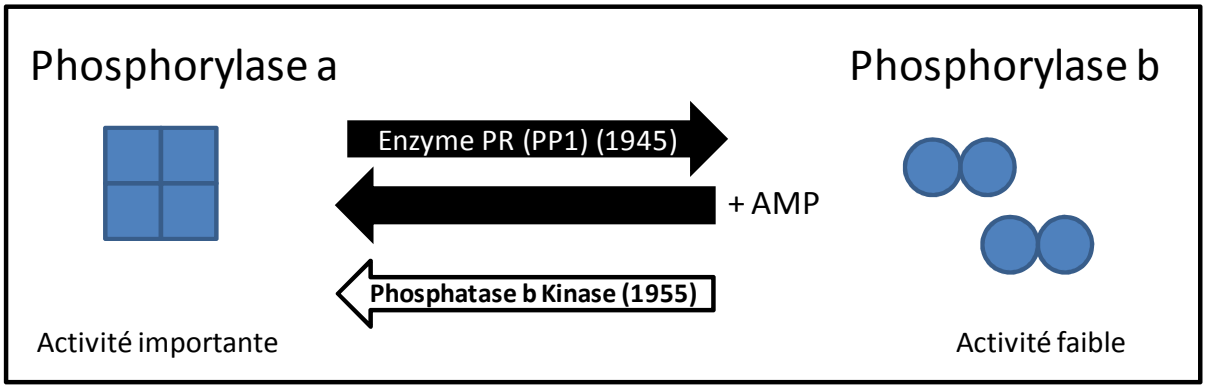


*Figure : 11. Interconversion de la phosphorylase tétramérique a (active) en phosphorylase dimérique b (inactive). Le passage de cette enzyme (impliquée dans la synthèse et la dégradation du glycogène) d'un état actif à inactif passe par l'intervention d'une enzyme appelée PR pour « Prosthetic group Removing) découverte en 1945 par Gerty et Carl Cori (**Cori CF. 1945**). A cette époque la véritable identité de PR n'est pas connue. On pense qu'elle permet l'activation de la phosphorylase a en clivant la protéine ou en permettant de déplacer le groupement AMP (dont on connait l'importance dans l'activation de la phosphorylase b). On ne comprit le rôle de phosphatase de cette enzyme que dix ans plus tard lorsque Fisher et Krebs montrèrent que la conversion de la protéine b en a nécessitait l'intervention de la phosphatase b kinase. L'enzyme PR fut alors appelée Phosphorylase phosphatase puis protéine phosphatase de type 1 (**Brautigan DL. 2012**).*

3.2.2 : Les fonctions pléiotropiques de la phosphatase de type 1, focus sur l'implication dans le cycle cellulaire:

La PP1 est une protéine ubiquitaire dont la taille varie entre 35-38 kDa. Elle régule un nombre important de mécanismes aussi divers et essentiels que la méiose, l'apoptose, la synthèse protéique, la contraction musculaire, le métabolisme des carbohydrates, la transcription ou la signalisation neuronale (**Bollen M & Stalmans W. 1992, Bollen M. 2001, Cohen PT. 2002**) pour revue, voir (**Ceulemans H & Bollen M. 2004**) (tableau 1, annexe)).

PP1 est également impliquée dans la progression du cycle cellulaire. En effet, des études portant sur *Aspergillus* ont établi l'implication de certaines mutations touchant la phosphatase dans l'arrêt du cycle cellulaire au stade métaphasique (**Doonan JH & Morris NR. 1989**). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe,* sa phosphorylation au niveau d'un motif TPPR aboutit à l'inhibition de son activité au cours de la mitose (**Yamano H. 1994**). Chez *Saccharomyces cerevisae*, la déplétion en Glc7, protéine de levure homologue de la PP1, entraîne un arrêt de l'assemblage du réseau mitotique (**Black S. 1995, Bloecher A & Tatchell K. 1999**), arrêt s'expliquant en partie par la nécessité de Glc7 de déphosphoryler la protéine kinétochorique Ndc10 (**Sassoon I. 1999**). De même, une mutation unique affectant *Glc7* entraîne une série d'anomalies mitotiques (**Hisamoto N. 1994**). Cet organisme, muté au niveau de *Ipl1* (Aurora B), présente des défauts de ségrégation chromosomique. Ces phénotypes peuvent être complémentés par la présence de mutations touchant spécifiquement *Glc7* (**Francisco L. 1994**).

Chez la drosophile, certaines mutations touchant un des isoformes de la PP1 sont létales pour les larves (délais de progression à travers la mitose, défauts d'organisation du réseau mitotique, ségrégation anormale des chromatides sœurs, hyperploïdie et condensation chromosomique excessive) (**Axton JM. 1990, Baksa K. 1993**)

La phosphatase semble donc indispensable au bon déroulement de la mitose et particulièrement impliquée dans l'entrée en anaphase.

3.2.3 : Séquence et structure de la PP1

3.2.3.1. Introduction

Cette enzyme bipartite se compose d'une sous-unité catalytique (PP1c) extrêmement conservée entre les espèces. Certains eucaryotes primitifs tels que *Giardia lamblia* possèdent un isoforme présentant une identité de séquence de 72% avec ses homologues mammifères (**Ceulemans H,Stalmans W,. 2002**). Contrairement à *Saccharomyces cerevisiae* qui ne possède qu'un gène (*Glc7*) responsable de l'expression de PP1 chez la plupart des organismes eucaryotes, plusieurs gènes codent pour les différents isoformes de PP1c (**Farkas I. 2007, Dombradi V,Axton JM,Brewis ND,. 1990**). Ainsi, les génomes mammifères présentent trois gènes codant pour 4 sous unités catalytiques distinctes : $PP1_{\alpha}$, $PP1_{\beta/\delta}$ et les variants de transcription : $PP1_{\gamma1}$ et $PP1_{\gamma2}$ (**Cohen PT. 1988**). Ces protéines sont extrêmement conservées ($PP1_{\gamma2}$ et $PP1_{\beta/\delta}$ possèdent une identité de l'ordre de 85% qui monte jusqu'à 93% entre $PP1_{\gamma1}$ et $PP1_{\gamma2}$). Seules les extrémités Nt et Ct présentent quelques variations de séquence. La répartition de $PP1_{\alpha}$ ainsi que celle de $PP1_{\beta/\delta}$ est ubiquitaire. Au contraire, $PP1_{\gamma2}$ présente une distribution exclusivement testiculaire (**Shima H. 1993, da Cruz e Silva EF. 1995, Andreassen PR. 1998**). Certaines mutations de PP1 retrouvées chez des champignons peuvent être en partie complémentées par l'expression chez ces organismes d'un isoforme mammifère (**Sangrador A. 1998, Doonan JH. 1991**). Les homologies retrouvées chez la phosphatase ne se cantonnent donc pas à une homologie de séquence mais concernent également la fonction.

3.2.3.2. Le domaine catalytique : PP1c

Contrairement aux protéines kinases, qui se lient à leurs substrats via la reconnaissance directe de séquences consensus se situant à proximité du site de phosphorylation, le domaine catalytique des sérine/thréonine phosphatases présente peu de spécificité intrinsèque. PP1c est ainsi finement régulée par son interaction avec plus de 200 protéines cibles, ces protéines permettent sa localisation cellulaire, modulent son activité et sa spécificité de substrat (**Hubbard MJ & Cohen P. 1993, Cohen P. 1989**).

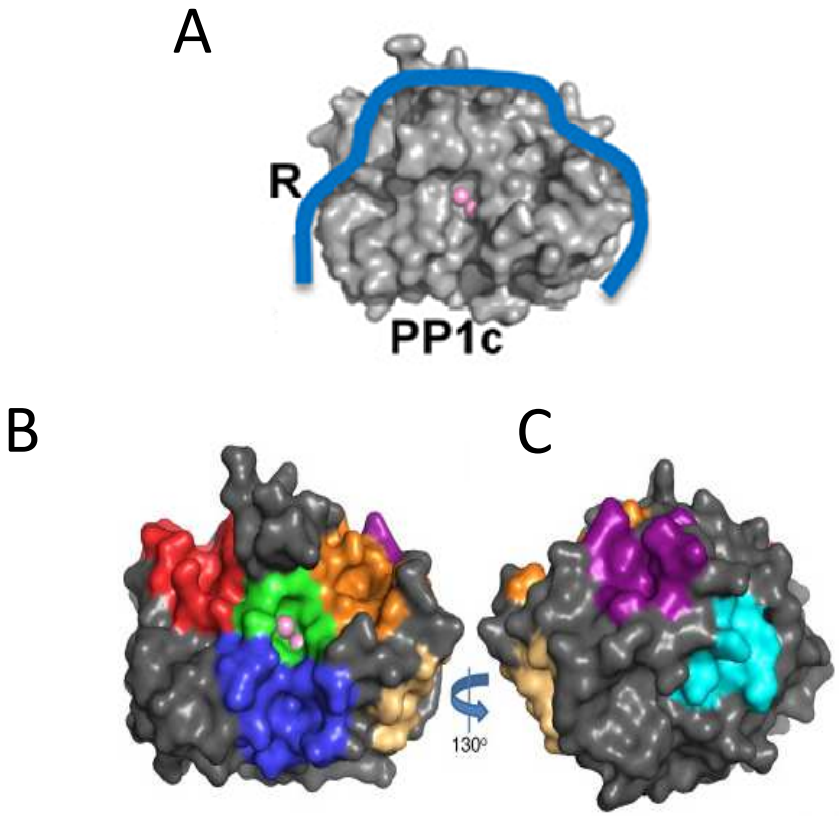


*Figure : 12 (A). PP1 est constituée d'un seul domaine catalytique (PP1c, sa surface est représentée ici en gris. PDB 3EGG). On connait plus de 200 régulateurs dont l'action biochimique a pu être confirmée (représenté en bleu, R). La fixation d'une ou plusieurs de ces molécules convertit cette phosphatase unique en plusieurs centaines d'holoenzymes dont l'action est hautement spécifique (**Peti W. 2012b**). (B) Représentation de surface de la structure de PP1 α (PDB ID 1FJM).Le site actif de PP1 (en vert) contient deux ions métalliques (sphères roses) qui se lient à l'intersection des trois sillons de fixations : hydrophobe (bleu), acide (orange), et C terminal (rouge). (C). Une rotation de la structure de 130° permet d'apercevoir les sites de fixation à la PP1 RVxF (violet), SILK (cyan) et MyPhoNE (paille) (**Bollen M. 2010**).*

Le site catalytique de PP1c (Figure 12 et 13) est formé d'un sillon peu profond contenant deux ions séparés de 3.3 Å pouvant être un Mn2+ et indifféremment un ion Fe^{2+}ou Fe^{3+} (Figure 13, B). Il se situe à l'intersection de 3 régions potentielles de fixation de protéines régulatrices. Ces régions prennent la forme d'un sillon hydrophobe (Figure 12, B et Figure 13, C), hydrophile (Figure 12, B et Figure 13, C), et, d'un sillon se situant au niveau C terminal (Figure 12, B et Figure 13, C).

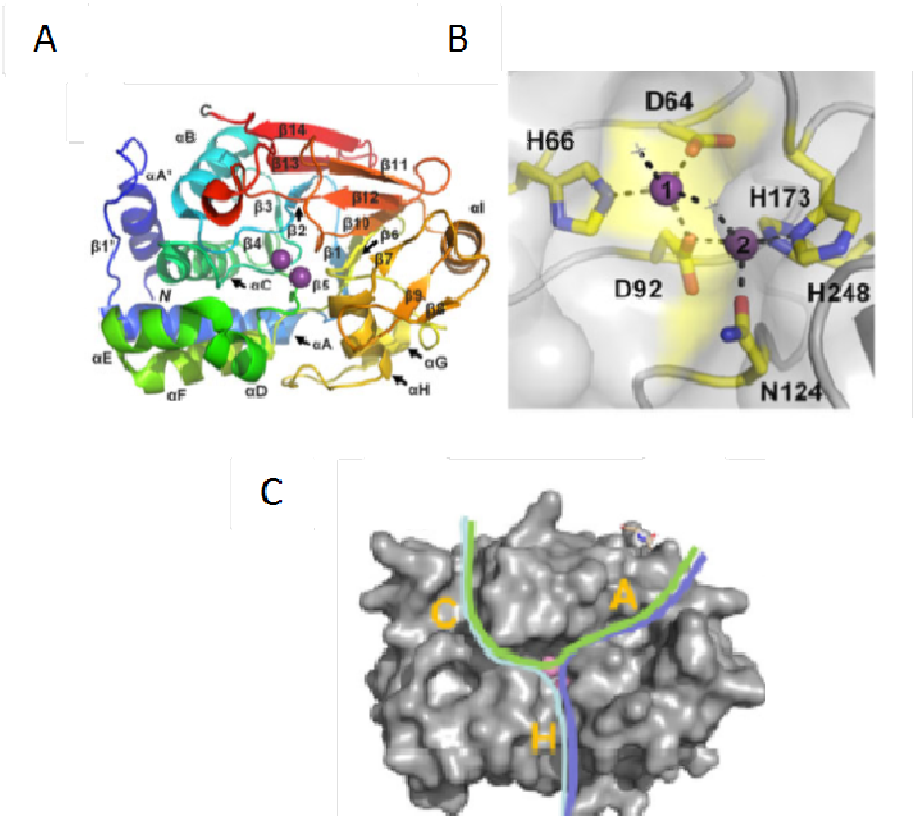


*Figure 13: Séquences, structure et régulation de PP1 (A) schéma structural de PP1α, allant du bleu (extrémité Nt) au rouge (extrémité Ct). Les sphères magenta représentent les ions métalliques. Les structures secondaires sont annotées. (B). Détails de la surface du site catalytique impliquée dans la fixation aux ions métalliques. (C). Schématisation de la surface de PP1 (structure PP1 : Gm (**Egloff MP. 1997**)). Les sphères roses représentent les ions métalliques contenus dans le site actif. Les sillons d'interaction hydrophobe (H), hydrophile (A) et Ct (C) sont marqués d'une lettre. Les différents substrats (lignes vertes, bleues et roses) se fixent à la phosphatase via pléthore de mécanismes. Ainsi, ils peuvent se lier en empruntant un ou plusieurs des sillons d'interaction (C) (**Peti W. 2012b**).*

3.2.4 : La conformation invariante de PP1

Il existe à ce jour 15 cristaux d'holoenzyme de PP1. De façon tout à fait remarquable et comme prédit par la résolution du complexe $Gm_{peptide}$:PP1, la conformation de la phosphatase est invariante et reste globalement inchangée lors de la fixation à ses régulateurs. La multitude de sites de fixation aux toxines et autres partenaires protéiques est largement préformée chez la phosphatase. Cette idée suggère que les changements subtils, que l'on peut malgré tout observer, impliquent certaines structures secondaires de la phosphatase telles que les boucles β12-β13 (impliquées dans la fixation de toxines inhibitrices) (**Connor JH. 2000**)) αA'-β2, ou β11-β12, l'hélice α1 et le feuillet β 14 (au niveau Ct du domaine catalytique)(**Peti W. 2012b**).

3.2.5 : Mécanisme d'inhibition des toxines de PP1

Comme toutes les Sérine-Thréonine Phosphatases, la Protéine Phosphatase de type 1 est sensible à un certain nombre de petites toxines inhibitrices, qui, nous le savons aujourd'hui, se fixent à un ensemble d'éléments structuraux fondamentaux de la phosphatase : le site actif et le sillon hydrophobe (Figure 14). Parmi ces toxines, la microcystine, la calyculine A, la tautomycine ou l'acide okadaique, ont été particulièrement étudiées. Historiquement, ces molécules, abondamment utilisées comme outils, ont permis l'identification de nombreux régulateurs de la phosphatase (**Campos M. 1996, Damer CK. 1998**). Le site actif des Ser/Thr phosphatases, et spécialement celui de PP1 et PP2A, présente de grandes similarités. L'action inhibitrice exercée par les toxines est donc très semblable. Seul l'acide okadaique agit sur la PP2A avec une efficacité bien supérieure à celle de la PP1. Certaines variations subtiles peuvent expliquer ce phénomène. En effet, l'une des principales différences structurales observées se situe au niveau de la boucle α7-α8, qui, chez PP2A se trouve fermée alors que chez PP1, elle est ouverte et située à 4-5 Å. Il semblerait que cette variation minime permette à la toxine de se fixer, et d'agir plus efficacement au niveau du sillon hydrophobe.

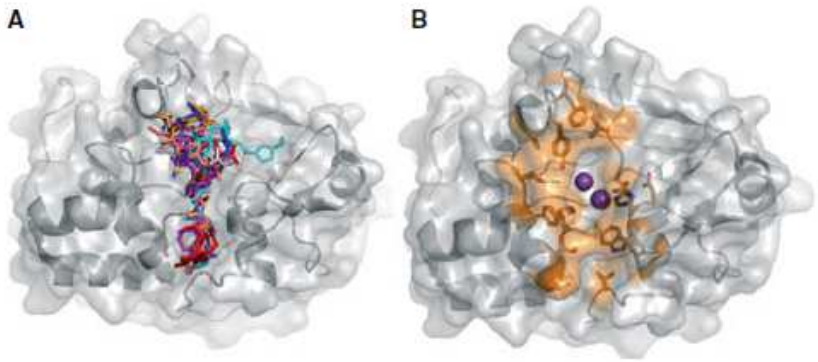


*Figure 14 : Structures de PP1/toxines inhibitrices. (A) Superposition des structures de 8 complexes PP1/toxines inhibitrices. Les toxines sont représentées en bâtons colorés. (B) Détail des résidus de PP1 impliqués dans l'interaction (bâtons orange) (**Peti W. 2012b**).*

3.2.6 : La protéine phosphatase de type 1 chez *P.falciparum*

3.2.6.1. Séquences, conservation de séquence et de fonction

La protéine phosphatase de type 1 de *P. falciparum (ou PfPP1,* numéro accession PlasmoDB : PF3D7_1414400*)* possède une similarité de l'ordre de 80% avec les séquences des homologues retrouvés chez l'homme, la levure, le lapin, le rat, ou les plantes (**Bhattacharyya MK. 2002**) (Tableau 4).

	Oc PP1	CgPP1	HsPP1	RnPP1	ScPP1	PfPP1
Oc PP1	100	88	93	93	85	86
Gg PP1		100	89	89	82	85
Hs PP1			100	100	86	87
Rn PP1				100	86	87
Sc PP1					100	83
Pf PP1						100

*Tableau 4: Comparaison et analyse des similarités de séquence retrouvées chez les différents homologues de la phosphatase de type 1 (**Bhattacharyya MK. 2002**). Oc : PP1 de lapin (Orycolagus cuniculus). Gg : PP1 de poulet (Gallus gallus). Hs : PP1 humaine (Homo sapiens). Rn : PP1 de rat (Rattus novegicus). Sc : PP1 de levure (Saccharomyces cerevisiae). Pf : PP1 de Plasmodium falciparum (**Bhattacharyya MK. 2002**).*

PfPP1, présente sous la forme d'un isoforme unique situé au niveau du chromosome 14, a été clonée puis caractérisée par deux équipes indépendantes (**Bhattacharyya MK. 2002, Kumar R. 2002**). Sa séquence, d'une longueur de 304 acides aminés possède la signature LRGNHE caractéristique des Ser/Thr phosphatases (acides aminés 119 à 124) ainsi que deux sites putatifs de phosphorylation de la protéine kinase C et cinq de la kinase caseine II (Figure 15). Les comparaisons de séquence de PfPP1 avec ses homologues de lapin, poulet, humain, rat, *Toxoplasma gondii* et levure montre une similarité parfaite au niveau du domaine catalytique (acides aminés 10 à 300) mais aussi au niveau des sites de fixation de la microcystine et de l'acide okadaique (boucle β12-β13, acides aminés 270 à 280) (**Bhattacharyya MK. 2002**). PfPP1 est la plus petite phosphatase de type 1

identifiée à ce jour. Il est intéressant de noter qu'elle ne possède pas, contrairement à ses homologues mammifères, de séquence Ct riche en proline (figure 15) (**Kumar R. 2002**).

```
TgPP1  MVSLDVDVDAVISKLLEVRGSRPGKPVQLTEAEIRGLCHKSREIFISQPILLELEAPIK  59
PfPP1   MALEIDIDNVISKLIEVRGTRPGKNVNLTENEIKILCLSSREIFLNQPILLELEAPIK  58
HsPP1 MSDSEKLNLDSIIGRLLEVQGSRPGKNVQLTENEIRGLCLKSREIFLSQPILLELEAPLK  60

TgPP1 ICGDIHGQYYDLLRLFEYGGFPPEANYLFLGDYVDRGKQSLETICLLLAYKIKYPENFFL  119
PfPP1 ICGDIHGQFYDLLRLFEYGGFPPDANYLFLGDYVDRGKQSLETICLLLAYKIKYPENFFL  118
HsPP1 ICGDIHGQYYDLLRLFEYGGFPPESNYLFLGDYVDRGKQSLETICLLLAYKIKYPENFFL  120

TgPP1 LRGNHECASINRIYGFYDECKRRYNIKLWKTFTDCFNCLPVAAIIDEKIFCMHGGLSPEL  179
PfPP1 LRGNHECASINRIYGFYDECKRRYSVKLWKTFIDCFNCLPVAAIIDEKIFCMHGGLSPEL  178
HsPP1 LRGNHECASINRIYGFYDECKRRYNIKLWKTFTDCFNCLPIAAIVDEKIFCCHGGLSPDL  180

TgPP1 NSMDQIRRIVRPTDVPDTGLLCDLLWSDPEKEISGWGENDRGVSFTFGQDVVHNFLRKHD  239
PfPP1 NNMEQIRKITRPTDVPDNGLLCDLLWSDPEKEINGWGENDRGVSFTFGQDVVHNFLRKHE  238
HsPP1 QSMEQIRRIMRPTDVPDQGLLCDLLWSDPDKDVQGWGENDRGVSFTFGAEVVAKFLHKHD  240

TgPP1 LDLICRAHQVVEDGYEFFAKRQLVTLFSAPNYCGEFDNAGAMMSVDETLMCSFQILKPVE  299
PfPP1 LDLICRAHQVVEDGYEFFAKRQLVTLFSAPNYCGEFDNAGAMMSVDETLMCSFQILKPVE  298
HsPP1 LDLICRAHQVVEDGYEFFAKRQLVTLFSAPNYCGEFDNAGAMMSVDETLMCSFQILKPAD  300

                                β12        boucle      β13
TgPP1 KKKGMAK                                                      306
PfPP1 KKKAAN                                                       304
HsPP1 KNKGKYGQFSGLNPGGRPITPPRNSAKAKK                               330
```

*Figure 15 : Alignement de la séquence de PfPP1 (numéro accession AAM54063) avec celles de ses homologues chez l'homme (numéro accession P62136) et Toxoplasma gondii (numéro accession 583.m05380). Le domaine caractéristique des S/T phosphatases LRGNHE est encadré en gris. Est également indiquée la boucle β12-β13 impliquée dans la fixation aux toxines inhibitrices chez les mammifères (Connor JH, 2000) (cadre bleu). (**Kumar R. 2002, Daher W,Pierce R,. 2007**).*

Chez *Saccharomyces cerevisae,* la protéine est capable de complémenter fonctionnellement des mutants interrompus pour le gène *glc7* (codant pour la PP1). La conservation entre les espèces de PP1 n'est donc pas restreinte à la séquence, elle concerne également la fonction. Enfin, PfPP1 est sensible, tous comme ses homologues, aux inhibiteurs 1 et 2 humains spécifiques de la phosphatase (**Kumar R. 2002**).

3.2.6.2. Fonction

Des analyses utilisant des inhibiteurs de phosphatases ont permis de montrer que cette enzyme était responsable de la majorité de l'activité phosphatase retrouvée chez les parasites apicomplexes (**Yokoyama D. 1998, Bhattacharyya MK. 2002, Cayla X. 2000**).

Des études d'interruption phénotypique de la phosphatase de type 1 chez *P.falciparum* par siRNA ont montré une diminution de la croissance parasitaire concomitante à l'abolition de

l'expression de la protéine. La phosphatase semble donc impliquée dans la progression du cycle cellulaire (**Kumar R. 2002**). Cependant, comme aucun des composants de la machinerie de SiRNA (DICER…) n'a pu être retrouvé dans le génome du parasite, ces résultats doivent être pris avec précaution, les effets observés pourraient être non-spécifiques.

Bien que PfPP1 ne soit pas impliquée dans la maturation des schizontes, elle semble l'être lors de la ré-invasion des stades érythrocytaires. Une étude menée par Blisnick et collaborateurs a permis de montrer l'implication de la phosphatase dans le fonctionnement de la Skeletal Binding Protein 1 (ou PfSBP1), une protéine transmembranaire se situant au niveau des fissures de Maurer et impliquée dans la stabilisation de la membrane des globules rouges. Il semblerait, que cette protéine, premier substrat potentiel de PfPP1, soit sensible à la déphosphorylation de PP1 qui entraine sa dissociation de son partenaire LANCL1 et provoque la rupture de érythrocytes et la libération des mérozoïtes (**Blisnick T. 2006**).

3.3. Les régulateurs de la protéine phosphatase de type 1

C'est au cours des années 70 que furent découvertes les premières protéines régulatrices de la phosphatase de type 1 (**Brandt H. 1974**). Des expériences de traitement à l'éthanol ou à la trypsine d'extraits tissulaires permirent d'observer une augmentation de l'activité de PP1, concomitante avec une réduction de la taille apparente de la sous-unité catalytique. Ces études établirent l'existence de protéines inhibitrices dont l'activité pouvait être détruite par les manipulations présentées plus haut (**Brandt H. 1975**). La mise en évidence de ces éléments formant, avec la phosphatase, une famille importante d'holoenzymes représenta une avancée majeure dans l'étude fonctionnelle et enzymologique de PP1. Nous savons aujourd'hui, grâce à un ensemble de données génétiques et biochimiques, que l'activité de ces sous unités régulatrices est au moins aussi importantes que celle de la phosphatase et tiennent une part importante dans le contrôle de la viabilité et de la survie cellulaire (**Hendrickx A. 2009**). Chez les vertébrés, près de 200 protéines interagissant avec PP1 ont pu être identifiées (Tableau 1, en annexe). Ces protéines se liant à la phosphatase peuvent être des substrats de PP1, être impliquées dans la localisation sub-cellulaire de la protéine ou encore, appartenir à la famille des inhibiteurs et permettre la régulation de son activité. On estime aujourd'hui, après la réalisation d'un certain nombre d'analyses informatiques, que des centaines de nouveaux partenaires restent à identifier (**Bollen M. 2010, Hendrickx A. 2009**).

D'un point de vu évolutif, on peut distinguer deux types de sous-unité : les protéines qui ont toujours été régulateurs de PP1 et celles qui ont acquis les propriétés de fixations plus tard au cours de leurs évolution (**Ceulemans H,Stalmans W,. 2002**).

La seconde partie de ce chapitre s'intéressera à l'étude détaillée de certains de ces régulateurs. La première partie présentera d'une manière plus générale les mécanismes d'interactions régissant la formation des différentes holoenzymes de PP1.

3.3.1 : Caractéristiques générales des sous unités régulatrices de la Protéine Phosphatase de type 1

3.3.1.1 Les motifs d'interaction avec la protéine phosphatase de type 1

a. le motif « RVxF »

En 1997, l'équipe de Barford décrivit pour la 1ère fois la structure de la PP1 liée à un peptide nommé « RVxF » issue de la protéine Gm (sous-unité permettant la localisation de la phosphatase au niveau des particules glycogéniques) (**Egloff MP. 1995**). On montra ensuite que plus de 90% des régulateurs de PP1 contenaient une séquence identifiable de type « RVxF » (**Bollen M. 2010**). Cette observation apporta une première explication quant aux mécanismes de fixation des multiples sous-unités régulatrices de la phosphatase.

Le motif «RVxF » se conforme le plus souvent à la séquence consensus [K/R] [K/R] [V/I] [x] [F/W] où x correspond à n'importe quel résidu exception faite de la phenylalanine, de l'isoleucine, de la methionine, de la tyrosine, de l'asparagine ou de la proline (**Hendrickx A. 2009, Wakula P. 2003, Meiselbach H. 2006**). L'analyse de la structure $Gm_{peptide}$:PP1 montre qu'au niveau de la phosphatase, le site de fixation se trouve à 20 Å du site actif, et se compose de 2 poches hydrophobes profondes formées de résidus invariants ou très conservés au sein desquelles se logent les acides aminés composant le motif « RVxF » (plus particulièrement la valine et la phénylalanine) (Figure 16). Une région négativement chargée permet d'accueillir les résidus basiques que l'on retrouve très souvent en amont du motif. De façon assez inattendue, l'interaction Gm RVxF/PP1 ne semble pas influencer outre mesure la structure de la phosphatase. Les rares changements sont retrouvés au niveau de certaines boucles et structures secondaires de la portion Ct du domaine catalytique. Il semble néanmoins indispensable de replacer cette observation dans son contexte, il ne s'agit ici que d'un modèle dont l'un des partenaires est un peptide dont l'encombrement stérique ne saurait remplacer celui d'une protéine entière. Des modifications plus conséquentes pourraient être observées lors de la fixation d'une protéine entière. Néanmoins, le motif « RVxF » apparait ici comme un site d'ancrage n'altérant pas la spécificité de la protéine. Cette observation pourrait s'expliquer par sa localisation relativement éloignée du site catalytique. En dépit du rôle essentiel que revêt ce motif dans l'interaction de PP1c à la plupart de ses régulateurs, des zones de fixation additionnelles existent et permettent non seulement de stabiliser les complexes, mais également de moduler l'activité et/ou la spécificité de la phosphatase.

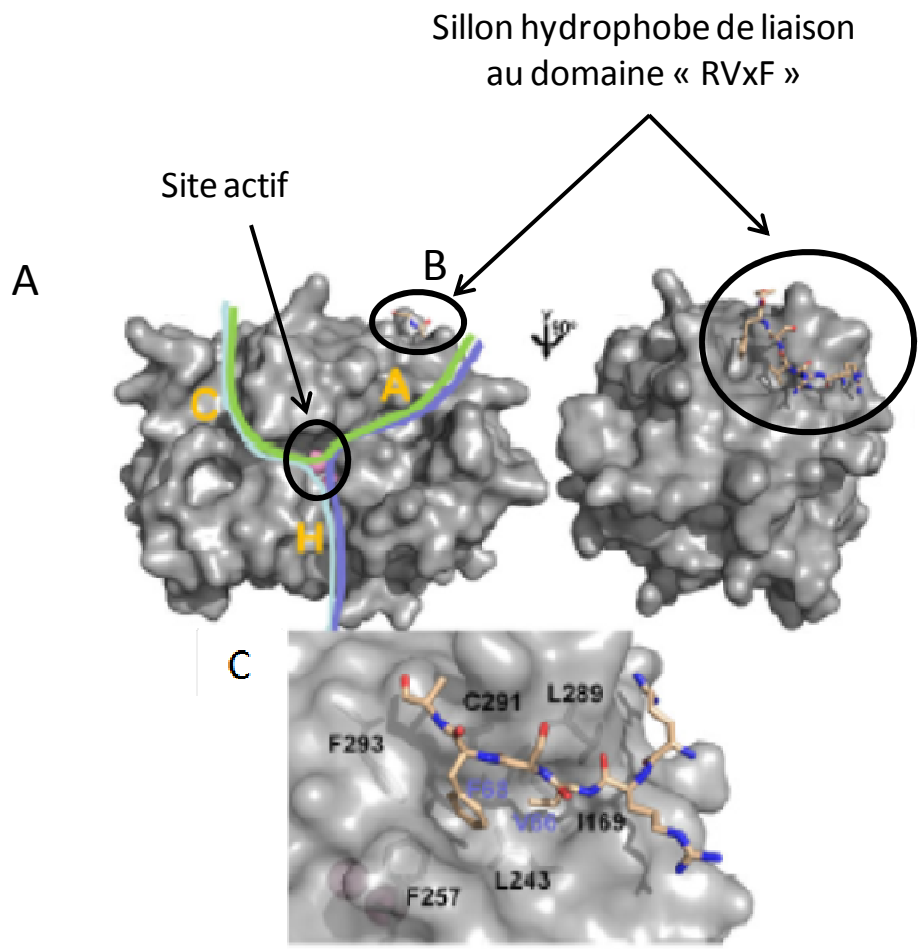


Figure 16 :
*(A) Schématisation de la surface de PP1 (structure PP1 : Gm (**Egloff MP. 1997**)). Les sphères roses au centre représentent les ions métalliques contenus dans le site actif. Le peptide RVxF de Gm est présenté en bâtonnets (beige). Les sillons d'interaction hydrophobe (H), hydrophile (A) et Ct (C) sont marqués d'une lettre (B). Rotation de PP1 de 90° permettant de visualiser le site de fixation du peptide RVxF (C). Vue détaillée du site de fixation du peptide « RVxF », et de la poche hydrophobe où les résidus « V » et « F » de « RVx F » viennent se fixer (V66 et F68 pour le peptide de Gm, en bleu clair) (D'après(**Peti W. 2012b**)).*

b. Autres motifs d'interaction

La surface de la sous-unité catalytique PP1c est creusée de plusieurs sillons qui permettent la formation des motifs d'interaction. La plupart de ces domaines de fixation ont une taille variant de 4 à 8 résidus pour une longueur moyenne de 400 Å (**Bollen M. 2010**). Il a été estimé que si toute la surface de la phosphatase était disponible et impliquée dans l'interaction aux régulateurs, il n'y aurait assez de place que pour une trentaine de sites non chevauchants. Certains régulateurs partagent donc des motifs d'interaction communs. La spécificité de fixation s'effectue par l'utilisation combinatoire de ces domaines, combinaison variant en fonction des protéines régulatrices impliquées (Figure 17 et tableau 5).

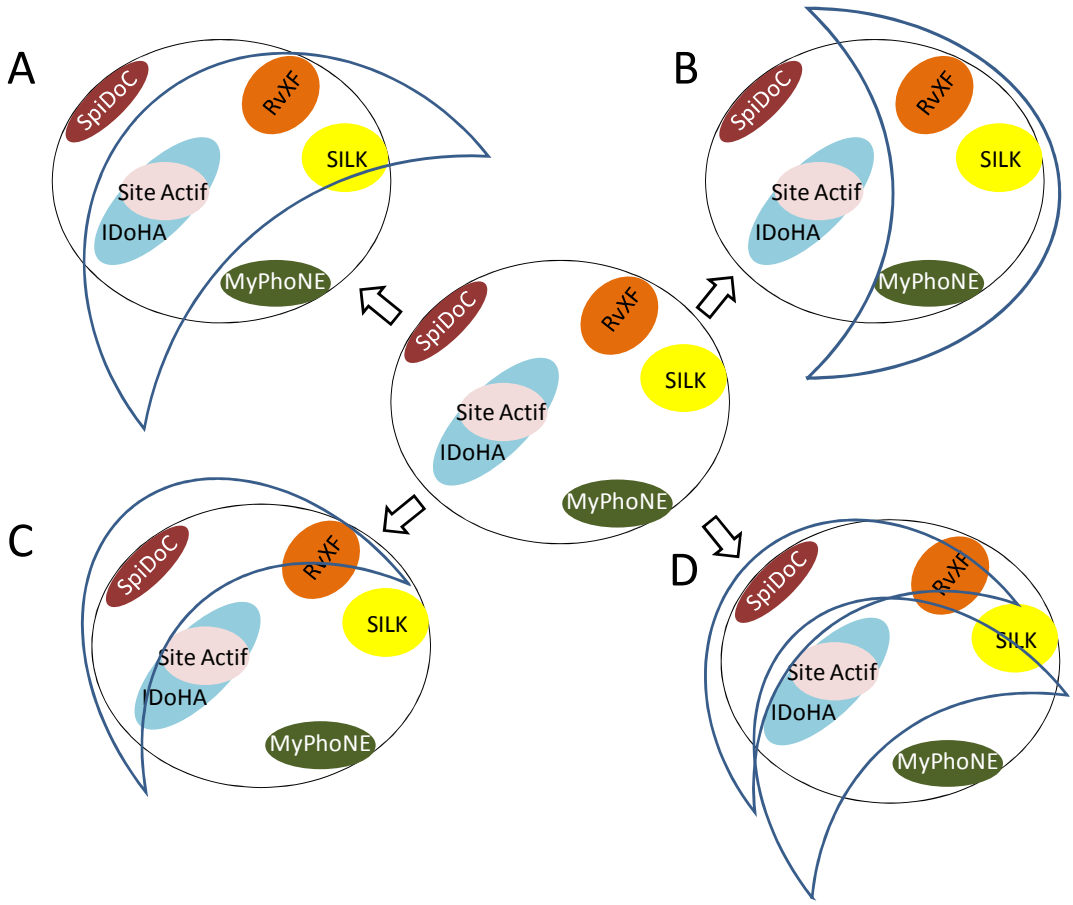


Figure 17 :
*PP1 possède à sa surface plusieurs sillons permettant la fixation des motifs de liaison que l'on retrouve sur les protéines régulatrices. Ici sont représentés les sillons permettant la fixation des motifs RvXF, SILK, MyPhoNE, SpiDoC, et IDoHA ainsi que l'utilisation combinatoire des régions de PP1 impliquées dans les interactions. Ces illustrations sont basées sur les structures connues de PP1-inhibiteur2 (A, (**Hurley TD. 2007**)); PP1-Mypt1 (B(**Terrak M. 2004**)), PP1-spinophiline (C (**Ragusa MJ. 2010**)) et enfin PP1-inhibiteur2 spinophiline (D (**Dancheck B. 2011**).*

Nom du motif	Exemple de sous-unités de PP1 sur lesquelles on retrouve le motif	Fonction du motif
RVxF	Sous-unité G, Inhibiteurs 1,2 et 3…	Fixation à PP1
SILK	Inhibiteur 2	Fixation à PP1
MyPhoNE	Mypt 1	Sélection du substrat
SpiDoC	Spinophiline	Sélection du substrat
IDoHA	Inhibiteur 2	Inhibition
RNYF	iASPP	?
BiSTriP	SDS22	?
Pseudosubstrate	Inhibiteur 1	Inhibition
AnkCap	Mypt1	Sélection du substrat

*Tableau : 5. Tableau reprenant différents motifs de fixation à la PP1, le nom des régulateurs qui les portent ainsi que la fonction que l'on leur attribut (**Heroes E. 2012**).*

Les motifs d'interaction, souvent petits, résident dans des régions désordonnées sujettes à de nombreuses mutations. Cette conformation peut représenter un avantage évolutif en cas de mutation fonctionnelle favorable (**Heroes E. 2012**).

Des données récentes rapportent que les protéines régulées par un grand nombre de partenaires présentent un taux d'évolution faible. Cela pourrait expliquer l'extrême conservation structurale et fonctionnelle que l'on retrouve chez tous les homologues de PP1 (**Manna B. 2009**).

3.3.1.2 Propriétés générales du « code de fixation » à la PP1

La liaison de PP1 à l'ensemble de ses régulateurs répond à un certain nombre de principes généraux que l'on peut regrouper sous le terme de « code de fixation à la PP1 ». La fixation à la phosphatase est spécifique, aucun des motifs d'interaction n'est connu pour se fixer à d'autres membres de la famille de PPP. Le code est universel et extrêmement conservé d'un point de vue évolutif. Il est dégénéré, comme l'illustre le motif « RvXF », qui se conforme à une séquence consensus [K/R] [V/I] [x] [F/W] (*cf* chapitre 3.2.3.1). Les variants « RvXF » présentent des affinités de liaison différentes pouvant expliquer pourquoi ce motif est parfois, mais pas toujours, indispensable à l'interaction de certains régulateurs (**Wakula P. 2003, Gibbons JA. 2005**). L'interaction à la PP1 n'est pas exclusive, comme le montre l'existence de complexes trimériques. Enfin, l'interactome de PP1 est dynamique, les régulateurs pouvant entrer en compétition les uns avec les autres. La mise en place des différentes holoenzymes dépend alors de la concentration locale des sous unités ainsi que de leurs affinités respectives (**Heroes E. 2012**).

3.3.1.3 Similarités structurales entre les différentes sous-unités régulatrices.

La plupart des sous unités régulatrices de PP1 possèdent un domaine de fixation à la phosphatase désordonné lorsque la protéine est seule, et, au moins partiellement, ordonnée lorsqu'elle se trouve complexée (**Bollen M. 2010, Peti W. 2012b**). L'absence de structure stable peut s'expliquer par le manque de résidus hydrophobes requis dans la formation des domaines globulaires. Cette caractéristique permet à ces protéines de rejoindre des sites de fixation éloignés les uns des autres. Certaines de ces protéines adoptent cependant une structure secondaire et parfois tertiaire transitoire représentant à un temps donné 20 à 80% de la population moléculaire (**Marsh JA. 2010, Peti W. 2012a**). La fixation préférentielle de ces éléments préformés (sélection conformationnelle) est la première étape de la mise en place des complexes et est suivie par une augmentation de la structuration du domaine de liaison de la sous-unité engagée.

Des analyses bio-informatique (utilisant le logiciel « Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)) ont permis de montrer que les 189 régulateurs validés chez les mammifères sont enrichis en certains domaines ou motifs particuliers (Figure 18). En comparaison à d'autres protéines, les sous-unités de PP1 possèdent plus de « carbohydrate binding module » ou CBM21 (6 régulateurs), de répétition d'ankyrine (13 régulateurs), de domaine de fixation aux nucléotides (11 régulateurs), de régions riche en poly-lysine (11 régulateurs), de domaine riche en poly-proline (29 régulateurs), en glutamine (13 régulateurs) ou en domaine SH3 (6 régulateurs) (Figure 18).

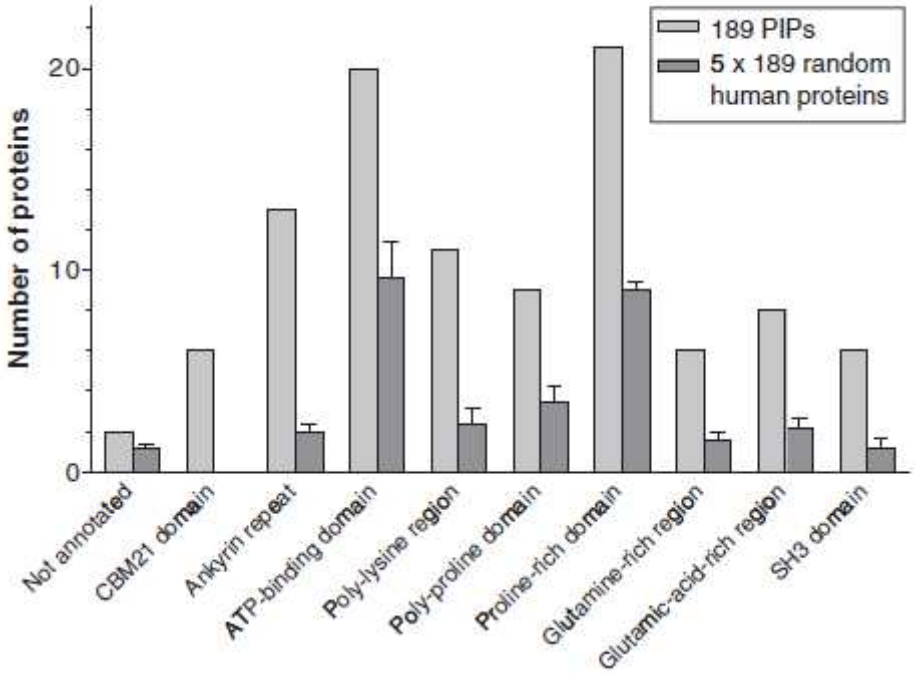


*Figure 18 : Les sous unités régulatrices de PP1 sont enrichies en certains domaines. Sont représentés les domaines retrouvés en plus grand nombre chez les vertébrés (P<0.05). Analyse utilisant le logiciel DAVID, version 6.7 (**Huang da W,Sherman BT,Zheng X,. 2009, Huang da W,Sherman BT & Lempicki RA. 2009**). En comparaison, la même étude a été réalisée sur 5 jeux de 189 protéines humaines choisies arbitrairement (**Heroes E. 2012**).*

Le domaine CBM21 permet le ciblage des sous-unités G vers le glycogène. D'autres motifs, tels que les répétitions d'ankyrine (**Terrak M. 2004**) ou les sites SH3 (**Llanos S. 2011**) peuvent être impliqués dans la fixation à la phosphatase. PP1 possède près de son site catalytique, deux sillons, un acide et un hydrophile (**Goldberg J. 1995**), qui représentent potentiellement des sites adéquats de liaison pour les domaines riches en proline et en poly-lysine. Sur les 20 protéines régulatrices possédant un site de fixation à l'ATP, 12 sont des kinases et certaines sont connues pour être des substrats de la phosphatase (**Heroes E. 2012**). Il est très intéressant de noter, qu'à l'exception des domaines riches en proline, aucun des sites présentés plus haut n'est retrouvé sur une sous unité régulatrice d'un autre membre des Ser/Thr phosphatases (**Heroes E. 2012**).

3.3.2 : Classification et détail des fonctions d'un panel de sous-unités régulatrices

3.3.2.1 Les sous-unités substrats

Plus d'une douzaine de sous unités de PP1 ont été identifiées chez les vertébrés comme étant des substrats de la protéine. A peu près la moitié d'entre elles sont des enzymes activées par déphosphorylation. On retrouve ce mode de régulation chez BRCA1, l'ubiquitine ligase E3, la phosphatase CDC25 ou la caspase 2 (**Margolis SS. 2006, Sankaran S. 2007a, Nutt LK. 2009, Bianchi M. 2005**). Au contraire, la phosphatase permet le maintien des kinases NEK-2 et Aurora-A à l'état inactif (**Mi J. 2007**). La déphosphorylation par PP1 permet le maintien du facteur de transcription Ikaros (**Popescu M. 2009**) et régule la fixation d'un grand nombre de ligands sur divers régulateurs (**Devogelaere B. 2007, Luo W. 2007, Traweger A. 2008b, Vietri M. 2006**).

Certaines sous unités substrats de PP1 sont également des régulateurs de la phosphatase, c'est le cas de la protéine kinase NEK-2, ou TIMAP (une protéine de fixation à la membrane) qui permettent le ciblage de protéines au complexe PP1 (**Zeke A. 2009, Li L. 2007**), de l'inhibiteur 2 et de CPI-17 ((pour protein kinase-C potentiated inhibitor) (**Eto M. 2009, Hurley TD. 2007**). La fonction de ces protéines sera présentée de façon plus détaillée dans le chapitre 3.3.3.

Il est possible d'imaginer que l'association stable existant entre la phosphatase et un certain nombre de ces régulateurs substrats ait facilité la mise en place, au cours de l'évolution, de telles relations réciproques. Il est cependant impossible d'exclure le fait que certaines de ces sous unités aient été originalement des régulateurs devenus substrats au cours du temps (**Heroes E. 2012**).

3.3.2.2 Les sous-unités régulatrices impliquées dans la localisation subcellulaire

L'interaction de PP1c avec un certain nombre de sous-unités permet de moduler la localisation subcellulaire de la phosphatase et par la même de moduler sa spécificité de substrat en l'adressant à certains complexes macromoléculaires prédéterminés. Ces régulateurs adressent la protéine vers des structures aussi diverses que la membrane plasmique (*via* l'interaction avec l'intégrine αIIB), le réticulum endoplasmique (*via* la protéine induite par le stress GADD34), la chromatine (*via* Repo-man), le nucléole (*via* NOM1) ou la mitochondrie (*via* URI).

Il existe une grande variété de protéines permettant l'adressage de la phosphatase au glycogène. Parmi elles, nous retrouvons les sous unités G_L, R5/PTG et R6 (**Doherty MJ. 1996,**

Armstrong CG. 1997, Armstrong CG. 1998, Wu J. 1996, Wu J. 1998). L'implication de G_M dans le métabolisme du glycogène a pu être démontrée lors d'expériences utilisant des souris mutantes, présentant une interruption du gène de la sous-unité. Ces animaux possèdent un taux de glycogène particulièrement élevé au niveau du muscle squelettique (**Suzuki Y. 2001**). En permettant la fixation de PP1c au niveau du glycogène, Gm augmente l'activité de PP1c vis-à-vis de trois de ses substrats : la glycogène phosphorylase, la glycogène synthétase et la phosphorylase kinase (**Cohen P. 1989**). G_M se retrouve également associée au réticulum sarcoplasmique des cellules du muscle strié *via* un domaine C terminal hydrophobe (**Hubbard MJ. 1990, Tang PM. 1991, Berrebi-Bertrand I. 1998**).

D'autres sous-unités telles que MYPT1 (également appelée M110, MBS ou M130), GADD34, la spinophiline, ou encore PNUTS possèdent plusieurs sites de liaison et jouent un rôle carrefour dans différents phénomènes métaboliques.

MYPT1 cible la protéine du rétinoblastome, la polo-like kinase-1 de même qu'un certain nombre de protéines se liant à l'actine telles que la myosine, merlin et moesine (**Jin H. 2006, Kiss A. 2008, Yamashiro S. 2008**). Elle permet, localement, de cibler et d'augmenter l'activité de la phosphatase au niveau des chaines légères de myosine tandis qu'elle la supprime au niveau de la glycogène phosphorylase (**Alessi D. 1992**).

La sous-unité GADD34 permet la déphosphorylation *via* PP1 du facteur d'initiation de la traduction eIF2α, entrainant un arrêt du processus. Elle possède également une action au niveau des protéines régulées par la GTP TSC1 et TSC2, du récepteur 1 TGFβ mais aussi de la kinase I-κB (IKK) (**Harding HP. 1999, Li HY. 2008, Shi W. 2004, Watanabe R. 2007**).

La spinophiline possède, en plus de ces domaines de fixation à l'actine, trois domaines d'adressage. Le premier, permet la fixation de récepteurs couplés à la protéine G, le second, un domaine PDZ, permet le recrutement de protéines solubles (telle la kinase ribosomique p70S6K) ou de protéines intégrées à la membrane (comme les récepteurs à la ryanodine ou au glutamate). Enfin, le dernier, un domaine Ct en boucle permet la liaison à la doublecortine (**Bielas SL. 2007, Kelker MS. 2007, Sarrouilhe D. 2006, Wang X. 2007**).

Pour terminer, la protéine PNUTS favorise le ciblage de la PP1 au niveau du récepteur acide γ-aminobutyric, du facteur de transcription LCP1 et de la protéine télomèrique TRF2 (**Kim H. 2009, Lee SJ. 2009, Rose M. 2008**).

Plusieurs A-kinase-anchoring proteins (AKAPs) permettent de garder les protéines kinase A (PKA) et PP1c à proximité l'une de l'autre. Elles possèdent également un rôle de localisation sub-cellulaire (**Schillace RV & Scott JD. 1999**).

La protéine Yotiao, localisée au niveau post-synaptique des jonctions neuromusculaires du muscle squelettique, se fixe à la fois à la PKA et à PP1c. Elle interagit avec le récepteur NMDA et permet l'augmentation de l'activité phosphatase vis-à-vis de ce récepteur (**Westphal RS. 1999, Feliciello A. 1999**). AKAP350 (ou AKAP450/CG-NAP) permet l'assemblage d'un certain nombre de Kinases et phosphatases, dont PP1c, au niveau du centrosome tout au long du cycle cellulaire et au niveau de l'appareil de golgi lors de l'interphase (**Takahashi M. 1999**).

La protéine kinase Nek2, dont on a précédemment montré l'implication dans la régulation de la séparation des centrosomes (**Fry AM. 1998**), interagit directement avec la phosphatase et permet sa localisation au centrosome (**Helps NR. 2000**). Il est alors possible qu'elle garde Nek2 et son substrat C-Nap1 déphosphorylés avant la mitose. Le complexe kinase/phosphatase joue alors un rôle de commutateur moléculaire permettant l'initiation rapide de la séparation.

NIPP1 qui fut initialement identifié comme un inhibiteur de PP1c (voir le chapitre 3.3.3) possède un site d'adressage unique mais multifonctionnel (**Nuytten M. 2008, Tanuma N. 2008**) et présente la capacité de se fixer à l'ARN (**Jagiello I. 1997, Van Eynde A. 1995**). Il possède un domaine FHA en épingle à cheveux qui lui permet d'interagir à un certain nombre de facteurs de transcription et d'adresser PP1c au complexe d'épissage (**Trinkle-Mulcahy L. 1999, Boudrez A. 2000, Jagiello I. 2000**).

3.3.2.3 Les régulateurs appartenant à la famille des inhibiteurs

a. Introduction générale:

Ces petites protéines, dont la taille varie entre 15 et 30 KDa, sont connues depuis plus de 30 ans (**Huang FL & Glinsmann WH. 1975**). Elles furent décrites dans le cadre de recherches portant sur la régulation de la phosphatase phosphorylase (voir 3.2.1 et 3.3). Elles partagent de nombreuses propriétés communes aux protéines non structurées (**Iakoucheva LM. 2002**) et sont, le plus souvent, hydrophobes et thermostables. Ces caractéristiques les rendent flexibles et leurs permettent de s'adapter facilement à la structure de leurs cibles. Les protéines inhibitrices de PP1 possèdent plusieurs sites de phosphorylation (Tableau 6) (**Eto M. 2003, Eto M & Brautigan DL. 2012**) qui sont, le plus souvent, indispensables à la mise en place de leur activité et parfois, associés à un changement de conformation de la protéine (**Ohki S. 2001**). Contrairement aux toxines inhibitrices qui possèdent un large champ d'action, ces inhibiteurs restent spécifiques de la phosphatase de type 1. Certains d'entre eux se fixent à la phosphatase alors que celle-ci se trouve déjà sous la forme d'une holoenzyme (**Eto M. 2004**). D'autres, multifonctionnels se fixent aux protéines kinases et permettent soit d'activer, soit d'inhiber leur action (**Bibb JA. 1999, Satinover DL. 2004b**).

L'inhibiteur 1 (ou I1) est une petite molécule thermostable de 165 AA dont la masse moléculaire est estimée à 23KDa. Même s'il fut identifié pour la première fois dans des extraits provenant de muscles striés squelettiques de lapin, on le retrouve exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus mammifères. I1 et son isoforme neuronal DARPP-32 (pour dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 KDa) sont de puissants inhibiteurs de PP1c. Leur activité nécessite la phosphorylation préalable d'un résidu thréonine par la cAMP dependant kinase (PKA) (**Cohen P. 1989**) qui, en se fixant directement au niveau du site actif agit à la façon d'un pseudosubstrat (**Desdouits F,Cheetham JJ,. 1995**). L'interaction de l'inhibiteur 1 à la protéine phosphatase de type 1 est facilitée par la présence sur le régulateur du domaine de fixation RVxF en position N terminale (**Egloff MP. 1997, Kwon YG. 1997, Huang HB. 1999**). Historiquement, cette protéine fut utilisée, en association avec l'inhibiteur 2 pour discriminer les Sérine/Thréonine phosphatases en deux types : le type 1, sensible aux régulateurs, du type 2, insensible (**Ingebritsen TS. 1983**). Les études qui suivirent permirent de montrer l'implication de l'inhibiteur 1 dans la régulation de la phosphorylation de CREB (cAMP-response element binding factor), de la kinase II calmoduline dépendante, ainsi que de la sous unité GluR1 du récepteur AMPA (**Alberts AS. 1994, Genoux D. 2002**). Ce régulateur est également impliqué dans un ensemble de processus aussi divers et fondamentaux que le métabolisme du glycogène, la plasticité neuronale (**Brown GP. 2000, Connor JH. 2001, Nakielny S. 1991, Foulkes JG.**

1983) ou la modulation des capacités cardiaques *via* sa fonction régulatrice de PP1 (**Carr AN. 2002, El-Armouche A. 2003, El-Armouche A. 2008, Nicolaou P. 2009**).

La protéine DARPP-32 joue, quant à elle, un rôle essentiel dans la neurotransmission et plus particulièrement au niveau des voies de signalisation de la dopamine (**Greengard P. 1999**). La phosphorylation joue un rôle fondamental dans la fonctionnalité de cette protéine. L'activation de PKA et PKC stimule sa phosphorylation au niveau du résidu thréonine 34, convertissant le régulateur en un inhibiteur de PP1 (**Hemmings HC, Jr. 1984**). L'état de phosphorylation de ce résidu dépend de celui des sérines 102 et 137, phophorylées respectivement par les CK2 et CK1 (**Girault JA. 1989, Desdouits F,Siciliano JC,. 1995**). Le régulateur DARPP-32 est également phosphorylé par la CDK5 au niveau de la thréonine 75 (**Bibb JA. 1999**) convertissant, cette fois ci, la protéine en un inhibiteur de la PKA. Ce régulateur possède donc la caractéristique surprenante d'être à la fois un inhibiteur de la PP1 et de la PKA. Cette propriété lui permet de prendre part à la régulation de réponses électrophysiologiques, transcriptionnelles et comportementales à des stimuli pharmacologiques incluant les antidépresseurs, les neuroleptiques et les abus de drogues (**Svenningsson P. 2004, Svenningsson P. 2005**).

De nouveaux inhibiteurs tels que NIPP-1, l'inhibiteur 4, CPI-17, PHI-1 et KEPI furent identifiés au cours des 15 dernières années dans des cellules de mammifères (Tableau 6 et Tableau 1 en annexes).

NIPP-1 correspond à un sous- domaine nucléaire d'une protéine plus large composée de plusieurs domaines, connu pour son implication dans le traitement de l'ARN (**Beullens M. 1992, Bollen M. 2001, Tanuma N. 2008**). Il est également phosphorylé par la PKA ou la kinase caseine II (CK-II), ce qui a pour effet d'activer la phosphatase de type 1 (**Bollen M. 2001**).

L'inhibiteur 4 fut identifié après analyse des banques de données comme un analogue de l'inhibiteur 2 (44% d'identité). Il présente par ailleurs une structure fonctionnelle et des propriétés biochimiques similaires et semble être un inhibiteur de la phosphatase de type 1 (**Shirato H. 2000**).

En 1995, une protéine appelée CPI-17 (pour PKC-potentiated inhibitor of 17 KDa), retrouvée essentiellement au niveau des muscles lisses fut identifiée comme étant un inhibiteur de la myosine phosphatase (**Eto M. 1995**). CPI-17 se rapproche de l'inhibiteur 1 et de la DARPP 32. Tout comme eux, sa phosphorylation au niveau de la thréonine 38 permet d'augmenter drastiquement sa capacité d'inhibition de la PP1. Cependant, au contraire des autres inhibiteurs, cette protéine est

préférentiellement phosphorylée par la PKC et non la PKA. Elle inhibe avec la même efficacité (IC 50~ 1nM) la PP1c sous forme monomérique ou sous la forme de l'holoenzyme MLCP (PP1 associée à la MYPT1) (pour Myosine phosphatase Target subunit 1)) (**Senba S. 1999, Eto M. 2004**). De nombreuses kinases et phosphatases sont impliquées dans la régulation de CPI-17. Au niveau des muscles lisses, la phosphorylation du régulateur est soumise aux stimulations antagonistes des PKC, ROCK et ILK (**Huang J. 2006, Kitazawa T. 2000**). La protéine semble donc être au centre d'un réseau de kinases contrôlant l'activité du complexe MLCP. Par ce biais, elle agit au niveau de la contraction musculaire et de la dépression synaptique (**Eto M. 2009, Eto M,Bock R,. 2002, Dimopoulos GJ. 2007**).

Des études récentes ont permis de montrer la fixation simultanée d'inhibiteurs et d'autres régulateurs sur la PP1c. Ces observations remettent en cause le concept précédemment admis selon lequel la régulation de la phosphatase suivait un schéma relativement simple où les différentes sous unités régulaient de façon séquentielle, et une à la fois, la fonction de la phosphatase. Ainsi, l'inhibiteur 1 se fixe à la protéine GADD 34 formant le complexe trimérique GADD34-PP1c-I1 où la régulation de la phosphatase est phospho-dépendante (**Connor JH. 2001**).

Nous pouvons maintenant imaginer la régulation cellulaire de la phosphatase comme un ensemble protéique complexe impliquant d'un côté les protéines inhibitrices ciblant et régulant certaines holoenzymes de PP1 et d'un autre coté les kinases, qui, en phosphorylant leurs substrats, peuvent contrecarrer l'action des premiers (**Ferrell JE, Jr. 2002**). Dans leur globalité, ces protéines jouent, dans un sens, comme dans l'autre, le rôle d'interrupteur biologique et contribuent à la mise en place de l'action pléiotropique de la protéine phosphatase de type 1.

La suite de ce chapitre exposera de façon plus détaillée les rôles et fonctions biologiques actuellement décrits des inhibiteurs 2 et 3, deux protéines auxquelles nous nous sommes particulièrement intéressées au cours de cette thèse.

Inhibiteur	Site de Phosphorylation	Kinase	Rôle de la phosphorylation	Références
Inhibiteur 1 (I1)	Thr 35 Ser 67	PKA PKC /Cdk5	Inhibition de PP1c Activation de PP1c	(**Braz JC. 2004, Aitken A & Cohen P. 1982**)
Inhibiteur 2 (I2)	Thr 72 Ser 86/120/121 Tyr	GSK3/cdc2/MAPK CK-II	Activation de PP1c-I2 Reconnaissance de la Thr72 par GSK3 ND	**(Park IK. 1999(Williams JP. 1995)**
Inhibiteur 3 (I3)	ND	PKA/PKC/CK-II	Perte activité inhibitrice	**(Zhang L. 2008)**
DARPP 32	Thr 34 Thr 75 Ser97 Ser 130	PKA/PKC Cdk5 CK-II CK-I	Inhibition de PP1c Inhibition de PKA Exposition de la Thr 34 Inhibition de CaN	**(Svenningsson P. 2004)**
NIPP-1	Ser 199 Ser 204	PKA CK-II	Activation de PP1c-NIPP-1	(**Beullens M. 1993, Van Eynde A. 1994**)
CPI-17	Thr 38 Ser 12 Ser128	PKC/ROCK/MYPT1-K/ILK PKC/MYPT1-K ND	Inhibition de la myosine phosphatase ND	**(Eto M. 2009)**
PHI-1	Thr57 Ser[b]	PKC/ROCK/ ILK PKC/ROCK	Inhibition de PP1 ND	(**Deng JT. 2002**)
Inhibiteur 4 (I4)	ND		Homologue d'I2	
KEPI	Thr73 Ser[b]	PKC/ ILK PKC	Inhibition de PP1 ND	(**Erdodi F. 2003, Liu QR. 2002**)
GBPI	Thr58 Ser[b]	PKC PKA	Inhibition de PP1 Perte activité inhibitrice	(**Liu QR. 2004**)

*Tableau 6 : Tableau présentant les régulateurs de la phosphatase de type 1 appartenant à la famille des inhibiteurs et retrouvés dans les cellules de mammifères, leurs actions et régulation par phosphorylation. ND : non déterminé (**Eto M. 2003, Eto M & Brautigan DL. 2012**).*

b. L'inhibiteur de type 2 :

- Introduction :

L'inhibiteur de type 2 (ou I2) fut découvert en 1976 et décrit comme étant une protéine thermostable capable d'inhiber l'activité de la phosphatase de type 1 (**Huang FL & Glinsmann WH. 1976**). Il est le plus ancien des régulateurs de PP1. On retrouve certains de ses homologues chez la levure (Glc8), *Caenorhabditis elegans*, la Drosophile, le Xénope ainsi que chez tous les mammifères (**Gruppuso PA. 1985, Roach P. 1985, Tung HY. 1995, Li M. 2007**).

- Structure et mécanisme d'inhibition :

La résolution de la structure de l'holoenzyme (cristal réalisé avec la PP1cγ1 de rat et l'inhibiteur 2 de souris), associée à des données de dichroïsme circulaire et de Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) ont permis de montrer qu'I2 était globalement non-structurée en solution, exception faite d'une hélice-α comprise entre les résidus 135 et 143 (**Huang HB. 2000**). Ce régulateur semble appartenir à une classe de protéines qui se structurent quand elles s'associent à leur partenaire (**Garner E. 1999**). L'Inhibiteur 2 mammifère possède trois zones de fixation à la phosphatase, toutes trois très conservés au cours de l'évolution (**Hurley TD. 2007**).

Le premier, et plus petit, domaine de fixation, est composé des résidus 12 à 17 (KGILKN, motif SILK) et correspond à un mélange d'associations hydrophobes et de liaisons hydrogènes (Figure 17). Diverses expériences de délétion et de mutagenèse dirigée ont permis de montrer l'importance de ce domaine Nt dans la régulation de l'activité de la phosphatase (**Park IK & DePaoli-Roach AA. 1994, Helps NR. 1998, Huang HB. 1999**). En effet, certaines protéines inhibitrices 2 retrouvées chez le rat (I2β (**Osawa Y. 1996**), la drosophile (**Helps NR. 1998**) ou de levure (Glc8 (**Tung HY. 1995**)), qui ne possèdent pas cette séquence présentent une faible capacité d'inhibition de la PP1.

Le second domaine est composé des résidus 44 et 56 (KSQKWDEMNILAT). Il permet une interaction à la phosphatase au niveau d'un sillon hydrophobe précédemment décrit pour permettre la fixation de certaines sous-unités porteuses du domaine de liaison « RVxF ». Ce mode d'interaction est retrouvé chez la grande majorité des régulateurs de la phosphatase.

Le dernier et plus long domaine, composé des résidus 130 à 169, forme une longue hélice-α interrompue au niveau des positions 149 et 153. La portion 130-146 s'ancre le long du sillon hydrophobe de la PP1 (Figure 17 et 18) alors que les acides aminés 147-151 se lient directement sur

le site actif et bloque son accès à tout autre substrat (Figures 19,20 et 21). Enfin, la dernière portion composée des résidus 152-169 quitte le site actif pour un sillon hydrophobe adjacent (Figures 19,20 et 21) (**Hurley TD. 2007**).

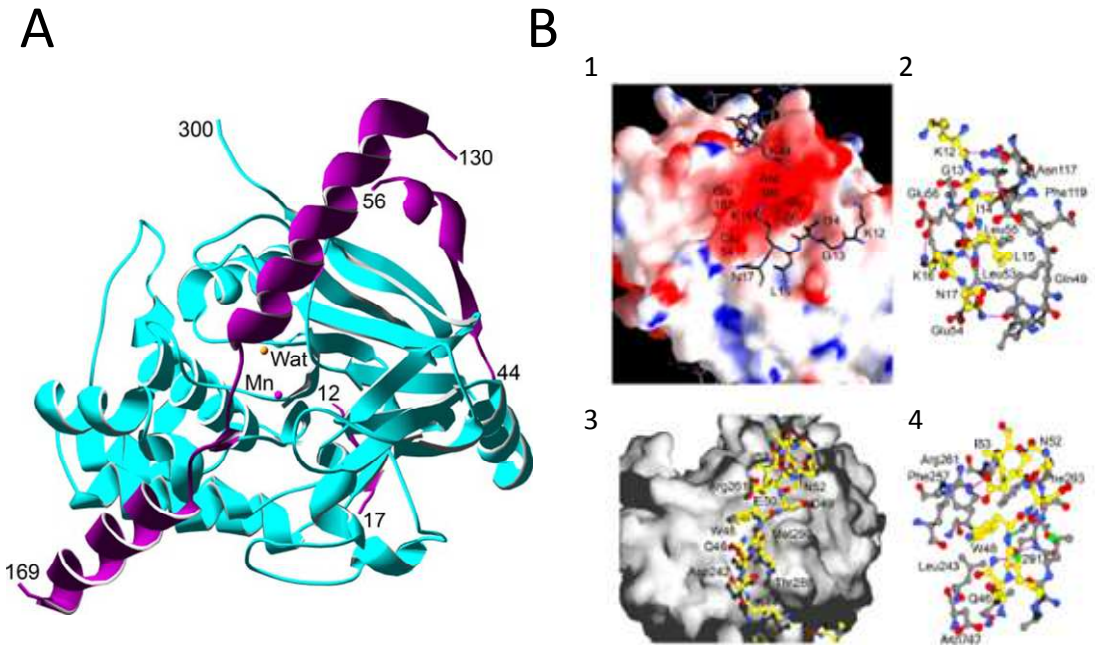


Figure : 19. Structure du complexe PP1cγ : I2. (A). La structure en bleue représente la sous unité catalytique de la phosphatase, l'inhibiteur est représenté en magenta. Sont également signalisés l'ion catalytique manganèse, noté Mn, ainsi que la position de la molécule d'eau (Wat). Sont représentés les résidus des débuts et fins des trois domaines de fixation (12-17/44-56/130-169). (B). Interaction des résidus 12-17 et 44-56 avec PP1c. (1 et 3) Représentation de la surface de PP1c impliquée dans les interactions avec les 1er et 2^{d} domaines de fixation de l'inhibiteur 2 (2 et 4). Vue détaillée des interactions misent en jeu au niveau des 1er et 2^{d} domaines de fixation (Sont représentés en jaunes les résidus de I2 et en gris ceux de la phosphatase).
*En ce qui concerne le 1er domaine de fixation, la chaine latérale de l'I2 Ile14 se retrouve encastrée dans une poche hydrophobe formée par les résidus Leu55, Phe119, Leu59 de PP1c. La chaine latérale de la Leu 15 (I2) se situe dans une structure formée par les Pro50, Leu53, et Phe119 de la PP1c. Les interactions restantes sont réalisées par les Lys12 et 16 (qui forment un pont hydrogène avec le résidu Asp166 de la phosphatase) et Asn 17 (fixation aux résidus 52 et 54 de la phosphatase) (1.2). En ce qui concerne le second domaine, l'interaction la plus importante se situe au niveau de la Gln46 (I2) qui forme un pont hydrogène avec la Cys291 de PP1c. Il est intéressant de noter que le résidu Lys44 (I2) interagit avec l'Asp166 de PP1c, ce même résidu avec lequel la Lys16 (I2) forme un pont hydrogène (**Hurley TD. 2007**).*

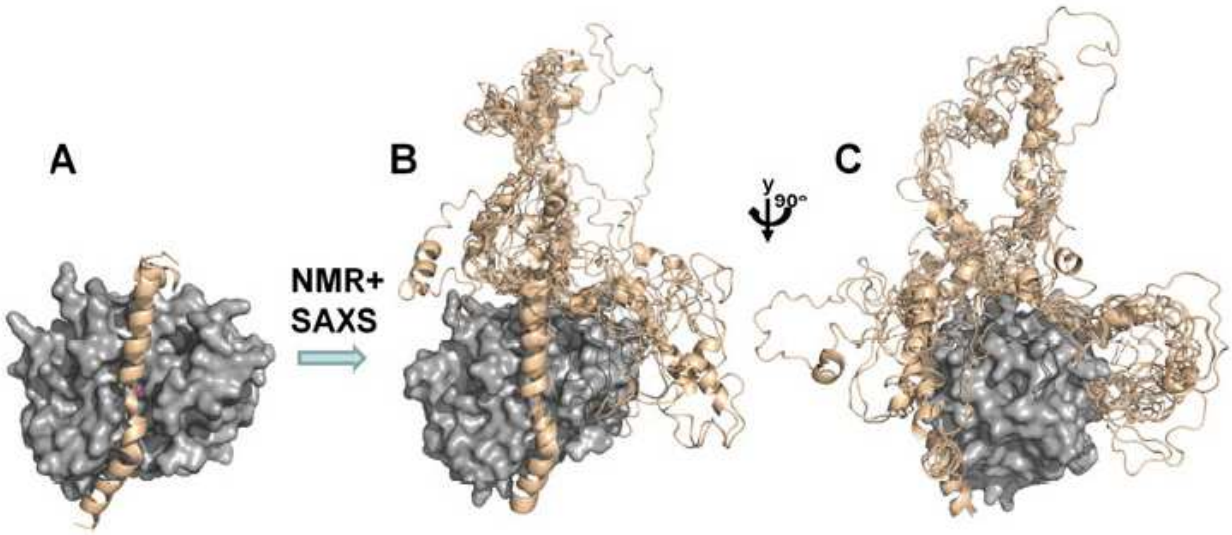


*Figure : 20 :Structure PP1/Inhibiteur 2. (A). Structure cristallographique de l'holoenzyme I2 :PP1. (La surface de PP1c est représentée en gris, la structure de I2 est quant à elle illustrée par les rubans beiges, PDB 2O8G). L'hélice α correspond, d'après les données obtenues par RMN (Huang HB, 2000), à la seule portion de la protéine dont la structure n'est pas induite par la fixation à la phosphatase (Hurley TD, 2007)). (B). L'utilisation de RMN et de SAXS ont permis la détermination de la structure complète du complexe. (C). Le complexe subit une rotation de 90° permettant d'observer les sites de fixation sur la phosphatase des peptides RVxF et SILK issus de la protéine I2 (**Peti W. 2012b**).*

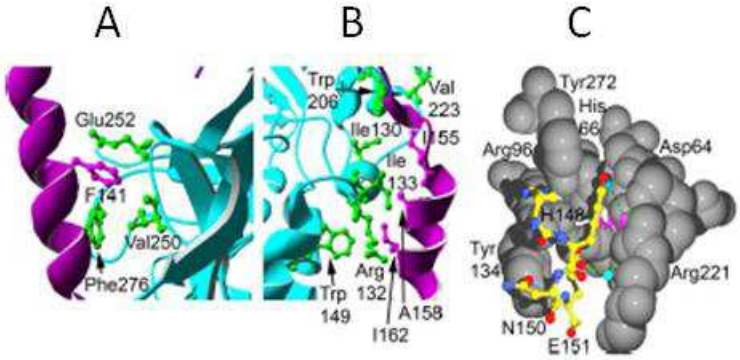


*Figure 21 : Interactions entre les résidus 141 et 162 de l'inhibiteur 2 au sein du site catalytique de PP1c. (A) Interactions du résidu conservé Phe141 (I2) avec les chaines latérales des Val250, Glu252 et Phe276 (PP1c). (B) Interactions hydrophobes entre les résidus Ile155, Ala 158 et Ile162 le long du sillon hydrophobe de fixation au substrat de la sous unité catalytique de la phosphatase. (C) Vue plus générale des interactions mises en jeu par les résidus 148-151 (I2) au niveau du site actif de PP1c. La phosphatase est représentée en gris, l'inhibiteur en jaune. La localisation de l'ion manganèse est notée en rose. D'un point de vue général, on observe un ensemble complexe d'interactions entre les résidus His148, Tyr149 et Glu151 de l'inhibiteur et le site actif de la phosphatase. L'histidine 48, en particulier, est impliquée dans deux interactions majeures. Sa chaine hydrogène latérale se fixe au résidu Tyr272 (PP1c) alors que sa chaine hydrogène principale se lie à l'Arg96 (PP1c). Ces interactions permettent au résidu 149 d'occuper le site de fixation phosphoaminoacide de la phosphatase, et entraîne le déplacement d'un ou plusieurs ions métalliques localisés au niveau du site actif (**Hurley TD. 2007**).*

- ## Phosphorylation et régulation de fonction :

Pendant de nombreuses années, la phosphorylation par la kinase GSK3 de l'inhibiteur 2 fixé à la PP1 fut étudiée pour son implication dans la régulation de la sous unité catalytique PP1c (**Ballou LM. 1985**). Les résultats montrèrent une activation conformationnelle et transitoire de l'holoenzyme « MgATP-dependante » variant en fonction de l'état de phosphorylation de la thréonine 73 retrouvée sur le motif PXTP (Pro-X-Thr-Pro) de la sous unité régulatrice (**Hemmings BA. 1982, Yang SD. 1981, DePaoli-Roach AA & Lee FT. 1985**). Ces données suggérèrent que sous différentes conditions, l'I2 pouvait être soit un inhibiteur, soit un activateur de la phosphatase. Cette nature duale le rapprochait de la famille RCN des régulateurs de la calcineurine phosphatase (**Hilioti Z & Cunningham KW. 2003**).

Nous savons aujourd'hui que l'inhibiteur 2 est impliqué dans un ensemble complexe d'interactions où de multiples kinases (GSK3, MAPK, CDK) entrent en jeux, régulent et sont elles-mêmes régulées lors du processus. Des études *in vitro* ont permis de montrer que le motif PXTP pouvait être phosphorylé, entre autres, par la GSK3, CK-II et la Cdc2 (**Hemmings BA. 1982, Ahmad Z. 1984, Puntoni F & Villa-Moruzzi E. 1995, Wang QM. 1995**) (Tableau 6). D'autres résidus tels que les Sérines 86, 120, 121 sont également sujets aux phosphorylations. Cette fois, la protéine impliquée est la CK2 (**Cohen P. 1989, Holmes CF,Kuret J,. 1986**). La fonction de ces modifications post-traductionnelles n'est pas d'entrainer directement la modulation de l'activité du complexe mais de permettre une potentialisation de l'action de la GSK3 (**DePaoli-Roach AA. 1984**).

L'inhibiteur 2 s'associe préférentiellement à certains types d'holoenzyme de PP1 tels que les complexes Nek2 :PP1, Spinophiline :PP1 ou KPI-2 :PP1 (**Eto M,Elliott E,. 2002, Terry-Lorenzo RT,Elliot E,. 2002, Wang H & Brautigan DL. 2002**) (Figure 22). Pourtant, les fonctions physiologiques sous tendant une telle conservation de structure et l'existence de ces holoenzymes restent encore aujourd'hui mal ou insuffisamment comprises. Dans la suite de ce chapitre, nous tenterons d'établir un état des lieux des connaissances actuellement acquises concernant les fonctions cellulaires de cet inhibiteur et les explications avancées quant à l'existence de tels complexes.

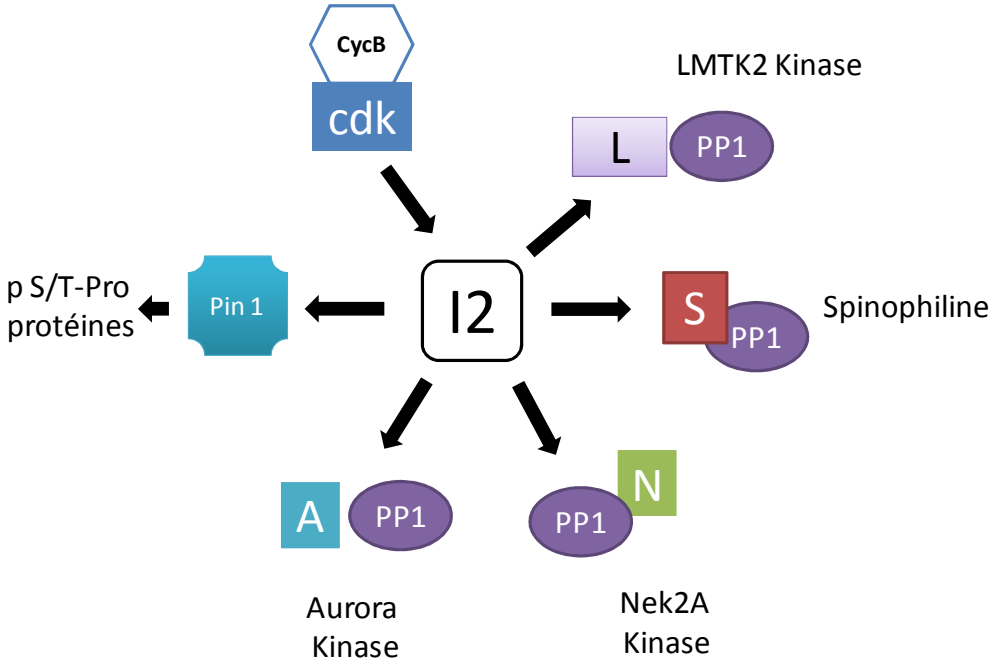


*Figure 22 : Certains inhibiteurs de PP1 présentent une certaine sélectivité quant aux holoenzymes avec lesquels ils interagissent. Ainsi, lors de la mitose, l'inhibiteur 2 est phosphorylé par le complexe CDK/cycline B1. Il s'associe avec un certain nombre de complexes incluant trois kinases (Nek2A, LMTK2 et Aurora) ainsi qu'avec la prolyl isomérase Pin1 (**Brautigan DL. 2012**).*

- ## Implication de l'inhibiteur 2 dans le cycle cellulaire :

Un ensemble d'études génétiques et biochimiques a permis d'établir l'implication de l'inhibiteur 2 dans la régulation du cycle cellulaire et plus particulièrement lors de la mitose et ce, entre autres, *via* l'interaction à de nombreuses kinases.

Rôle du complexe CDK2-cycline B:

Dans les cellules de mammifère, l'expression de l'inhibiteur 2 fluctue durant le cycle et atteint son maximum lors de la mitose (**Brautigan DL. 1990**), la protéine est alors phosphorylée par le complexe CDK2-cycline B1 au niveau du motif conservé PXTP et se concentre au niveau des centrosomes (**Leach C. 2003, Li M. 2006**).

Rôle du complexe Neck2/PP1/I2 :

La Mima related Ser/Thr kinase (Neck2) forme avec PP1c un complexe localisé au niveau du centrosome et impliqué dans la duplication et la séparation chromosomique (**Fry AM. 1998**). L'inhibiteur 2, qui se fixe indirectement à la kinase *via* son association à PP1, semble jouer un rôle dans la régulation de l'holoenzyme en permettant l'augmentation de l'activité de NEK2 et l'initiation de la séparation chromosomique (**Eto M,Elliott E,. 2002**).

Rôle des kinases Aurora :

- Aurora A :

D'autres kinases, telles que Aurora A, présentent la caractéristique d'interagir directement avec l'inhibiteur 2 entrainant l'augmentation de son activité (**Satinover DL. 2004b**). Dans les ovocytes de Xénope, même si aucun argument génétique n'apporte la preuve de son implication dans la mise en place de la méiose, il semblerait que le régulateur agisse de concert avec la kinase Aurora A et régule le seuil de cycline B indispensable au bon déroulement de cette étape cellulaire. Les travaux de Satinover et associés montrent que le seuil cycline B peut être augmenté ou diminué suite à une variation du taux d'Aurora-A ou d'Inhibiteur 2. Ces résultats montrent que les deux protéines régulatrices sont impliquées dans la boucle signalétique nécessaire à la mise en place des commutations caractéristiques de l'entrée en mitose (**Satinover DL. 2006**).

- Aurora B :

Des expériences d'interférence réalisées sur l'inhibiteur 2 de cellules humaines d'épithélium de rétine, ont permis de montrer un retard d'anaphase associé à des défauts de cytokinèse entrainant la formation de cellules multinuclées comprenant, entre autres, des centrosomes surnuméraires. Un phénotype similaire est retrouvé lors de l'inhibition chimique de la kinase Aurora B, tous deux peuvent être restaurés par l'interruption partielle de PP1 (**Wang W,Stukenberg PT,. 2008b**).

Chez la levure, la surexpression de l'homologue Glc8 de l'inhibiteur 2 complémente certaines mutations touchant *ipl1* (homologue de l'aurora kinase B) (**Tung HY. 1995**). Cette kinase est par ailleurs indispensable à la mise en place correcte de la mitose. En effet, elle permet la phosphorylation de protéines nécessaires à l'assemblage des kinétochores et à leur attachement au niveau des microtubules (**Vader G. 2006**). La phosphatase de type 1 agit en déphosphorylant et inactivant la kinase et certains de ses substrats (exemple de la protéine Dam1, localisée au niveau des kinétochores (**Pinsky BA. 2006**). Il est possible qu'en inhibant ou limitant l'action de PP1, l'inhibiteur 2 permette une augmentation indirecte de l'activité d'Aurora B. Au contraire, un défaut d'inhibiteur pourrait entrainer un déséquilibre de la balance AuroraB/PP1 en faveur de la phosphatase. Ce déséquilibre, interférant avec les fonctions de la kinase, expliquerait les défauts de ségrégation observés.

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent une implication de l'inhibiteur 2 dans la cytokinèse et la ségrégation chromosomique *via* la régulation mitotique de la balance PP1/Aurora B.

Rôle du prolyl cis/transisomérase:

L'inhibiteur 2 se lie et régule un ensemble important de protéines dont certaines kinases avec lesquelles il semble intervenir en de nombreux points touchant la régulation mitotique. Cependant, les kinases ne sont pas les seules protéines agissant de concert avec le régulateur. En effet, une étude récente a permis de mettre à jour l'interaction insoupçonnée d'I2 avec Pin1, le membre le plus étudié des peptides prolyl cis/transisomérase appartenant à la famille des parvulines. Cette enzyme n'est pas une kinase néanmoins, elle possède la particularité de se fixer à un grand nombre de protéines phosphorylées dont certaines kinases mitotiques. Pin1 est une protéine extrêmement conservée. Son activité est à mettre en relation avec la régulation du cycle cellulaire. Des expériences de délétions réalisées chez la levure et la drosophile ont permis de montrer l'essentialité de Pin1 lors du développement de ces organismes (**Hanes SD. 1989, Maleszka R. 1996**). Des études d'interruption par ARN anti-sens montrent un arrêt des cellules en mitose, arrêt s'expliquant par une probable implication de l'enzyme dans la condensation chromosomique *via* la

fixation à certaines topoisomérases (**Xu YX & Manley JL. 2007**). De plus, sa surexpression a pu être détectée dans de multiples cancers humains (**Wulf G. 2003, Ayala G. 2003, Wulf GM. 2001, Kim CJ. 2005**). La surexpression de Pin1 bloque les cellules en phase G2 du cycle, et entraîne une amplification centrosomale associée à une instabilité chromosomale (**Suizu F. 2006, Zhou XZ. 2000**).

La fixation de l'inhibiteur 2 à Pin 1 semble moduler l'interaction de l'enzyme à certains de ces substrats phosphoprotéiques et permet donc de moduler son action mitotique. Ces données suggèrent que la dynamique mise en place entre ces deux protéines puisse avoir un rôle important dans l'orchestration des évènements précédant et accompagnant la mitose (Figure 23) (**Li M. 2008**).

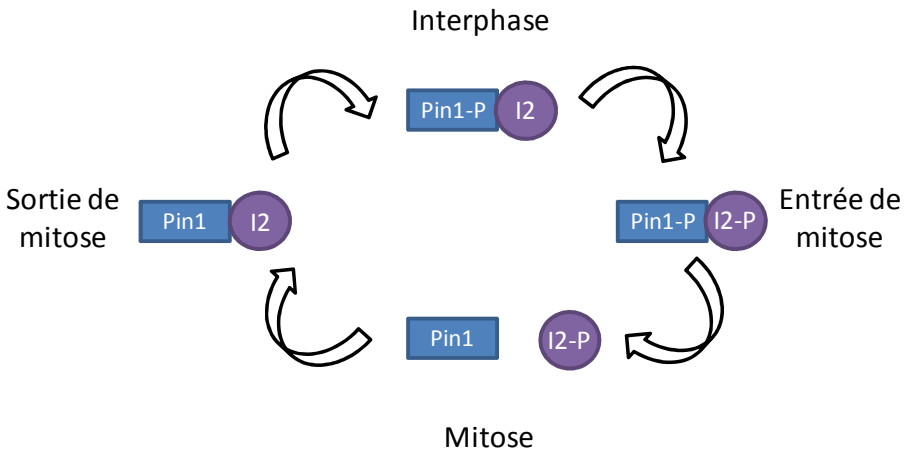


*Figure 23 : Cycle phospho-dépendant de la fixation d'I2 à Pin1. Ce modèle prédit l'engagement de complexes Pin1 actifs lors de l'entrée et la sortie de mitose et pendant l'interphase. Les auteurs suggèrent que les deux protéines suivraient le cycle suivant : lors de l'interphase, Pin1 phosphorylé au niveau de son résidu Sérine 16 se fixe à l'inhibiteur 2 non-phosphorylé. Lors de l'entrée en mitose, I2, phosphorylé au niveau de sa thréonine 72 reste fixé à l'enzyme Pin1. La déphosphorylation de Pin1 survenant plus tard durant la mitose entraine une dissociation du complexe. Enfin, I2 est déphosphorylé et se fixe de nouveau à Pin1 avant l'arrivée d'un nouveau cycle. Les auteurs proposent l'existence d'une variation de spécificité de substrat évoluant parallèlement à la formation de ces différents complexes. Cette expression séquentielle créant une séquence d'évènement dépendant de Pin1 (et indirectement de I2) nécessaire à la progression mitotique (**Li M. 2008**).*

- ## Implication dans l'embryogenèse :

Dans une étude récente réalisée sur la drosophile, les auteurs montrent après un ensemble d'expériences *in vivo* l'implication d'I2 dans la ségrégation chromosomique et la synchronisation des mitoses lors du développement embryonnaire.(**Wang W,Cronmiller C,. 2008**).

Chez cet animal, le gène de l'inhibiteur 2 se retrouve sous la forme d'une copie simple dont l'expression est indispensable à la mise en place de l'embryogenèse. Au cours de l'oogenèse, l'expression d'I2 issue des lignées germinales résulte en son accumulation sous forme d'ARNm et de protéine dans les œufs non fertilisés. Chez les embryons, la protéine endogène se concentre autour des chromosomes mitotiques condensés, puis, se déplace autour du noyau lors de l'interphase. L'interruption de fonction de l'inhibiteur est associée, chez les embryons, à une réduction de leur viabilité. Les embryons dérivés de mères mutantes présentent de nombreuses aberrations chromosomiques et mitotiques (comprenant entre autre la perte de ségrégation chromosomique, et de synchronie mitotique) (**Wang W,Cronmiller C,. 2008**). Les auteurs proposent une implication de l'inhibiteur dans la régulation de la ségrégation chromosomique lors de l'embryogenèse de la drosophile via la régulation coordonnée de PP1 et d'Aurora B.

- ## Conclusion:

Même s'il est aujourd'hui impossible de dresser un portrait complet des fonctions biologiques de l'inhibiteur 2, les données obtenues semblent converger vers une implication de l'inhibiteur dans la régulation du cycle mitotique *via* son interaction à la phosphatase de type 1 d'une part, et à un ensemble de diverses kinases, d'autre part.

c. L'inhibiteur de type 3 :

- Introduction:

Beaucoup moins étudié que l'inhibiteur 2, l'inhibiteur de type 3 (ou I3) fut initialement décrit chez l'homme où cette petite molécule hydrophile thermostable de 126 AA fut caractérisée pour son activité inhibitrice (de l'ordre du nanomolaire) vis-à-vis de la sous unité catalytique de la phosphatase 1 (**Zhang J. 1998**). Plus tard, des travaux initiés chez la levure et les plantes montrèrent que leurs homologues chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Arabidoptis thaliana* présentaient le même type d'activité (**Garcia-Gimeno MA. 2003, Takemiya A. 2009**). Cette protéine, extrêmement conservée au cours de l'évolution (**Zhang J. 1998**), est, avec la protéine Sds22 l'un des deux plus anciens régulateurs de la PP1 (**Ceulemans H,Vulsteke V,. 2002**). La conservation de l'inhibiteur 3 et de Sds22 (une protéine régulatrice de la phosphatase impliquée dans le contrôle de la mitose et la ségrégation chromosomique) au cours d'une si longue distance évolutionnaire, suppose un rôle de ces protéines dans un ou plusieurs mécanismes cellulaires essentiels.

- Séquence, motifs et holoenzymes de PP1 impliquant l'inhibiteur 3:

D'un point de vu structural, l'inhibiteur 3 humain possède deux sites impliqués dans l'interaction avec la Phosphatase de type 1. Le premier « ^{39}KKVEW^{43} », se conforme au motif « RVxF » et interagit au niveau d'un sillon hydrophobe éloigné du site catalytique (*cf* chapitre 3.3.1.1), le second se situe entre les acides aminés 65 et 77. Tous deux sont impliqués dans l'activité inhibitrice du régulateur. La séquence humaine présente à ses extrémités deux groupes de résidus basiques « RKRK » (extrémité Nt) et « HRKGRRR » (extrémité Ct) permettant respectivement, sa localisation nucléaire et nucléolaire (**Zhang L. 2008**).

L'inhibiteur 3 est impliqué dans un complexe trimérique faisant intervenir d'une part la protéine phosphatase de type 1 et la protéine Sds 22, d'autre part. Cette dernière, possède une succession de 11 domaines LRR (Leucine Rich Repeat) lui permettant de se fixer sur le motif triangulaire α4/α5/α6 situé à proximité du site actif de la phosphatase (**Ceulemans H,Vulsteke V,. 2002**). Dans ce contexte, les deux protéines I3 et Sds22 sont capables de se fixer simultanément à la PP1, Sds22 permettant la conversion lente de la phosphatase en une forme inactive (**Pedelini L. 2007, Lesage B. 2007**).

- ## Implication dans le cycle cellulaire:

L'inhibiteur 3 est une protéine nucléaire, localisée au niveau du nucléole, des centrosomes, et de l'appareil mitotique cellulaire. La séquence de la protéine est clairement organisée, la portion N-terminale permet la localisation de la protéine au noyau tandis que la partie C-terminale oriente la protéine vers le nucléole (**Huang HS. 2005**). Des études *in vivo* montrent la perte de son activité inhibitrice après phosphorylation par les kinases A, C ou caseine 2 (**Zhang J. 1998**).

L'inhibiteur 3 présente une spécificité de liaison avec certains isoformes de la phosphatase de type 1. En effet, I3 est souvent retrouvé en association avec PP1α et $PP1_{\gamma 1}$ mais jamais avec PP1β (**Huang HS. 2005**). Il est possible que ce régulateur joue un rôle dans la modulation des pools intra-cellulaire des isoformes de la phosphatase ainsi que de leurs localisations subcellulaires.

Des études menées chez la levure ont permis de montrer que l'inhibiteur 3 est essentiel au développement de cet organisme, et qu'il se lie à la PP1 de même qu'avec Sds22. La perte conditionnelle de l'une ou l'autre de ces protéines entraine une altération de la localisation nucléaire de la phosphatase associée à un arrêt de la croissance cellulaire en milieu de mitose, et à la formation d'un réseau mitotique aberrant (**Pedelini L. 2007, Peggie MW. 2002**). Ces résultats suggèrent un rôle commun de ces protéines dans la régulation de la fonction nucléaire de PP1 chez la levure.

- ## Implication dans le développement embryonnaire chez les plantes:

Une étude réalisée chez *Arabidopsis Thaliana* a permis de mettre en évidence l'existence d'un homologue de l'inhibiteur 3 capable, tout comme ses homologues mammifères et de levures, de se fixer à la sous-unité catalytique de la phosphatase de type 1, et d'en inhiber l'activité avec une IC50 de l'ordre du nanomolaire. Le motif « RvXF », joue, une fois de plus, un rôle essentiel dans la mise en place et la régulation du complexe I3 :PP1. Ces résultats illustrent parfaitement la conservation de fonction de ce régulateur.

L'expression épisomique de la protéine fusionnée à la GFP a permis de montrer sa localisation nucléocytoplasmique et sa superposition à ce niveau avec la PP1 de la plante.

Des expériences de mutagénèse ciblant le gène de l'inhibiteur 3 (*AtINH3*) ont permis de montrer son implication dans le bon déroulement du début de l'embryogénèse chez *Arabidopsis thaliana*. En effet, les mutants interrompus pour *AtINH3* présentent un retard dans la progression de l'embryogénèse précoce, avec un arrêt au stade globulaire. Cette mutation est parfois même létale. Le motif « RvXF » joue un rôle déterminant dans la fonction du régulateur, les mutants pouvant être

complémentés par une version intacte de l'inhibiteur mais pas par une version modifiée au niveau de ce domaine crucial (**Takemiya A. 2009**).

- Implication dans l'apoptose:

Les mécanismes apoptotiques sont complexes et impliquent des signalétiques interconnectées répondant à des signaux de mort se fixant sur des récepteurs particuliers (voie extrinsèque) ou à un stress intracellulaire (voie intrinsèque) (**Boatright KM & Salvesen GS. 2003, Riedl SJ & Salvesen GS. 2007**). La fixation de certains signaux apoptotiques tels que FasL et TRAIL au niveau de récepteurs transmembranaires permet l'activation de caspases initiatrices (caspases 8 et 10). La voie intrinsèque est, quant à elle, déclenchée par un stress intracellulaire (dommage de l'ADN, des mitochondries, molécules chimiques génotoxiques, radiations ionisantes…) entrainant la libération du cytochrome c provenant de la mitochondrie (**Adams JM. 2003**) et l'assemblage de l'apoptosome permettant l'activation de la caspase 9 (**Bao Q & Shi Y. 2007**) (**Riedl SJ & Salvesen GS. 2007**). Les caspases initiatrices activent à leur tour d'autres caspases activatrices (caspases 3/6/7). La caspase 3 est un élément majeur qui permet la dégradation d'un grand nombre de substrats (**Earnshaw WC. 1999, Fischer U. 2003**). La libération du cytochrome c est régulée par son interaction avec un ensemble de protéines membres de la famille des Bcl-2 pro-apoptotiques ou/et pro-survie. Les dommages cellulaires sont, quant à eux, détectés par les protéines pro-apoptotiques BH3-only, Bim, Bid, Puma, BAD (Bcl-2 antagonist of cell death). Plusieurs membres des groupes Bcl2 et BH3-only sont régulés par phosphorylation (**Puthalakath H & Strasser A. 2002**). Certaines phosphatases, dont PP1α, sont impliquées dans l'activation de la caspase 9 (**Dessauge F. 2006**) et la déphosphorylation de BAD (**Ayllon V. 2000, Ayllon V. 2001, Ayllon V. 2002**). Des travaux *in vitro* et *in vivo* montrent l'implication de l'inhibiteur 3 dans ce phénomène. Le régulateur semble y être un substrat de la caspase 3 rapidement dégradé par cette dernière lors de l'apoptose induite par l'actinomycine (**Huang HS & Lee EY. 2008**).

Un schéma général présentant l'impact potentiel de la dégradation de l'inhibiteur 3 par la caspase 3 sur les fonctions cellulaires a été proposé par les auteurs (Figure 24, d'après (**Huang HS & Lee EY. 2008**)).

Il est intéressant de noter que plusieurs caractéristiques spécifiques de l'apoptose tels que la condensation chromatidienne, la fragmentation de l'ADN, l'externalisation des phosphatidylsérines ou l'activité de certaines caspases-likes, ont pu être retrouvées chez *Plasmodium berghei (**Al-Olayan EM. 2002, Arambage SC. 2009, Pollitt LC. 2010**)*.

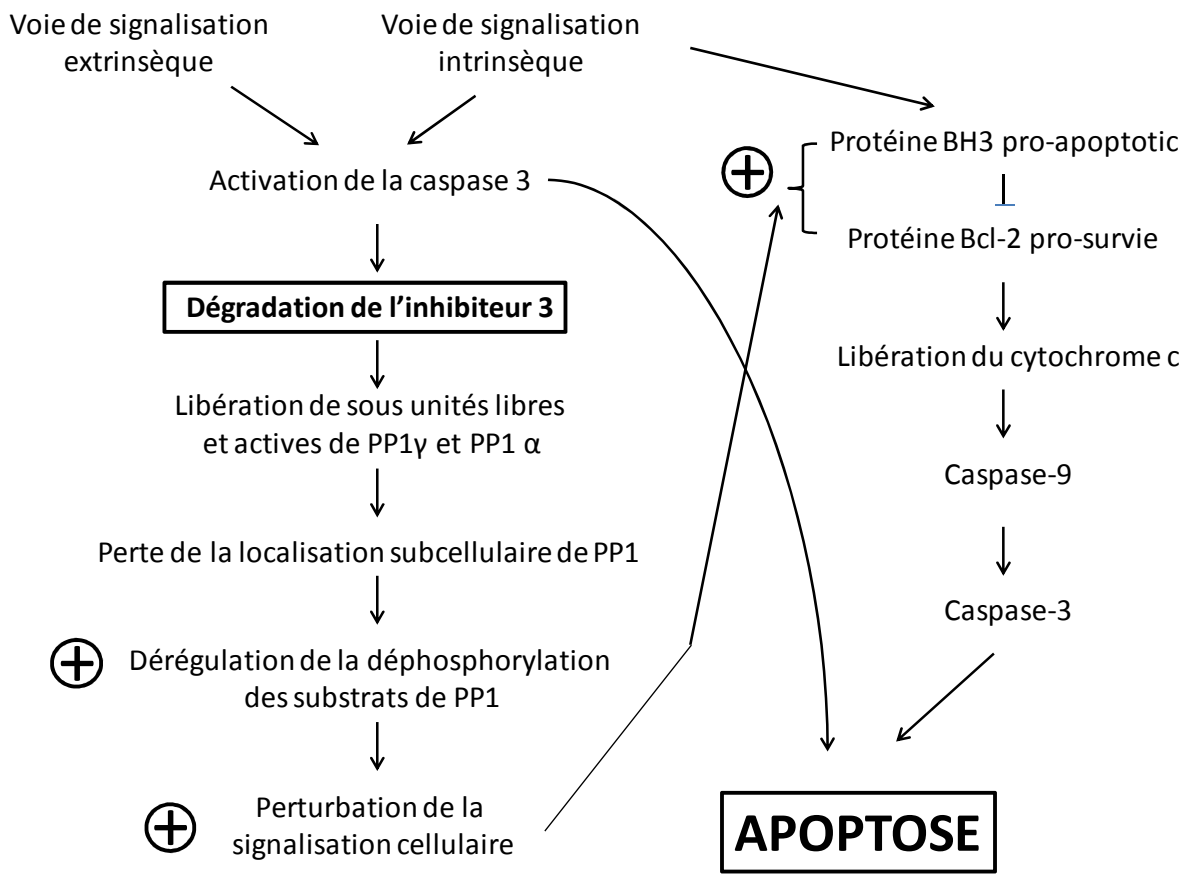


Figure : 24
*Schématisation de l'impact potentiel de la dégradation de l'inhibiteur 3 par la caspase 3 sur les fonctions cellulaires. Le signe + indique un effet pro-apoptotique. ((**Huang HS & Lee EY. 2008**) modifié).*

Des travaux réalisés sur *Plasmodium falciparum* rapportent l'existence de mécanismes similaires, survenant aux différents stades du développement sexué (ookinetes (**Arambage SC. 2009**)) et asexué du parasite (**Picot S. 1997, Ch'ng JH. 2010, Meslin B. 2007, Sturm A. 2006**). Chez ces organismes, les phénomènes de mort cellulaire programmée semblent permettre la régulation du nombre d'individus ainsi que la prolongation de leur survie au sein des différents hôtes.

- Conclusion:

Bien que les fonctions de l'inhibiteur 3 soient encore incertaines, il est probable que cette protéine intervienne, *via* son interaction à la phosphatase de type 1, dans de nombreux processus fondamentaux comprenant, entre autres, la régulation de la division cellulaire.

Chapitre 2 :

OBJECTIFS DE LA THESE

Les régulateurs de la phosphatase de type 1 chez *Plasmodium falciparum*

Bien que la protéine phosphatase de type 1 revête un rôle essentiel dans la biologie de *Plasmodium falciparum*, son mode de fonctionnement et de régulation sont encore mal décrits. Ce constat nous a amené à orienter la recherche réalisée au sein du laboratoire autour de l'identification et de la caractérisation fonctionnelle d'éventuels régulateurs de PfPP1.

Un premier travail publié en 2006, a permis l'identification d'un gène codant pour une protéine nommée PfLRR1 (numéro d'ascession PlasmoDB : PF3D7_1032800) de 247 acides aminés (29.3KDa) présentant une homologie de séquence significative avec la Sds 22 retrouvée chez *Schizosaccharomyces pombe*. Sds22 est connue pour son rôle essentiel dans la régulation de la division cellulaire de la levure. En effet, elle permet le passage de la métaphase à l'anaphase de mitose *via* une diminution d'activité de la phosphatase de type 1 dont elle est l'un des régulateurs (**Ohkura H & Yanagida M. 1991**). Chez *Plasmodium falciparum,* notre équipe a démontré que la PfLRR1, localisée dans les compartiments nucléocytoplasmiques, était capable d'interagir *in vivo* et *in vitro* avec la phosphatase et d'inhiber son activité. Afin d'identifier l'existence d'une éventuelle action de PfLRR1 sur le cycle cellulaire, l'ARNm correspondant à la partie codante du gène a été injecté dans des ovocytes de Xénope. Cette injection a permis la levée du blocage de ces cellules naturellement bloquées en phase G2 du cycle. PfLRR1 possède donc une action régulatrice sur le cycle cellulaire (**Daher W. 2006**). L'implication de la PP1 de Xénope (XePP1) dans le passage de la transition G2/M est connue et bien décrite (**Huchon D. 1981**). Il est probable que la levée du blocage observée après injection soit la résultante d'une action inhibitrice de PfLRR1 sur la phosphatase du Xénope. Il est intéressant de noter que TgLRR1, son orthologue chez *Toxoplasma gondii*, présente les mêmes propriétés vis-à-vis de TgPP1. TgLRR1 est fortement exprimée chez le tachyzoïte (forme de division rapide de *T.gondii*). Cette observation, associée au fait que TgLRR1 et PfLRR1 sont toutes les deux majoritairement nucléaires, supporte l'idée d'une implication de ces deux protéines et de leurs complexes dans la progression du cycle cellulaire (**Daher W,Oria G,. 2007**).

Afin de poursuivre l'étude de la régulation de PfPP1 et d'identifier les partenaires potentiels, nous avons réalisé une analyse comparative en utilisant les données de la banque PlasmoDB de *P.falciparum* (http://plasmodb.org/plasmo/) et les séquences des protéines humaines appartenant à la famille des inhibiteurs (I1, I2 et I3) de la phosphatase de type1. Ce criblage comparatif n'a permis d'identifier aucun homologue de l'inhibiteur 1. Cependant, il a révélé la présence de deux cadres ouverts de lecture correspondant aux inhibiteurs 2 (numéro d'accession PlasmoDB :

PF3D7_0320000) et 3 (numéro d'accession PlasmoDB : PF3D7_1031700) qui jouent un rôle principal au niveau de la régulation du cycle cellulaire. Le premier, que nous avons appelé Pf inhibiteur 3 (PfI3), possède une identité de séquence avec l'inhibiteur 3 de la PP1 humaine (identité de 30%) et le second, Pf inhibiteur 2 (PfI2), présente une identité de 24% avec la séquence de l'inhibiteur 2 humain.

L'objectif principal de cette thèse était d'identifier les gènes *PfI3* et *PfI2* puis, d'étudier les deux protéines d'un point de vue biochimique et biologique et d'entamer une analyse de la relation structure-fonction avec la phosphatase de type 1. Afin de mener à bien ce projet, nous avons suivi le plan suivant :

1) Vérification de l'expression protéique des inhibiteurs chez le parasite.
2) Identification de l'éventuelle interaction avec la PfPP1 ainsi que des motifs et résidus impliqués.
3) Mise en évidence d'un éventuel effet régulateur sur la phosphatase (identification des motifs et résidus impliqués dans cette fonction)
4) Etude de la localisation et des fonctions *in vivo* chez *Plasmodium falciparum*

Chapitre 3 :

RESULTATS

Article 1 : Identification et caractérisation de l'inhibiteur 3 de P.falciparum.

Des analyses bioinformatiques de génomique comparative ont permis l'identification chez *Plasmodium falciparum* de l'homologue de l'inhibiteur 3 de la phosphatase de type 1. Cette protéine, globalement non structurée, possède une identité de séquence significative avec l'ensemble des inhibiteurs 3 précédemment identifiés chez un grand nombre d'organismes (identité de 30% avec l'homologue humain). L'étude de la séquence protéique du régulateur potentiel a permis de montrer la présence d'un domaine KVVRW correspondant à une version dégénérée du motif « RVxF» connu et décrit pour son implication dans la fixation à la phosphatase.

Une approche de spectrométrie par RMN, associée à un ensemble de tests *in vitro*, ont permis de montrer l'existence d'une interaction directe entre l'inhibiteur et la phosphatase, interaction complexe impliquant l'existence d'au moins deux sites de liaisons, mais résultant en grande partie de l'engagement du motif primaire KVVRW.

Des expériences d'expression épisomale de la protéine fusionnée à la GFP montrent une localisation essentiellement nucléaire. Il est intéressant de noter que l'on retrouve également la phosphatase 1 de *P.falciparum* au niveau de ce compartiment (**Daher W. 2006**).

Dans le but d'examiner la fonction *in vivo* de la protéine, nous avons entrepris des expériences d'interruption du gène *PfI3*. Aucune de nos tentatives n'a permis l'obtention de parasites recombinants, démontrant l'essentialité de PfI3 dans le développement asexuée du pathogène. Afin de contourner ce problème et de tenter une analyse plus fine de la fonctionnalité du régulateur, nous avons opté pour une analyse fonctionnelle utilisant le modèle hétérologue de levure. Chez ces organismes déplétés de leur inhibiteur 3, l'expression épisomale de la protéine de *Plasmodium* n'a pas permis de restaurer la croissance des cellules. Ce résultat suggère que la protéine parasitaire possède une fonction différente de celle exercée par son homologue. Des tests *in vitro* d'activité phosphatase révèlent une action positive de PfI3 sur PfPP1. Ces résultats, inverses de ceux observés chez ses homologues humain et de levure mettent en évidence une fonction différente et spécifique de PfI3 et font de cette protéine un régulateur nucléaire potentiel de PfPP1 chez *P.falciparum*.

Référence de l'article :

Plasmodium falciparum inhibitor-3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival.

Fréville A, Landrieu I, García-Gimeno MA, Vicogne J, Montbarbon M, Bertin B, Verger A, Kalamou H, Sanz P, Werkmeister E, Pierrot C, Khalife J.

J Biol Chem. 2012 Jan 6;287(2):1306-21. doi: 10.1074/jbc.M111.276865. Epub 2011 Nov 28.

Article 2 : Identification et caractérisation de l'inhibiteur 2 de P.falciparum.

Nous avons, dans le cadre de la poursuite de nos travaux concernant les régulateurs de la PfPP1, entamé l'étude d'une protéine de 144 aa codée par un gène se situant au niveau du chromosome 3 et correspondant à l'homologue potentiel de l'inhibiteur 2 de la phosphatase de type 1 chez *Plasmodium falciparum*.

Nous avons, dans un premier temps, réalisé une analyse de la séquence protéique et avons pu identifier deux des trois motifs communément décrits comme étant impliqués dans la liaison du complexe I2/PP1 mammifère (**Hurley TD. 2007**). Le premier, ^{12}KTISW^{16} correspond à une séquence dégénérée du motif « RVxF » classiquement présenté comme étant un domaine majeur d'interaction à la phosphatase. Le second, ^{102}HYNE^{105}, est lui aussi extrêmement conservé au sein de la famille des inhibiteurs 2.

Des expériences de transfection épisomale du régulateur fusionné à la GFP nous ont permis de montrer son expression nucléocytoplasmique tout au long du cycle érythrocytaire avec cependant une concentration nucléaire lors des stades tardifs. Il est essentiel de rappeler qu'une distribution nucléocytoplasmique de la PP1 avait été précédemment décrite chez le parasite (**Daher W. 2006**).

Dans le but de déterminer l'implication *in vivo* de la protéine lors du stade sanguin, nous avons réalisé un ensemble d'expériences d'interruption de *PfI2*. Aucune de nos tentatives n'a permis l'obtention de parasites recombinants. Ces résultats suggèrent l'essentialité de la protéine dans le déroulement correct du cycle érythrocytaire.

Nous avons, ensuite, pu montrer que PfI2 était capable d'interagir avec la PfPP1 et d'en inhiber la fonction et ce de façon similaire à ce qui avait été décrit chez ses homologues. Un ensemble de tests (i*n vitro* et dans le modèle hétérologue d'ovocyte de Xènope) nous a permis de montrer l'importance des motifs décrits plus haut dans la mise en place de la fonction inhibitrice de la protéine. Cependant, la mutation de ces domaines ne permet pas, à elle seule, d'abroger l'interaction à la phosphatase. N'ayant pu identifier de domaine majeur d'interaction, nous supposons que la formation de l'holoenzyme fait intervenir plusieurs domaines de liaison agissant de concert, et implique au moins les deux domaines identifiés plus haut.

Enfin, nous avons pu montrer que certaines PfI2 mutées non actives mais se fixant à la PfPP1 étaient capables de contrer l'action régulatrice de la protéine sauvage. Ces résultats prometteurs nous permettent d'envisager l'utilisation de peptides inhibiteurs qui mimeraient l'action de ces protéines mutées, cibleraient la PfPP1 et bloqueraient la formation du complexe.

Article en préparation:

Characterization and functional studies of *Plasmodium falciparum* Inhibitor-2: a regulator of protein phosphatase 1

Aline Frèville[1], Katia Cailliau-Maggio[2], Christine Pierrot[1], Géraldine Tellier[1], Hadidjatou Kalamou[1], Sophia Lafitte[1], Alain Martoriati[2], Jean-François Bodart[2] and Jamal Khalife[1*].

[1] Center for Infection and Immunity of Lille, Inserm U1019-CNRS UMR 8204, University of Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France.
[2] EA4479 Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
*corresponding author: Tel: +33320877968; fax: +33320877888 . E-mail address: jamal.khalife@pasteur-lille.fr (J.Khalife).

Keywords: *Plasmodium*, Malaria, Phosphate 1, Inhibitor 2, Interaction Protein-Protein.

Running title: Characterisation of *Plasmodium falciparum* PP1 Inhibitor 2

Introduction

During its life cycle, *Plasmodium falciparum*, the deadliest malaria parasite for humans, undergoes several rounds of successive mitosis to amplify parasite populations and consequently to increase the rate of its transmission. It is likely that parasite kinases and phosphatases are essential for this growth and division. Indeed, initial experiments using inhibitors of kinases and phosphatases, such as staurosporine and okadaic acid drastically inhibited parasite growth *in vitro* (**Yokoyama D. 1998, Ward GE. 1994, Dluzewski AR & Garcia CR. 1996**). Subsequently, the identification of kinases and phosphatases and their central functions in *P. falciparum* (**Solyakov L. 2011a, Doerig C & Tobin AB. 2010, Doerig C. 2008**) points out that phosphorylation and dephosphorylation represent an important post translational modification to regulate proteins activities. The former process is supported by a recent high-throughput phosphoproteomic study of blood stage parasites that identified around 7000 phosphorylation sites on ~ 28% of proteins (**Treeck M. 2011**). Of note is that the profile of the reported phosphoproteomic reflects the global status of proteins resulting from a balance between endogenous kinases and phosphatases activities. *In vivo* studies, knocking down kinases in *Plasmodium*, and high-throughput screenings of several thousands of small chemical compounds against blood stage parasites increasingly supported kinases as important drug targets (**Tewari R. 2010, Gamo FJ. 2010, Doerig C. 2010a, Doerig C. 2004**).

Among phosphatases, PP1 has been discovered in *P. falciparum* (PfPP1c) and its activity has been attributable to the major phosphatase activity in total parasite extracts (**Yokoyama D. 1998, Bhattacharyya MK. 2002, Cayla X. 2000**). RNAi of PfPP1c significantly inhibited the growth of blood stage parasites

and the release of infectious merozoites respectively (**Blisnick T. 2006, Kumar R. 2002**). In the past decade, a vast body of research provided converging evidence that the key mechanism of the mode of action of the PP1c subunit resides in the presence of interacting regulators that direct the proper functions of this phosphatase (i.e. localization, specificity and the level of activity) (**Ceulemans H,Stalmans W,. 2002, Ceulemans H & Bollen M. 2004, Cohen PT. 2002**). At present, there are about 200 PP1 interacting proteins among which about 100 have been identified as regulatory subunits of PP1c (**Fardilha M. 2010, Hendrickx A. 2009, Bollen M. 2010**). The majority of regulators, known to inhibit the phosphatase activity, interact with PP1c through an amino acid sequence designated 'RVXF' motif. Subsequently, a consensus sequence [R/K]X0-1[V/I](p)[F/W] where X can be any amino acid and (p) any residue except proline has been defined as a canonical PP1-binding site (**Wakula P. 2003**). With respect to the endogenous regulators of PP1 and in comparison to other organisms, relatively very few have so far been identified in *P. falciparum* although we previously reported the identification of two regulators, PfLRR1 and Pf inhibitor-3 (**Daher W. 2006, Freville A. 2012**). Characterization studies have shown that both regulators interact with PfPP1 and are present in the nucleus compartment of blood stage parasites. Functional assays revealed that PfLRR1, dramatically decreased PfPP1 activity, like its homologues in other organisms (**Daher W. 2006**). Unexpectedly, PfI3 strongly increased PfPP1 activity in vitro and was unable to rescue yeast deleted for the expression of its homologue. These data suggest that these regulators control the PP1 activity in the nucleus and underscore the need for a better understanding of the function of PP1 regulators in each species.

A database search with Inhibitor-1 (I1) and Inhibitor-2 (I2), known as powerful regulators of PP1c, identified one open reading frame in *P. falciparum* genome (gene identifier PFC0886w) encoding a potential protein with identity to known I2. Inhibitor-2 is a thermo- and acid-stable regulators initially purified from rabbit skeletal muscle and it is conserved among all eukaryotes (**Huang FL & Glinsmann WH. 1976, Holmes CF,Campbell DG,. 1986**). The potency of inhibitory effect of recombinant I2 of different species carried out in parallel seems to be species specific in terms of IC50 inhibitory effect and phosphorylation by kinases (**Li M. 2007**). It is interesting to note that amino acid sequences of I2 homologues vary in length, from 164 amino acids in plants up to 205 amino acids in human (genbank). This may account for specificities mentioned above. The comparison of I2 sequences of different species along with the *in vitro* functional studies revealed that 2 main conserved regions participate in the interaction with and inhibition of PP1c activity: a first binding region containing a KSQKW motif, and a second region containing a HYNE motif (**Yang J. 2000, Huang HB. 1999**). In addition, a third region present only in the N-terminal side of human I2 containing KGILK motif has been also shown to be involved in the interaction with PP1c (**Huang HB. 1999, Park IK & DePaoli-Roach AA. 1994, Helps NR. 1998**). The resolution of rodent PP1c-I2 crystal structure confirmed the implication of these regions in the binding process (**Hurley TD. 2007**). Nevertheless, it is important to point out the absence of the well-known RVXF motif in I2.

In vivo, the overexpression of GLC8 (I2 homologue) or the knockdown of human I2 by RNA interference showed its direct role in cell cycle (**Tung HY. 1995, Wang W,Stukenberg PT,. 2008b**). For instance, human I2 knockdown produced multinucleated cells during anaphase and blocked cytokinesis (**Wang W,Stukenberg PT,. 2008b**). More

importantly, exploration of the role of I2 in Drosophila development evidenced that an I2 loss-of-function in mothers yields to a dramatic reduction of progeny viability as measured by a decrease of embryonic hatch rates and larval lethality, however, the I2 gain-of-function by transgenic expression of I2 in mutant mothers reversed this effect is (**Wang W,Cronmiller C,. 2008**). Altogether, these observations indicate that I2 plays a critical role for achieving successful mitosis and it is apparent that interfering with I2 role represents an attractive approach for pharmacological intervention. We are interested in characterizing this regulator in *P. falciparum* in order to explore its role and the means to affect its function.

Experimental procedures

Materials

Plasmids pQE30, pGEX4T3, pETDuet, pGADT7 and pGBKT7 were purchased from Qiagen, Life Sciences, Novagen and Clontech respectively. Plasmid pCAM-HA, and pCAM were kind gifts of Dr C. Doerig (Monash University, Australia). Monoclonal anti HA and anti-Myc antibodies were purchased from Roche and Invitrogen respectively.

Preparation of parasites

P. falciparum 3D7 clone was grown according to Trager and Jensen(**Trager W & Jensen JB. 1976**), in RPMI-1640 medium supplemented with 0.5% AlbuMAX^{TM}II (Invitrogen), 0.2mM Hypoxanthin (CCPro) and 20µg/ml Gentamycin (Invitrogen), in the presence of O^+ erythrocytes. Cultures were maintained as previously described. Parasites were synchronized by a double sorbitol treatment as previously described (**Vernes A. 1984**). In order to isolate total RNA or proteins, parasitized erythrocytes were saponin lysed (**Umlas J & Fallon JN. 1971**) and either resuspended in Trizol (Invitrogen) or in phosphate buffered saline containing EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). For some experiments, infected red blood cells were purified using Percoll-sorbitol density gradients with slight modifications (**Ginsburg H. 1987**). Soluble protein extracts were prepared from saponin-isolated parasites by suspending the pellet in lysis buffer (20mM Tris-HCl, Nacl 150mM pH 7.4, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitors cocktail (Roche)) followed by 7 consecutive freeze/thawing cycles with intermediate sonication steps and subsequent centrifugation at 13 000 rpm for 30 min at 4°C.

Recombinant proteins expression and purification

Initial experiments with the wild *PfI2* cDNA did not allow the production of recombinant protein whatever the bacterial plasmid and the condition of expression used. Subsequently, the sequencing of all clones containing bacterial plasmids revealed that an A was missing in the first stretch of A when compared to the initial sequence cloned in shuttle vectors. In order to overcome this problem, a *PfI2* gene with optimized codons has been synthesized (eurofins, MWG operon). The sequence is presented in Figure S1. This synthetic gene has been cloned in different bacterial and yeast plasmids for interaction and functional studies. It has also been used as template to obtain deleted and mutated PfI2 proteins.

Briefly, The full-length coding region of PfI2, PfI2(1-94) and PfI2(19-144) obtained by PCR with the primers Pr1-Pr2, Pr3-Pr4 and Pr5-Pr6 (Table S1) were subcloned in pQE30. For the expression of PfPP1 (primers Pr11 and Pr12), the pDUET expression system was used. The restriction sites are mentioned in Supplemental Table I. Before cloning in expression vectors, all PCR products were subcloned in a TA cloning vector (pCR2.1-TOPO, Invitrogen) and verified by sequencing for the absence of any modification introduced by Taq polymerase.

To obtain the PfI2 mutant constructs, we performed a PCR-based site-directed mutagenesis strategy using the constructions pQE30-PfI2 or pGADT7-PfI2 as templates, the primers Pr7 to Pr8 (PfI2W16A) or Pr9 to Pr10 (PfI2Y103A) and Isis Proofreading DNA polymerase (Qbiogene). The PCR conditions consisted of 1 min at 95°C followed by 16 cycles at 95°C (30 s), 55°C (1 min) and 72°C (8 min). The parental DNA plasmid was then digested with *DpnI* and an aliquot was used to transform XL10-Gold Ultracompetent cells (Stratagene). Mutated plasmids were checked by sequencing for the replacement of tryptophane 16 and tyrosine 103 by an alanine and then used for the expression of mutant PfI2 recombinant proteins or yeast two-hybrid assays.

Protein expression was carried out in the *E. coli* M15 strain for the pQE30 construct and the BL21 strain for pETDuet constructs. The expression of PfI2 recombinant proteins were carried out in the presence of 0.5 mM IPTG at 37°C for 2 hr. For the expression of PfPP1, the culture was induced overnight at 16°C in the presence of 0.5mM IPTG and 2mM $MnCl_2$. Cells were harvested in sonication buffer (20 mM Tris, 1% Triton X-100, lysozyme 1mg/ml, and protease inhibitor cocktail (Roche)). His-tagged proteins were purified according to manufacturer's instructions by Ni2+ chelation chromatography (Sigma). With respect to the PfI2-His proteins, the extract was prepared using a 20mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM Nacl, 20mM Imidazole and 6M guanidine buffer and loaded on a 1 ml nickel-NTA resin column (HiTrap, GE Healthcare). Washing steps were performed with a buffer containing 20 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl and 20 mM imidazole. The imidazole-eluted proteins were dialyzed against 20mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl. Under these conditions, the purity checked by SDS-PAGE followed by Coomassie-blue staining was >95%. The pfI2 recombinant protein was further subjected to peptide mass fingerprint by MALDI-TOF mass spectrometry to confirm its identity.

For antisera production, the purified PfI2WT was mixed in $Al(OH)_3$ (Alu-Gel-S, Serva) (100µg per injection) and injected into mice (intra peritoneal route). Animals were boosted twice at intervals of 3 weeks with the same quantity of PfI2WT. The sera were obtained 2 weeks after the last boost and tested for their titres and specificity by ELISA and Western-Blotting against recombinant proteins. Preimmune sera were used as negative control.

Generation of P.falciparum transgenic parasites

The *PfI2* disruption plasmid (pCAM-*PfI2*) was generated by inserting a PCR product corresponding to a 5' portion from the *PfI2* sequence (720 bp) into the pCAM-BSD vector which contains a cassette conferring resistance to blasticidin. The insert was obtained using 3D7 genomic DNA as template and the oligonucleotides Pr15 and Pr26 (Table S1), which contain PstI and BamHI sites respectively. Attempts to check the accessibility of *PfI2* locus were performed by transfecting wild 3D7 parasites with 3' tagging constructs. To this end, the 3' end of the *PfI2* sequence (695bp, omitting the stop codon) was amplified by PCR using 3D7 genomic DNA and the primers Pr25 and Pr18 containing PstI and BamHI restriction sites respectively. The 3' tagging plasmids were generated by inserting the PCR product into PstI and BamHI sites of the pCAM-BSD-hemagglutinin (HA). Transfections were carried out by electroporation of ring stage 3D7 parasites with 75-100 µg of plasmid DNA, according to Sidhu *et al* (**Sidhu AB. 2005**). To select transformed parasites, 48h after transfection, Blasticidin (Invivogen) was added to a final concentration 2.5 µg/ml. Resistant parasites appeared after 3-4 weeks and were maintained under drug selection.

Genotype and phenotype analysis of P. falciparum transfectants

To confirm that transfected parasites contained the right constructs, plasmid rescue was carried out. Genomic DNA extracted (KAPA Express Extract, kapaBioSystems) from wild or transfected parasites were used to transform *E. coli DH5*α cells (Invitrogen). Plasmid DNA was then purified from bacterial clones and digested with PstI and BamHI.

Genotypes of *PfI2* knock-out parasites were analyzed by PCR on genomic DNA using standard procedures with the primers number Pr 30 (derived from the 5' non-translated region and not present in the construct) and Pr28 specific for the pCAM-BSD vector. Genotypes of *PfI2* knock-in were analyzed using the primer Pr1 and Pr 29 (reverse primer corresponding to HA). The expression of PfI2-HA was checked by Western blotting.

Yeast two-hybrid assays

Briefly, the cDNAs of PfPP1 or Laminine were inserted into pGBKT7 yeast vector and PfI2, PfI2(1-94) and PfI2(19-144) sequences were inserted into pGADT7 yeast vector (Clontech). To obtain the PfI2 mutant constructs (pGADT7-PfI2W16A and pGADT7-PfI2Y103A) we performed a PCR-based site-directed mutagenesis strategy using the construct pGADT7-PfI2 as templates. The constructs were transformed into mat a (AH109) or mat α (Y187) yeast strain, according to the manufacturer protocol (Clontech). After mating, diploid yeasts were grown on SD media supplemented with Leucine and Trytophane for 4 days. Interacting proteins were identified by growth on selective plates (SD-Leu-Trp-His). Yeasts transformed with empty vector or with pGBKT7 laminine were used as controls.

Induction of Xenopus oocytes germinal vesicle breakdown and co-immunoprecipitation

Preparation of *Xenopus* oocytes and microinjection experiments were performed as previously described (**Vicogne J. 2004**). Briefly, in each assay, 20 oocytes removed from at least two or three different animals were microinjected with PfI2 recombinants proteins or peptides. Okadaic acid was used as a negative control (data not shown). Regarding the pre-injection experiments, deleted PfI2 recombinant proteins, mutated PfI2 recombinant proteins or peptides were pre-injected in the oocytes 2 hours before the PfI2WT injection. GVBD was detected by the appearance of a white spot at the centre of the animal pole. To detect PfI2 recombinant proteins in injected extracts, we performed western blot analysis after electrophoresis. The membranes were revealed with anti-His monoclonal antibody (Qiagen). To detect interaction of PfI2WT with XePP1 we carried out immunoblot analysis of eluates from PfI2WT injected oocyte extracts after co-immunoprecipitation using anti-his antibodies (Qiagen) or anti-rabbit antibodies as control. The membranes were revealed either by anti-PP1 antibodies (Santa-Cruz Biotechnology) or by anti-his antibodies (Qiagen). Antibodies complexes were detected using the Western blotting Luminol Reagent: sc-2048 (Santa Cruz Biotechnology).

Assays for PfPP1 and effect of PfI2

The activity of PfPP1 with *p*-nitro-phenylphosphate (pNPP) as substrate was assayed exactly as previously described (**Daher W. 2006**). To investigate the role of PfI2 recombinant proteins or peptides on PfPP1 activity, different amounts of proteins were added to 1 µg of PfPP1 recombinant protein and preincubated for 30 min at 37°C before testing the PfPP1 phosphatase activity. Okadaic acid (data not show) was used as

control. Results are presented as mean of increase or decrease of phosphates activity in comparison to PfPP1 incubated in the reaction buffer.

Localisation of PfI2 and PfPP1 during the IDC

For an episomal expression of PfI2-GFP, the full-length coding region of *PfI2* was amplified by PCR using the primers Pr19 and Pr20 (Table S1) containing XhoI and KpnI restriction sites respectively. The PCR fragment was cloned into pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) and its nucleotide sequence was verified. The PCR product was then subcloned in frame with GFP into pARL vector (Kind gift of the Dr C. Sanchez Heidelberg, Germany)(**Kuhn Y. 2010**) digested with XhoI and KpnI. The plasmid carries the human *dhfr* gene for selection with WR99210. The Populations of stably transfected parasites were obtained after 6 weeks. Live parasites were analysed and images were recorded by fluorescence microscopy (Zeiss, LSM710).

Results

Cloning and analysis of Pf Inhibitor-2

Analysis of PlasmoDB using known Inhibitor-2 sequences identified PFC0886w gene encoding for a potential *P. falciparum* Inhibitor-2 homolog (PfI2). To establish the identity of *PfI2* sequence, we set out to determine the nucleotide sequence by RT-PCR using cDNA from total RNA of blood stage parasites and primers mentioned above. The amplification showed a PCR product of the predicted size, confirming its transcription and the microarray data available in PlasmoDB. A walking approach on cDNA from the untranslated 5' and 3' side allowed the validation of the start and stop codons respectively. The deduced amino acid sequence of the open reading frame corresponds to a protein containing 144 amino acids, revealing that PfI2 is the shortest amino acid sequence among I2 homologs. The Blast sequence analysis combined with visual inspection of PfI2 showed an overall identity of 24% (38 % similarity) and 31% identity (48% similarity) between amino acid at positions 5 to 105 of PfI2 when compared to human I2 (Genbank accession number: NM_006241) (Fig. 1A). Most interestingly, The PfI2 protein contains two, phylogenetically conserved peptides KTISW and KHYNE that fit perfectly to the [R/K]X[V/I]X[F/W] or RVXF motif and [K/R]HYNE binding motifs to PP1c (Fig. 1B). It is to note that there are 2 main differences in terms of binding sites between PfI2 and human I2. First, the pentapeptide KGILK sequence, found in the human I2 and shown to be required for interaction with PP1c is not present in the PfI2 sequence and second, the KSQKW of human I2 contains a Q residue instead of V or I of the consensus sequence.

Expression of PfI2 protein by P. falciparum

To investigate the expression of PfI2 by *P. falciparum*, polyclonal antibodies against a recombinant His6-PfI2 fusion protein were raised. As presented in Fig. 2A lane 1 (Red Ponceau staining), the recombinant protein whose amino acid sequence was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry, migrated at about 20 kDa, in agreement with anomalous electrophoric behavior of inhibitors of PP1 family. Although these antibodies strongly recognized the recombinant protein (Fig. 2A, lane 2), they were unable to react with any bands in total extracts of asynchronous blood stage parasites. In order to detect endogenous PfI2, we carried out immunoprecipitation experiments with anti-PfI2 sera or prebleed sera and total parasite extracts. Immunoblots with anti-PfI2 antibodies showed the presence of a band at 20 kDa in the immunoprecipitates with anti-PfI2 (Fig. 2, lane 2), while the pre-bleed serum did not show any specific band (Fig. 2B, lane1). To confirm this expression and to examine whether native PfI2 could be

among the partners of PfPP1, we performed affinity purification from total parasite extracts using recombinant His6-PfPP1 retained on Ni-NTA agarose beads. As depicted in Fig. 2C, immunoblot analysis of eluates with anti-PfI2 antibodies (lane 2) reacted with one band at 20 kDa, corresponding to the migration of the recombinant PfI2 protein. Lane 3 confirmed the presence of His-tagged PfPP1 by the use of mAb anti-His antibody.

Localization of PfI2 and PfPP1 in blood P. falciparum parasites

To follow up the trafficking of PfI2 during intraerythrocytic development cycle, we examined 3D7 parasites transfected with pARL2 construct mediating the expression of full-length GFP-fused *PfI2*. The use of this vector by Kuhn et al showed that the trafficking was assigned to the nature of the protein expressed (**Kuhn Y. 2010**). Using a mAb anti-GFP antibody, immunoblot analysis of total extract of blood stage parasites expressing PfI2-GFP revealed the presence of a specific band at 37 kDa, which is the expected molecular mass of the PfI2-GFP (Fig. 2D, lane 2). This demonstrates the integrity of the fused protein in transfected parasites. Examination of live parasites showed that the signal was confined within the parasite where the distribution seems to be nucleo-cytoplasmic (Fig. 2E), as the fluorescence partially overlapped DNA staining. The distribution appears to be diffuse in the late parasite stages with a main staining in the nucleus. The signal of PfI2-GFP is completely absent from the digestive food vacuole (Fig. 2E).

Genetic manipulation of PfI2

To study whether the lack of PfI2 expression could play a key role in the growth of blood stage parasites, attempts to disrupt the *PfI2* gene using the pCAM vector system were carried out. We transfected blood ring stage parasites of 3D7 strain with a pCAM construct containing a 5' fragment derived from genomic *PfI2* sequence and the BSD gene pCAM-BSD-PfI2, conferring resistance to blasticidin (Fig 3A). The presence of this construct in transfected parasites was checked by plasmid rescue approach as previously described (**Freville A. 2012**) (Data not shown). Analysis of genomic DNA obtained from resistant stable parasites by PCR (> 2 months of culture under blasticidin pressure), with specific primers indicated in the Table S1, (two independent transfection experiments) did not show the interruption of the *PfI2* gene (Fig 3C, lane8). The wild type gene was still amplified in genomic DNA even after prolonged culture (> 9 months drug cycling) and the plasmid remained episomal.

The absence of knock out parasites could be attributed either to the essentiality PfI2 to the viability of blood stage parasites or to the lack of accessibility of PfI2 to genetic manipulations. To exclude the latter hypothesis and to check the accessibility for recombination of *PfI2* locus, we introduced targeted modification in the locus without loss-of-function. To this end, 3D7 ring stage parasites were transfected with a plasmid containing the 3' end of the PfI2 coding region fused to the hemagglutinin sequence (Fig.3B). Genotype analysis by PCR, using one specific primer of PfI2 derived from the upstream region of the construct PfI2-HA and a primer corresponding to the hemagglutinin sequence showed the presence of a specific PCR product at the expected size, indicating the correct integration of PfI2 into the locus (Fig. 3D, lane8). Taken together, these data suggest that PfI2 is essential for the survival of blood stage parasites.

Effect of PfI2 on Phosphatase activity of PfPP1

Next, we assayed PfI2 for its potential capacity to regulate PfPP1 activity. As previously described, PfPP1 produced as recombinant His-tagged protein dephosphorylates pNPP substrate, is sensitive to known PP1 inhibitors and its activity is $Mn2^{+}$-dependent (**Daher W. 2006**). Using one concentration of PfPP1, within a range producing linear release of phosphate, the effect of wild recombinant, deleted or mutant PfI2 proteins was evaluated as described under experimental procedure, a strong decrease up to 80% of the phosphatase activity was observed when PfPP1 was preincubated with wild recombinant PfI2 (Fig. 4B). As PfI2 contains the 2 main motifs, ^{12}KTISW^{16} (RVXF consensus motif) and ^{102}HYNE^{105}, known to be essential for the function of Inhibitor-2, we explored the impact of these motifs on PfI2 function in terms of PP1 inhibition. To this end, deleted or mutated PfI2 proteins were produced and used in the functional assay (Fig.4A). The deletion of either the Nt (PfI2(19-144)) or Ct (PfI2(1-94)) portion containing the RVXF and HYNE motifs respectively of PfI2 protein abolished almost completely the inhibitory function of PfI2 (Fig. 4C, 4D). When PfI2W16A mutant protein was tested, we observed that this mutation led an almost loss of function of PfI2, whatever the concentration of PfI2W16A used (Fig. 4E). Indeed, The PfPP1 activity detected was identical to the control. In the case of PfI2Y103A mutant protein was used, a loss of function was observed at the low concentration, however, at higher concentrations of PfI2Y103A a decrease of ~50% of PfPP1 activity was observed (Fig. 4F), suggesting that this mutation partially affected the function of PfI2. These data suggest that KTISW motif is the major contributor for PfI2 function.

Study of PfI2-PfPP1 interaction and mapping of binding motifs

In order to assess the binding capacity of wild, deleted and mutated proteins of PfI2 with PfPP1, we used the yeast double hybrid system. The full length PfPP1 was cloned into pGBKT7 vector containing DNA binding domain (GAL4) and wild PfI2-HA, deleted or mutated version ((PfI2(1-94)-HA, PfI2(19-144)-HA, PfI2W16A-HA, PfI2Y103A-HA)) into pGADT7 containing activation domain (AD). The pGBKT7-PfPP1 construct was used to transform Y187 strain and maintained on SD media without tryptophan (SD-W) and PfI2 constructs were used to transform AH 109 strain and maintained on SD media lacking leucine (SD-L). Mating these two haploid strains results in the formation of diploid strain, which is viable on SD-LW. The interaction between PfPP1-GAL4 and PfI2-AD can be only evidenced by growing diploid strains on SD media lacking leucine, tryptophan, histidine (SD-LWH) or SD-LWHA (A for adenine). Mating assays between different strains are summarized in Fig. 5A, including those with control plasmids. All mated strains were shown to be able to grow on SD-LW (Fig. 5B), suggesting that they contained both constructs. In addition, Western blot analysis showed the expression of tagged PfPP1 (anti-GAL4 antibody) and the expression of PfI2 where expected (data not shown). On SD-LWH media, as expected, the diploid strain with PfPP1-wild PfI2 construct was viable (Fig. 5C). The mating of AH109 containing pGADT7-PfI2(19-144), mutated PfI2W16A or PfI2Y103A plasmid with Y187-pGBKT7-PfPP1 also showed a growth on SD-LWH media, however, the PfPP1-PfI2(1-94) construct was non-viable. When stringent culture conditions were used (SD-LWHA media), only the growth of the yeast strain containing PfPP1-PfI2Y103A construct was not observed (Fig. 5D). Taken together, the above results support the fact that the loss of PfI2 function cannot be only supported by a loss of interaction with PfPP1.

Initiation of G2/M in Xenopus oocytes by PfI2

Conservation of main motifs in PfI2 likely suggests its capacity to interact with vertebrate PP1 (highly conserved >85% identity) and to exert its function. Previous studies reported that the inhibition of PP1 in *Xenopus* oocytes by anti-PP1 antibodies triggered G2/M transition measured by the appearance of Germinal Vesicle Break Down or GVBD (**Huchon D. 1981**). Having established an inhibitory role of recombinant PfI2 on phosphatase activity of PfPP1 *in vitro*, we have followed up the induction of GVBD by microinjecting the wild or mutant recombinant proteins of PfI2. We have also evaluated the ability of Nt deleted PfI2 (PfI2(19-144)) as it is still able to bind PP1 although the RVXF motif was removed (Fig. 5 C, 5 D). Results presented in Fig. 6A did show that wild PfI2 was able to induce GVBD (~ 85%) when used at 100 ng in each oocyte. Under the same conditions, PfI2(19-144), PfI2W16A or PfI2Y103A proteins were ineffective for inducing GVBD. The presence of each protein in microinjected oocytes have been checked by immunoblots using anti-His mAb (Data not shown). In parallel, it was essential to check whether PfI2 recombinant protein can bind to *Xenopus* PP1 (XePP1). As shown in Fig. 6C, the use of specific PP1 antibody for immunoblot analysis of eluates co-immunoprecipitated with anti-His mAb revealed the presence of XePP1 in the complex (lane 3, lane 6). The complex PfI2-XePP1 can be detectable in *Xenopus* extracts 15 mn post micro-injection (lane 3).

The capacity of PfI2(19-144), PfI2W16A and PfI2Y103A to bind to PfPP1, together with the loss of their functions prompted us to examine their capacity to disrupt the function of wild PfI2. For this, oocytes were preinjected with the deleted or mutant proteins, incubated for 1 hr and followed by the injection of wild PfI2. The data evidenced that PfI2(19-144) as well as PfI2W16A were able to completely abrogated the function of PfI2 as no GVBD was observed (Fig. 6B). However, the PfI2Y103A did not seem to significantly affect the function of wild PfI2.

Discussion

Protein Phosphatase type 1 (PP1) has been shown to play diverse and essential roles in cell survival. Its dephosphorylation activity/specificity is accomplished by interaction of its catalytic subunit of PP1 (PP1c) with regulatory proteins (**Cohen PT. 2002**). Among these proteins, the inhibitor-2 (I2) is one of the most ancient PP1 regulators that is conserved from fungi to metazoans. In yeast, drosophila or mouse, ectopic or stable overexpression of I2 inhibits the PP1c dephosphorylation activity and phenotypically they are similar to loss-of-function mutants of PP1c, mainly with a defect in chromosomes segregation and cell cycle progression (**Tung HY. 1995, Bennett D. 2003, Kirchhefer U. 2005**). This underscores the key role of I2 and brings up a significant level of biological importance of this regulator comparable to that expressed by PP1c subunit itself (important in the investigation of the role of PP1). In this report, we present evidence that *Plasmodium falciparum*, the causative agent of the most deadly form of malaria, expresses a structural homolog of mammalian I2, designated as PfI2. Biochemical studies, in vitro and in vivo studies using yeast model revealed that PfI2 binds PP1, inhibits its activity and is able to overcome the G2/M cell cycle checkpoint in *Xenopus* oocytes by inducing the germinal vesicle breakdown. Genetic manipulations in *P. falciparum* suggest an essential role of PfI2 as no viable mutants with disrupted *PfI2* gene were detectable. Most importantly, we show that PfI2 peptides competing with docking sites exhibit strong anti-plasmodial activity against blood stage parasites in vitro, suggesting that PP1c-regulator interactions could be a novel

step for (targeting) the discovery of new means to control malaria.

The *PfI2* gene, in chromosome 3, encodes a protein of 144 amino acid related to I2 protein of different organisms, including human I2, which are known to inhibit PP1c activity in vitro. Of the three fundamental regions identified as binding motifs in I2 protein, specifically the KGILK, RVXF, and HYNE motifs, PfI2 contained only the degenerate RVXF (^{12}KTISW^{16}) and the ^{102}HYNE^{105} sequences. The lack of KGILK in PfI2 was supported by bioinformatics analysis indicating the absence of this sequence in all open reading frames present in chromosome 3 and was further confirmed by a 5'cDNA walking approach. However, it is important to note that studies on the interaction of KGILK site in vertebrate I2 showed its involvement in the interaction with PP1 through the region of amino acids 50-59 in the PP1c (**Hurley TD. 2007**). Moreover, deletion of the N-terminal side of I2 containing this site and mutation of the first Lys or the Ile dramatically reduced the inhibition capacity of I2 (>500 fold decrease) (**Yang J. 2000, Park IK & DePaoli-Roach AA. 1994**). These observations emphasize the importance of this site in binding capacity and activity of vertebrate I2 which is a major difference with PfI2 lacking this motif. With respect to the RVXF site, vertebrate I2 did not contain the canonical motif falling within the consensus sequence [R/K]X0-1[V/I]X0-1[F/W]. However, subsequent studies on the crystal of PP1c-I2 revealed that the sequence KSQKW where Val/Ile residue is replaced by Gln docked in the PP1 groove which usually binds the RVXF motif (**Hurley TD. 2007**). Structure-activity studies on the implication of KSQKW site showed that the mutation of Tyr in mammalian or drosophila I2 drastically reduced the inhibitory activity of I2. It is worth noting that almost all I2 protein contain Gln at the position of Val/Ile. In *P. falciparum*, I2 protein does contain an Ile in the RVXF motif, a second important dissimilarity between PfI2 and other I2 proteins. The comparaison of PfI2 with putative I2 of *Toxoplasma gondii* or *Neospora canium* (TGGT1_114760, NCLIV_032710), revealed the presence of the consensus RVXF sequence where V/I is replaced by Leu, respecting the hydrophobicity of the residue and suggesting a conservation within related apicomplexa parasites. Studies on the third site of interaction, HYNE, have shown that His and Tyr residues are important residues in the interaction with PP1c and firstly proposed that this motif functions as a 'degenerate' RVXF motif (**Yang J. 2000, Helps NR & Cohen PT. 1999**). More recent studies clearly showed that the region containing the HYNE motif interacts directly with the active site of PP1c (implying ^{272}Tyr and ^{96}Arg residues of PP1c) with a major contribution of His and Tyr residues (**Yang J. 2000, Hurley TD. 2007**). This excludes completely the idea of a competition of binding to PP1c between RVXF and HYNE motifs and suggests that the His and Tyr residues of I2 promote the displacement of the catalytic metal. In PfI2 protein, these two residues are conserved.

Among the three binding sites of I2, the best-identified and most widely found in PP1 partners is the [R/K]X0-1[V/I]X0-1[F/W] consensus motif, delineated as KTISW in PfI2. The presence of RVXF in about 25-30% of eukaryotic proteins is not a sufficient indicator in itself to classify a protein as a PP1c regulator (**Bollen M. 2010**). These observations, together with the fact that PfI2 is the shortest I2 protein identified so far (144 amino acids for PfI2 vs 164-205 for other I2) and the absence of one binding site and a fundamental difference in a second one raised the question about the capacity of PfI2 to bind and to regulate PfPP1. Using wild recombinant proteins, we showed that labeled PfPP1 was able to bind to PfI2 and vice versa (not

shown). This interaction was further validated by the use of a double yeast hybrid system, confirming the interaction of wild PfI2-PfPP1c and suggesting a strong interaction as the mated PfI2 and PfPP1 yeast strains were able to grow on SD-LWHA medium. In order to explore the contribution of PfI2 RVXF and HYNE motifs for the interaction with PfPP1, deleted and single mutation of PfI2 were used. These assays revealed that PfI2 lacking the RVXF motif (PfI219-144) or mutated versions (PfI2 W16A, PfI2 Y103A) did not affect the binding with PP1c when yeast strains were grown on SD-LWH. Surprisingly, under more stringent culture conditions (SD-LWHA), all deleted and mutated PfI2 versions were still able to grow up except the PfI2Y103A. These observations point out the absence of a single and major site of interaction in PfI2 as it has been found for Pf Inhibitor-3 (PfI3) we previously reported and where the mutation of W completely abolished the binding/function of PfI3 (**Freville A. 2012**). PfI3 exhibits a totally disorganized structure and seems to bind first to the PfPP1 via the RVXF groove and folds afterwards to accomplish its function (**Freville A. 2012**). Regarding I2, previous studies suggested a main role for the RVXF motif along with secondary binding sites which should be intrinsically structured for an efficient binding to PP1c (**Park IK & DePaoli-Roach AA. 1994, Yang J. 2000, Huang HB. 1999**). Analysis of PfI2 using protein secondary structure prediction software PsiPred (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) predicted that the RVXF motif is a part on an unstructured region, while the HYNE is within a α-helix structure occurring between positions 70 and 120. This structure is in agreement with that identified in mammalian I2 (**Hurley TD. 2007**). The role of this structure in PfI2-PfPP1c was substantiated by the lack of binding of PfI2 deleted of its region containing the α-helix (PfI2 1-94). In the case of mutated PfI2, double hybrid yeast approach did support a role of Tyr103 in the stabilization of PfI2-PfPP1 binding under stringent culture conditions.

It has been shown that most I2 proteins were able to drastically decrease PP1c activity towards different non-specific substrates such as Phosphorylase A pNPP or MBP. In order to investigate the capacity of PfI2 to inhibit the PfPP1, we used an *in vitro* assay with pNPP as substrate. We previously showed the ability of PfPP1 recombinant protein is catalytically active and is sensitive to natural toxins such as okadaic acid (**Daher W. 2006**). As expected, the addition of PfI2 at nanomolar range significantly decreased the PfPP1 activity up to 80% (Fig. 4B). Next, we investigated the impact of KTISW and HYNE motifs on PfI2 regulation activity. To this end, we produced and tested under the same conditions different versions of deleted or mutated recombinant proteins. Results depicted in Figure 4 clearly demonstrated a key contribution of the RVXF motif (KTISW) to the function of PfI2 as both deleted PfI2 (19-144)) and mutated protein (PfI216WA) were unable to inhibit PfPP1 activity. The involvement of the HYNE domain seems to be less important, although the deleted PfI2 protein lacking this motif abolished almost completely the inhibitory capacity. Indeed, the use of the mutated PfI2Y103A recovered its capacity of inhibition (~50%) when high concentrations of PfI2Y103A were used. Taken together, these data suggest that the RVXF is a vital site for the inhibitory activity of PfI2, although binding experiments did not reveal any impact on the binding of PfI2 when PfI2W16A was used. However, under stringent conditions, HYNE site is required for a stable binding of PfI2. To further reinforce the inhibitory activity of PfI2 and the role of the two motifs, we took advantage of the *Xenopus* model where oocytes are physiologically arrested in G2/M prophase I (**Nebreda AR & Ferby I. 2000**). The injection of *Xenopus* I2 (spanning 188 residues

and containing the KGILK, KSQKW and HYNE motifs) or anti PP1 antibodies to these oocytes induced germinal vesicle breakdown or GVBD (**Huchon D. 1981, Satinover DL. 2006**). We observed that the microinjection of recombinant PfI2 to oocytes promoted the progression to M phase, inducing GVBD. Coimmunoprecipitation experiments confirmed he interaction of PfI2 with *Xenopus* PP1c. These data evidenced that PfI2 can function in cells without the need of the KGILK site and are in accordance with previous studies which showed the *Xenopus* I2 involvement in G2/M transition (**Satinover DL. 2006**) or the Glc8 (yeast inhibitor 2) implication in cell cycle (**Tung HY. 1995, Wang W,Stukenberg PT,. 2008a, Wang W,Cronmiller C,. 2008**). Deletion, mutation or RNA interference studies carried out on inhibitor 2 demonstrated its implication in cell cycle, chromosome segregation, embryogenic development (**Satinover DL. 2006, Tung HY. 1995, Wang W,Stukenberg PT,. 2008b**). In the case of PfI2, when deleted PfI2 (19-144) lacking RVXF or mutated proteins (PfI2W16A or PfI2Y103A) were microinjected, no GVBD was observed, demonstrating the importance of these site in the functional capacity of PfI2. Based on the above results indicating that the PfI2 mutated proteins are able to bind PP1 but unable to inhibit its function, we examined whether the preinjection of deleted or mutated PfI2 proteins may block the role of wild PfI2. The preinjection of either PfI2(19-144) or PfI2W16A were able to block the induction of GVBD while the PfI2Y103A did not. One explanation of these observations is that the HYNE-dependent binding is critical as the injection of the wild recombinant PfI2 is able to displace this mutated protein and to induce the GVBD. However the RVXF-independent binding of PfI2 is sufficiently stable to prevent its displacement. Closer examination of PfI2 amino acid sequence revealed the presence of a PXTP motif (^{37}PNTP^{40}), present also in other I2. The phosphorylation of the T within this site abrogated the function of I2. In PfI2, the replacement of T by D did not impact either the binding or the function of PfI2 (Data not shown), excluding the phospho-regulation of I2 at this site. These data are rather in agreement with the recent Pf phosphoproteome showing the phosphorylation of PfI2 at positions T^{13}, S^{48}, S^{50}, S^{115}, T^{117} and S^{142}. The impact of PfI2 phosphorylation will await further investigations on these phosphorylated residues. At this stage, it is important to mention that, beside the capacity to interact with PP1c, human I2 has been shown to participate in a direct kinases-dependent signaling network. It has been found that I2 was able to bind and to activate Nek2 and Aurora-A kinase (**Eto M,Elliott E,. 2002, Satinover DL. 2004b**). For these functions, I2 seems to operate through its C-terminal domain as the protein I2 1-118 failed to interact with these kinases, excluding the KGILK and RVXF motifs. The capacity of PfI2 to bind Pf kinases should be evaluated, although PfI2 sequence is 61amino acids shorter than its human homologue.

In *P. falciparum*, microarray analysis detected PfI2 mRNA in all blood parasite stages and gametocytes (data available in PlasmoDB, www.plasmodb.org). In this work, direct immunoblot analysis of total parasite extracts did not allow the detection of PfI2 protein, however, coimmunoprecipitation experiments with antibodies anti-PfI2 followed by Western blot and the use of PfPP1 column affinity clearly revealed the expression of PfI2 protein by *P. falciparum* and of its capacity to bind PfPP1 confirming the results mentioned above. To gain further insight into the profile of expression, we followed up the PfI2-GFP tagged protein in live transfected parasites. The distribution is nucleocytoplasmic, like PfPP1 (**Daher W. 2006**), with a strong

accumulation in the nucleus that is in agreement with the localization of other I2 proteins (**Leach C. 2002**). Indeed the mammalian I2 fused to GFP has been localized in both the cytoplasm and the nucleus, with an active import to the latter compartment, supported by the presence of 2 putative nuclear localization signals (**Leach C. 2002, Gerace L. 1995, Quimby BB & Corbett AH. 2001**). Earlier studies designed to follow up the expression of I2 during cell cycle showed an accumulation in the nucleus when human cells progressed into S phase (**Kakinoki Y. 1997**). In the case of PfI2, the use of PSORTII software (http://psort.hgc.jp) revealed a putative nuclear signal (sequence position ^{98}KRKKHYNEYKMLQKLRK^{114}) with a reliability of 94%. We previously reported that PfLRR1 and inhibitor-3, the first identified regulatory subunits of PfPP1c localized to the nucleus, evoking a specific role in this compartment (**Freville A. 2012, Daher W. 2006**). The present study suggests an additional role of the PfI2 regulatory subunit of PP1c, present in the cytoplasm. Our reverse genetic studies strongly suggest a critical role for PfI2 in the erythrocytic asexual cycle in vitro as no parasites with disrupted *PfI2* gene were viable. Definition of the PfI2 role(s) during the life cycle necessitates further work, namely with the development of a powerful inducible expression system for *P. falciparum*.

References

Bennett, D, Szoor, B, Gross, S, Vereshchagina, N & Alphey, L (**2003**) Ectopic expression of inhibitors of protein phosphatase type 1 (PP1) can be used to analyze roles of PP1 in Drosophila development. *Genetics*, 164, 235-245.

Bhattacharyya, MK, Hong, Z, Kongkasuriyachai, D & Kumar, N (**2002**) Plasmodium falciparum protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in Saccharomyces cerevisiae. *International journal for parasitology*, 32, 739-747.

Blisnick, T, Vincensini, L, Fall, G & Braun-Breton, C (**2006**) Protein phosphatase 1, a Plasmodium falciparum essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. *Cell Microbiol*, 8, 591-601.

Bollen, M, Peti, W, Ragusa, MJ & Beullens, M (**2010**) The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci*, 35, 450-458.

Cayla, X, Garcia, A, Baumgartner, M, Ozon, R & Langsley, G (**2000**) A Theileria parva type 1 protein phosphatase activity. *Mol Biochem Parasitol*, 110, 161-166.

Ceulemans, H & Bollen, M (**2004**) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiological reviews*, 84, 1-39.

Ceulemans, H, Stalmans, W & Bollen, M (**2002**) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*, 24, 371-381.

Cohen, PT (**2002**) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *Journal of cell science*, 115, 241-256.

Daher, W, Browaeys, E, Pierrot, C, Jouin, H, Dive, D, Meurice, E, Dissous, C, Capron, M, Tomavo, S, Doerig, C, Cailliau, K & Khalife, J (**2006**) Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by PfLRR1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol*, 60, 578-590.

Dluzewski, AR & Garcia, CR (**1996**) Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of Plasmodium falciparum by kinase inhibitors. *Experientia*, 52, 621-623.

Doerig, C (**2004**) Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*, 1697, 155-168.

Doerig, C, Abdi, A, Bland, N, Eschenlauer, S, Dorin-Semblat, D, Fennell, C, Halbert, J, Holland, Z, Nivez, MP, Semblat, JP, Sicard, A & Reininger, L (**2010**) Malaria: targeting parasite and host cell kinomes. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 604-612.

Doerig, C, Billker, O, Haystead, T, Sharma, P, Tobin, AB & Waters, NC (**2008**) Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol*, 24, 570-577.

Doerig, C & Tobin, AB (**2010**) Parasite protein kinases: at home and abroad. *Cell host & microbe*, 8, 305-307.

Eto, M, Elliott, E, Prickett, TD & Brautigan, DL (**2002**) Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with NimA-related kinase to induce centrosome separation. *J Biol Chem*, 277, 44013-44020.

Fardilha, M, Esteves, SL, Korrodi-Gregorio, L, da Cruz e Silva, OA & da Cruz e Silva, FF (**2010**) The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interacting proteins to health and disease. *Curr Med Chem*, 17, 3996-4017.

Freville, A, Landrieu, I, Garcia-Gimeno, MA, Vicogne, J, Montbarbon, M, Bertin, B, Verger, A, Kalamou, H, Sanz, P, Werkmeister, E, Pierrot, C & Khalife, J (**2012**) Plasmodium falciparum inhibitor-3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival. *J Biol Chem*, 287, 1306-1321.

Gamo, FJ, Sanz, LM, Vidal, J, de Cozar, C, Alvarez, E, Lavandera, JL, Vanderwall, DE, Green, DV, Kumar, V, Hasan, S, Brown, JR, Peishoff, CE, Cardon, LR & Garcia-Bustos, JF (**2010**) Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*, 465, 305-310.

Gerace, L (**1995**) Nuclear export signals and the fast track to the cytoplasm. *Cell*, 82, 341-344.

Ginsburg, H, Landau, I, Baccam, D & Mazier, D (**1987**) Fractionation of mouse malarious blood according to parasite developmental stage, using a Percoll-sorbitol gradient. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 62, 418-425.

Helps, NR & Cohen, PT (**1999**) Drosophila melanogaster protein phosphatase inhibitor-2: identification of a site important for PP1 inhibition. *FEBS Lett*, 463, 72-76.

Helps, NR, Vergidou, C, Gaskell, T & Cohen, PT (**1998**) Characterisation of a novel Drosophila melanogaster testis specific PP1 inhibitor related to mammalian inhibitor-2: identification of the site of interaction with PP1. *FEBS Lett*, 438, 131-136.

Hendrickx, A, Beullens, M, Ceulemans, H, Den Abt, T, Van Eynde, A, Nicolaescu, E, Lesage, B & Bollen, M (**2009**) Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem Biol*, 16, 365-371.

Holmes, CF, Campbell, DG, Caudwell, FB, Aitken, A & Cohen, P (**1986**) The protein phosphatases involved in cellular regulation. Primary structure of inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, 155, 173-182.

Huang, FL & Glinsmann, WH (**1976**) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, 70, 419-426.

Huang, HB, Horiuchi, A, Watanabe, T, Shih, SR, Tsay, HJ, Li, HC, Greengard, P & Nairn, AC (**1999**) Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem*, 274, 7870-7878.

Huchon, D, Ozon, R & Demaille, JG (**1981**) Protein phosphatase-1 is involved in Xenopus oocyte maturation. *Nature*, 294, 358-359.

Hurley, TD, Yang, J, Zhang, L, Goodwin, KD, Zou, Q, Cortese, M, Dunker, AK & DePaoli-Roach, AA (**2007**) Structural basis for regulation of protein phosphatase 1 by inhibitor-2. *J Biol Chem*, 282, 28874-28883.

Kakinoki, Y, Somers, J & Brautigan, DL (**1997**) Multisite phosphorylation and the nuclear localization of phosphatase inhibitor 2-green fluorescent protein fusion protein during S phase of the cell growth cycle. *J Biol Chem*, 272, 32308-32314.

Kirchhefer, U, Baba, HA, Boknik, P, Breeden, KM, Mavila, N, Bruchert, N, Justus, I, Matus, M, Schmitz, W, Depaoli-Roach, AA & Neumann, J (**2005**) Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res*, 68, 98-108.

Kuhn, Y, Sanchez, CP, Ayoub, D, Saridaki, T, van Dorsselaer, A & Lanzer, M (**2010**) Trafficking of the phosphoprotein PfCRT to the digestive vacuolar membrane in Plasmodium falciparum. *Traffic*, 11, 236-249.

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

Leach, C, Eto, M & Brautigan, DL (**2002**) Domains of type 1 protein phosphatase inhibitor-2 required for nuclear and cytoplasmic localization in response to cell-cell contact. *Journal of cell science*, 115, 3739-3745.

Li, M, Satinover, DL & Brautigan, DL (**2007**) Phosphorylation and functions of inhibitor-2 family of proteins. *Biochemistry*, 46, 2380-2389.

Nebreda, AR & Ferby, I (**2000**) Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 666-675.

Park, IK & DePaoli-Roach, AA (**1994**) Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *J Biol Chem*, 269, 28919-28928.

Quimby, BB & Corbett, AH (**2001**) Nuclear transport mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, 58, 1766-1773.

Satinover, DL, Brautigan, DL & Stukenberg, PT (**2006**) Aurora-A kinase and inhibitor-2 regulate the cyclin threshold for mitotic entry in Xenopus early embryonic cell cycles. *Cell Cycle*, 5, 2268-2274.

Satinover, DL, Leach, CA, Stukenberg, PT & Brautigan, DL (**2004**) Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 8625-8630.

Sidhu, AB, Valderramos, SG & Fidock, DA (**2005**) pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol*, 57, 913-926.

Solyakov, L, Halbert, J, Alam, MM, Semblat, JP, Dorin-Semblat, D, Reininger, L, Bottrill, AR, Mistry, S, Abdi, A, Fennell, C, Holland, Z, Demarta, C, Bouza, Y, Sicard, A, Nivez, MP, Eschenlauer, S, Lama, T, Thomas, DC, Sharma, P, Agarwal, S, Kern, S, Pradel, G, Graciotti, M, Tobin, AB & Doerig, C (**2011**) Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature communications*, 2, 565.

Tewari, R, Straschil, U, Bateman, A, Bohme, U, Cherevach, I, Gong, P, Pain, A & Billker, O (**2010**) The systematic functional analysis of Plasmodium protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. *Cell Host Microbe*, 8, 377-387.

Trager, W & Jensen, JB (**1976**) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193, 673-675.

Treeck, M, Sanders, JL, Elias, JE & Boothroyd, JC (**2011**) The phosphoproteomes of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. *Cell Host Microbe*, 10, 410-419.

Tung, HY, Wang, W & Chan, CS (**1995**) Regulation of chromosome segregation by Glc8p, a structural homolog of mammalian inhibitor 2 that functions as both an activator and an inhibitor of yeast protein phosphatase 1. *Mol Cell Biol*, 15, 6064-6074.

Umlas, J & Fallon, JN (**1971**) New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis. *Am J Trop Med Hyg*, 20, 527-529.

Vernes, A, Haynes, JD, Tapchaisri, P, Williams, JL, Dutoit, E & Diggs, CL (**1984**) Plasmodium falciparum strain-specific human antibody inhibits merozoite invasion of erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg*, 33, 197-203.

Vicogne, J, Cailliau, K, Tulasne, D, Browaeys, E, Yan, YT, Fafeur, V, Vilain, JP, Legrand, D, Trolet, J & Dissous, C (**2004**) Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth Schistosoma mansoni. *J Biol Chem*, 279, 37407-37414.

Wakula, P, Beullens, M, Ceulemans, H, Stalmans, W & Bollen, M (**2003**) Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, 278, 18817-18823.

Wang, W, Cronmiller, C & Brautigan, DL (**2008**) Maternal phosphatase inhibitor-2 is required for proper chromosome segregation and mitotic synchrony during Drosophila embryogenesis. *Genetics*, 179, 1823-1833.

Wang, W, Stukenberg, PT & Brautigan, DL (**2008a**) Phosphatase inhibitor-2 balances protein phosphatase 1 and aurora B kinase for chromosome segregation and cytokinesis in human retinal epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 19, 4852-4862.

Wang, W, Stukenberg, PT & Brautigan, DL (**2008b**) Phosphatase inhibitor-2 balances protein phosphatase 1 and aurora B kinase for chromosome segregation and cytokinesis in human retinal epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 19, 4852-4862.

Ward, GE, Fujioka, H, Aikawa, M & Miller, LH (**1994**) Staurosporine inhibits invasion of erythrocytes by malarial merozoites. *Exp Parasitol*, 79, 480-487.

Yang, J, Hurley, TD & DePaoli-Roach, AA (**2000**) Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif. *J Biol Chem*, 275, 22635-22644.

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

A

```
HuI2:MAASTASHRPIKGILKNKTSTTSSMVASAEQPRGNVDEELSKKSQKWDEMNI 52
PfI2:-------------------------------MKKKVDKSVTKKTISWDEVTI 21
                                     : :**:.::**: .***:.*

HuI2: LATYHPADKDYG-LMKIDEPSTPYHSMMGDDEDACSDTEATEAMAPDILA 101
PfI2: NE----QDKERGSRMKILEPNTPFNFILMDSASEDEASKYGDVKGSDEGQ 67
            **: *  *** **.**:: :: *. .  . ::  :. ..*

HuI2: RKLAAAEGLEPKYRIQEQESSGEEDSDLSPEEREKKRQFEMKRKLHYNEG 151
PfI2: NNIADDLINKLNQLVEKQENKGVSNID—----------FKEKRKKHYNEY 106
      .::*     : :  :::**..* .: *           *  *** ****

HuI2: LNIKLARQLISKDLHDDDEDEEMLETADGESMNTEESNQGSTPSDQQQNK 201
PfI2: KMLQKLRKSGTL---------- DDIDEEYKPDNKDSNCDNSNMNESEE- 145

HuI2: LRSS 205
PfI2: ---- 144
```

B

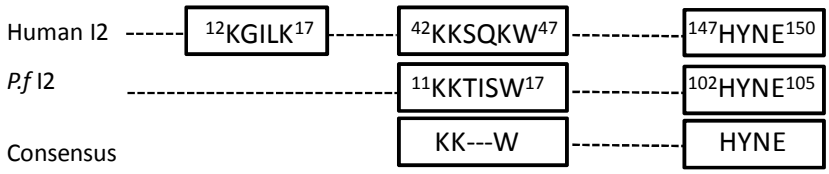


Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *P. falciparum* inhibitor 2 (PfI2). A. Analysis of amino acid sequence of PfI2. PfI2 (Plasmo DB gene identifier PFC0886w) was aligned with the Human Inhibitor 2 (HuI2 (Genbank accession number: NM_006241)) homologous using Clustal W. The idendical residues are shown by a star. Amino acids are numbered to the right of the sequence. **B**. Known interaction sequences between Human I2 and PP1 were compared to PfI2 sequences.

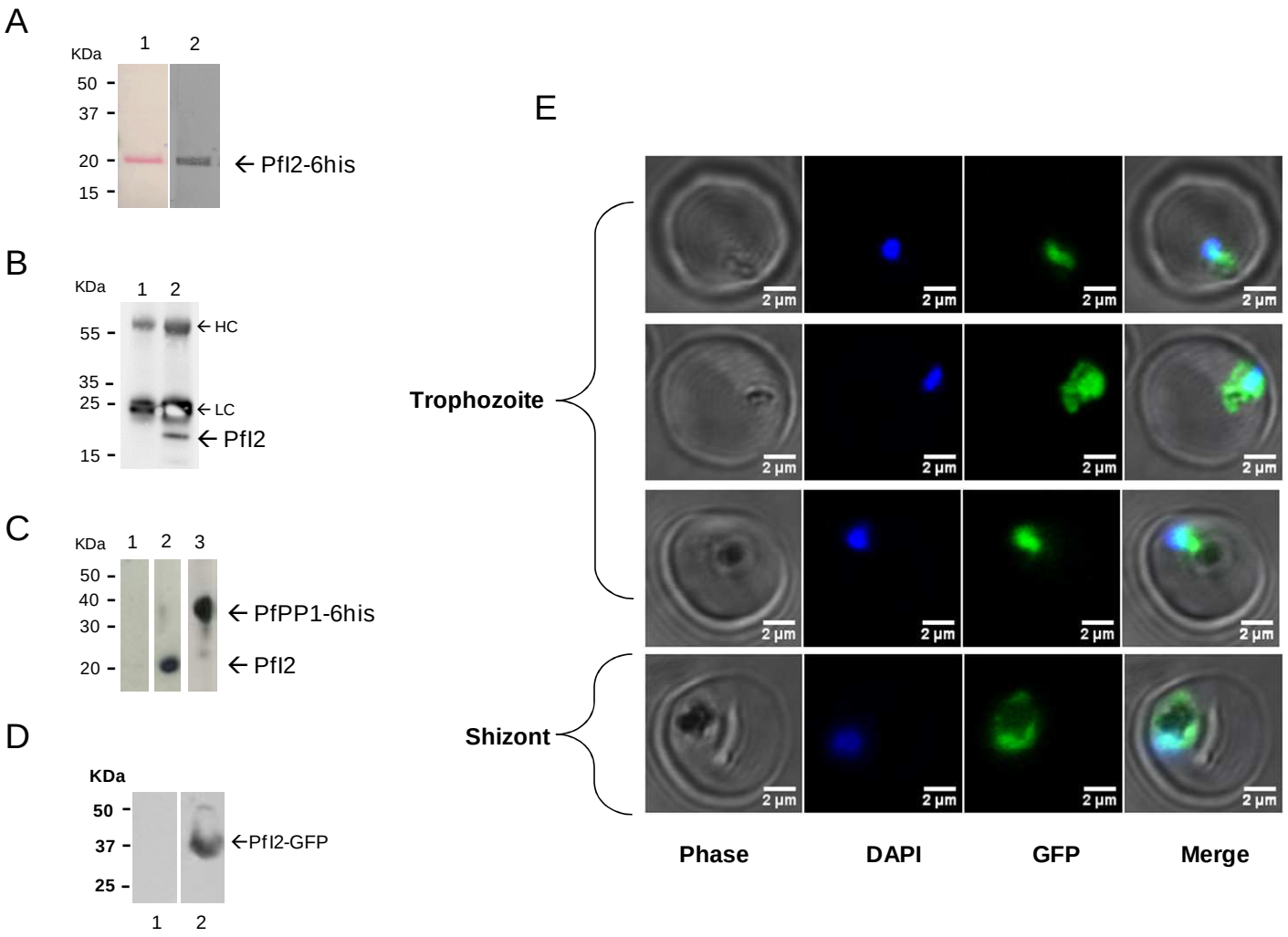


Figure 2. Expression and localization of the PfI2 gene product by *P. falciparum*. A. Purified His-fusion PfI2 separated by 15% SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose (Red Ponceau staining, lane 1) and revealed with mAb anti-His (lane 2) showed a single band at ~ 20kDa, indicating an anomalous electrophoretic migration of PfI3 (expected size 16.7 kDa). The identity of the purified recombinant PfI2 has been further confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry**. B.** Immunoprecipitation of native PfI2 with anti-PfI2 polyclonal antibodies from *Plasmodium falciparum* extracts. Immunoprecipitated proteins with preimmune serum (lane 1) or with anti-PfI2 antisera (lane 2) were eluted, separated by SDS-PAGE (4-12%gel) and transferred to nitrocellulose. Immunoblot analysis was performed with anti-PfI2 antibodies and revealed as described in Materials and Methods. **C.** Detection of endogenous PfI2 in total proteins extracted from asynchronous cultures of *P. falciparum*. Total protein extracts (10mg) pre-cleared on Ni-NTA sepharose beads were incubated overnight with 6xHis-tagged PfPP1 affinity Ni-NTA column. After washings, proteins eluted with SDS-PAGE loading buffer were migrated and blotted to nitrocellulose. The blots were probed with preimmune serum (lane1), anti-PfI2 (lane2) or with anti-His mAb antibodies (lane3). The blots were revealed as described in Materials and Methods. **D.** Immunoblot analysis of pARL2-PfI2-GFP transfected *P. falciparum*. Protein extracted from wild-type parasites (lane1) or from transfected parasites (lane2) were subjected to western-blotting and probed with anti-GFP antibodies. **E.** Expression and localization of PfI2-GFP throughout the erythrocytic cell cycle of *P. falciparum.* Parasites were transfected with pARL2-PfI2-GFP construct as described in Material and Methods and live transfectants were analysed by fluorescence microscopy.

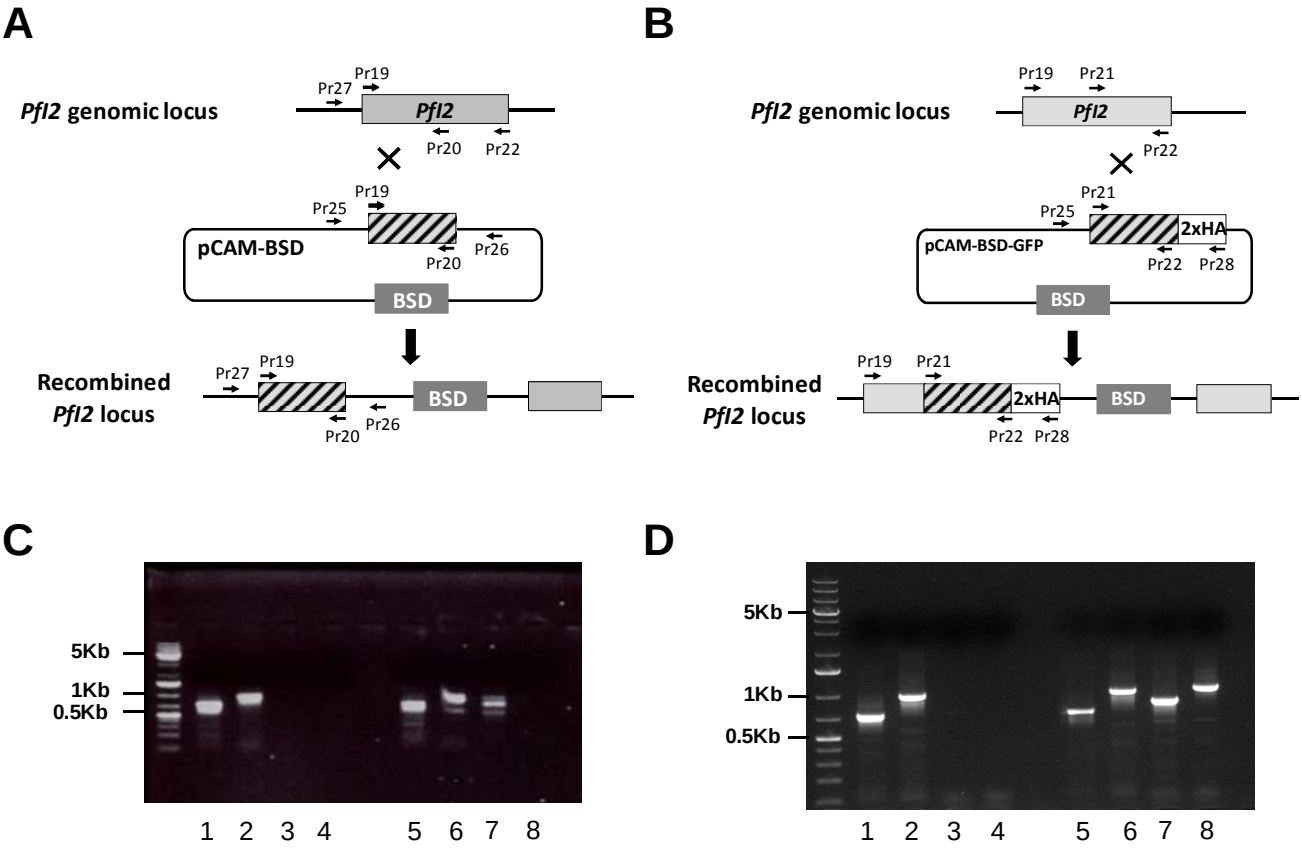


Figure 3. Targeted gene disruption and HA-tagging of the *PfI2* locus. A. Gene-targeting construct for gene disruption by single homologous recombination using the pCAM-BSD, and the locus resulting from integration of the knock-out construct . **B.** epitope tagging of PfI2 by knock-in strategy. Insertion of an HA epitope tag at the C terminus of *PfI2* by single homologous recombination (knock-in).The location of the primers (Pr1,Pr18, Pr25, Pr26, Pr27, Pr28,Pr29, Pr30) (Table S1) used for PCR analysis are indicated as well as the blasticidin-resistance cassette (BSD). **C.** Analysis of pCAM-BSD-PfI2 transfected 3D7 culture by PCR (Knock-out strategy). Lanes 1-4 correspond to DNA extracted from wild type parasites; lanes 5-8 correspond to DNA extracted from transfected parasites. Lanes 1 and 5 represent the detection of a portion of wild type locus (PCR with Pr19 and Pr20); lanes 2 and 6 represent the detection of wild type locus (PCR with Pr19 and Pr22); lanes 3 and 7 represent the detection of episomal DNA(PCR with Pr25 and Pr26) and lanes 4 and 8 represent the detection of the integration at the 5'end of the insert (PCR with Pr27 and Pr26). The absence of amplication of a PCR product using genomic DNA prepared from transfected parasite culture using Pr27 and Pr26 as primers indicated the lack of homologous recombinaison (lane 8). **B.** Analysis of pCAM-PfI2-2HA transfected 3D7 culture by PCR (Knock-in strategy).). Lanes 1-4 correspond to DNA extracted from wild type parasites; lanes 5-8 correspond to DNA extracted from transfected parasites. Lanes 1 and 5 represent the detection of a portion of wild type locus (PCR with Pr21 and Pr22); lanes 2 and 6 represent the detection of wild type locus (PCR with Pr19 and Pr22); lanes 3 and 7 represent the detection of episomal DNA (PCR with Pr25 and Pr28) and lanes 4 and 8 represent the detection of the integration at the 3'end of the insert (PCR with Pr19 and Pr28). The amplication of a PCR product at ~ 1000 pb using genomic DNA prepared from transfected parasite culture using Pr19 and Pr28 as primers indicated the homologous recombinaison and integration of the 2-HA construct in endogenous *PfI2* (lane 8)

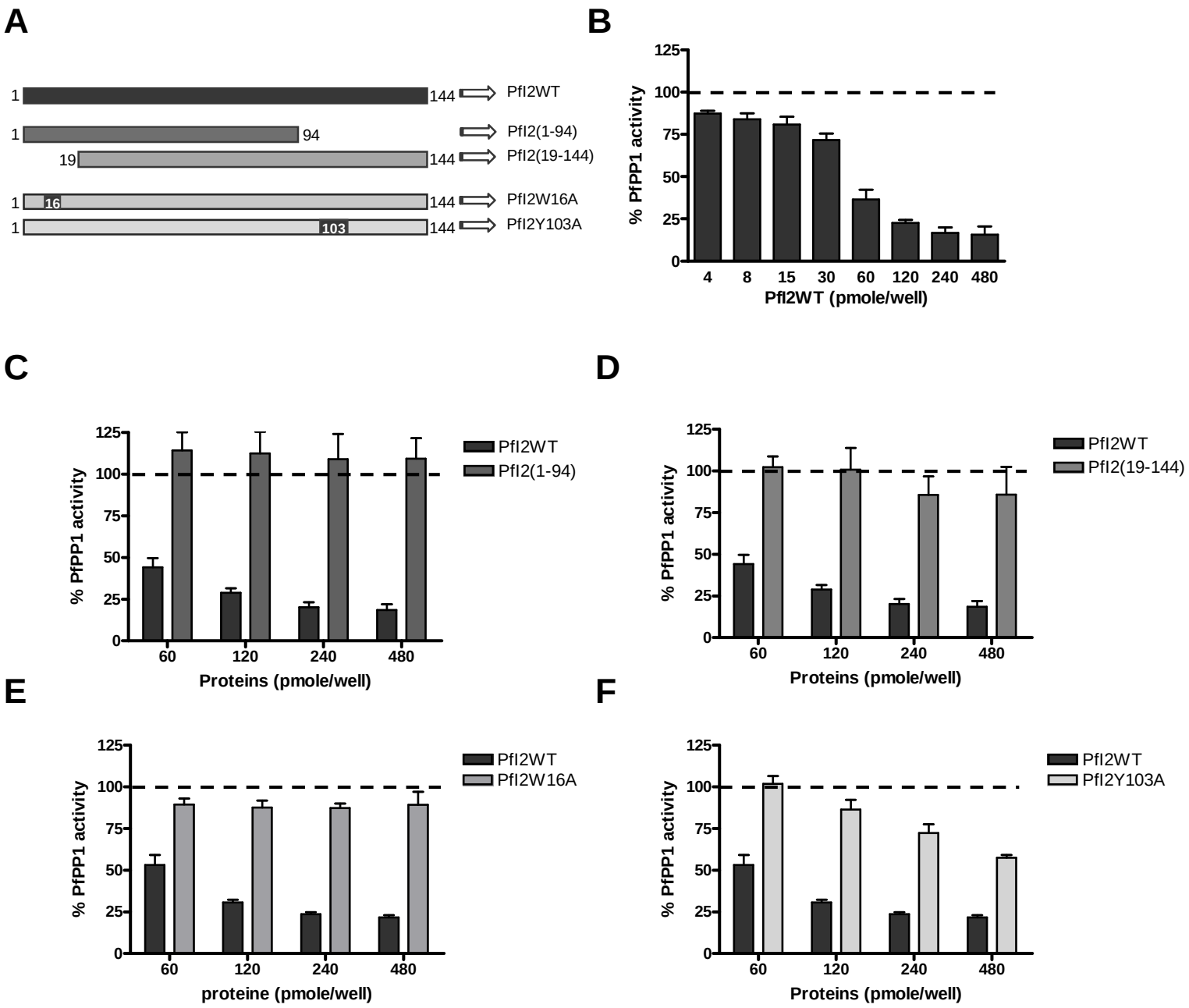
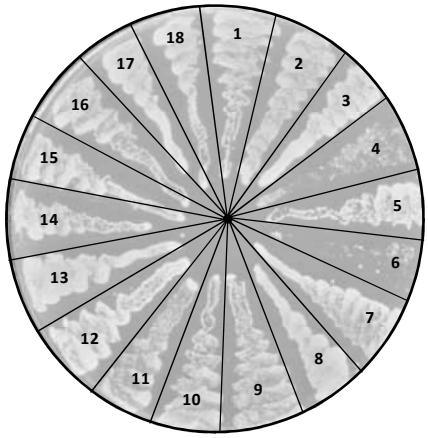


Figure.4. Effect of PfI2 on PfPP1 phosphatase activity. Scheme of recombinant WT, deleted and mutated proteins used in this assay (**A**). Recombinant PfPP1 at 27.03 nM (2.5µg) was pre-incubated for 30 min at 37°C with different concentrations of PfI2WT (**B**), PfI2(1-94) (**C**), PfI2(19-144) (**D**), PfI2W16A (**E**) and PfI2Y103A (**F**) recombinant proteins before the addition of pNPP. Results presented as % of relative increase or decrease are means ± SEM of four independent experiments performed in duplicate.

A

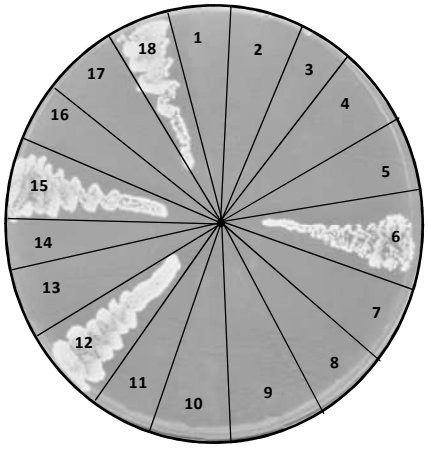
Y187 / AH 109	pGBKT7	pGBKT7 lam	pGBKT7 PfPP1
pGADT7	1	2	3
pGADT7 PfI2	4	5	**6**
pGADT7 PfI2(1-94)	7	8	9
pGADT7 PfI2 (19-144)	10	11	**12**
pGADT7 PfI2 W16A	13	14	**15**
pGADT7 PfI2Y103A	16	17	**18**

B



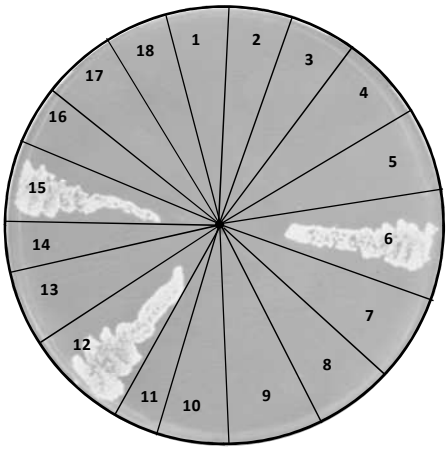
SD-LW

C



SD-LWH

D



SD-LWHA

Figure.5. Study of PfI2-PfPP1 interaction and mapping of binding motifs in yeast two hybrid system. pGBKT7, pGBKT7-lam, pGBKT7-PfPP1 constructs were inserted into mat α (Y187) yeast and pGADT7, pGADT7-PfI2, pGADT7-PfI2(1-94), pGADT7-PfI2(19-144), pGADT7-PfI2W16A and pGADT7-PfI2Y103A constructs into mat a (AH109) yeast. These transformations were followed by mating (table (**A**)). Yeast diploids were checked on SD-LW plates (**B**) and interactions were identified by growth on SD-LWH (**C**) or SD-LWHA (**D**)

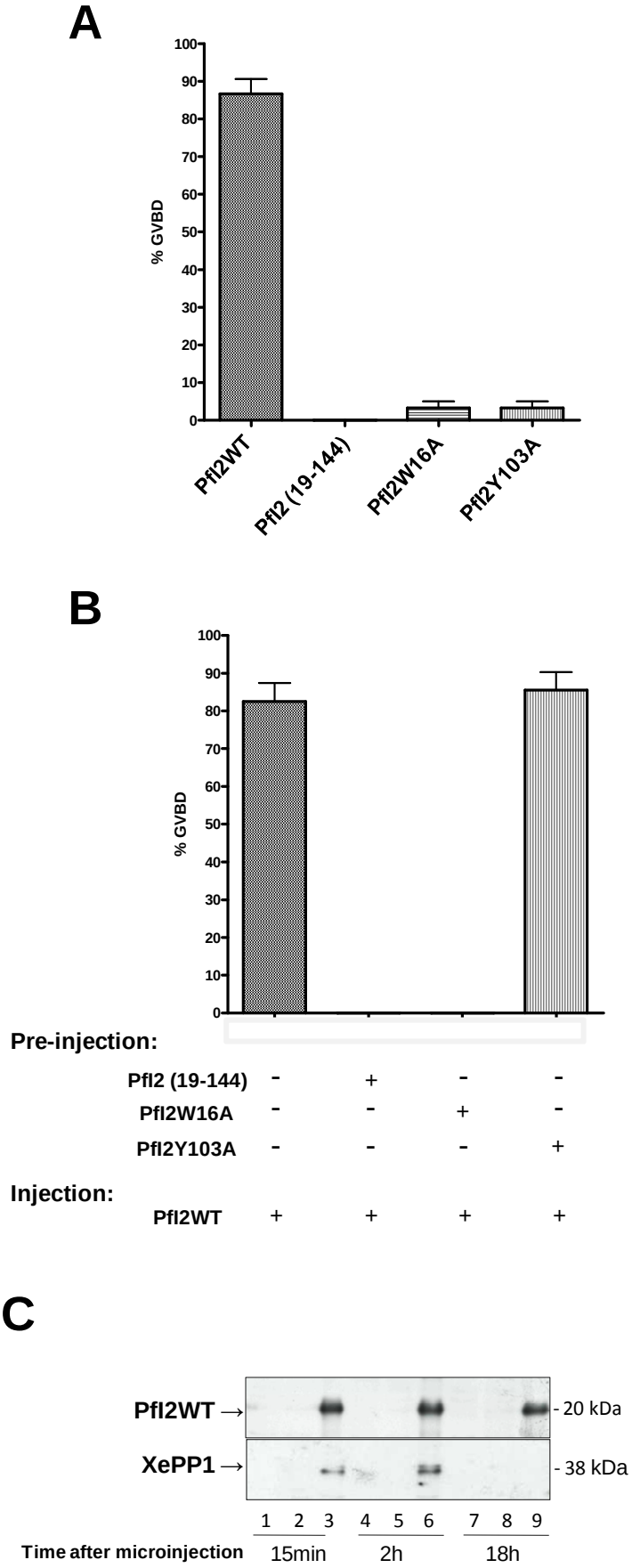


Fig.6: Initiation of G2/M in *Xenopus* oocytes by PfI2.

Appearance of GVBD was monitored for 24h after injection, and values are presented as percentages. Each experiment was performed using a set of 20 oocytes and was repeated three times at least. **A.** percentage of GVBD induced with 100 ng of recombinant PfI2WT, PfI2(19-144), PfI2W16A or PfI2Y103A. **B**. Percentage of GVBD induced by the pre-injection of PfI2(19-204), PfI2W16A or PfI2Y103A (100ng) 2 hours before PfI2WT injection (100ng). PfI2WT injection was used as a positive control. **C**. Interaction of PfI2 with *Xenopus* PP1. Immunoblot analysis using specific anti-XePP1 antibodies of PfI2WT injected oocytes extracts (lanes 2,3,5,6,8,9) after co-immunoprecipitation with anti-His mAb (lanes 3,6,9) or anti-rabbit used as control (lanes 2,8,5) revealed the presence of XePP1 in the complex (lanes 3,6). Non injected extracts (lanes 1,4,7) were used as negative control.

Table S1: list of the primers used throughout this study.

Primers				use	
name	sequence (orientation)	orientation	Restriction sites		
				Recombinant protein expression	
				Tagged gene	Vector
Pr1	**GGATCC**ATGAAGAAGAAAGTCGATAAAAGCGTTACC	F	BamH1	PfI2-6his	pQE-30
Pr2	**AAGCTT**TTATTCCTCACTTTCATTCATGTTCG	R	HindIII		
Pr3	**GGATCC**ATGAAGAAGAAAGTCGATAAAAGCGTTACC	F	BamH1	PfI2(1-94)-6his	pQE-30
Pr4	**AAGCTT**TTAGTCTATGTTGCTAACACCTTTGTTTTCCTG	R	HindIII		
Pr5	**GGATCC**GAAGTGACGATCAATGAACAAGACAAAGAACG	F	BamH1	PfI2(19-144)-6his	pQE-30
Pr6	**AAGCTT**TTATTCCTCACTTTCATTCATGTTCG	R	HindIII		
Pr7	ACCAAGAAAACCATTTCGGCGGATGAAGTGACGATCAATGAAC			mutagenesis PfI2W16A	
Pr8	GTTCATTGATCGTCACTTCATCCGCCGAAATGGTTTTCTTGGT				
Pr9	GAGAAACGTAAGAAACATGCTAACGAGTACAAAATGCTGCAGAAAC			mutagenesis PfI2Y103A	
Pr10	GTTTCTGCAGCATTTTGTACTCGTTAGCATGTTTCTTACGTTTCTC				
Pr11	**GGATCC**ATGGCATTAGAAATAGATATAGATAATGTAATATC	F	Eco R1	PfPP1-6his	pDUET
Pr12	**GCGGCC**GCTTAATTTGCTGCTTTCTTTTTTTCCACTGG	R	NotI		
				Plasmid constructions for yeast	
				Tagged gene	Vector
Pr13	**CATATG**AAGAAGAAAGTCGATAAAAGCGTTACC	F	Eco R1	PfI2-HA	pGADT7
Pr14	**GAATTC**TTATTCCTCACTTTCATTCATGTTCG	R	Nde 1		
Pr15	**CATATG**AAGAAGAAAGTCGATAAAAGCGTTACC	F	Eco R1	PfI2(1-94)-HA	pGADT7
Pr16	**GAATTC**AAAGTCTATGTTGCTAACACCTTTGTTTTCCTG	R	Nde 1		
Pr17	**CATATG**GAAGTGACGATCAATGAACAAGACAAAGAACG	F	Eco R1	PfI2(19-144)-HA	pGADT7
Pr18	**GAATTC**TTATTCCTCACTTTCATTCATGTTCG	R	Nde 1		
		F	Eco R1	PfPP1-GAL4	pGBKT7
		R	Eco R1		
				Pf transfections	
				Construct	Vector
Pr19	**CTGCAG**ATGAAAAAAAAAGTTGATAAATCCGTTACG	F	Pst1	KO construct	pCAM-BSD
Pr20	**GGATCC**AAGTCAATATTCGAAACTCCTTTATTTTCTTGC	R	bamH1		
Pr21	**CTGCAG**GAGGTTCAAGGATGAAAATATTAGAGC	F	Pst1	KI construct	pCAM-BSD-2HA
Pr22	**GGATCC**TTCTTCGGATTCATTCATATTACTATTATCAC	R	bamH1		
Pr23	**CTCGAG**ATGAAAAAAAAAGTTGATAAATCCGTT	F	Xho1	PfI2-GFP episomal construct	pARL-GFP
Pr24	**GGTACC**TTCTTCGGATTCATTCATATTACTATTATCAC	R	Kpn		
Pr25	TATTCCTAATCATGTAAATCTTAAA (167pCAM-BSD)	F		detection of episomes	
Pr26	CAATTAACCCTCACTAAAG (168pCAM-BSD)	R		detection of episomes	
Pr27	TACTTGTTTTCCCTTTGTTGTG	F		genotypes of transfected *Pf* (KO)	
Pr28	GATCTAGCATAATCTGGAACATCATATGGATAG(639pCAM-BSD)	R		genotypes of transfected *Pf* (KI)	
Pr29	GGATCCATGAAGAAGAAAGTCGATAAAAGCGTTACC	F		genotypes of transfected *Pf* (KI)	
Pr30	GAAATAATTATACTTGTTTTCCCTTTGTTGTG	F		gene walking on cDNA 5'side	
Pr31	AAAAAAGAGAAAGTATAAAATTCATTAAAA	F		gene walking on cDNA 5'side	
Pr32	CTGCAGATGAAAAAAAAAGTTGATAAATCCGTTACG	R		gene walking on cDNA 5'side	
Pr33	GACATGTATATAGGTACTATTAAAATAAATATG	R		gene walking on cDNA 3'side	
Pr34	GTAATAAATGAAAAAACAAAATTATGATATGTG	R		gene walking on cDNA 3'side	
Pr35	GGATCCTTCTTCGGATTCATTCATATTACTATTATCAC	F		gene walking on cDNA 3'side	

Figure S1. Original and adapted nucleotide sequence of *P. falciparum* inhibitor 2:

A. Original Sequence of PfI2

ATG AAA AAA AAA GTT GAT AAA TCC GTT ACA AAA AAA ACA ATA TCA TGG GAT GAA GTA ACA ATA AAT GAA CAA GAT AAA GAA AGA GGT TCA AGG ATG AAA ATA TTA GAG CCT AAT ACC CCC TTC AAT TTT ATT TTA ATG GAT AGT GCT TCA GAA GAT GAA GCA TCA AAG TAT GGG GAT GTG AAA GGA AGT GAT GAA GGA CAA AAT AAT ATT GCT GAT GAT TTG ATA AAT AAA TTA AAT CAA CTT GTG GAA AAG CAA GAA AAT AAA GGA GTT TCG AAT ATT GAC TTT AAG GAG AAA AGA AAA AAG CAT TAC AAT GAA TAT AAG ATG TTA CAA AAA TTA AGA AAA TCG GGA ACA TTA GAT GAT ATT GAT GAA GAG TAC AAA CCA GAT AAT AAA GAT TCA AAT TGT GAT AAT AGT AAT ATG AAT GAA TCC GAA GAA TAA

B. Adapted Sequence:

ATG AAG AAG AAA GTC GAT AAA AGC GTT ACC AAG AAA ACC ATT TCG TGG GAT GAA GTG ACG ATC AAT GAA CAA GAC AAA GAA CGT GGA TCA CGC ATG AAA ATT CTG GAA CCG AAT ACT CCG TTT AAC TTC ATT CTC ATG GAC AGT GCA TCC GAG GAT GAA GCC TCC AAA TAT GGC GAT GTG AAA GGC TCT GAT GAA GGG CAA AAT AAC ATT GCG GAT GAC TTG ATC AAC AAA CTG AAT CAG TTA GTA GAG AAA CAG GAA AAC AAA GGT GTT AGC AAC ATA GAC TTT AAA GAG AAA CGT AAG AAA CAT TAT AAC GAG TAC AAA ATG CTG CAG AAA CTT CGC AAA TCT GGT ACA CTG GAT GAT ATC GAT GAA GAA TAC AAA CCA GAC AAC AAG GAT AGC AAT TGC GAC AAT TCG AAC ATG AAT GAA AGT GAG GAA TAA

Chapitre 4 :

DISCUSSION GENERALE/PERSPECTIVES

I) Discussion générale

1) Introduction

Plasmodium falciparum possède un cycle de vie complexe, original impliquant différents hôtes et de nombreuses phases de divisions mitotiques. Ces différents niveaux de développement sont autant d'étapes lui permettant de se multiplier, de s'adapter mais aussi d'évoluer en fonction de son environnement. Le cycle cellulaire du parasite présente certains traits et caractéristiques moléculaires particuliers, qui, même s'ils représentent un ensemble de cibles thérapeutiques de choix (**Koyama FC. 2009**) sont encore aujourd'hui mal compris. Historiquement, un grand nombre d'études se sont focalisées autour de l'étude de l'implication des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation dans la régulation du cycle cellulaire, et plus particulièrement dans le contrôle de la division mitotique (**Bloecher A & Tatchell K. 2000, Hsu JY. 2000**). Au cours des dernières décennies, la communauté scientifique étudiant *Plasmodium falciparum* a entrepris l'étude de ces phénomènes chez le parasite et a pu mettre en évidence le rôle fondamental de la phosphorylation dans la régulation du cycle de vie du parasite (**Ward P. 2004, Kumar N. 1997, Kawamoto F. 1990, Rangachari K. 1986, Yuthavong Y & Limpaiboon T. 1987**)

Fort de ce constat, nous nous sommes intéressés à l'analyse des mécanismes de régulation de la phosphatase de type 1 de *Plasmodium falciparum* au travers de l'étude de deux de ces régulateurs : Pf inhibiteur 2 et Pf inhibiteur 3. Notre travail a permis de mettre à jour un certain nombre de spécificités relatives au fonctionnement de PfPP1 permettant d'entrevoir de nouvelles pistes thérapeutiques originales ciblant le parasite.

Les études ciblant le rôle de la phosphatase de type 1 ont permis de montrer son implication, entre autres, lors du déroulement mitotique et plus précisément lors de la transition G2/M (**Hisamoto N. 1994, Doonan JH & Morris NR. 1989, Axton JM. 1990, Ohkura H. 1989, Dombradi V,Axton JM,Barker HM,. 1990**). Chez *Plasmodium falciparum*, la PfPP1 présente un rôle fondamental dans le développement érythrocytaire du pathogène (**Kumar R. 2002, Blisnick T. 2006**). La protéine présente une localisation nucléocytoplasmique ce qui n'exclue pas son implication dans la mise en place de la mitose parasitaire (**Daher W. 2006**). Chez tous les organismes où l'action de PP1 a été décrite, le rôle de sous unités régulatrices a pu être démontré. Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu observer l'essentialité des inhibiteurs 2 (PfI2) et 3 (PfI3) de PfPP1 dans le développement sanguin du parasite. Tous deux sont localisés au niveau nucléaire (localisation exclusivement nucléaire pour l'inhibiteur 3 et nucléocytoplasmique pour l'inhibiteur 2). Les expériences menées dans le modèle hétérologue d'ovocytes de Xénope ont permis d'identifier chez PfI2 une capacité

de régulation négative de la PP1 endogène entraînant la maturation de la cellule. Ensemble, ces résultats, similaires à ceux obtenus lors de l'étude de PfLRR1, le premier régulateur de PfPP1 identifié, (**Daher W. 2006**) suggèrent fortement l'implication de ces protéines dans la régulation mitotique du cycle parasitaire via une action régulatrice de la phosphatase.

2) PfI2 : une protéine mitotique indispensable au cycle cellulaire de P.falciparum?

L'affirmation selon laquelle PfI2 serait impliquée dans la régulation cellulaire peut-être étayée par de nombreuses données de la littérature qui abondent en ce sens. Les travaux ciblant l'étude de l'inhibiteur 2, réalisés dans des contextes biologiques variables, ont, de nombreuses fois abouti à la conclusion d'un rôle mitotique (**Brautigan DL. 1990, Wang W,Stukenberg PT,. 2008b, Satinover DL. 2006**), certains auteurs allant même jusqu'à la caractériser de « phosphoprotéine mitotique » enrôlée dans de multiples relations cibles/partenaires (**Eto M & Brautigan DL. 2012**). En effet, cette implication résulterait à la fois de son interaction à la phosphatase de type 1, mais aussi avec un certain nombre de kinases (**Satinover DL. 2006, Brautigan DL. 2012, Satinover DL. 2004b**). D'un point de vue général, l'inhibiteur 2 semble impliqué dans le contrôle de la ségrégation chromosomique, de la mise en place des centrosomes et du réseau mitotique (**Leach C. 2003, Li M. 2006, Wang W,Stukenberg PT,. 2008b**). Or, chez *Plasmodium falciparum*, c'est précisément la localisation singulière des centrosomes et la mise en place particulière du réseau mitotique qui constitue l'une des caractéristiques remarquable de la mitose parasitaire (Figure 25).

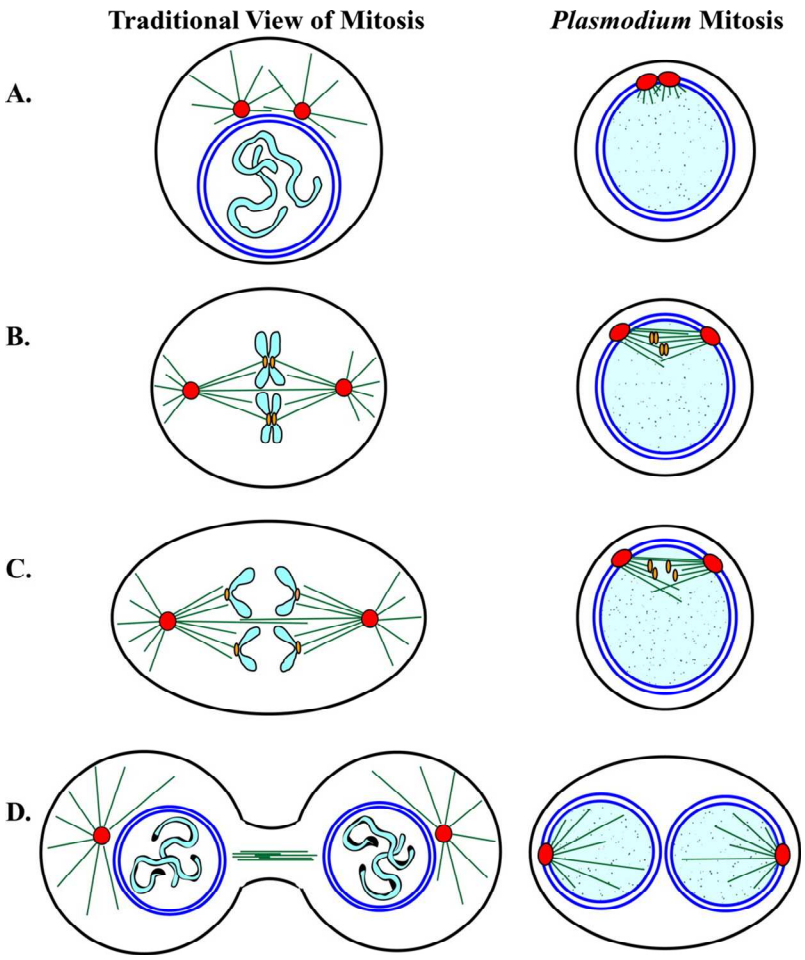


*Figure : 25. Comparaison et mise en parallèle de la vision traditionnelle de la mitose avec nos connaissances actuelles concernant la mitose de Plasmodium falciparum lors de son stade érythrocytaire. Dessin schématique représentant les membranes plasmiques (lignes noires), les centres organisateurs de microtubules (MTOCs, cercles rouges), les microtubules (lignes vertes), les kinétochores (ovales ocres), les membranes nucléaires (lignes bleues foncées), les chromosomes condensés (lignes bleu clair), les chromosomes non-condensés (ensemble bleu clair pointillé). (A) En début de mitose (prophase), lors de la mitose classique, les chromosomes, entourés de membranes nucléaires, commencent à se condenser, les microtubules cytoplasmiques sont synthétisés via deux MTOCs, également cytoplasmiques. Chez Plasmodium, les chromosomes ne se condensent pas, les deux MTOCs sont encastrés dans la membrane nucléaire, les microtubules commencent à se former au sein du noyau. (B) Lors de la métaphase, dans le cas d'une mitose classique, la membrane nucléaire se désintègre, les chromosomes condensés sont attachés au réseau bipolaire de microtubules via les kinétochores qui se retrouvent alignés le long de la plaque équatoriale. Chez le parasite, la membrane nucléaire reste intacte, les chromosomes ne se condensent pas, et les kinétochores sont capturés par le réseau bipolaire qui se forme à l'intérieur du noyau (C). Lors de l'anaphase (vue traditionnelle), les chromatides sœurs et leurs kinétochores associés se séparent et commencent à se diriger vers les pôles cellulaires. Chez P.falciparum, les kinétochores frères se séparent et migrent en sens opposé alors que les chromatides sœurs restent non condensées. (D) Télophase. Dans une mitose classique, les membranes nucléaires s'assemblent autour des génomes filles, les chromosomes commencent à se décondenser, la cellule commence sa division. Chez le parasite au stade schizonte, la membrane nucléaire se divise et sépare les génomes filles, la cellule ne se divise pas avant qu'un nouveau cycle de mitose n'ait eu lieu et permette la production d'une cellule multinucléée (Gerald N, 2011). Même si la mitose de P.falciparum ne suit pas un schéma classique, il est important de garder à l'esprit que le résultat final reste le même que celui observé chez les autres eucaryotes. Le parasite possède un fuseau de microtubules bipolaires polymérisé par deux MTOCs qui permet, lors de l'anaphase et de la télophase, la duplication du génome et sa redistribution équitable entre les cellules filles (D). Certains éléments mitotiques semblent donc conservés (d'après (**Gerald N. 2011**)).*

En effet, chez cet organisme, le déroulement de ce mécanisme fondamental diffère quelque peu du schéma traditionnel retrouvé chez la plupart des eucaryotes (Figure 25). Chez le parasite, les chromosomes ne semblent pas se condenser (Figure 25, A et B). Observé en microscopie à fluorescence, le matériel génétique apparaît diffus, sa faible densité électronique le rend également difficile à observer en microscopie électronique à transmission (**Bannister LH. 2003**).

D'autres particularités, ciblant les centres organisateurs de microtubules (ou MTOC) ont pu être observés. Ces structures sont des éléments clefs de la mitose : ils permettent la structuration mitotique et assurent le bon déroulement de la migration chromosomique. Ce sont des structures complexes, composées d'une paire de centrioles cylindriques disposée perpendiculairement l'une à l'autre et entourée de matériel péri-centriolaire au sein de la matrice cytoplasmique (Figure 26) (**Meijer L. 2003, Guertin DA. 2002**).

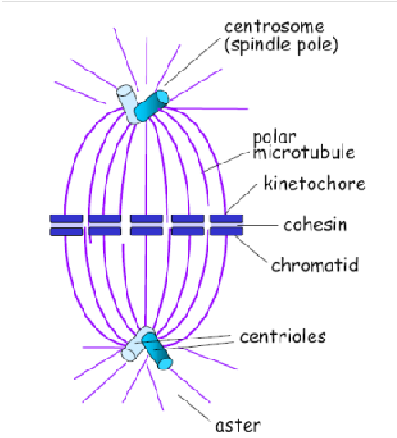


*Figure : 26. Schéma du réseau mitotique tel qu'on le retrouve dans la mitose classique (**Meijer L. 2003**).*

Les MTOCs présentent une grande diversité de conformation variant en fonction des organismes; certains persistent dans le cytoplasme, d'autres se retrouvent ancrés aux membranes. C'est le cas de *P.falciparum* où ces structures denses aux électrons apparaissent intégrées aux pores de la membrane nucléaire avec une face exposée à l'intérieur du noyau, l'autre exposée au cytoplasme (**Bannister LH. 2000, Schrevel J. 2008**). Les fuseaux microtubulaires fusionnent aux MTOCs *via* leur partie nucléaire (Figure 24, A-D). L'un des aspects caractéristiques de la mitose de *Plasmodium falciparum* est la duplication de la membrane nucléaire associée aux MTOCs et l'assemblage des microtubules nucléaires (Figure 24, A).

P.falciparum possède des kinétochores qui sont capturés par les microtubules polaires suivant un mécanisme proche de celui d'une mitose classique. Cependant, des zones d'ombres

subsistent quant au mécanisme d'alignement de ces kinétochores et à l'existence ou non de points de contrôle, qui, présents chez les mammifères, régulent l'assemblage du réseau de microtubules et la sortie de mitose.

Chez beaucoup d'eucaryotes, la mitose est suivie de la mise en place de structures permettant à la cellule de se diviser de nouveau. Chez *P.falciparum*, les mitoses successives sans cytokinèse permettent au parasite de générer des cellules multi-nucléaires. Ces éléments représentent une part importante de la stratégie de reproduction du pathogène. Il est intéressant de noter que les noyaux se divisent de façon asynchrone (**Arnot DE & Gull K. 1998**). Cet aspect particulier de la biologie du parasite rend difficile la compréhension des mécanismes permettant la coordination de la synthèse d'ADN et la mise en place de la mitose (**Naughton JA & Bell A. 2007**). Il est également difficile de prédire avec exactitude le nombre de progénies qu'un schizonte peut produire (**Arnot DE & Gull K. 1998, Naughton JA & Bell A. 2007, Leete TH & Rubin H. 1996, Read M. 1993**).

Cependant, et malgré ces observations, les mécanismes moléculaires qui gouvernent d'éventuels points de contrôle chez *P.falciparum* n'ont pas encore été complètement identifié. Les études génétiques, génomiques et biochimiques indiquent que, chez les apicomplexes, et en particulier chez *Plasmodium*, les réseaux de signalisation ne semblent pas conservés contrairement à ce que l'on observe généralement chez les autres eucaryotes (**Doerig C. 2010b, Doerig C. 2009, Gubbels MJ. 2008, Sinou V. 1998**).

Si l'on suppose que certaines de ces variations sont bien le fait, au moins en partie, d'une action spécifique de l'inhibiteur 2 de *Pf*, il faut alors imaginer que cette protéine, extrêmement conservée dans le règne eucaryotes ait pu se spécialiser au cours de son histoire évolutive au sein du parasite.

Des trois motifs d'interaction décrits par le cristal de l'holoenzyme PP1/I2 humain, (**Hurley TD. 2007**) deux ont pu être retrouvés chez PfI2 (le motif « RVxF » dégénéré : KKTISW ainsi que le motif HYNE). Nous avons, au cours de ce travail, montré leur importance dans la fonctionnalité de la protéine. Nous avons également montré qu'il n'existait pas chez PfI2, comme chez ses homologues et contrairement à ce que nous avions observé chez PfI3, de domaine de fixation prédominant. Ce résultat laisse supposer l'existence au niveau du complexe d'un système d'interaction multiple impliquant plusieurs domaines de liaison. Au vu de ces résultats, il apparaît donc qu'un certain nombre d'éléments conservés permettent de réguler au moins en partie l'activité de la protéine parasitaire.

Cependant, une analyse fine de la séquence protéique de PfI2 a permis de mettre en évidence un certain nombre de caractéristiques particulières. Cette protéine est le plus petit membre de la famille des inhibiteurs identifiés à ce jour. Elle semble dépossédée d'une large portion N terminale (retrouvée chez un grand nombre de ses orthologues) contenant le domaine KGILK décrit comme étant un élément essentiel impliqué dans l'interaction/activité de la protéine vis-à-vis de la phosphatase (**Hurley TD. 2007, Park IK & DePaoli-Roach AA. 1994, Osawa Y. 1996, Helps NR. 1998, Yang J. 2000**). La relation structure/fonction régissant le complexe PfPP1/PfI2 semble donc suivre des règles différentes de ce qui a pu être décrit jusqu'à aujourd'hui dans d'autres organismes. Cette observation revêt une importance capitale lorsque l'on replace l'inhibiteur 2 de *Plasmodium* dans un contexte protéique plus général. En effet, qu'en est-il de ses relations/interactions avec certaines protéines, et plus particulièrement avec certaines kinases mitotiques décrites comme étant partenaires des inhibiteurs 2 homologues ? Il semble cependant que ce soit la partie Ct et plus précisément une portion de la protéine comprise entre les acides aminés 118 et 205 qui soit impliquée dans l'interaction entre l'inhibiteur et les Neck-2 et Aurora-A kinase (**Eto M,Elliott E,. 2002, Satinover DL. 2004b**). Même si l'existence de telles interactions chez *P.falciparum* devrait être confirmée expérimentalement, cette portion protéique est assez bien conservée chez le parasite, nous pouvons légitimement supposer qu'elle existe.

Cette réflexion n'est cependant pas transposable à toutes les protéines partenaires de l'inhibiteur 2. Le cas de Pin 1 en est un bon exemple. Cette protéine mitotique, décrite comme étant *via* sa liaison à l'inhibiteur 2 une protéine centrale de la régulation de la division cellulaire, doit sa liaison à la portion Nt (acide aminés 1 à 14) du régulateur (**Li M. 2008**). Nous pouvons supposer, qu'à ce niveau, des variations spécifiques au parasite entrent en jeu. Si une régulation mitotique *via* Pin1 existe chez ce pathogène, elle diffère au niveau de son fonctionnement et plus particulièrement au niveau de l'implication de l'Inhibiteur 2.

Une étude récente présentant les résultats du phosphoprotéome global de *Plasmodium falciparum* a permis de montrer que chez le parasite PfI2 présente un profil de phosphorylation inattendu (T^{13}, S^{48}, S^{50}, S^{115}, T^{117} and S^{142}) (**Solyakov L. 2011b**). On n'y retrouve aucun des résidus classiquement phosphorylés chez ses homologues. Ces résultats sont néanmoins en accord avec un ensemble de tests complémentaires que nous avons réalisés sur le motif PXTP de PfI2. Chez la plupart des homologues de l'inhibiteur 2, plusieurs kinases (impliquées par ailleurs dans la régulation du cycle cellulaire) agissent à ce niveau afin de moduler la fonction du régulateur. Bien que conservé chez PfI2, ce domaine ne semble pas influencer par sa phosphorylation la fonction de la protéine. Ces résultats, malgré tout surprenants au vu de la conservation de ce mode de régulation, illustrent une nouvelle fois la complexité et la spécificité des mécanismes liés à la division cellulaire mis en jeu chez le parasite. Si une modulation fonctionnelle du régulateur existe, il est difficile de prédire en quoi ou

de quelle manière elle s'exerce ici. Un ensemble de travaux complémentaires ciblant l'étude de ce phosphoprotéome ainsi que des éventuelles relations PfI2/kinases semble indispensable à l'éclaircissement de ces points (voir perspectives point 3).

Les tests d'injection en ovocyte de Xénope menés au cours de ce travail de thèse ont permis de montrer l'implication de PfI2 dans la régulation du cycle cellulaire et plus particulièrement dans la transition G2/M de la cellule *via* la régulation négative exercée sur la PP1 endogène. De façon générale, l'inhibiteur semble impliqué en plusieurs points de la régulation du cycle cellulaire. Si la plupart des études se focalise sur une action mitotique (particulièrement lors de la prophase (**Leach C. 2003**), d'autres travaux évoquent également une implication lors de la progression en phase S. C'est en effet à ce stade que l'on observe une accumulation de la protéine humaine dans le noyau (**Kakinoki Y. 1997**). Mais qu'en est-il de PfI2 ? Nous avons pu établir sa localisation nucléocytoplasmique au cours du cycle érythrocytaire, mais nous n'avons pu déterminer avec précision quand la fonction de l'holoenzyme se mettait en place. Le complexe est t-il fonctionnel tout au long du cycle ou est- il cantonné à une forme parasitaire précise ? Il est difficile de répondre aujourd'hui à ses questions. Il faudrait pour cela, envisager la mise en place d'expériences permettant l'évaluation *in vivo* de l'impact physiologique de la formation du complexe. Nous pourrions, par exemple, imaginer la synthèse puis la diffusion au sein du pathogène de certaines molécules interférant avec la formation du complexe holoenzymatique. Afin d'entamer l'évaluation de la faisabilité de telles expériences, nous avons opté en premier lieu pour une approche dans le modèle hétérologue de Xénope. Nous avons réalisé un ensemble de tests consistant en l'injection dans l'ovocyte de protéines mutées ou déletées non actives mais ayant conservé la capacité de se fixer à la PP1. Ces travaux ont permis d'identifier chez ces dernières la capacité d'inhibition de l'action régulatrice de la protéine PfI2 wild type. Ce résultat encourageant montre qu'en interférant avec la formation du complexe, il est possible d'engendrer et d'observer une réponse physiologique. Si nous pouvions transférer ce type d'expérience d'inhibition de la formation de l'holoenzyme chez *Plasmodium falciparum* nous pourrions envisager de répondre à certaines de nos interrogations (la faisabilité technique de telles expériences sera discutée dans le point II.2).

Nous pouvons conclure de l'ensemble de ces observations que si la protéine I2 est bien impliquée dans la mitose parasitaire, un nombre important de mécanismes alternatifs entrent en jeu, aussi bien au niveau du complexe formé avec la PP1 que dans l'existence d'éventuels complexes multimériques formés avec d'autres protéines régulatrices et éventuellement quelques kinases mitotiques. Nous pouvons penser qu'il existe à ce niveau un mode de régulation du dialogue protéique spécifique à *Plasmodium*.

3) PfI3 : indispensable au cycle cellulaire de Pf ?

L'inhibiteur 3 de PfPP1 possède, en dépit de son homologie de séquence avec l'ensemble de ses homologues (homologie particulièrement forte au niveau du site « RVxF » de fixation à la phosphatase), un nombre important de caractéristiques intéressantes. Il présente, par exemple, la particularité de se fixer aux PP1 de *Plasmodium* ou de levure mais pas à la PP1 humaine. La forte similarité de séquence existant entre ces protéines rend ce résultat tout à fait étonnant.

Les tentatives d'exploration de la fonction de PfI3 *in vivo* (expériences d'interruption du gène *PfI3*) n'ayant pas permis d'obtenir de parasites mutés, nous avons réalisé un ensemble de tests fonctionnels *in vitro* et *in vivo* en modèle hétérologue de levure. Les résultats obtenus, encore une fois surprenants, présentent PfI3 comme un régulateur positif de PP1 incapable de complémenter des levures déficientes en I3. Ces travaux montrent que l'inhibiteur 3 de *P.falciparum*, présenterait une action opposée à celle de ses homologues humains ou de levure. Ces trois protéines, très conservées, ne seraient donc pas orthologues. Si PfI3 est, au moins en partie, impliqué dans le déroulement du cycle cellulaire *via* son interaction à la phosphatase de type 1, la régulation de ce mécanisme présente un nombre significatif de divergences.

Dans des cellules mammifères, cette protéine a été décrite comme formant un complexe trimérique avec la PP1 et la protéine Sds22 (homologue du LRR1 de *Pf*)(**Lesage B. 2007**). Des études menées chez *Schizosaccharomyces pombe* ont permis d'identifier chez cette dernière une implication dans la régulation de la division cellulaire de la levure, et plus particulièrement dans la transition G2/M de mitose (**Ohkura H & Yanagida M. 1991**). Si l'inhibiteur 3 présente bien une action cellulaire *via* la formation de ce complexe, il serait intéressant d'entamer son étude chez *Plasmodium*. Un premier travail concernant la caractérisation fonctionnelle de PfLRR1 avait permis d'identifier son rôle dans la régulation du cycle cellulaire *via* son interaction à la phosphatase (**Daher W. 2006**). Ces résultats, publiés en 2006 par le laboratoire, représentaient le début de l'étude des régulateurs de la PP1 de *Plasmodium falciparum*. Il serait extrêmement intéressant de le compléter par une analyse du trimère PP1/LRR1/I3. Il serait alors peut être possible d'identifier, là aussi, une implication mitotique, et de mettre à jour un certain nombre de particularités ou spécificités parasitaires.

4) Conclusion.

Au vu des différences identifiées au cours de cette étude, nous pouvons supposer que PfI2 présente, en comparaison avec ses homologues eucaryotes, de multiples variations de fonctionnement. Ces variations peuvent s'exprimer au niveau de sa relation à la PP1 mais également lors d'interactions avec d'autres protéines partenaires (kinases mitotiques par exemple). Il en va de

même pour la PfI3 qui, en exprimant *in vitro* une activité contraire à celle observée chez ses pendants humains et de levures, présuppose son engagement dans un mécanisme différent de celui décrit classiquement.

Même si ces deux protéines semblent impliquées dans des mécanismes cruciaux à la survie cellulaire et extrêmement conservés chez les eucaryotes, les différences fonctionnelles mises à jour dans le cadre de ce travail montrent qu'elles pourraient être considérées comme cibles thérapeutiques. Certaines des caractéristiques spécifiques décrites plus haut permettront peut être la création de molécules antipaludiques originales et efficaces.

En conclusion, ce travail, même s'il en est encore qu'à ses débuts a permis d'améliorer nos connaissances vis-à-vis de la régulation de la phosphatase de type 1, une protéine dont l'importance pour la physiologie du parasite n'est plus à démontrer. Nous avons également identifié un certain nombre de mécanismes qui permettront de comprendre le fonctionnement particulier de la phosphatase de type 1 de *Plasmodium falciparum* et plus généralement de la division cellulaire de ce pathogène.

II) Perspectives

1) Approfondissement de l'étude de la structure/fonction PfPP1/PfI2.

Afin d'améliorer nos connaissances concernant la structure/fonction des holoenzymes de PfPP1 étudiées au cours de ce travail, nous pourrions envisager de réaliser les structures RMN et cristallographiques des complexes PfPP1/PfI2 et PfPP1/PfI3. Nous pourrions alors déterminer avec exactitude les zones mises en jeux dans les interactions et identifier les éventuelles variations en comparant les données à celles obtenues lors de précédentes études portant sur les orthologues (**Hurley TD. 2007, Huang HB. 1999, Park IK & DePaoli-Roach AA. 1994, Zhang L. 2008**).

Une analyse bioinformatique de la séquence de l'inhibiteur 2 a d'ores et déjà permis l'identification d'un troisième motif d'intérêt. Le domaine FXXRXR, initialement identifié au niveau de protéines appartenant à la famille Bcl-2, semble être impliqué dans la fixation et la régulation apoptotique de la phosphatase de type 1 (**Godet AN. 2010**). Il serait intéressant d'envisager une étude plus précise de cet élément et d'envisager un éventuel rôle d'I2 dans la mort cellulaire programmée de *Pf*.

2) Mise en place d'une stratégie de ciblage et d'inhibition des complexes PfPP1/régulateurs. Utilisation de peptides inhibiteurs (Revue en Annexe 2)

Plasmodium possède une fréquence de recombinaison et de mutation très importante qui, associée, à un fort taux de renouvellement explique l'émergence de souches résistantes aux médicaments et l'apparition d'échecs thérapeutiques (voir chapitre 3, point 4). La situation actuelle est d'autant plus alarmante que des études récentes ont reporté une diminution de l'efficacité de certains traitements à base d'artémisine en combinaison (Ces composés représentent la première ligne de médication utilisée en territoires endémiques).

Dans ce contexte, il semble essentiel d'explorer de nouvelles voies et pistes thérapeutiques ciblant le cycle de développement du parasite et/ou d'imaginer des stratégies innovantes diminuant le risque de sélection de souches résistantes.

Les interactions protéines-protéines (ou interactome) représentent une voie biologique majeure et sont impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques

(**Cohen FE & Prusiner SB. 1998, Loregian A. 2002, Selkoe DJ. 1998**). La majeure partie des protéines ne sont en fait que des constituants d'une structure plus large qui n'exercent leur fonction biologique que sous la forme de complexes correctement structurés. La plupart des liaisons protéiques n'implique qu'une surface relativement faible de l'interface disponible. L'existence de ces zones critiques, également appelée « hot spot » d'interaction (**Bogan AA & Thorn KS. 1998, Clackson T & Wells JA. 1995**), a pu être démontrée par des expériences de mutagenèse attestant du fait que, dans certains cas, la modification de la chaîne latérale d'un résidu essentiel puisse abolir l'interaction protéique (**Wells JA. 1996**). Ces petites régions, qui concentrent la majorité de l'énergie de liaison du complexe, sont considérées comme de possibles cibles thérapeutiques. Il est probable que l'interaction directe de petites molécules au niveau de ces zones essentielles puisse interférer avec la formation des structures et/ou entraîner des changements conformationnels rendant impossible la mise en place de leur(s) fonction(s) biologique(s) (**Buchwald P. 2010**) (Figure 27, (**Guergnon J. 2006**)).

Dans ce contexte, et au vu des résultats expérimentaux obtenus lors de la caractérisation des complexes PfPP1/PfI2 et PfPP1/PfI3, nous pourrions imaginer de transposer cette technologie innovante à *Plasmodium falciparum*. La mise en place de ces deux holoenzymes étant indispensable au développement du parasite lors du stade sanguin (stade où apparaissent les symptômes de la malaria), il est hautement probable que l'injection ou la diffusion au sein du pathogène de peptides ou de petits composés interférant avec leurs structurations altérerait ou inhiberait la croissance du parasite. Ces travaux et les résultats en découlant auraient de multiples impacts. Au delà de l'intérêt évident vis-à-vis de la biologie fondamentale de *P.falciparum* et de la compréhension de l'influence des structures multimériques dans le développement de *P.falciparum*, cette stratégie, si elle s'avère fructueuse, représenterait une avancée certaine dans la lutte anti-malarique et la mise en place de nouveaux produits thérapeutiques. Il serait alors possible d'imaginer la synthèse, à façon, de petites molécules ciblant spécifiquement des complexes parasitaires indispensables à la croissance du pathogène.

D'un point de vue technologique, la mise en place de cette stratégie semble tout à fait accessible. En effet, un travail ciblant l'étude de petites molécules contenant les sites consensus de liaison à la PP1 a permis de montrer leur capacité de fixation et de régulation de la phosphate (**Tappan E & Chamberlin AR. 2008**). De même, une étude récente décrit la liaison d'une petite molécule, le guanabenz, au niveau de la sous–unité de la phosphatase 1, GADD34. Ce composé agit sélectivement en inhibant la déphosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2α et permet ainsi de restaurer la protéostasie cellulaire (**Tsaytler P. 2011**). Une étude menée sur le virus du VIH et utilisant des composés ciblant le sillon hydrophobe « RVxF » de PP1 a permis l'observation

d'une inhibition de la réplication du virus résultante de la perte d'interaction entre la phosphatase et la protéine Tat (**Ammosova T. 2012**). Une stratégie peptidique similaire, réalisée chez *P.falciparum* et ciblant des protéines de surfaces impliquées dans l'invasion a également montré des résultats prometteurs (**Vulliez-Le Normand B. 2012**).

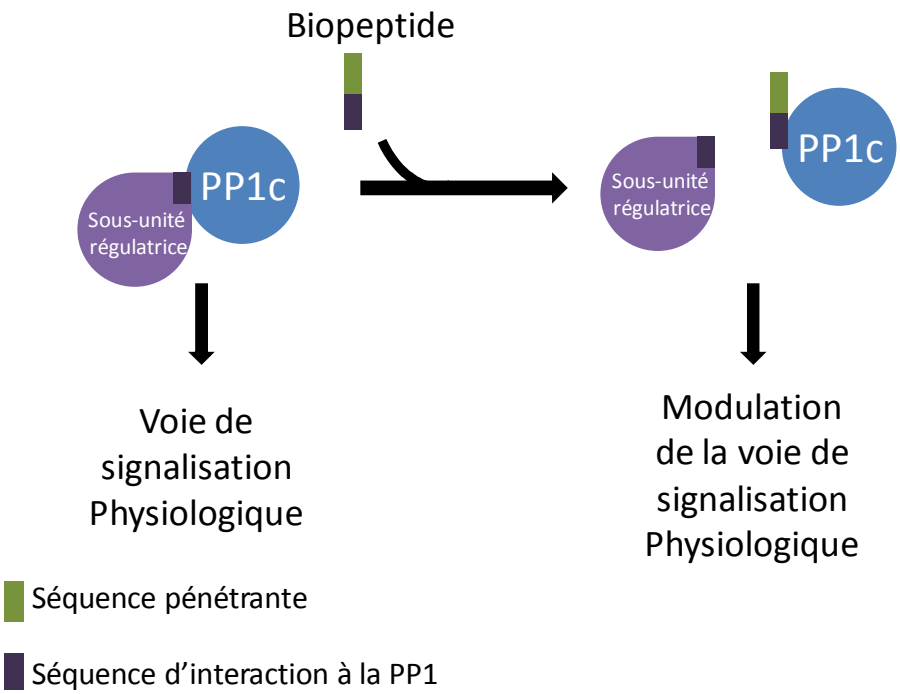


Figure 27 : Illustration schématique du principe d'inhibition de la structuration de complexes multimériques par interaction d'un peptide inhibiteur bipartite comprenant une séquence permettant la pénétration au sein de la cellule (en vert sur le schéma) ainsi qu'une séquence correspondant à un domaine d'interaction connu à la protéine cible (dans notre cas, il s'agit de la PfPP1). Sont représentés en bleu, la sous-unité catalytique de la phosphatase et en violet la sous-unité régulatrice (D'après (**Guergnon J. 2006**)).

La mise en évidence du domaine protéique PTD (Protein transduction domain) (**Lindgren M. 2000**), initialement identifié au niveau de protéines telles que l'HSV-1VP22 et permettant la distribution de ces molécules au sein des cellules par transduction, nous amène à envisager de nouvelles possibilités concernant la stratégie peptidique anti-malarique.

L'obtention de la structure cristallographique du complexe PfI2/PfPP1 (discutée dans le point 1) représenterait un outil de choix dans la recherche de molécules inhibitrices. La connaissance précise des zones sensibles impliquée dans l'interaction et/ou la conformation fonctionnelle du complexe faciliterait grandement la conception des peptides inhibiteurs.

3) Etude de la relation PfI2/kinases ainsi que des complexes holoenzymatiques PfPP1/PfI2/kinases de Pf.

Il serait intéressant de compléter notre étude du complexe PfI2/PfPP1 en nous intéressant aux interactions potentielles qu'il pourrait réaliser avec certaines protéines kinases précédemment décrites chez d'autres organismes comme interagissant avec l'holoenzyme (voir chapitre 3.3.2.3.b, (**DePaoli-Roach AA. 1984, Wang QM. 1995, Eto M,Elliott E,. 2002, Terry-Lorenzo RT,Elliot E,. 2002, Wang H & Brautigan DL. 2002, Leach C. 2003, Li M. 2006, Satinover DL. 2006, Wang W,Stukenberg PT,. 2008b**)).

Nous pourrions, dans un premier temps, entamer ce travail en nous focalisant sur l'étude des interactions complexe/kinase. Nous pourrions alors réaliser un ensemble de tests d'interaction *in vitro* de type test ELISA ou GST Pull Down puis, envisager des tests *in vivo* dans un modèle hétérologue de double hybride de levure ou chez *Plasmodium falciparum* par co-immunoprécipitation.

Il serait ensuite possible d'orienter nos travaux vers une approche fonctionnelle. Nous pourrions analyser l'implication de ces kinases dans la régulation de l'activité du complexe en réalisant plusieurs tests *in vitro* d'activité kinase utilisant un substrat MBP (myelin basic protein) associé à de l'ATP marqué (voir protocole dans article (**Satinover DL. 2004b**) ou d'activité phosphatase utilisant un substrat de type pNPP (voir protocole, (**Daher W. 2006, Freville A. 2012**)). Il serait aussi envisageable de réaliser des tests *in vitro* de déphosphorylation des kinases mais également de l'inhibiteur (voir protocole (**Satinover DL. 2004b**)) afin d'envisager une éventuelle variation phospho-dépendante de la régulation du complexe.

Il est à souligner que la caractérisation de certaines de ces kinases a déjà été entamée chez le parasite mais l'angle de recherche ne s'est jamais orienté vers une éventuelle régulation du complexe PfPP1/PfI2 (**Reininger L. 2009, Reininger L. 2011**).

4) Identification du ou des substrats ainsi que d'éventuels partenaires des complexes PfI2/PfPP1 et PfI3/PfPP1.

Bien que notre travail ait permis d'améliorer notre vision de la régulation de la phosphatase de type 1 chez *Plasmodium falciparum* via son interaction aux sous unités inhibitrices 2 et 3, les tests fonctionnels *in vitro* utilisés mettant en jeux le substrat non spécifique pNPP n'ont pas permis de mimer avec exactitude les conditions retrouvées chez le pathogène. Ils n'ont donc permis d'obtenir qu'une vision approximative de la réalité physiologique.

Afin de pallier ce biais, et d'améliorer notre compréhension de la fonction biologique de ces holoenzymes, il serait intéressant d'identifier le ou les substrats cibles des complexes. Dans ce but nous pourrions envisager d'utiliser le principe du triple hybride de levure pour réaliser le criblage d'une banque de *Plasmodium* (disponible au laboratoire) en utilisant les complexes PfPP1/PfI2 et PfPP1/PfI3 comme appât. Les résultats obtenus seront ensuite confirmés par un ensemble de tests d'interactions de type *in vitro* (ELISA ou GST Pull Down) ou dans le modèle hétérologue de double hybride de levure. L'ensemble de ces travaux permettront, à terme, l'identification du ou des substrats ainsi que d'éventuelles protéines interagissant avec les complexes. Ces résultats permettront peut être d'entrouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques innovantes.

L'ensemble de ces résultats nous permettront de mieux appréhender la complexité de la régulation de la protéine de type 1 chez *Plasmodium falciparum* et permettront peut être d'entrouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques innovantes.

ANNEXES

Annexe 1 :

Tableau récapitulatif de *l'interactome de PP1 chez l'homme.*

Gène	Nom	Fonction de l'holoenzyme	Référence
AATK	LMTK1	Apoptose	(**Gagnon KB. 2007**)
AHCYL1	IRBIT,DCAL	Régulation d'IP3R (lui-même régulé par un signal Ca2+)	(**Devogelaere B. 2007**)
AKAP1	AKAP84, AKAP121, AKAP149	Réassemblage de l'enveloppe nucléaire (déphosphorylation de la laminine B)	(**Steen RL. 2000, Steen RL. 2003**)
AKAP11	AKAP120	Coordination du signal PKA/PP1	(**Schillace RV & Scott JD. 1999, Tanji C. 2002**)
AKAP9	AKAP350, AKAP450, Yotiao, CG-NAP	Transmission synaptique (récepteur NMDA), fonction centrosomale	(**Westphal RS. 1999, Takahashi M. 1999, Feliciello A. 2001**)
AKT1	PKB, RAC	Apoptose	(**Chen CS. 2005, Choudhury GG. 2006**)
ANKRD28	PITK, KIAA0379	Transcription	(**Kwiek NC. 2006, Kwiek NC. 2007**)
ANKRD42	SARP1	Facteur de transcription putatif	(**Browne GJ. 2007**)
ANKRD42	SARP2	Facteur de transcription putatif	(**Browne GJ, 2007**)
ANP32A	LaNP, PHAP1, PHAPI, I1 PP2A	Stimulation de PP1 et inhibition de PP2A	(**Katayose Y. 2000**)
ANP32B	SET, PHAPII, TAF1β, APRIL, SSP2, I2 PP2A	Stimulation de PP1 et inhibition de PP2A	(**Katayose Y, 2000**)
APAF1	CED4	Apoptose	(**Flores-Delgado G. 2007**)
AR	RECEPTEUR ANDROGENE	Epissage et transcription	(**Chen S. 2009**)
ATM	AT1, ATA, TEL1	Cycle cellulaire, réponse aux dommages de l'ADN	(**Guo CY. 2002, Mi J. 2007, Tang X. 2008**)
AURKA	AURORA2, STK6, STK7, STK15, ARK1	Cycle cellulaire	(**Katayama H. 2001, Ohashi S. 2006, Satinover DL. 2004a, Satinover DL. 2006**)
AURKB	AIK2, AIM1, ARK2, AurB, IPL1, STK5, STK12	Cycle cellulaire	(**Sugiyama K. 2002, Emanuele MJ. 2008, Wang W,Stukenberg PT,. 2008b**)
AXIN1	Axin	Signalization Wnt/Beta-catenin	(**Luo W. 2007, Jiang Y. 2009**)
BAD	BCL2L8, BBC2	Apoptose	(**Luo W, 2007,** (**Garcia A. 2003, Garcia A. 2004, Ayllon V. 2000**) **Flores-Delgado G, 2007**)
BAX	BCL2L4	Apoptose	**Flores-Delgado G, 2007**

BCL2	Bcl-2	Apoptose	(**Ayllon V. 2001, Garcia A. 2004, Garcia A. 2003, Brichese L. 2002**)
BCL2L1	Bcl-X, Bcl-XL	Apoptose, épissage	(**Ayllon V. 2002, Boon-Unge K. 2007, Kim MH. 2008, Yang H. 2004**) (**Garcia A, 2003 et 2004**)
BCL2L2	Bcl-W	Apoptose	(**Ayllon V, 2002, Garcia A, 2003; 2004**)
BRCA1	IRIS,PSCP	Cycle cellulaire, réparation de l'ADN	(**Liu Y. 2002, Sankaran S. 2007b, Yu YM. 2008**)
C7orf16	GSBS, G-substrate	Inhibition de PP1	(**Aitken A & Cohen P. 1982, Endo S. 1999, Hall KU. 1999**)
CASP2	ICH1, NEDD2	apoptose	(**Nutt LK. 2009**)
CASP9	MCH6, APAF3	apoptose	(**Dessauge F. 2006**)
CAV1	CAV, VIP21, CGL3, BSCL3	Cycle cellulaire	(**Li L. 2003, Henkhaus RS. 2008, Radel C & Rizzo V. 2005**)
CDC25	CDC25C	Cycle cellulaire	(**Margolis SS. 2006, Margolis SS. 2003, Margolis SS & Kornbluth S. 2004**)
CDCA2	Repo-Man	Cycle cellulaire, viabilité cellulaire	(**Trinkle-Mulcahy L. 2006, Vagnarelli P. 2006**)
CDCK5R1	NCLK,CDCK5P35	Développement du système nerveux central	(**Agarwal-Mawal A & Paudel HK. 2001, Li T. 2007, Sato K. 2007**)
DCX	Doublecortine	Migration neuronale	(**Santra M. 2009, Shmueli A. 2006**)
EIF2AK2	PKR	Synthèse protéique, Infection à HSV-1	(**Tan SL. 2002, Eley HL. 2007, Hakki M & Geballe AP. 2008**)
EIF2S2	EIF2β	Initiation de la traduction	(**Wakula P. 2006**)
FER/Fer	TYK3	Cycle cellulaire	(**Pasder O. 2006**)
GRM1	mGluR1	Transmission glutamatergique	(**Croci C. 2003, Enz R. 2007**)
GRM5	mGluR5	Transmission glutamatergique	(**Croci C, 2003, Enz R, 2007**)
GRM7	mGluR7b	Transmission glutamatergique	(**Enz R. 2007,2002**)
CFC1	HCF1	Transcription et Cycle cellulaire	(**Ajuh PM. 2000**)
HDAC10	MGC149722	Transcription	(**Brush MH. 2004**)
HSPA5	GRP78 ,MIF5,BIP	Chaperonne, modulation de l'activité de PP1γ2	(**Chun YS. 1994**)
HSPA8	HSP71	Adhésion des plaquettes	(**Polanowska-Grabowska R. 1997**)
I4	pseudo gène	Inhibition de PP1	(**Shirato H. 2000**)
ITGA3	Intégrine, chaine α 3	Régulation de la phosphorylation de l'intégrine	(**Mutz D. 2006**)

KDM4A	JMJD2A	Contrôle épigénique de la transcription et de la mémoire à long terme	(**Koshibu K. 2009**)
KIAA1949	Phostensin	Réarrangement de l'actine	(**Kao SC. 2007**)
KIF13A	Famille des kinésine (membre 13A)	Cycle cellulaire	(**Santra M. 2009**)
LMNB1	Laminine B	Assemblage de la laminine nucléaire	(**Thompson LJ. 1997, Steen RL & Collas P. 2001**)
LMTK2	KPI-2 CPRK , AATYK2	Régulation de PP1 et de PP1 R2 à la surface membranaire	(**Wang H & Brautigan DL. 2002**)
LRRC67	TLRR	Transformation et formation de la queue des spermatides	(**Wang R & Sperry AO. 2008, Wang R. 2010**)
MAPK1	MAK2,ERK,ERK2,p38,	Activation de eiF2B par IGF1	(**Quevedo C. 2003**)
MAPK3	ERK1	Activation de eiF2B par IGF1	(**Quevedo C, 2003**)
MAPK8	JNK	Apoptose complexe JNK/Bcl2/PP1	(**Brichese L. 2004, Monick MM. 2006**)
MAPT	TAU	Assemblage et stabilité des microtubules	(**Liao H. 1998**)
MYAF2	MEF2,KIAA1341,FLJ11213	Survie des cellules neuronales, modulation cardiaque et différenciation terminale des muscles cardiaques, vasculaires et squelettiques	(**Perry RL. 2009**)
MYO16	MYR8	Développement du cerveau	(**Patel KG. 2001**)
NCAM1	NCAM180 NCAM140	Développement et maintien du système nerveux	(**Buttner B. 2005, Buttner B & Horstkorte R. 2010**)
NCL	Nucleodine	Cycle cellulaire, apoptose	(**Morimoto H. 2007**)
NCOR1	N-Cor, TRAC1, Récepteur nucléaire et co-récepteur	Régulation de la différenciation des cellules souches neuronales	(**Hermanson O. 2002**)

NEFL	NF-L	Morphologie et plasticité et/ou transmission neuronale ?	(**Terry-Lorenzo RT. 2000**)
NEK2A	NEK2A NEK2A-T	Fonction centrosomale, ségrégation chromosomique (NEK2A) Fonction nucléaire (NEK2A –T)	(**Lou Y. 2004, Wu W. 2007, Fardilha M. 2004, Helps NR. 2000**)
NOMI	SGD1, protéine nucléolaire portant un domaine 1 MIF4G	Ciblage de PP1 au nucléole	(**Gunawardena SR. 2008**)
OCLN	Occludine	Régulation négative de l'assemblage des jonctions serrées	(**Seth A. 2007, Rao R. 2009**)
PARD3	Par-3, Bazooka, Baz, AZIP	Formation jonctions serrées fonctionnelles ?	(**Traweger A. 2008a**)
PCDH7	Protocadhérine 7-c	Interaction cellule-cellule (neurones)	(**Yoshida K. 1999**)
PER2	FASPS, KIAA0347	Rythme circadien	(**Yoshida K, 1999**)
PFKM	PFK1,PFKA,PFKX,GSD7	Glycolyse ?	(**Zhao S & Lee EY. 1997**)
PHACTR1	Phosphatase et régulateur 1 de l'actine	Activité synaptique et cytosquelette d'actine	(**Allen PB. 2004**)
PHACTR3	Scapinine	Association avec des structures nucléaires non-chromatidienne et mobillité/diffusion cellulaire via l'actine du cytosquelette	(**Sagara J. 2003, Sagara J. 2009**)
PHACTR4	Phosphatase et régulateur 4 de l'actine	Régulation du tube neural et de la fermeture de la fissure optique	(**Kim TH. 2007**)
PLCL1	PRIP,p130,Phospholipase C-like 1	Régulation de l'inhibition synaptique via le controle de la phosphorylation du récepteur GABA	(**Yoshimura K. 2001, Yanagihori S. 2006**)

PPP1RIA	Inhibiteur 1, I1	Inhibition de PP1, métabolisme du glycogène, plasticité synaptique, contraction musculaire, fonction cardiaque.	**Huang FL, 1976 ; Nicolaou P, 2009** ; (**Rodriguez P. 2006**)
PPP1R1B	DARPP 32	Neurotransmission	(**Hemmings HC, Jr. 1984, Svenningsson P. 2005, Svenningsson P. 2004**)
PPP1RIC	IPP5	Apoptose	(**Wang X. 2008, Zeng Q. 2009**)
PPP1R2	Inhibiteur 2, I2	Inhibition de PP1	(**Huang HB, 1999 , Li M, 2007**)
PPP1R3A	Gm, RGL, PPP1R3, PP1G	Métabolisme du glycogène	(**Johnson DF. 1996, Toole BJ & Cohen PT. 2007a, Suzuki Y. 2001**)
PPPR3B	GL, PPP1R4	Métabolisme du glycogène	(**Doherty MJ. 1995, Moorhead G. 1995, Montori-Grau M. 2007**)
PPP1R3C	PTG, PP1R5	Métabolisme du glycogène	(**Doherty MJ. 1996, Brady MJ. 1997, Browne GJ. 2001, Printen JA. 1997**)
PPP1R3D	PPP1R6	Métabolisme du glycogène	(**Toole BJ & Cohen PT. 2007b, Armstrong CG. 1997**)
PPP1R3E	KIAA1443, FLJ00089		(**Ceulemans H, 2002**) (**Munro S. 2005**)
PPP1R3F	Hb2E		(**Ceulemans H, 2002**) (**Mukherji M. 2006**)
PPP1R3G			**(Ceulemans H, 2002)**
PPP1R7	Sds22	Mitose, régulation de la fonction spermique de la polarité et de la forme des cellules épithéliales	(**Dinischiotu A. 1997, Grusche FA. 2009, Mishra S. 2003, Peggie MW. 2002**)
PPP1R8	NIPP1, ARD-1, NIPP-T	épissage	**(Beullens M, 1992, Tanuma N, 2008, Trinkle-Mulcahy L, 1999)**
PPP1R9A	Neurabinine 1	Plasticité et transmission synaptique, signalisation dendritique via les voies glutamatergique et dopaminergique	**(MacMillan LB. 1999, Kelker MS. 2007) (Terry-Lorenzo RT, 2002))**
PPP1R9B	Spinophiline, Neurabinine II	idem	**(Feng J. 2000, Allen PB. 1997, Sarrouilhe D. 2006, Kelker MS. 2007, Terry-Lorenzo RT,Elliot E,. 2002, Terry-Lorenzo RT,Carmody LC,. 2002)**

PPP1R10	PNUTS, P99, CAT53	Epissage, décondensation chromosomique, apoptose, dégradation proteasomale et activité synaptique rétinienne	(**Allen PB. 1998, Kreivi JP. 1997, Kim YM. 2003, Landsverk HB. 2005, Lee SJ. 2007, Rose M. 2008, Udho E. 2002**)
PPP1R11	Inhibiteur 3, HCG-V, TCTE5, TCTETX5, IPP3	Inhibition PP1, apoptose, fonction spermique	(**Zhang J, 1993 ; Zhang L, 2008**)
PPP1R12A	MYPT1, M110, MBS, M130	Ciblage de la myosine et de l'actine	(**Cheng A. 2000, Alessi D. 1992**)
PPP1R12B	MYPT2, PP1bp55, M20 forme épissée	Ciblage de la myosine et de l'actine, ciblage de la myosine phosphatase au cœur	(**Okamoto R. 2006, Moorhead G. 1998**)
PPP1R12C	P85, LENG3	Ciblage de la myosine et de l'actine	(**Tan I. 2001**)
PPP1R13B	ASPP1, p53BP2-like	Apoptose	(**Helps NR. 1995, Liu ZJ. 2005**)
PPP1R14A	CPI-17	Inhibition de l'augmentation d'activité de la myosine phosphatase musculaire lors de la contraction	(**Eto M, 1997 ; 2009**)
PPP1R14B	PHI-1	Modulation de la rétractation des cellules endothéliales et épithéliales	(**Tountas NA. 2004, Eto M. 1999, Eto M. 2009**)
PPP1R14C	KEPI-CPI-17 like	Inhibiteur de PP1 dépendant de PKC : implication dans l'addiction	**(Eto M, 2009**, (**Liu QR. 2002, Gong JP. 2005**)
PPP1R14D	Forme longue (testicules) et courte (cerveau, estomac) GBPI-1, CPI-17like	Inhibition de PP1 lorsqu'elle est phosphorylée (activation par PKC, inhibition par PKA)	**(Liu QR. 2004, Eto M. 2009)**
PPP1R15A	GADD34	Synthèse protéique, régulation de l'exposition à la calréticuline, signalisation TGFβ	(**Connor JH. 2001, Brush MH. 2003, Kepp O. 2009, Shi W. 2004**)

PPP1R15B	CReP	Synthèse protéique	(**Jousse C. 2003, Harding HP. 2009**)
PPP1R16A	MYPT3	Ciblage de la myosine et de l'actine, translocation des récepteurs nucléaires	(**Skinner JA & Saltiel AR. 2001, Vereshchagina N. 2004, Sueyoshi T. 2008**)
PP1R16B	TIMAP, ANKRD4	Régulation de la barrière endothéliale pulmonaire	(**Kim K. 2005, Csortos C. 2008**)
PTK2	FAK, FADK, FRNK	Adhésion focale	(**Fresu M. 2001, Villa-Moruzzi E. 1998**)
RAF1	CRAF	Activation de RAF1 entraine l'inactivation de la voie de signalisation MEK/ERK.	(**Jaumot M & Hancock JF. 2001, Mitsuhashi S. 2003**)
RB1	RB, p110rb	Inhibition du cycle cellulaire, progression en phase S et apoptose	(**Durfee T. 1993, Berndt N & Ludlow JW. 2004, Tamrakar S & Ludlow JW. 2000**)
RIPP1		Fonction ribosomale ?	(**Beullens M. 1996**)
RL1	Protéines de neurovirulence ICP34.5/$\gamma_1$34.5	Inhibition de la synthèse protéine en relation avec GADD34	(**He B. 1997,1998, Zhang C. 2008**)
RPL5	Protéine ribosomale L5	Fonction ribosomale ?	(**Hirano K. 1995**)
RYR1	Récepteur à la ryanodine 1	Activité des canaux à ions dans les muscles cardiaques et squelettiques	(**Zhao S. 1998, Terentyev D. 2003**)
RYR2	Récepteur à la ryanodine 2	Activité des canaux à ions dans les muscles cardiaques	(**Terentyev D, 2003,** (**Marx SO. 2000**))
SFPQ	PSF	Epissage	(**Hirano K. 1996, Gozani O. 1994, Patton JG. 1993, Huang CJ. 2007**)
SFRS13A	SRp38, TASR, NSSR, FUSIP	Régulation de l'épissage en réponse au stress cellulaire	(**Shi Y & Manley JL. 2007**)
SH3RF2	HePP1, FLJ123654	Fonction cardiaque ?	(**Chen CY. 2010**)
SHOC2	SUR8	Effecteur M-RAS, M-Ras cible cet holoenzyme afin d'activer RAF1	(**Rodriguez-Viciana P. 2006**)

SLC9A1	NHE1, FL42224	Régulation des échanges Na^-/H^-	(**Misik AJ. 2005**)
SLC12A2	NKCC1	Transport de sodium, potassium et chlore	(**Darman RB. 2001, Gagnon KB. 2007**)
SMARCB1	SNF5,INI1	Complexe avec PP1 et GADD34. Ciblage de PP1 au niveau de substrats potentiels associés avec le complexe hSWI/SNF ?	(**Wu DY. 2002**)
STAU	Staufen, FLJ2510	ARNm translocation et traduction	(**Monshausen M. 2002, Brendel C. 2004**)
TAT p14	TAT-1	HIV transcription, ciblage de PP1 au noyau	(**Ammosova T. 2005, Nekhai S. 2007**)
TLX1	TCL3, HOX 11	Point d'arrêt du cycle cellulaire	(**Riz I & Hawley RG. 2005**)
TP53	P53, TRP53, FLJ92943	Apoptose	(**Helps NR. 1995, Li DW. 2006, Haneda M. 2004**) (**Takenaka I. 1995**)
TP53BP2	PPP1R13A, p53BP2, ASPP2	Apoptose	(**Helps NR, 1995,** (**Sullivan A & Lu X. 2007**))
VDR	Récepteur à la vitamine D	Cycle cellulaire et différenciation	(**Bettoun DJ. 2002, Bettoun DJ. 2004**)
WBP11	SIPP-1, SNP70, NpwBP	Epissage	(**Llorian M. 2004, Llorian M. 2005**)
YLPM1	ZAP3	Fonction nucléaire	(**Tran HT. 2004, Ulke-Lemee A. 2007**)
YWHAZ	14-3-3 zeta, KCIP-1	Spermatogenèse	(**Huang Z. 2004, Puri P. 2008**)
ZFYVE16	Endofine	Augmentation du recrutement de PP1 au niveau du récepteur 1 BMP (ALK3 et ALK6)	(**Shi W. 2007**)
ZFYVE9	SARA	Augmentation du recrutement de PP1 au niveau du récepteur 1 au TGFβ	(**Shi W. 2004, Bennett D & Alphey L. 2002**)

Tableau XX : Interactome de PP1 chez l'homme. Tableau reprenant le nom des gènes, des protéines de toutes protéines validées comme étant régulatrices de PP1 et leurs fonctions associées (Fardilha M, 2010).

Annexe 2 :

Inhibition of Protein-protein Interactions in *Plasmodium falciparum* : Future Drug Targets

Pierrot C, Fréville A, Olivier C, Souplet V, Khalife J.

Revue publiée en 2012 dans « Current Pharmaceutical design » ; 18(24):3522-30.

PMID: 22607144 [PubMed - in process]

BIBLIOGRAPHIE

A

Abdi, A, Eschenlauer, S, Reininger, L & Doerig, C (**2010**) SAM domain-dependent activity of PfTKL3, an essential tyrosine kinase-like kinase of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Cell Mol Life Sci*, 67, 3355-3369.

Adams, JM (**2003**) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, 17, 2481-2495.

Adl, SM, Leander, BS, Simpson, AG, Archibald, JM, Anderson, OR, Bass, D, Bowser, SS, Brugerolle, G, Farmer, MA, Karpov, S, Kolisko, M, Lane, CE, Lodge, DJ, Mann, DG, Meisterfeld, R, Mendoza, L, Moestrup, O, Mozley-Standridge, SE, Smirnov, AV & Spiegel, F (**2007**) Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic biology*, 56, 684-689.

Adl, SM, Simpson, AG, Farmer, MA, Andersen, RA, Anderson, OR, Barta, JR, Bowser, SS, Brugerolle, G, Fensome, RA, Fredericq, S, James, TY, Karpov, S, Kugrens, P, Krug, J, Lane, CE, Lewis, LA, Lodge, J, Lynn, DH, Mann, DG, McCourt, RM, Mendoza, L, Moestrup, O, Mozley-Standridge, SE, Nerad, TA, Shearer, CA, Smirnov, AV, Spiegel, FW & Taylor, MF (**2005**) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 52, 399-451.

Agarwal-Mawal, A & Paudel, HK (**2001**) Neuronal Cdc2-like protein kinase (Cdk5/p25) is associated with protein phosphatase 1 and phosphorylates inhibitor-2. *J Biol Chem*, 276, 23712-23718.

Agarwal, S, Kern, S, Halbert, J, Przyborski, JM, Baumeister, S, Dandekar, T, Doerig, C & Pradel, G (**2011**) Two nucleus-localized CDK-like kinases with crucial roles for malaria parasite erythrocytic replication are involved in phosphorylation of splicing factor. *J Cell Biochem*, 112, 1295-1310.

Ahmad, Z, Camici, M, DePaoli-Roach, AA & Roach, PJ (**1984**) Glycogen synthase kinases. Classification of a rabbit liver casein and glycogen synthase kinase (casein kinase-1) as a distinct enzyme. *J Biol Chem*, 259, 3420-3428.

Aitken, A & Cohen, P (**1982**) Isolation and characterisation of active fragments of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett*, 147, 54-58.

Ajuh, PM, Browne, GJ, Hawkes, NA, Cohen, PT, Roberts, SG & Lamond, AI (**2000**) Association of a protein phosphatase 1 activity with the human factor C1 (HCF) complex. *Nucleic Acids Res*, 28, 678-686.

Al-Olayan, EM, Williams, GT & Hurd, H (**2002**) Apoptosis in the malaria protozoan, Plasmodium berghei: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *International journal for parasitology*, 32, 1133-1143.

Alberts, AS, Montminy, M, Shenolikar, S & Feramisco, JR (**1994**) Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 14, 4398-4407.

Alessi, D, MacDougall, LK, Sola, MM, Ikebe, M & Cohen, P (**1992**) The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem*, 210, 1023-1035.

Allen, PB, Greenfield, AT, Svenningsson, P, Haspeslagh, DC & Greengard, P (**2004**) Phactrs 1-4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7187-7192.

Allen, PB, Kwon, YG, Nairn, AC & Greengard, P (**1998**) Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit. *J Biol Chem*, 273, 4089-4095.

Allen, PB, Ouimet, CC & Greengard, P (**1997**) Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9956-9961.

Alonso, PL, Sacarlal, J, Aponte, JJ, Leach, A, Macete, E, Milman, J, Mandomando, I, Spiessens, B, Guinovart, C, Espasa, M, Bassat, Q, Aide, P, Ofori-Anyinam, O, Navia, MM, Corachan, S, Ceuppens, M, Dubois, MC, Demoitie, MA, Dubovsky, F, Menendez, C, Tornieporth, N, Ballou, WR, Thompson, R & Cohen, J (**2004**) Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium

falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*, 364, 1411-1420.

Aly, AS, Vaughan, AM & Kappe, SH (**2009**) Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol*, 63, 195-221.

Amino, R, Thiberge, S, Blazquez, S, Baldacci, P, Renaud, O, Shorte, S & Menard, R (**2007**) Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc*, 2, 1705-1712.

Amino, R, Thiberge, S, Shorte, S, Frischknecht, F & Menard, R (**2006**) Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. *C R Biol*, 329, 858-862.

Ammosova, T, Jerebtsova, M, Beullens, M, Lesage, B, Jackson, A, Kashanchi, F, Southerland, W, Gordeuk, VR, Bollen, M & Nekhai, S (**2005**) Nuclear targeting of protein phosphatase-1 by HIV-1 Tat protein. *J Biol Chem*, 280, 36364-36371.

Ammosova, T, Platonov, M, Yedavalli, VR, Obukhov, Y, Gordeuk, VR, Jeang, KT, Kovalskyy, D & Nekhai, S (**2012**) Small molecules targeted to a non-catalytic "RVxF" binding site of protein phosphatase-1 inhibit HIV-1. *PLoS One*, 7, e39481.

Anamika, Srinivasan, N & Krupa, A (**2005**) A genomic perspective of protein kinases in Plasmodium falciparum. *Proteins*, 58, 180-189.

Andreassen, PR, Lacroix, FB, Villa-Moruzzi, E & Margolis, RL (**1998**) Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol*, 141, 1207-1215.

Aponte, JJ, Aide, P, Renom, M, Mandomando, I, Bassat, Q, Sacarlal, J, Manaca, MN, Lafuente, S, Barbosa, A, Leach, A, Lievens, M, Vekemans, J, Sigauque, B, Dubois, MC, Demoitie, MA, Sillman, M, Savarese, B, McNeil, JG, Macete, E, Ballou, WR, Cohen, J & Alonso, PL (**2007**) Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. *Lancet*, 370, 1543-1551.

Arambage, SC, Grant, KM, Pardo, I, Ranford-Cartwright, L & Hurd, H (**2009**) Malaria ookinetes exhibit multiple markers for apoptosis-like programmed cell death in vitro. *Parasit Vectors*, 2, 32.

Armstrong, CG, Browne, GJ, Cohen, P & Cohen, PT (**1997**) PPP1R6, a novel member of the family of glycogen-targetting subunits of protein phosphatase 1. *FEBS Lett*, 418, 210-214.

Armstrong, CG, Doherty, MJ & Cohen, PT (**1998**) Identification of the separate domains in the hepatic glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 that interact with phosphorylase a, glycogen and protein phosphatase 1. *Biochem J*, 336 (Pt 3), 699-704.

Arnot, DE & Gull, K (**1998**) The Plasmodium cell-cycle: facts and questions. *Ann Trop Med Parasitol*, 92, 361-365.

Axton, JM, Dombradi, V, Cohen, PT & Glover, DM (**1990**) One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in Drosophila is essential for mitosis. *Cell*, 63, 33-46.

Ayala, G, Wang, D, Wulf, G, Frolov, A, Li, R, Sowadski, J, Wheeler, TM, Lu, KP & Bao, L (**2003**) The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer. *Cancer Res*, 63, 6244-6251.

Ayllon, V, Cayla, X, Garcia, A, Fleischer, A & Rebollo, A (**2002**) The anti-apoptotic molecules Bcl-xL and Bcl-w target protein phosphatase 1alpha to Bad. *Eur J Immunol*, 32, 1847-1855.

Ayllon, V, Cayla, X, Garcia, A, Roncal, F, Fernandez, R, Albar, JP, Martinez, C & Rebollo, A (**2001**) Bcl-2 targets protein phosphatase 1 alpha to Bad. *J Immunol*, 166, 7345-7352.

Ayllon, V, Martinez, AC, Garcia, A, Cayla, X & Rebollo, A (**2000**) Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *Embo J*, 19, 2237-2246.

B

Baer, K, Klotz, C, Kappe, SH, Schnieder, T & Frevert, U (**2007**) Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS pathogens*, 3, e171.

Baer, K, Roosevelt, M, Clarkson, AB, Jr., van Rooijen, N, Schnieder, T & Frevert, U (**2007**) Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol*, 9, 397-412.

Baksa, K, Morawietz, H, Dombradi, V, Axton, M, Taubert, H, Szabo, G, Torok, I, Udvardy, A, Gyurkovics, H, Szoor, B & et al. (**1993**) Mutations in the protein phosphatase 1 gene at 87B can differentially affect suppression of position-effect variegation and mitosis in Drosophila melanogaster. *Genetics*, 135, 117-125.

Ballou, LM, Villa-Moruzzi, E & Fischer, EH (**1985**) Subunit structure and regulation of phosphorylase phosphatase. *Curr Top Cell Regul*, 27, 183-192.

Bannister, L & Mitchell, G (**2003**) The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends in parasitology*, 19, 209-213.

Bannister, LH, Hopkins, JM, Dluzewski, AR, Margos, G, Williams, IT, Blackman, MJ, Kocken, CH, Thomas, AW & Mitchell, GH (**2003**) Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *Journal of cell science*, 116, 3825-3834.

Bannister, LH, Hopkins, JM, Fowler, RE, Krishna, S & Mitchell, GH (**2000**) A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitol Today*, 16, 427-433.

Bano, N, Romano, JD, Jayabalasingham, B & Coppens, I (**2007**) Cellular interactions of Plasmodium liver stage with its host mammalian cell. *International journal for parasitology*, 37, 1329-1341.

Bao, Q & Shi, Y (**2007**) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, 14, 56-65.

Barik, S, Taylor, RE & Chakrabarti, D (**1997**) Identification, cloning, and mutational analysis of the casein kinase 1 cDNA of the malaria parasite, Plasmodium falciparum. Stage-specific expression of the gene. *J Biol Chem*, 272, 26132-26138.

Baruch, DI (**1999**) Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 12, 747-761.

Bastians, H & Ponstingl, H (**1996**) The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *Journal of cell science*, 109 (Pt 12), 2865-2874.

Baton, LA & Ranford-Cartwright, LC (**2005**) How do malaria ookinetes cross the mosquito midgut wall? *Trends in parasitology*, 21, 22-28.

Baum, J, Gilberger, TW, Frischknecht, F & Meissner, M (**2008**) Host-cell invasion by malaria parasites: insights from Plasmodium and Toxoplasma. *Trends Parasitol*, 24, 557-563.

Beier, JC, Keating, J, Githure, JI, Macdonald, MB, Impoinvil, DE & Novak, RJ (**2008**) Integrated vector management for malaria control. *Malar J*, 7 Suppl 1, S4.

Bejon, P, Lusingu, J, Olotu, A, Leach, A, Lievens, M, Vekemans, J, Mshamu, S, Lang, T, Gould, J, Dubois, MC, Demoitie, MA, Stallaert, JF, Vansadia, P, Carter, T, Njuguna, P, Awuondo, KO, Malabeja, A, Abdul, O, Gesase, S, Mturi, N, Drakeley, CJ, Savarese, B, Villafana, T, Ballou, WR, Cohen, J, Riley, EM, Lemnge, MM, Marsh, K & von Seidlein, L (**2008**) Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N Engl J Med*, 359, 2521-2532.

Bell, D & Peeling, RW (**2006**) Evaluation of rapid diagnostic tests: malaria. *Nat Rev Microbiol*, 4, S34-38.

Bennett, D & Alphey, L (**2002**) PP1 binds Sara and negatively regulates Dpp signaling in Drosophila melanogaster. *Nature genetics*, 31, 419-423.

Bennett, D, Szoor, B, Gross, S, Vereshchagina, N & Alphey, L (**2003**) Ectopic expression of inhibitors of protein phosphatase type 1 (PP1) can be used to analyze roles of PP1 in Drosophila development. *Genetics*, 164, 235-245.

Beraldo, FH, Almeida, FM, da Silva, AM & Garcia, CR (**2005**) Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of Plasmodium falciparum cell cycle. *J Cell Biol*, 170, 551-557.

Berndt, N & Ludlow, JW (**2004**) Interaction between the retinoblastoma protein and protein phosphatase 1 during the cell cycle. *Methods Mol Biol*, 281, 17-32.

Berrebi-Bertrand, I, Souchet, M, Camelin, JC, Laville, MP, Calmels, T & Bril, A (**1998**) Biophysical interaction between phospholamban and protein phosphatase 1 regulatory subunit GM. *FEBS Lett*, 439, 224-230.

Bettoun, DJ, Buck, DW, 2nd, Lu, J, Khalifa, B, Chin, WW & Nagpal, S (**2002**) A vitamin D receptor-Ser/Thr phosphatase-p70 S6 kinase complex and modulation of its enzymatic activities by the ligand. *J Biol Chem*, 277, 24847-24850.

Bettoun, DJ, Lu, J, Khalifa, B, Yee, Y, Chin, WW & Nagpal, S (**2004**) Ligand modulates VDR-Ser/Thr protein phosphatase interaction and p70S6 kinase phosphorylation in a cell-context-dependent manner. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 89-90, 195-198.

Beullens, M, Stalmans, W & Bollen, M (**1996**) Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver. *Eur J Biochem*, 239, 183-189.

Beullens, M, Van Eynde, A, Bollen, M & Stalmans, W (**1993**) Inactivation of nuclear inhibitory polypeptides of protein phosphatase-1 (NIPP-1) by protein kinase A. *J Biol Chem*, 268, 13172-13177.

Beullens, M, Van Eynde, A, Stalmans, W & Bollen, M (**1992**) The isolation of novel inhibitory polypeptides of protein phosphatase 1 from bovine thymus nuclei. *J Biol Chem*, 267, 16538-16544.

Bhattacharyya, MK, Hong, Z, Kongkasuriyachai, D & Kumar, N (**2002**) Plasmodium falciparum protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in Saccharomyces cerevisiae. *International journal for parasitology*, 32, 739-747.

Bianchi, M, De Lucchini, S, Vietri, M & Villa-Moruzzi, E (**2005**) Reciprocally interacting domains of protein phosphatase 1 and focal adhesion kinase. *Mol Cell Biochem*, 272, 85-90.

Bibb, JA, Snyder, GL, Nishi, A, Yan, Z, Meijer, L, Fienberg, AA, Tsai, LH, Kwon, YT, Girault, JA, Czernik, AJ, Huganir, RL, Hemmings, HC, Jr., Nairn, AC & Greengard, P (**1999**) Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*, 402, 669-671.

Bielas, SL, Serneo, FF, Chechlacz, M, Deerinck, TJ, Perkins, GA, Allen, PB, Ellisman, MH & Gleeson, JG (**2007**) Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell*, 129, 579-591.

Black, S, Andrews, PD, Sneddon, AA & Stark, MJ (**1995**) A regulated MET3-GLC7 gene fusion provides evidence of a mitotic role for Saccharomyces cerevisiae protein phosphatase 1. *Yeast*, 11, 747-759.

Blisnick, T, Vincensini, L, Fall, G & Braun-Breton, C (**2006**) Protein phosphatase 1, a Plasmodium falciparum essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. *Cell Microbiol*, 8, 591-601.

Bloecher, A & Tatchell, K (**1999**) Defects in Saccharomyces cerevisiae protein phosphatase type I activate the spindle/kinetochore checkpoint. *Genes Dev*, 13, 517-522.

Bloecher, A & Tatchell, K (**2000**) Dynamic localization of protein phosphatase type 1 in the mitotic cell cycle of Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*, 149, 125-140.

Boatright, KM & Salvesen, GS (**2003**) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 725-731.

Bogan, AA & Thorn, KS (**1998**) Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol*, 280, 1-9.

Bojang, K, Milligan, P, Pinder, M, Doherty, T, Leach, A, Ofori-Anyinam, O, Lievens, M, Kester, K, Schaecher, K, Ballou, WR & Cohen, J (**2009**) Five-year safety and immunogenicity of

GlaxoSmithKline's candidate malaria vaccine RTS,S/AS02 following administration to semi-immune adult men living in a malaria-endemic region of The Gambia. *Hum Vaccin*, 5, 242-247.

Bojang, KA (**2006**) RTS,S/AS02A for malaria. *Expert Rev Vaccines*, 5, 611-615.

Bojang, KA, Milligan, PJ, Pinder, M, Vigneron, L, Alloueche, A, Kester, KE, Ballou, WR, Conway, DJ, Reece, WH, Gothard, P, Yamuah, L, Delchambre, M, Voss, G, Greenwood, BM, Hill, A, McAdam, KP, Tornieporth, N, Cohen, JD & Doherty, T (**2001**) Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against Plasmodium falciparum infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet*, 358, 1927-1934.

Bollen, M (**2001**) Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci*, 26, 426-431.

Bollen, M, Peti, W, Ragusa, MJ & Beullens, M (**2010**) The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci*, 35, 450-458.

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

Boon-Unge, K, Yu, Q, Zou, T, Zhou, A, Govitrapong, P & Zhou, J (**2007**) Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chem Biol*, 14, 1386-1392.

Boudrez, A, Beullens, M, Groenen, P, Van Eynde, A, Vulsteke, V, Jagiello, I, Murray, M, Krainer, AR, Stalmans, W & Bollen, M (**2000**) NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry. *J Biol Chem*, 275, 25411-25417.

Bozdech, Z, Llinas, M, Pulliam, BL, Wong, ED, Zhu, J & DeRisi, JL (**2003**) The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol*, 1, E5.

Brady, MJ, Printen, JA, Mastick, CC & Saltiel, AR (**1997**) Role of protein targeting to glycogen (PTG) in the regulation of protein phosphatase-1 activity. *J Biol Chem*, 272, 20198-20204.

Brandt, H, Killilea, SD & Lee, EY (**1974**) Activation of phosphorylase phosphatase by a novel procedure: evidence for a regulatory mechanism involving the release of a catalytic subunit from enxyme-inhibitor complex(es) of higher molecular weight. *Biochem Biophys Res Commun*, 61, 598-604.

Brandt, H, Lee, EY & Killilea, SD (**1975**) A protein inhibitor of rabbit liver phosphorylase phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*, 63, 950-956.

Brautigan, DL (**2012**) Protein Ser/ Thr phosphatases - the ugly ducklings of cell signalling. *Febs J*.

Brautigan, DL, Sunwoo, J, Labbe, JC, Fernandez, A & Lamb, NJ (**1990**) Cell cycle oscillation of phosphatase inhibitor-2 in rat fibroblasts coincident with p34cdc2 restriction. *Nature*, 344, 74-78.

Braz, JC, Gregory, K, Pathak, A, Zhao, W, Sahin, B, Klevitsky, R, Kimball, TF, Lorenz, JN, Nairn, AC, Liggett, SB, Bodi, I, Wang, S, Schwartz, A, Lakatta, EG, DePaoli-Roach, AA, Robbins, J, Hewett, TE, Bibb, JA, Westfall, MV, Kranias, EG & Molkentin, JD (**2004**) PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med*, 10, 248-254.

Brendel, C, Rehbein, M, Kreienkamp, HJ, Buck, F, Richter, D & Kindler, S (**2004**) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J*, 384, 239-246.

Brichese, L, Barboule, N, Heliez, C & Valette, A (**2002**) Bcl-2 phosphorylation and proteasome-dependent degradation induced by paclitaxel treatment: consequences on sensitivity of isolated mitochondria to Bid. *Exp Cell Res*, 278, 101-111.

Brichese, L, Cazettes, G & Valette, A (**2004**) JNK is associated with Bcl-2 and PP1 in mitochondria: paclitaxel induces its activation and its association with the phosphorylated form of Bcl-2. *Cell Cycle*, 3, 1312-1319.

Brown, GP, Blitzer, RD, Connor, JH, Wong, T, Shenolikar, S, Iyengar, R & Landau, EM (**2000**) Long-term potentiation induced by theta frequency stimulation is regulated by a protein phosphatase-1-operated gate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20, 7880-7887.

Browne, GJ, Delibegovic, M, Keppens, S, Stalmans, W & Cohen, PT (**2001**) The level of the glycogen targetting regulatory subunit R5 of protein phosphatase 1 is decreased in the livers of insulin-dependent diabetic rats and starved rats. *Biochem J*, 360, 449-459.

Browne, GJ, Fardilha, M, Oxenham, SK, Wu, W, Helps, NR, da Cruz, ESOA, Cohen, PT & da Cruz, ESEF (**2007**) SARP, a new alternatively spliced protein phosphatase 1 and DNA interacting protein. *Biochem J*, 402, 187-196.

Brush, MH, Guardiola, A, Connor, JH, Yao, TP & Shenolikar, S (**2004**) Deactylase inhibitors disrupt cellular complexes containing protein phosphatases and deacetylases. *J Biol Chem*, 279, 7685-7691.

Brush, MH, Weiser, DC & Shenolikar, S (**2003**) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*, 23, 1292-1303.

Buchwald, P (**2010**) Small-molecule protein-protein interaction inhibitors: therapeutic potential in light of molecular size, chemical space, and ligand binding efficiency considerations. *IUBMB Life*, 62, 724-731.

Buttner, B & Horstkorte, R (**2010**) Intracelluar ligands of NCAM. *Adv Exp Med Biol*, 663, 55-66.

Buttner, B, Kannicht, C, Reutter, W & Horstkorte, R (**2005**) Novel cytosolic binding partners of the neural cell adhesion molecule: mapping the binding domains of PLC gamma, LANP, TOAD-64, syndapin, PP1, and PP2A. *Biochemistry*, 44, 6938-6947.

C

Campos, M, Fadden, P, Alms, G, Qian, Z & Haystead, TA (**1996**) Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography. *J Biol Chem*, 271, 28478-28484.

Carr, AN, Schmidt, AG, Suzuki, Y, del Monte, F, Sato, Y, Lanner, C, Breeden, K, Jing, SL, Allen, PB, Greengard, P, Yatani, A, Hoit, BD, Grupp, IL, Hajjar, RJ, DePaoli-Roach, AA & Kranias, EG (**2002**) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol*, 22, 4124-4135.

Caulfield, LE, de Onis, M, Blossner, M & Black, RE (**2004**) Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. *Am J Clin Nutr*, 80, 193-198.

Cayla, X, Garcia, A, Baumgartner, M, Ozon, R & Langsley, G (**2000**) A Theileria parva type 1 protein phosphatase activity. *Mol Biochem Parasitol*, 110, 161-166.

Ceulemans, H & Bollen, M (**2004**) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiological reviews*, 84, 1-39.

Ceulemans, H, Stalmans, W & Bollen, M (**2002**) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*, 24, 371-381.

Ceulemans, H, Vulsteke, V, De Maeyer, M, Tatchell, K, Stalmans, W & Bollen, M (**2002**) Binding of the concave surface of the Sds22 superhelix to the alpha 4/alpha 5/alpha 6-triangle of protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, 277, 47331-47337.

Ch'ng, JH, Kotturi, SR, Chong, AG, Lear, MJ & Tan, KS (**2010**) A programmed cell death pathway in the malaria parasite Plasmodium falciparum has general features of mammalian apoptosis but is mediated by clan CA cysteine proteases. *Cell Death Dis*, 1, e26.

Chakrabarti, D, Da Silva, T, Barger, J, Paquette, S, Patel, H, Patterson, S & Allen, CM (**2002**) Protein farnesyltransferase and protein prenylation in Plasmodium falciparum. *J Biol Chem*, 277, 42066-42073.

Chen, CS, Weng, SC, Tseng, PH & Lin, HP (**2005**) Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *J Biol Chem*, 280, 38879-38887.

Chen, CY, Lai, NS, Yang, JJ, Huang, HL, Hung, WC, Li, C, Lin, TH & Huang, HB (**2010**) FLJ23654 encodes a heart protein phosphatase 1-binding protein (Hepp1). *Biochem Biophys Res Commun*, 391, 698-702.

Chen, Q, Schlichtherle, M & Wahlgren, M (**2000**) Molecular aspects of severe malaria. *Clinical microbiology reviews*, 13, 439-450.

Chen, S, Kesler, CT, Paschal, BM & Balk, SP (**2009**) Androgen receptor phosphorylation and activity are regulated by an association with protein phosphatase 1. *J Biol Chem*, 284, 25576-25584.

Chen, Y, Jirage, D, Caridha, D, Kathcart, AK, Cortes, EA, Dennull, RA, Geyer, JA, Prigge, ST & Waters, NC (**2006**) Identification of an effector protein and gain-of-function mutants that activate Pfmrk, a malarial cyclin-dependent protein kinase. *Mol Biochem Parasitol*, 149, 48-57.

Cheng, A, Dean, NM & Honkanen, RE (**2000**) Serine/threonine protein phosphatase type 1gamma1 is required for the completion of cytokinesis in human A549 lung carcinoma cells. *J Biol Chem*, 275, 1846-1854.

Choudhury, GG, Mahimainathan, L, Das, F, Venkatesan, B & Ghosh-Choudhury, N (**2006**) c-Src couples PI 3 kinase/Akt and MAPK signaling to PDGF-induced DNA synthesis in mesangial cells. *Cell Signal*, 18, 1854-1864.

Chun, YS, Shima, H, Nagasaki, K, Sugimura, T & Nagao, M (**1994**) PP1 gamma 2, a testis-specific protein-serine/threonine-phosphatase type 1 catalytic subunit, is associated with a protein having high sequence homology with the 78-kDa glucose-regulated protein, a member of the 70-kDa heat shock protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3319-3323.

Clackson, T & Wells, JA (**1995**) A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science*, 267, 383-386.

Cohen, FE & Prusiner, SB (**1998**) Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*, 67, 793-819.

Cohen, P (**1989**) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem*, 58, 453-508.

Cohen, PT (**1988**) Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene. *FEBS Lett*, 232, 17-23.

Cohen, PT (**1997**) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci*, 22, 245-251.

Cohen, PT (**2002**) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *Journal of cell science*, 115, 241-256.

Connor, JH, Frederick, D, Huang, H, Yang, J, Helps, NR, Cohen, PT, Nairn, AC, DePaoli-Roach, A, Tatchell, K & Shenolikar, S (**2000**) Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *J Biol Chem*, 275, 18670-18675.

Connor, JH, Weiser, DC, Li, S, Hallenbeck, JM & Shenolikar, S (**2001**) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol*, 21, 6841-6850.

Cori, CF (**1945**) Enzymatic reactions in carbohydrate metabolism. *Harvey Lect*, 41, 253-272.

Cowman, AF, Baldi, DL, Duraisingh, M, Healer, J, Mills, KE, O'Donnell, RA, Thompson, J, Triglia, T, Wickham, ME & Crabb, BS (**2002**) Functional analysis of Plasmodium falciparum merozoite antigens: implications for erythrocyte invasion and vaccine development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357, 25-33.

Crabb, BS & Cowman, AF (**2002**) Plasmodium falciparum virulence determinants unveiled. *Genome Biol*, 3, REVIEWS1031.

Croci, C, Sticht, H, Brandstatter, JH & Enz, R (**2003**) Group I metabotropic glutamate receptors bind to protein phosphatase 1C. Mapping and modeling of interacting sequences. *J Biol Chem*, 278, 50682-50690.

Csortos, C, Czikora, I, Bogatcheva, NV, Adyshev, DM, Poirier, C, Olah, G & Verin, AD (**2008**) TIMAP is a positive regulator of pulmonary endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, L440-450.

Cui, F, Raymond, M & Qiao, CL (**2006**) Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. *Pest Manag Sci*, 62, 1013-1022.

D

da Cruz e Silva, EF, Fox, CA, Ouimet, CC, Gustafson, E, Watson, SJ & Greengard, P (**1995**) Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15, 3375-3389.

Dabire, KR, Diabate, A, Djogbenou, L, Ouari, A, N'Guessan, R, Ouedraogo, JB, Hougard, JM, Chandre, F & Baldet, T (**2008**) Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar J*, 7, 188.

Dacks, JB, Walker, G & Field, MC (**2008**) Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol Int*, 57, 97-104.

Daher, W, Browaeys, E, Pierrot, C, Jouin, H, Dive, D, Meurice, E, Dissous, C, Capron, M, Tomavo, S, Doerig, C, Cailliau, K & Khalife, J (**2006**) Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by PfLRR1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol*, 60, 578-590.

Daher, W, Oria, G, Fauquenoy, S, Cailliau, K, Browaeys, E, Tomavo, S & Khalife, J (**2007**) A Toxoplasma gondii leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity. *Eukaryot Cell*, 6, 1606-1617.

Daher, W, Pierce, R & Khalife, J (**2007**) Census, molecular characterization and developmental expression of Leucine-Rich-Repeat proteins in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 155, 161-166.

Daher, W & Soldati-Favre, D (**2009**) Mechanisms controlling glideosome function in apicomplexans. *Curr Opin Microbiol*, 12, 408-414.

Damer, CK, Partridge, J, Pearson, WR & Haystead, TA (**1998**) Rapid identification of protein phosphatase 1-binding proteins by mixed peptide sequencing and data base searching. Characterization of a novel holoenzymic form of protein phosphatase 1. *J Biol Chem*, 273, 24396-24405.

Dancheck, B, Ragusa, MJ, Allaire, M, Nairn, AC, Page, R & Peti, W (**2011**) Molecular investigations of the structure and function of the protein phosphatase 1-spinophilin-inhibitor 2 heterotrimeric complex. *Biochemistry*, 50, 1238-1246.

Darman, RB, Flemmer, A & Forbush, B (**2001**) Modulation of ion transport by direct targeting of protein phosphatase type 1 to the Na-K-Cl cotransporter. *J Biol Chem*, 276, 34359-34362.

Dautzenberg, FM, Muller, D & Richter, D (**1993**) Dephosphorylation of phosphorylated atrial natriuretic peptide by protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem*, 211, 485-490.

Day, KP, Hayward, RE & Dyer, M (**1998**) The biology of Plasmodium falciparum transmission stages. *Parasitology*, 116 Suppl, S95-109.

Deng, JT, Sutherland, C, Brautigan, DL, Eto, M & Walsh, MP (**2002**) Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J*, 367, 517-524.

DePaoli-Roach, AA (**1984**) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem*, 259, 12144-12152.

DePaoli-Roach, AA & Lee, FT (**1985**) Phosphoprotein phosphatase inhibitor-2 is phosphorylated at both serine and threonine residues in mouse diaphragm. *FEBS Lett*, 183, 423-429.

Desdouits, F, Cheetham, JJ, Huang, HB, Kwon, YG, da Cruz e Silva, EF, Denefle, P, Ehrlich, ME, Nairn, AC, Greengard, P & Girault, JA (**1995**) Mechanism of inhibition of protein phosphatase 1 by DARPP-32: studies with recombinant DARPP-32 and synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 206, 652-658.

Desdouits, F, Siciliano, JC, Greengard, P & Girault, JA (**1995**) Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32: phosphorylation of Ser-137 by casein kinase I inhibits

dephosphorylation of Thr-34 by calcineurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 2682-2685.

Dessauge, F, Cayla, X, Albar, JP, Fleischer, A, Ghadiri, A, Duhamel, M & Rebollo, A (**2006**) Identification of PP1alpha as a caspase-9 regulator in IL-2 deprivation-induced apoptosis. *J Immunol*, 177, 2441-2451.

Devogelaere, B, Beullens, M, Sammels, E, Derua, R, Waelkens, E, van Lint, J, Parys, JB, Missiaen, L, Bollen, M & De Smedt, H (**2007**) Protein phosphatase-1 is a novel regulator of the interaction between IRBIT and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J*, 407, 303-311.

Dimopoulos, GJ, Semba, S, Kitazawa, K, Eto, M & Kitazawa, T (**2007**) Ca2+-dependent rapid Ca2+ sensitization of contraction in arterial smooth muscle. *Circ Res*, 100, 121-129.

Dinischiotu, A, Beullens, M, Stalmans, W & Bollen, M (**1997**) Identification of sds22 as an inhibitory subunit of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *FEBS Lett*, 402, 141-144.

Djimde, A, Doumbo, OK, Cortese, JF, Kayentao, K, Doumbo, S, Diourte, Y, Coulibaly, D, Dicko, A, Su, XZ, Nomura, T, Fidock, DA, Wellems, TE & Plowe, CV (**2001**) A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med*, 344, 257-263.

Dluzewski, AR & Garcia, CR (**1996**) Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of Plasmodium falciparum by kinase inhibitors. *Experientia*, 52, 621-623.

Doerig, C (**2004**) Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*, 1697, 155-168.

Doerig, C, Abdi, A, Bland, N, Eschenlauer, S, Dorin-Semblat, D, Fennell, C, Halbert, J, Holland, Z, Nivez, MP, Semblat, JP, Sicard, A & Reininger, L (**2010a**) Malaria: targeting parasite and host cell kinomes. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 604-612.

Doerig, C, Abdi, A, Bland, N, Eschenlauer, S, Dorin-Semblat, D, Fennell, C, Halbert, J, Holland, Z, Nivez, MP, Semblat, JP, Sicard, A & Reininger, L (**2010b**) Malaria: targeting parasite and host cell kinomes. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 604-612.

Doerig, C, Baker, D, Billker, O, Blackman, MJ, Chitnis, C, Dhar Kumar, S, Heussler, V, Holder, AA, Kocken, C, Krishna, S, Langsley, G, Lasonder, E, Menard, R, Meissner, M, Pradel, G, Ranford-Cartwright, L, Sharma, A, Sharma, P, Tardieux, T, Tatu, U & Alano, P (**2009**) Signalling in malaria parasites. The MALSIG consortium. *Parasite (Paris, France)*, 16, 169-182.

Doerig, C, Billker, O, Haystead, T, Sharma, P, Tobin, AB & Waters, NC (**2008**) Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol*, 24, 570-577.

Doerig, C, Endicott, J & Chakrabarti, D (**2002a**) Cyclin-dependent kinase homologues of Plasmodium falciparum. *Int J Parasitol*, 32, 1575-1585.

Doerig, C, Endicott, J & Chakrabarti, D (**2002b**) Cyclin-dependent kinase homologues of Plasmodium falciparum. *International journal for parasitology*, 32, 1575-1585.

Doerig, C, Horrocks, P, Coyle, J, Carlton, J, Sultan, A, Arnot, D & Carter, R (**1995**) Pfcrk-1, a developmentally regulated cdc2-related protein kinase of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 70, 167-174.

Doerig, C & Tobin, AB (**2010**) Parasite protein kinases: at home and abroad. *Cell host & microbe*, 8, 305-307.

Doherty, MJ, Moorhead, G, Morrice, N, Cohen, P & Cohen, PT (**1995**) Amino acid sequence and expression of the hepatic glycogen-binding (GL)-subunit of protein phosphatase-1. *FEBS letters*, 375, 294-298.

Doherty, MJ, Young, PR & Cohen, PT (**1996**) Amino acid sequence of a novel protein phosphatase 1 binding protein (R5) which is related to the liver- and muscle-specific glycogen binding subunits of protein phosphatase 1. *FEBS Lett*, 399, 339-343.

Dombradi, V, Axton, JM, Barker, HM & Cohen, PT (**1990**) Protein phosphatase 1 activity in Drosophila mutants with abnormalities in mitosis and chromosome condensation. *FEBS Lett*, 275, 39-43.

Dombradi, V, Axton, JM, Brewis, ND, da Cruz e Silva, EF, Alphey, L & Cohen, PT (**1990**) Drosophila contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1. *Eur J Biochem*, 194, 739-745.

Dondorp, AM, Nosten, F, Yi, P, Das, D, Phyo, AP, Tarning, J, Lwin, KM, Ariey, F, Hanpithakpong, W, Lee, SJ, Ringwald, P, Silamut, K, Imwong, M, Chotivanich, K, Lim, P, Herdman, T, An, SS, Yeung, S, Singhasivanon, P, Day, NP, Lindegardh, N, Socheat, D & White, NJ (**2009**) Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *N Engl J Med*, 361, 455-467.

Doonan, JH, MacKintosh, C, Osmani, S, Cohen, P, Bai, G, Lee, EY & Morris, NR (**1991**) A cDNA encoding rabbit muscle protein phosphatase 1 alpha complements the Aspergillus cell cycle mutation, bimG11. *J Biol Chem*, 266, 18889-18894.

Doonan, JH & Morris, NR (**1989**) The bimG gene of Aspergillus nidulans, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell*, 57, 987-996.

Dorin-Semblat, D, Quashie, N, Halbert, J, Sicard, A, Doerig, C, Peat, E & Ranford-Cartwright, L (**2007**) Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum by reverse genetics. *Mol Microbiol*, 65, 1170-1180.

Dorin-Semblat, D, Schmitt, S, Semblat, JP, Sicard, A, Reininger, L, Goldring, D, Patterson, S, Quashie, N, Chakrabarti, D, Meijer, L & Doerig, C (**2011**) Plasmodium falciparum NIMA-related kinase Pfnek-1: sex specificity and assessment of essentiality for the erythrocytic asexual cycle. *Microbiology*, 157, 2785-2794.

Dorin-Semblat, D, Sicard, A, Doerig, C & Ranford-Cartwright, L (**2008**) Disruption of the PfPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Eukaryot Cell*, 7, 279-285.

Dorin, D, Le Roch, K, Sallicandro, P, Alano, P, Parzy, D, Poullet, P, Meijer, L & Doerig, C (**2001**) Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite Plasmodium falciparum Biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. *Eur J Biochem*, 268, 2600-2608.

Dorsey, G, Kamya, MR, Singh, A & Rosenthal, PJ (**2001**) Polymorphisms in the Plasmodium falciparum pfcrt and pfmdr-1 genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *J Infect Dis*, 183, 1417-1420.

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

Durfee, T, Becherer, K, Chen, PL, Yeh, SH, Yang, Y, Kilburn, AE, Lee, WH & Elledge, SJ (**1993**) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*, 7, 555-569.

Dvorin, JD, Martyn, DC, Patel, SD, Grimley, JS, Collins, CR, Hopp, CS, Bright, AT, Westenberger, S, Winzeler, E, Blackman, MJ, Baker, DA, Wandless, TJ & Duraisingh, MT (**2010**) A plant-like kinase in Plasmodium falciparum regulates parasite egress from erythrocytes. *Science*, 328, 910-912.

E

Earnshaw, WC, Martins, LM & Kaufmann, SH (**1999**) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68, 383-424.

Eastman, RT & Fidock, DA (**2009**) Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol*, 7, 864-874.

Ebers, GM & Stern, L (1875). *Papyrus Ebers. Facsimile with a partial translation.*

.

Egloff, MP, Cohen, PT, Reinemer, P & Barford, D (**1995**) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol*, 254, 942-959.

Egloff, MP, Johnson, DF, Moorhead, G, Cohen, PT, Cohen, P & Barford, D (**1997**) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J*, 16, 1876-1887.

El-Armouche, A, Rau, T, Zolk, O, Ditz, D, Pamminger, T, Zimmermann, WH, Jackel, E, Harding, SE, Boknik, P, Neumann, J & Eschenhagen, T (**2003**) Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *Faseb J*, 17, 437-439.

El-Armouche, A, Wittkopper, K, Degenhardt, F, Weinberger, F, Didie, M, Melnychenko, I, Grimm, M, Peeck, M, Zimmermann, WH, Unsold, B, Hasenfuss, G, Dobrev, D & Eschenhagen, T (**2008**) Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 80, 396-406.

Eley, HL, Russell, ST & Tisdale, MJ (**2007**) Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem J*, 407, 113-120.

Emanuele, MJ, Lan, W, Jwa, M, Miller, SA, Chan, CS & Stukenberg, PT (**2008**) Aurora B kinase and protein phosphatase 1 have opposing roles in modulating kinetochore assembly. *J Cell Biol*, 181, 241-254.

Endo, S, Suzuki, M, Sumi, M, Nairn, AC, Morita, R, Yamakawa, K, Greengard, P & Ito, M (**1999**) Molecular identification of human G-substrate, a possible downstream component of the cGMP-dependent protein kinase cascade in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2467-2472.

Enz, R (**2002**) The metabotropic glutamate receptor mGluR7b binds to the catalytic gamma-subunit of protein phosphatase 1. *J Neurochem*, 81, 1130-1140.

Enz, R (**2007**) The trick of the tail: protein-protein interactions of metabotropic glutamate receptors. *Bioessays*, 29, 60-73.

Erdodi, F, Kiss, E, Walsh, MP, Stefansson, B, Deng, JT, Eto, M, Brautigan, DL & Hartshorne, DJ (**2003**) Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 382-387.

Eto, M (**2009**) Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *J Biol Chem*, 284, 35273-35277.

Eto, M, Bock, R, Brautigan, DL & Linden, DJ (**2002**) Cerebellar long-term synaptic depression requires PKC-mediated activation of CPI-17, a myosin/moesin phosphatase inhibitor. *Neuron*, 36, 1145-1158.

Eto, M & Brautigan, DL (**2012**) Endogenous inhibitor proteins that connect Ser/Thr kinases and phosphatases in cell signaling. *IUBMB Life*, 64, 732-739.

Eto, M, Elliott, E, Prickett, TD & Brautigan, DL (**2002**) Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with NimA-related kinase to induce centrosome separation. *J Biol Chem*, 277, 44013-44020.

Eto, M, Karginov, A & Brautigan, DL (**1999**) A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry*, 38, 16952-16957.

Eto, M, Kitazawa, T & Brautigan, DL (**2004**) Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 8888-8893.

Eto, M, Leach, C, Tountas, NA & Brautigan, DL (**2003**) Phosphoprotein inhibitors of protein phosphatase-1. *Methods Enzymol*, 366, 243-260.

Eto, M, Ohmori, T, Suzuki, M, Furuya, K & Morita, F (**1995**) A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem*, 118, 1104-1107.

F

Fardilha, M, Esteves, SL, Korrodi-Gregorio, L, da Cruz e Silva, OA & da Cruz e Silva, FF (**2010**) The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interacting proteins to health and disease. *Curr Med Chem*, 17, 3996-4017.

Fardilha, M, Wu, W, Sa, R, Fidalgo, S, Sousa, C, Mota, C, da Cruz e Silva, OA & da Cruz e Silva, EF (**2004**) Alternatively spliced protein variants as potential therapeutic targets for male infertility and contraception. *Ann N Y Acad Sci*, 1030, 468-478.

Farkas, I, Dombradi, V, Miskei, M, Szabados, L & Koncz, C (**2007**) Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends in plant science*, 12, 169-176.

Feliciello, A, Cardone, L, Garbi, C, Ginsberg, MD, Varrone, S, Rubin, CS, Avvedimento, EV & Gottesman, ME (**1999**) Yotiao protein, a ligand for the NMDA receptor, binds and targets cAMP-dependent protein kinase II(1). *FEBS Lett*, 464, 174-178.

Feliciello, A, Gottesman, ME & Avvedimento, EV (**2001**) The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J Mol Biol*, 308, 99-114.

Feng, J, Yan, Z, Ferreira, A, Tomizawa, K, Liauw, JA, Zhuo, M, Allen, PB, Ouimet, CC & Greengard, P (**2000**) Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9287-9292.

Fennell, C, Babbitt, S, Russo, I, Wilkes, J, Ranford-Cartwright, L, Goldberg, DE & Doerig, C (**2009**) PfeIK1, a eukaryotic initiation factor 2alpha kinase of the human malaria parasite Plasmodium falciparum, regulates stress-response to amino-acid starvation. *Malar J*, 8, 99.

Ferrell, JE, Jr. (**2002**) Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 140-148.

Fichera, ME & Roos, DS (**1997**) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*, 390, 407-409.

Fidock, DA, Eastman, RT, Ward, SA & Meshnick, SR (**2008**) Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. *Trends in parasitology*, 24, 537-544.

Fischer, EH & Krebs, EG (**1955**) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem*, 216, 121-132.

Fischer, U, Janicke, RU & Schulze-Osthoff, K (**2003**) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10, 76-100.

Florens, L, Washburn, MP, Raine, JD, Anthony, RM, Grainger, M, Haynes, JD, Moch, JK, Muster, N, Sacci, JB, Tabb, DL, Witney, AA, Wolters, D, Wu, Y, Gardner, MJ, Holder, AA, Sinden, RE, Yates, JR & Carucci, DJ (**2002**) A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. *Nature*, 419, 520-526.

Flores-Delgado, G, Liu, CW, Sposto, R & Berndt, N (**2007**) A limited screen for protein interactions reveals new roles for protein phosphatase 1 in cell cycle control and apoptosis. *Journal of proteome research*, 6, 1165-1175.

Foley, M & Tilley, L (**1997**) Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *International journal for parasitology*, 27, 231-240.

Foulkes, JG, Strada, SJ, Henderson, PJ & Cohen, P (**1983**) A kinetic analysis of the effects of inhibitor-1 and inhibitor-2 on the activity of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem*, 132, 309-313.

Francisco, L, Wang, W & Chan, CS (**1994**) Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol*, 14, 4731-4740.

Fresu, M, Bianchi, M, Parsons, JT & Villa-Moruzzi, E (**2001**) Cell-cycle-dependent association of protein phosphatase 1 and focal adhesion kinase. *Biochem J*, 358, 407-414.

Frevert, U (**2004**) Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends in parasitology*, 20, 417-424.

Freville, A, Landrieu, I, Garcia-Gimeno, MA, Vicogne, J, Montbarbon, M, Bertin, B, Verger, A, Kalamou, H, Sanz, P, Werkmeister, E, Pierrot, C & Khalife, J (**2012**) Plasmodium falciparum

inhibitor-3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival. *J Biol Chem*, 287, 1306-1321.

Fry, AM, Meraldi, P & Nigg, EA (**1998**) A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *Embo J*, 17, 470-481.

G

Gagnon, KB, England, R, Diehl, L & Delpire, E (**2007**) Apoptosis-associated tyrosine kinase scaffolding of protein phosphatase 1 and SPAK reveals a novel pathway for Na-K-2C1 cotransporter regulation. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292, C1809-1815.

Gamo, FJ, Sanz, LM, Vidal, J, de Cozar, C, Alvarez, E, Lavandera, JL, Vanderwall, DE, Green, DV, Kumar, V, Hasan, S, Brown, JR, Peishoff, CE, Cardon, LR & Garcia-Bustos, JF (**2010**) Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*, 465, 305-310.

Garcia-Gimeno, MA, Munoz, I, Arino, J & Sanz, P (**2003**) Molecular characterization of Ypi1, a novel Saccharomyces cerevisiae type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol Chem*, 278, 47744-47752.

Garcia, A, Cayla, X, Caudron, B, Deveaud, E, Roncal, F & Rebollo, A (**2004**) New insights in protein phosphorylation: a signature for protein phosphatase 1 interacting proteins. *C R Biol*, 327, 93-97.

Garcia, A, Cayla, X, Guergnon, J, Dessauge, F, Hospital, V, Rebollo, MP, Fleischer, A & Rebollo, A (**2003**) Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie*, 85, 721-726.

Gardner, MJ, Shallom, SJ, Carlton, JM, Salzberg, SL, Nene, V, Shoaibi, A, Ciecko, A, Lynn, J, Rizzo, M, Weaver, B, Jarrahi, B, Brenner, M, Parvizi, B, Tallon, L, Moazzez, A, Granger, D, Fujii, C, Hansen, C, Pederson, J, Feldblyum, T, Peterson, J, Suh, B, Angiuoli, S, Pertea, M, Allen, J, Selengut, J, White, O, Cummings, LM, Smith, HO, Adams, MD, Venter, JC, Carucci, DJ, Hoffman, SL & Fraser, CM (**2002**) Sequence of Plasmodium falciparum chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature*, 419, 531-534.

Garner, E, Romero, P, Dunker, AK, Brown, C & Obradovic, Z (**1999**) Predicting Binding Regions within Disordered Proteins. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, 10, 41-50.

Genoux, D, Haditsch, U, Knobloch, M, Michalon, A, Storm, D & Mansuy, IM (**2002**) Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, 418, 970-975.

Gerace, L (**1995**) Nuclear export signals and the fast track to the cytoplasm. *Cell*, 82, 341-344.

Gerald, N, Mahajan, B & Kumar, S (**2011**) Mitosis in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Eukaryot Cell*, 10, 474-482.

Gibbons, JA, Weiser, DC & Shenolikar, S (**2005**) Importance of a surface hydrophobic pocket on protein phosphatase-1 catalytic subunit in recognizing cellular regulators. *J Biol Chem*, 280, 15903-15911.

Ginsburg, H, Landau, I, Baccam, D & Mazier, D (**1987**) Fractionation of mouse malarious blood according to parasite developmental stage, using a Percoll-sorbitol gradient. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 62, 418-425.

Girault, JA, Hemmings, HC, Jr., Williams, KR, Nairn, AC & Greengard, P (**1989**) Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase II. *J Biol Chem*, 264, 21748-21759.

Godet, AN, Guergnon, J, Maire, V, Croset, A & Garcia, A (**2010**) The combinatorial PP1-binding consensus Motif (R/K)x((0,1))V/IxFxx(R/K)x(R/K) is a new apoptotic signature. *PLoS One*, 5, e9981.

Goldberg, J, Huang, HB, Kwon, YG, Greengard, P, Nairn, AC & Kuriyan, J (**1995**) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, 376, 745-753.

Gong, JP, Liu, QR, Zhang, PW, Wang, Y & Uhl, GR (**2005**) Mouse brain localization of the protein kinase C-enhanced phosphatase 1 inhibitor KEPI (kinase C-enhanced PP1 inhibitor). *Neuroscience*, 132, 713-727.

Gozani, O, Patton, JG & Reed, R (**1994**) A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *Embo J*, 13, 3356-3367.

Graeser, R, Franklin, RM & Kappes, B (**1996**) Mechanisms of activation of the cdc2-related kinase PfPK5 from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 79, 125-127.

Graeser, R, Wernli, B, Franklin, RM & Kappes, B (**1996**) Plasmodium falciparum protein kinase 5 and the malarial nuclear division cycles. *Mol Biochem Parasitol*, 82, 37-49.

Greengard, P, Allen, PB & Nairn, AC (**1999**) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron*, 23, 435-447.

Greenwood, BM, Fidock, DA, Kyle, DE, Kappe, SH, Alonso, PL, Collins, FH & Duffy, PE (**2008**) Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*, 118, 1266-1276.

Gruppuso, PA, Johnson, GL, Constantinides, M & Brautigan, DL (**1985**) Phosphorylase phosphatase regulatory subunit. "Western" blotting with immunoglobulins against inhibitor-2 reveals a protein of Mr = 60,000. *J Biol Chem*, 260, 4288-4294.

Grusche, FA, Hidalgo, C, Fletcher, G, Sung, HH, Sahai, E & Thompson, BJ (**2009**) Sds22, a PP1 phosphatase regulatory subunit, regulates epithelial cell polarity and shape [Sds22 in epithelial morphology]. *BMC developmental biology*, 9, 14.

Gubbels, MJ, White, M & Szatanek, T (**2008**) The cell cycle and Toxoplasma gondii cell division: tightly knit or loosely stitched? *Int J Parasitol*, 38, 1343-1358.

Guergnon, J, Dessauge, F, Dominguez, V, Viallet, J, Bonnefoy, S, Yuste, VJ, Mercereau-Puijalon, O, Cayla, X, Rebollo, A, Susin, SA, Bost, PE & Garcia, A (**2006**) Use of penetrating peptides interacting with PP1/PP2A proteins as a general approach for a drug phosphatase technology. *Mol Pharmacol*, 69, 1115-1124.

Guertin, DA, Trautmann, S & McCollum, D (**2002**) Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 155-178.

Gunawardena, SR, Ruis, BL, Meyer, JA, Kapoor, M & Conklin, KF (**2008**) NOM1 targets protein phosphatase I to the nucleolus. *J Biol Chem*, 283, 398-404.

Guo, CY, Brautigan, DL & Larner, JM (**2002**) Ionizing radiation activates nuclear protein phosphatase-1 by ATM-dependent dephosphorylation. *J Biol Chem*, 277, 41756-41761.

H

Hakki, M & Geballe, AP (**2008**) Cellular serine/threonine phosphatase activity during human cytomegalovirus infection. *Virology*, 380, 255-263.

Halbert, J, Ayong, L, Equinet, L, Le Roch, K, Hardy, M, Goldring, D, Reininger, L, Waters, N, Chakrabarti, D & Doerig, C (**2010**) A Plasmodium falciparum transcriptional cyclin-dependent kinase-related kinase with a crucial role in parasite proliferation associates with histone deacetylase activity. *Eukaryot Cell*, 9, 952-959.

Haldar, K & Mohandas, N (**2007**) Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Curr Opin Hematol*, 14, 203-209.

Hall, KU, Collins, SP, Gamm, DM, Massa, E, DePaoli-Roach, AA & Uhler, MD (**1999**) Phosphorylation-dependent inhibition of protein phosphatase-1 by G-substrate. A Purkinje cell substrate of the cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 274, 3485-3495.

Haneda, M, Kojima, E, Nishikimi, A, Hasegawa, T, Nakashima, I & Isobe, K (**2004**) Protein phosphatase 1, but not protein phosphatase 2A, dephosphorylates DNA-damaging stress-induced phospho-serine 15 of p53. *FEBS Lett*, 567, 171-174.

Hanes, SD, Shank, PR & Bostian, KA (**1989**) Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 5, 55-72.

Harding, HP, Zhang, Y & Ron, D (**1999**) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397, 271-274.

Harding, HP, Zhang, Y, Scheuner, D, Chen, JJ, Kaufman, RJ & Ron, D (**2009**) Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 1832-1837.

He, B, Gross, M & Roizman, B (**1997**) The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 843-848.

He, B, Gross, M & Roizman, B (**1998**) The gamma134.5 protein of herpes simplex virus 1 has the structural and functional attributes of a protein phosphatase 1 regulatory subunit and is present in a high molecular weight complex with the enzyme in infected cells. *J Biol Chem*, 273, 20737-20743.

He, CY, Shaw, MK, Pletcher, CH, Striepen, B, Tilney, LG & Roos, DS (**2001**) A plastid segregation defect in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Embo J*, 20, 330-339.

Helps, NR, Barker, HM, Elledge, SJ & Cohen, PT (**1995**) Protein phosphatase 1 interacts with p53BP2, a protein which binds to the tumour suppressor p53. *FEBS Lett*, 377, 295-300.

Helps, NR & Cohen, PT (**1999**) Drosophila melanogaster protein phosphatase inhibitor-2: identification of a site important for PP1 inhibition. *FEBS Lett*, 463, 72-76.

Helps, NR, Luo, X, Barker, HM & Cohen, PT (**2000**) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*, 349, 509-518.

Helps, NR, Vergidou, C, Gaskell, T & Cohen, PT (**1998**) Characterisation of a novel Drosophila melanogaster testis specific PP1 inhibitor related to mammalian inhibitor-2: identification of the site of interaction with PP1. *FEBS Lett*, 438, 131-136.

Hemmings, BA, Resink, TJ & Cohen, P (**1982**) Reconstitution of a Mg-ATP-dependent protein phosphatase and its activation through a phosphorylation mechanism. *FEBS Lett*, 150, 319-324.

Hemmings, HC, Jr., Greengard, P, Tung, HY & Cohen, P (**1984**) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature*, 310, 503-505.

Hendrickx, A, Beullens, M, Ceulemans, H, Den Abt, T, Van Eynde, A, Nicolaescu, E, Lesage, B & Bollen, M (**2009**) Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem Biol*, 16, 365-371.

Henkhaus, RS, Roy, UK, Cavallo-Medved, D, Sloane, BF, Gerner, EW & Ignatenko, NA (**2008**) Caveolin-1-mediated expression and secretion of kallikrein 6 in colon cancer cells. *Neoplasia*, 10, 140-148.

Hermanson, O, Jepsen, K & Rosenfeld, MG (**2002**) N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature*, 419, 934-939.

Heroes, E, Lesage, B, Gornemann, J, Beullens, M, Van Meervelt, L & Bollen, M (**2012**) The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *Febs J*.

Hilioti, Z & Cunningham, KW (**2003**) The RCN family of calcineurin regulators. *Biochem Biophys Res Commun*, 311, 1089-1093.

Hirano, K, Erdodi, F, Patton, JG & Hartshorne, DJ (**1996**) Interaction of protein phosphatase type 1 with a splicing factor. *FEBS Lett*, 389, 191-194.

Hirano, K, Ito, M & Hartshorne, DJ (**1995**) Interaction of the ribosomal protein, L5, with protein phosphatase type 1. *J Biol Chem*, 270, 19786-19790.

Hisamoto, N, Sugimoto, K & Matsumoto, K (**1994**) The Glc7 type 1 protein phosphatase of Saccharomyces cerevisiae is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol Cell Biol*, 14, 3158-3165.

Holland, Z, Prudent, R, Reiser, JB, Cochet, C & Doerig, C (**2009**) Functional analysis of protein kinase CK2 of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Eukaryot Cell*, 8, 388-397.

Holmes, CF, Campbell, DG, Caudwell, FB, Aitken, A & Cohen, P (**1986**) The protein phosphatases involved in cellular regulation. Primary structure of inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, 155, 173-182.

Holmes, CF, Kuret, J, Chisholm, AA & Cohen, P (**1986**) Identification of the sites on rabbit skeletal muscle protein phosphatase inhibitor-2 phosphorylated by casein kinase-II. *Biochim Biophys Acta*, 870, 408-416.

Hsu, JY, Sun, ZW, Li, X, Reuben, M, Tatchell, K, Bishop, DK, Grushcow, JM, Brame, CJ, Caldwell, JA, Hunt, DF, Lin, R, Smith, MM & Allis, CD (**2000**) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, 102, 279-291.

Huang, CJ, Tang, Z, Lin, RJ & Tucker, PW (**2007**) Phosphorylation by SR kinases regulates the binding of PTB-associated splicing factor (PSF) to the pre-mRNA polypyrimidine tract. *FEBS Lett*, 581, 223-232.

Huang da, W, Sherman, BT & Lempicki, RA (**2009**) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 37, 1-13.

Huang da, W, Sherman, BT, Zheng, X, Yang, J, Imamichi, T, Stephens, R & Lempicki, RA (**2009**) Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 13, Unit 13 11.

Huang, FL & Glinsmann, WH (**1975**) Inactivation of rabbit muscle phosphorylase phosphatase by cyclic AMP-dependent kinas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 3004-3008.

Huang, FL & Glinsmann, WH (**1976**) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, 70, 419-426.

Huang, HB, Chen, YC, Tsai, LH, Wang, H, Lin, FM, Horiuchi, A, Greengard, P, Nairn, AC, Shiao, MS & Lin, TH (**2000**) Backbone 1H, 15N, and 13C resonance assignments of inhibitor-2 -- a protein inhibitor of protein phosphatase-1. *J Biomol NMR*, 17, 359-360.

Huang, HB, Horiuchi, A, Watanabe, T, Shih, SR, Tsay, HJ, Li, HC, Greengard, P & Nairn, AC (**1999**) Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem*, 274, 7870-7878.

Huang, HS & Lee, EY (**2008**) Protein phosphatase-1 inhibitor-3 is an in vivo target of caspase-3 and participates in the apoptotic response. *J Biol Chem*, 283, 18135-18146.

Huang, HS, Pozarowski, P, Gao, Y, Darzynkiewicz, Z & Lee, EY (**2005**) Protein phosphatase-1 inhibitor-3 is co-localized to the nucleoli and centrosomes with PP1gamma1 and PP1alpha, respectively. *Arch Biochem Biophys*, 443, 33-44.

Huang, J, Mahavadi, S, Sriwai, W, Hu, W & Murthy, KS (**2006**) Gi-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC20 via preferential activation of the PI3K/ILK pathway. *Biochem J*, 396, 193-200.

Huang, Z, Myers, K, Khatra, B & Vijayaraghavan, S (**2004**) Protein 14-3-3zeta binds to protein phosphatase PP1gamma2 in bovine epididymal spermatozoa. *Biology of reproduction*, 71, 177-184.

Hubbard, MJ & Cohen, P (**1993**) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci*, 18, 172-177.

Hubbard, MJ, Dent, P, Smythe, C & Cohen, P (**1990**) Targetting of protein phosphatase 1 to the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle by a protein that is very similar or identical to the G subunit that directs the enzyme to glycogen. *Eur J Biochem*, 189, 243-249.

Huchon, D, Ozon, R & Demaille, JG (**1981**) Protein phosphatase-1 is involved in Xenopus oocyte maturation. *Nature*, 294, 358-359.

Hurley, TD, Yang, J, Zhang, L, Goodwin, KD, Zou, Q, Cortese, M, Dunker, AK & DePaoli-Roach, AA (**2007**) Structural basis for regulation of protein phosphatase 1 by inhibitor-2. *J Biol Chem*, 282, 28874-28883.

I

Iakoucheva, LM, Brown, CJ, Lawson, JD, Obradovic, Z & Dunker, AK (**2002**) Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol Biol*, 323, 573-584.

Imwong, M, Pukrittayakamee, S, Renia, L, Letourneur, F, Charlieu, JP, Leartsakulpanich, U, Looareesuwan, S, White, NJ & Snounou, G (**2003**) Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of Plasmodium vivax: evidence for sequential selection by drug pressure. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 1514-1521.

Ingebritsen, TS, Stewart, AA & Cohen, P (**1983**) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *Eur J Biochem*, 132, 297-307.

J

Jagiello, I, Beullens, M, Vulsteke, V, Wera, S, Sohlberg, B, Stalmans, W, von Gabain, A & Bollen, M (**1997**) NIPP-1, a nuclear inhibitory subunit of protein phosphatase-1, has RNA-binding properties. *J Biol Chem*, 272, 22067-22071.

Jagiello, I, Van Eynde, A, Vulsteke, V, Beullens, M, Boudrez, A, Keppens, S, Stalmans, W & Bollen, M (**2000**) Nuclear and subnuclear targeting sequences of the protein phosphatase-1 regulator NIPP1. *Journal of cell science*, 113 Pt 21, 3761-3768.

Janssens, V, Longin, S & Goris, J (**2008**) PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci*, 33, 113-121.

Jaumot, M & Hancock, JF (**2001**) Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene*, 20, 3949-3958.

Jiang, Y, Luo, W & Howe, PH (**2009**) Dab2 stabilizes Axin and attenuates Wnt/beta-catenin signaling by preventing protein phosphatase 1 (PP1)-Axin interactions. *Oncogene*, 28, 2999-3007.

Jin, H, Sperka, T, Herrlich, P & Morrison, H (**2006**) Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature*, 442, 576-579.

Johnson, DF, Moorhead, G, Caudwell, FB, Cohen, P, Chen, YH, Chen, MX & Cohen, PT (**1996**) Identification of protein-phosphatase-1-binding domains on the glycogen and myofibrillar targetting subunits. *Eur J Biochem*, 239, 317-325.

Jousse, C, Oyadomari, S, Novoa, I, Lu, P, Zhang, Y, Harding, HP & Ron, D (**2003**) Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol*, 163, 767-775.

K

Kakinoki, Y, Somers, J & Brautigan, DL (**1997**) Multisite phosphorylation and the nuclear localization of phosphatase inhibitor 2-green fluorescent protein fusion protein during S phase of the cell growth cycle. *J Biol Chem*, 272, 32308-32314.

Kao, SC, Chen, CY, Wang, SL, Yang, JJ, Hung, WC, Chen, YC, Lai, NS, Liu, HT, Huang, HL, Chen, HC, Lin, TH & Huang, HB (**2007**) Identification of phostensin, a PP1 F-actin cytoskeleton targeting subunit. *Biochem Biophys Res Commun*, 356, 594-598.

Katayama, H, Zhou, H, Li, Q, Tatsuka, M & Sen, S (**2001**) Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem*, 276, 46219-46224.

Katayose, Y, Li, M, Al-Murrani, SW, Shenolikar, S & Damuni, Z (**2000**) Protein phosphatase 2A inhibitors, I(1)(PP2A) and I(2)(PP2A), associate with and modify the substrate specificity of protein phosphatase 1. *J Biol Chem*, 275, 9209-9214.

Kato, N, Sakata, T, Breton, G, Le Roch, KG, Nagle, A, Andersen, C, Bursulaya, B, Henson, K, Johnson, J, Kumar, KA, Marr, F, Mason, D, McNamara, C, Plouffe, D, Ramachandran, V, Spooner, M, Tuntland, T, Zhou, Y, Peters, EC, Chatterjee, A, Schultz, PG, Ward, GE, Gray, N, Harper, J & Winzeler, EA (**2008**) Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to Plasmodium falciparum motility. *Nature chemical biology*, 4, 347-356.

Kawamoto, F, Alejo-Blanco, R, Fleck, SL, Kawamoto, Y & Sinden, RE (**1990**) Possible roles of Ca2+ and cGMP as mediators of the exflagellation of Plasmodium berghei and Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 42, 101-108.

Keeling, PJ (**2009**) Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 56, 1-8.

Kelker, MS, Dancheck, B, Ju, T, Kessler, RP, Hudak, J, Nairn, AC & Peti, W (**2007**) Structural basis for spinophilin-neurabin receptor interaction. *Biochemistry*, 46, 2333-2344.

Kelker, MS, Page, R & Peti, W (**2009**) Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to nodularin-R and tautomycin: a novel scaffold for structure-based drug design of serine/threonine phosphatase inhibitors. *J Mol Biol*, 385, 11-21.

Keller, PJ (**1955**) The action of trypsin on phosphorylase a. *J Biol Chem*, 214, 135-141.

Kepp, O, Galluzzi, L, Giordanetto, F, Tesniere, A, Vitale, I, Martins, I, Schlemmer, F, Adjemian, S, Zitvogel, L & Kroemer, G (**2009**) Disruption of the PP1/GADD34 complex induces calreticulin exposure. *Cell Cycle*, 8, 3971-3977.

Kester, KE, Cummings, JF, Ofori-Anyinam, O, Ockenhouse, CF, Krzych, U, Moris, P, Schwenk, R, Nielsen, RA, Debebe, Z, Pinelis, E, Juompan, L, Williams, J, Dowler, M, Stewart, VA, Wirtz, RA, Dubois, MC, Lievens, M, Cohen, J, Ballou, WR & Heppner, DG, Jr. (**2009**) Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis*, 200, 337-346.

Kester, KE, McKinney, DA, Tornieporth, N, Ockenhouse, CF, Heppner, DG, Jr., Hall, T, Wellde, BT, White, K, Sun, P, Schwenk, R, Krzych, U, Delchambre, M, Voss, G, Dubois, MC, Gasser, RA, Jr., Dowler, MG, O'Brien, M, Wittes, J, Wirtz, R, Cohen, J & Ballou, WR (**2007**) A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of a two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS,S/AS02A in malaria-naive adults. *Vaccine*, 25, 5359-5366.

Kim, CJ, Cho, YG, Park, YG, Nam, SW, Kim, SY, Lee, SH, Yoo, NJ, Lee, JY & Park, WS (**2005**) Pin1 overexpression in colorectal cancer and its correlation with aberrant beta-catenin expression. *World J Gastroenterol*, 11, 5006-5009.

Kim, H, Lee, OH, Xin, H, Chen, LY, Qin, J, Chae, HK, Lin, SY, Safari, A, Liu, D & Songyang, Z (**2009**) TRF2 functions as a protein hub and regulates telomere maintenance by recognizing specific peptide motifs. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 372-379.

Kim, K, Li, L, Kozlowski, K, Suh, HS, Cao, W & Ballermann, BJ (**2005**) The protein phosphatase-1 targeting subunit TIMAP regulates LAMR1 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 1327-1334.

Kim, MH (**2008**) Protein phosphatase 1 activation and alternative splicing of Bcl-X and Mcl-1 by EGCG + ibuprofen. *J Cell Biochem*, 104, 1491-1499.

Kim, TH, Goodman, J, Anderson, KV & Niswander, L (**2007**) Phactr4 regulates neural tube and optic fissure closure by controlling PP1-, Rb-, and E2F1-regulated cell-cycle progression. *Dev Cell*, 13, 87-102.

Kim, YM, Watanabe, T, Allen, PB, Lee, SJ, Greengard, P, Nairn, AC & Kwon, YG (**2003**) PNUTS, a protein phosphatase 1 (PP1) nuclear targeting subunit. Characterization of its PP1- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem*, 278, 13819-13828.

Kirchhefer, U, Baba, HA, Boknik, P, Breeden, KM, Mavila, N, Bruchert, N, Justus, I, Matus, M, Schmitz, W, Depaoli-Roach, AA & Neumann, J (**2005**) Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res*, 68, 98-108.

Kiss, A, Lontay, B, Becsi, B, Markasz, L, Olah, E, Gergely, P & Erdodi, F (**2008**) Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A. *Cell Signal*, 20, 2059-2070.

Kita, A, Matsunaga, S, Takai, A, Kataiwa, H, Wakimoto, T, Fusetani, N, Isobe, M & Miki, K (**2002**) Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Structure*, 10, 715-724.

Kitazawa, T, Eto, M, Woodsome, TP & Brautigan, DL (**2000**) Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem*, 275, 9897-9900.

Koshibu, K, Graff, J, Beullens, M, Heitz, FD, Berchtold, D, Russig, H, Farinelli, M, Bollen, M & Mansuy, IM (**2009**) Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *J Neurosci*, 29, 13079-13089.

Koyama, FC, Chakrabarti, D & Garcia, CR (**2009**) Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in Plasmodium. *Mol Biochem Parasitol*, 165, 1-7.

Kozlov, S, Waters, NC & Chavchich, M (**2010**) Leveraging cell cycle analysis in anticancer drug discovery to identify novel plasmodial drug targets. *Infect Disord Drug Targets*, 10, 165-190.

Kreivi, JP, Trinkle-Mulcahy, L, Lyon, CE, Morrice, NA, Cohen, P & Lamond, AI (**1997**) Purification and characterisation of p99, a nuclear modulator of protein phosphatase 1 activity. *FEBS Lett*, 420, 57-62.

Krishna, S, Woodrow, CJ, Staines, HM, Haynes, RK & Mercereau-Puijalon, O (**2006**) Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. *Trends Mol Med*, 12, 200-205.

Kuhn, Y, Sanchez, CP, Ayoub, D, Saridaki, T, van Dorsselaer, A & Lanzer, M (**2010**) Trafficking of the phosphoprotein PfCRT to the digestive vacuolar membrane in Plasmodium falciparum. *Traffic*, 11, 236-249.

Kumar, A, Vaid, A, Syin, C & Sharma, P (**2004**) PfPKB, a novel protein kinase B-like enzyme from Plasmodium falciparum: I. Identification, characterization, and possible role in parasite development. *J Biol Chem*, 279, 24255-24264.

Kumar, N (**1997**) Protein phosphorylation during sexual differentiation in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 87, 205-210.

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

Kwiek, NC, Thacker, DF, Datto, MB, Megosh, HB & Haystead, TA (**2006**) PITK, a PP1 targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP K. *Cell Signal*, 18, 1769-1778.

Kwiek, NC, Thacker, DF & Haystead, TA (**2007**) Dual kinase-mediated regulation of PITK by CaMKII and GSK3. *Cell Signal*, 19, 593-599.

Kwon, YG, Huang, HB, Desdouits, F, Girault, JA, Greengard, P & Nairn, AC (**1997**) Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 3536-3541.

L

Landsverk, HB, Kirkhus, M, Bollen, M, Kuntziger, T & Collas, P (**2005**) PNUTS enhances in vitro chromosome decondensation in a PP1-dependent manner. *Biochem J*, 390, 709-717.

Laveran, CL (**1982**) Classics in infectious diseases: A newly discovered parasite in the blood of patients suffering from malaria. Parasitic etiology of attacks of malaria: Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922). *Rev Infect Dis*, 4, 908-911.

Le Roch, K, Sestier, C, Dorin, D, Waters, N, Kappes, B, Chakrabarti, D, Meijer, L & Doerig, C (**2000**) Activation of a Plasmodium falciparum cdc2-related kinase by heterologous p25 and cyclin H. Functional characterization of a P. falciparum cyclin homologue. *J Biol Chem*, 275, 8952-8958.

Le Roch, KG, Zhou, Y, Blair, PL, Grainger, M, Moch, JK, Haynes, JD, De La Vega, P, Holder, AA, Batalov, S, Carucci, DJ & Winzeler, EA (**2003**) Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*, 301, 1503-1508.

Leach, C, Eto, M & Brautigan, DL (**2002**) Domains of type 1 protein phosphatase inhibitor-2 required for nuclear and cytoplasmic localization in response to cell-cell contact. *Journal of cell science*, 115, 3739-3745.

Leach, C, Shenolikar, S & Brautigan, DL (**2003**) Phosphorylation of phosphatase inhibitor-2 at centrosomes during mitosis. *J Biol Chem*, 278, 26015-26020.

Lee, SJ, Lee, JK, Maeng, YS, Kim, YM & Kwon, YG (**2009**) Langerhans cell protein 1 (LCP1) binds to PNUTS in the nucleus: implications for this complex in transcriptional regulation. *Exp Mol Med*, 41, 189-200.

Lee, SJ, Lim, CJ, Min, JK, Lee, JK, Kim, YM, Lee, JY, Won, MH & Kwon, YG (**2007**) Protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit is a hypoxia inducible gene: its role in post-translational modification of p53 and MDM2. *Cell Death Differ*, 14, 1106-1116.

Leete, TH & Rubin, H (**1996**) Malaria and the cell cycle. *Parasitol Today*, 12, 442-444.

Lesage, B, Beullens, M, Pedelini, L, Garcia-Gimeno, MA, Waelkens, E, Sanz, P & Bollen, M (**2007**) A complex of catalytically inactive protein phosphatase-1 sandwiched between Sds22 and inhibitor-3. *Biochemistry*, 46, 8909-8919.

Levene, PA & Alsberg, CL (**1906**) The cleavage products of vitellin. *J Biol Chem*, 127 – 133

Li, DW, Liu, JP, Schmid, PC, Schlosser, R, Feng, H, Liu, WB, Yan, Q, Gong, L, Sun, SM, Deng, M & Liu, Y (**2006**) Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities. *Oncogene*, 25, 3006-3022.

Li, HY, Liu, H, Wang, CH, Zhang, JY, Man, JH, Gao, YF, Zhang, PJ, Li, WH, Zhao, J, Pan, X, Zhou, T, Gong, WL, Li, AL & Zhang, XM (**2008**) Deactivation of the kinase IKK by CUEDC2 through recruitment of the phosphatase PP1. *Nat Immunol*, 9, 533-541.

Li, JL, Robson, KJ, Chen, JL, Targett, GA & Baker, DA (**1996**) Pfmrk, a MO15-related protein kinase from Plasmodium falciparum. Gene cloning, sequence, stage-specific expression and chromosome localization. *Eur J Biochem*, 241, 805-813.

Li, L, Kozlowski, K, Wegner, B, Rashid, T, Yeung, T, Holmes, C & Ballermann, BJ (**2007**) Phosphorylation of TIMAP by glycogen synthase kinase-3beta activates its associated protein phosphatase 1. *J Biol Chem*, 282, 25960-25969.

Li, L, Ren, CH, Tahir, SA, Ren, C & Thompson, TC (**2003**) Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biol*, 23, 9389-9404.

Li, M, Satinover, DL & Brautigan, DL (**2007**) Phosphorylation and functions of inhibitor-2 family of proteins. *Biochemistry*, 46, 2380-2389.

Li, M, Stefansson, B, Wang, W, Schaefer, EM & Brautigan, DL (**2006**) Phosphorylation of the Pro-X-Thr-Pro site in phosphatase inhibitor-2 by cyclin-dependent protein kinase during M-phase of the cell cycle. *Cell Signal*, 18, 1318-1326.

Li, M, Stukenberg, PT & Brautigan, DL (**2008**) Binding of phosphatase inhibitor-2 to prolyl isomerase Pin1 modifies specificity for mitotic phosphoproteins. *Biochemistry*, 47, 292-300.

Li, T, Chalifour, LE & Paudel, HK (**2007**) Phosphorylation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent protein kinase 5 during nerve growth factor-induced PC12 cell differentiation. *J Biol Chem*, 282, 6619-6628.

Liao, H, Li, Y, Brautigan, DL & Gundersen, GG (**1998**) Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *J Biol Chem*, 273, 21901-21908.

Lindgren, M, Hallbrink, M, Prochiantz, A & Langel, U (**2000**) Cell-penetrating peptides. *Trends in pharmacological sciences*, 21, 99-103.

Liu, QR, Zhang, PW, Lin, Z, Li, QF, Woods, AS, Troncoso, J & Uhl, GR (**2004**) GBPI, a novel gastrointestinal- and brain-specific PP1-inhibitory protein, is activated by PKC and inactivated by PKA. *Biochem J*, 377, 171-181.

Liu, QR, Zhang, PW, Zhen, Q, Walther, D, Wang, XB & Uhl, GR (**2002**) KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. *J Biol Chem*, 277, 13312-13320.

Liu, W, Li, Y, Learn, GH, Rudicell, RS, Robertson, JD, Keele, BF, Ndjango, JB, Sanz, CM, Morgan, DB, Locatelli, S, Gonder, MK, Kranzusch, PJ, Walsh, PD, Delaporte, E, Mpoudi-Ngole, E, Georgiev, AV, Muller, MN, Shaw, GM, Peeters, M, Sharp, PM, Rayner, JC & Hahn, BH (**2010**) Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas. *Nature*, 467, 420-425.

Liu, Y, Virshup, DM, White, RL & Hsu, LC (**2002**) Regulation of BRCA1 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 1alpha. *Cancer Res*, 62, 6357-6361.

Liu, ZJ, Anderson, MW, Gu, GM & King, GJ (**2005**) Apoptosis in the regenerate produced by mandibular osteodistraction in the mature rat. *Orthodontics & craniofacial research*, 8, 41-51.

Llanos, S, Royer, C, Lu, M, Bergamaschi, D, Lee, WH & Lu, X (**2011**) Inhibitory member of the apoptosis-stimulating proteins of the p53 family (iASPP) interacts with protein phosphatase 1 via a noncanonical binding motif. *J Biol Chem*, 286, 43039-43044.

Llorian, M, Beullens, M, Andres, I, Ortiz, JM & Bollen, M (**2004**) SIPP1, a novel pre-mRNA splicing factor and interactor of protein phosphatase-1. *Biochem J*, 378, 229-238.

Llorian, M, Beullens, M, Lesage, B, Nicolaescu, E, Beke, L, Landuyt, W, Ortiz, JM & Bollen, M (**2005**) Nucleocytoplasmic shuttling of the splicing factor SIPP1. *J Biol Chem*, 280, 38862-38869.

Loregian, A, Marsden, HS & Palu, G (**2002**) Protein-protein interactions as targets for antiviral chemotherapy. *Reviews in medical virology*, 12, 239-262.

Lou, Y, Xie, W, Zhang, DF, Yao, JH, Luo, ZF, Wang, YZ, Shi, YY & Yao, XB (**2004**) Nek2A specifies the centrosomal localization of Erk2. *Biochem Biophys Res Commun*, 321, 495-501.

Luo, W, Peterson, A, Garcia, BA, Coombs, G, Kofahl, B, Heinrich, R, Shabanowitz, J, Hunt, DF, Yost, HJ & Virshup, DM (**2007**) Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *Embo J*, 26, 1511-1521.

Lye, YM, Chan, M & Sim, TS (**2006**) Pfnek3: an atypical activator of a MAP kinase in Plasmodium falciparum. *FEBS Lett*, 580, 6083-6092.

M

MacMillan, LB, Bass, MA, Cheng, N, Howard, EF, Tamura, M, Strack, S, Wadzinski, BE & Colbran, RJ (**1999**) Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *J Biol Chem*, 274, 35845-35854.

Mahajan, B, Selvapandiyan, A, Gerald, NJ, Majam, V, Zheng, H, Wickramarachchi, T, Tiwari, J, Fujioka, H, Moch, JK, Kumar, N, Aravind, L, Nakhasi, HL & Kumar, S (**2008**) Centrins, cell cycle regulation proteins in human malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem*, 283, 31871-31883.

Maleszka, R, Hanes, SD, Hackett, RL, de Couet, HG & Miklos, GL (**1996**) The Drosophila melanogaster dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of Saccharomyces cerevisiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 447-451.

Mann, DJ, Dombradi, V & Cohen, PT (**1993**) Drosophila protein phosphatase V functionally complements a SIT4 mutant in Saccharomyces cerevisiae and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. *Embo J*, 12, 4833-4842.

Manna, B, Bhattacharya, T, Kahali, B & Ghosh, TC (**2009**) Evolutionary constraints on hub and non-hub proteins in human protein interaction network: insight from protein connectivity and intrinsic disorder. *Gene*, 434, 50-55.

Margolis, SS & Kornbluth, S (**2004**) When the checkpoints have gone: insights into Cdc25 functional activation. *Cell Cycle*, 3, 425-428.

Margolis, SS, Perry, JA, Weitzel, DH, Freel, CD, Yoshida, M, Haystead, TA & Kornbluth, S (**2006**) A role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated positive feedback activation of Cdc25. *Mol Biol Cell*, 17, 1779-1789.

Margolis, SS, Walsh, S, Weiser, DC, Yoshida, M, Shenolikar, S & Kornbluth, S (**2003**) PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *Embo J*, 22, 5734-5745.

Marsh, JA, Dancheck, B, Ragusa, MJ, Allaire, M, Forman-Kay, JD & Peti, W (**2010**) Structural diversity in free and bound states of intrinsically disordered protein phosphatase 1 regulators. *Structure*, 18, 1094-1103.

Marte, BM & Downward, J (**1997**) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci*, 22, 355-358.

Martinsen, ES, Perkins, SL & Schall, JJ (**2008**) A three-genome phylogeny of malaria parasites (Plasmodium and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol*, 47, 261-273.

Marx, SO, Reiken, S, Hisamatsu, Y, Jayaraman, T, Burkhoff, D, Rosemblit, N & Marks, AR (**2000**) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101, 365-376.

Maynes, JT, Bateman, KS, Cherney, MM, Das, AK, Luu, HA, Holmes, CF & James, MN (**2001**) Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, 276, 44078-44082.

Meijer, L (**2003**) Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, 311-326.

Meiselbach, H, Sticht, H & Enz, R (**2006**) Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif: molecular description of binding specificities identifies interacting proteins. *Chem Biol*, 13, 49-59.

Merckx, A, Echalier, A, Langford, K, Sicard, A, Langsley, G, Joore, J, Doerig, C, Noble, M & Endicott, J (**2008**) Structures of P. falciparum protein kinase 7 identify an activation motif and leads for inhibitor design. *Structure*, 16, 228-238.

Merckx, A, Le Roch, K, Nivez, MP, Dorin, D, Alano, P, Gutierrez, GJ, Nebreda, AR, Goldring, D, Whittle, C, Patterson, S, Chakrabarti, D & Doerig, C (**2003**) Identification and initial characterization of three novel cyclin-related proteins of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem*, 278, 39839-39850.

Merckx, A, Nivez, MP, Bouyer, G, Alano, P, Langsley, G, Deitsch, K, Thomas, S, Doerig, C & Egee, S (**2008**) Plasmodium falciparum regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS pathogens*, 4, e19.

Meslin, B, Barnadas, C, Boni, V, Latour, C, De Monbrison, F, Kaiser, K & Picot, S (**2007**) Features of apoptosis in Plasmodium falciparum erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis*, 195, 1852-1859.

Mi, J, Guo, C, Brautigan, DL & Larner, JM (**2007**) Protein phosphatase-1alpha regulates centrosome splitting through Nek2. *Cancer Res*, 67, 1082-1089.

Miller, LH, Hudson-Taylor, D, Gamain, B & Saul, AJ (**2002**) Definition of the minimal domain of CIDR1alpha of Plasmodium falciparum PfEMP1 for binding CD36. *Mol Biochem Parasitol*, 120, 321-323.

Mishra, S, Somanath, PR, Huang, Z & Vijayaraghavan, S (**2003**) Binding and inactivation of the germ cell-specific protein phosphatase PP1gamma2 by sds22 during epididymal sperm maturation. *Biology of reproduction*, 69, 1572-1579.

Mishra, SK, Mohanty, S, Satpathy, SK & Mohapatra, DN (**2007**) Cerebral malaria in adults -- a description of 526 cases admitted to Ispat General Hospital in Rourkela, India. *Ann Trop Med Parasitol*, 101, 187-193.

Misik, AJ, Perreault, K, Holmes, CF & Fliegel, L (**2005**) Protein phosphatase regulation of Na+/H+ exchanger isoform I. *Biochemistry*, 44, 5842-5852.

Mitsuhashi, S, Shima, H, Tanuma, N, Matsuura, N, Takekawa, M, Urano, T, Kataoka, T, Ubukata, M & Kikuchi, K (**2003**) Usage of tautomycetin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1), reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 in vivo. *J Biol Chem*, 278, 82-88.

Monick, MM, Powers, LS, Gross, TJ, Flaherty, DM, Barrett, CW & Hunninghake, GW (**2006**) Active ERK contributes to protein translation by preventing JNK-dependent inhibition of protein phosphatase 1. *J Immunol*, 177, 1636-1645.

Monshausen, M, Rehbein, M, Richter, D & Kindler, S (**2002**) The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *J Neurochem*, 81, 557-564.

Montori-Grau, M, Guitart, M, Lerin, C, Andreu, AL, Newgard, CB, Garcia-Martinez, C & Gomez-Foix, AM (**2007**) Expression and glycogenic effect of glycogen-targeting protein phosphatase 1 regulatory subunit GL in cultured human muscle. *Biochem J*, 405, 107-113.

Moorhead, G, Johnson, D, Morrice, N & Cohen, P (**1998**) The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the beta-isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. *FEBS Lett*, 438, 141-144.

Moorhead, G, MacKintosh, C, Morrice, N & Cohen, P (**1995**) Purification of the hepatic glycogen-associated form of protein phosphatase-1 by microcystin-Sepharose affinity chromatography. *FEBS Lett*, 362, 101-105.

Moorhead, GB, Trinkle-Mulcahy, L & Ulke-Lemee, A (**2007**) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 234-244.

Morimoto, H, Ozaki, A, Okamura, H, Yoshida, K, Amorim, BR, Tanaka, H, Kitamura, S & Haneji, T (**2007**) Differential expression of protein phosphatase type 1 isotypes and nucleolin during cell cycle arrest. *Cell biochemistry and function*, 25, 369-375.

Mota, MM, Giordano, S & Rodriguez, A (**2004**) Targeting Plasmodium host cells: survival within hepatocytes. *Trends Mol Med*, 10, 487-492.

Mukherji, M, Bell, R, Supekova, L, Wang, Y, Orth, AP, Batalov, S, Miraglia, L, Huesken, D, Lange, J, Martin, C, Sahasrabudhe, S, Reinhardt, M, Natt, F, Hall, J, Mickanin, C, Labow, M, Chanda, SK, Cho, CY & Schultz, PG (**2006**) Genome-wide functional analysis of human cell-cycle regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 14819-14824.

Munro, S, Ceulemans, H, Bollen, M, Diplexcito, J & Cohen, PT (**2005**) A novel glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 that is regulated by insulin and shows differential tissue distribution in humans and rodents. *Febs J*, 272, 1478-1489.

Murphy, SC & Breman, JG (**2001**) Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*, 64, 57-67.

Mutz, D, Weise, C, Mechai, N, Hofmann, W, Horstkorte, R, Bruning, G & Danker, K (**2006**) Integrin alpha3beta1 interacts with I1PP2A/lanp and phosphatase PP1. *J Neurosci Res*, 84, 1759-1770.

N

Nakielny, S, Campbell, DG & Cohen, P (**1991**) The molecular mechanism by which adrenalin inhibits glycogen synthesis. *Eur J Biochem*, 199, 713-722.

Naughton, JA & Bell, A (**2007**) Studies on cell-cycle synchronization in the asexual erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. *Parasitology*, 134, 331-337.

Nebreda, AR & Ferby, I (**2000**) Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 666-675.

Nekhai, S, Jerebtsova, M, Jackson, A & Southerland, W (**2007**) Regulation of HIV-1 transcription by protein phosphatase 1. *Current HIV research*, 5, 3-9.

Nevill, CG, Some, ES, Mung'ala, VO, Mutemi, W, New, L, Marsh, K, Lengeler, C & Snow, RW (**1996**) Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Int Health*, 1, 139-146.

Newbold, C, Craig, A, Kyes, S, Rowe, A, Fernandez-Reyes, D & Fagan, T (**1999**) Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in Plasmodium falciparum. *International journal for parasitology*, 29, 927-937.

Nicolaou, P, Hajjar, RJ & Kranias, EG (**2009**) Role of protein phosphatase-1 inhibitor-1 in cardiac physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol*, 47, 365-371.

Norris, CM, Halpain, S & Foster, TC (**1998**) Alterations in the balance of protein kinase/phosphatase activities parallel reduced synaptic strength during aging. *Journal of neurophysiology*, 80, 1567-1570.

Nunes, MC, Goldring, JP, Doerig, C & Scherf, A (**2007**) A novel protein kinase family in Plasmodium falciparum is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. *Mol Microbiol*, 63, 391-403.

Nutt, LK, Buchakjian, MR, Gan, E, Darbandi, R, Yoon, SY, Wu, JQ, Miyamoto, YJ, Gibbons, JA, Andersen, JL, Freel, CD, Tang, W, He, C, Kurokawa, M, Wang, Y, Margolis, SS, Fissore, RA & Kornbluth, S (**2009**) Metabolic control of oocyte apoptosis mediated by 14-3-3zeta-regulated dephosphorylation of caspase-2. *Dev Cell*, 16, 856-866.

Nuytten, M, Beke, L, Van Eynde, A, Ceulemans, H, Beullens, M, Van Hummelen, P, Fuks, F & Bollen, M (**2008**) The transcriptional repressor NIPP1 is an essential player in EZH2-mediated gene silencing. *Oncogene*, 27, 1449-1460.

O

O'Connell, MJ, Krien, MJ & Hunter, T (**2003**) Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol*, 13, 221-228.

Ockenhouse, CF, Ho, M, Tandon, NN, Van Seventer, GA, Shaw, S, White, NJ, Jamieson, GA, Chulay, JD & Webster, HK (**1991**) Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. *J Infect Dis*, 164, 163-169.

Ohashi, S, Sakashita, G, Ban, R, Nagasawa, M, Matsuzaki, H, Murata, Y, Taniguchi, H, Shima, H, Furukawa, K & Urano, T (**2006**) Phospho-regulation of human protein kinase Aurora-A: analysis using anti-phospho-Thr288 monoclonal antibodies. *Oncogene*, 25, 7691-7702.

Ohki, S, Eto, M, Kariya, E, Hayano, T, Hayashi, Y, Yazawa, M, Brautigan, D & Kainosho, M (**2001**) Solution NMR structure of the myosin phosphatase inhibitor protein CPI-17 shows phosphorylation-induced conformational changes responsible for activation. *J Mol Biol*, 314, 839-849.

Ohkura, H, Kinoshita, N, Miyatani, S, Toda, T & Yanagida, M (**1989**) The fission yeast dis2+ gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell*, 57, 997-1007.

Ohkura, H & Yanagida, M (**1991**) S. pombe gene sds22+ essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1. *Cell*, 64, 149-157.

Okamoto, R, Kato, T, Mizoguchi, A, Takahashi, N, Nakakuki, T, Mizutani, H, Isaka, N, Imanaka-Yoshida, K, Kaibuchi, K, Lu, Z, Mabuchi, K, Tao, T, Hartshorne, DJ, Nakano, T & Ito, M (**2006**) Characterization and function of MYPT2, a target subunit of myosin phosphatase in heart. *Cell Signal*, 18, 1408-1416.

Olsen, JV, Vermeulen, M, Santamaria, A, Kumar, C, Miller, ML, Jensen, LJ, Gnad, F, Cox, J, Jensen, TS, Nigg, EA, Brunak, S & Mann, M (**2010**) Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*, 3, ra3.

Onwuamaegbu, ME, Henein, M & Coats, AJ (**2004**) Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice. *Postgrad Med J*, 80, 642-649.

Osawa, Y, Nakagama, H, Shima, H, Sugimura, T & Nagao, M (**1996**) Identification and characterization of three isotypes of protein phosphatase inhibitor-2 and their expression profiles during testis maturation in rats. *Eur J Biochem*, 242, 793-798.

Osmani, SA, Pu, RT & Morris, NR (**1988**) Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell*, 53, 237-244.

Ozen, M, Gungor, S, Atambay, M & Daldal, N (**2006**) Cerebral malaria owing to Plasmodium vivax: case report. *Ann Trop Paediatr*, 26, 141-144.

P

Parija, SC & Praharaj, I (**2011**) Drug resistance in malaria. *Indian J Med Microbiol*, 29, 243-248.

Park, IK & DePaoli-Roach, AA (**1994**) Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *J Biol Chem*, 269, 28919-28928.

Pasder, O, Shpungin, S, Salem, Y, Makovsky, A, Vilchick, S, Michaeli, S, Malovani, H & Nir, U (**2006**) Downregulation of Fer induces PP1 activation and cell-cycle arrest in malignant cells. *Oncogene*, 25, 4194-4206.

Patel, KG, Liu, C, Cameron, PL & Cameron, RS (**2001**) Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits 1alpha and 1gamma1. *J Neurosci*, 21, 7954-7968.

Patton, JG, Porro, EB, Galceran, J, Tempst, P & Nadal-Ginard, B (**1993**) Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev*, 7, 393-406.

Pedelini, L, Marquina, M, Arino, J, Casamayor, A, Sanz, L, Bollen, M, Sanz, P & Garcia-Gimeno, MA (**2007**) YPI1 and SDS22 proteins regulate the nuclear localization and function of yeast type 1 phosphatase Glc7. *J Biol Chem*, 282, 3282-3292.

Peggie, MW, MacKelvie, SH, Bloecher, A, Knatko, EV, Tatchell, K & Stark, MJ (**2002**) Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1. *Journal of cell science*, 115, 195-206.

Perry, RL, Yang, C, Soora, N, Salma, J, Marback, M, Naghibi, L, Ilyas, H, Chan, J, Gordon, JW & McDermott, JC (**2009**) Direct interaction between myocyte enhancer factor 2 (MEF2) and protein phosphatase 1alpha represses MEF2-dependent gene expression. *Mol Cell Biol*, 29, 3355-3366.

Peti, W, Nairn, AC & Page, R (**2012a**) Folding of Intrinsically Disordered Protein Phosphatase 1 Regulatory Proteins. *Curr Phys Chem*, 2, 107-114.

Peti, W, Nairn, AC & Page, R (**2012b**) Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *Febs J*.

Picot, S, Burnod, J, Bracchi, V, Chumpitazi, BF & Ambroise-Thomas, P (**1997**) Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91, 590-591.

Pinsky, BA, Kotwaliwale, CV, Tatsutani, SY, Breed, CA & Biggins, S (**2006**) Glc7/protein phosphatase 1 regulatory subunits can oppose the Ipl1/aurora protein kinase by redistributing Glc7. *Mol Cell Biol*, 26, 2648-2660.

Pizzi, E & Frontali, C (**2001**) Low-complexity regions in Plasmodium falciparum proteins. *Genome Res*, 11, 218-229.

Polanowska-Grabowska, R, Simon, CG, Jr., Falchetto, R, Shabanowitz, J, Hunt, DF & Gear, AR (**1997**) Platelet adhesion to collagen under flow causes dissociation of a phosphoprotein complex of heat-shock proteins and protein phosphatase 1. *Blood*, 90, 1516-1526.

Polhemus, ME, Remich, SA, Ogutu, BR, Waitumbi, JN, Otieno, L, Apollo, S, Cummings, JF, Kester, KE, Ockenhouse, CF, Stewart, A, Ofori-Anyinam, O, Ramboer, I, Cahill, CP, Lievens, M, Dubois, MC, Demoitie, MA, Leach, A, Cohen, J, Ballou, WR & Heppner, DG, Jr. (**2009**) Evaluation of RTS,S/AS02A and RTS,S/AS01B in adults in a high malaria transmission area. *PLoS One*, 4, e6465.

Pollitt, LC, Colegrave, N, Khan, SM, Sajid, M & Reece, SE (**2010**) Investigating the evolution of apoptosis in malaria parasites: the importance of ecology. *Parasit Vectors*, 3, 105.

Popescu, M, Gurel, Z, Ronni, T, Song, C, Hung, KY, Payne, KJ & Dovat, S (**2009**) Ikaros stability and pericentromeric localization are regulated by protein phosphatase 1. *J Biol Chem*, 284, 13869-13880.

Printen, JA, Brady, MJ & Saltiel, AR (**1997**) PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. *Science*, 275, 1475-1478.

Puntoni, F & Villa-Moruzzi, E (**1995**) Phosphorylation of the inhibitor-2 of protein phosphatase-1 by cdc2-cyclin B and GSK3. *Biochem Biophys Res Commun*, 207, 732-739.

Puri, P, Myers, K, Kline, D & Vijayaraghavan, S (**2008**) Proteomic analysis of bovine sperm YWHA binding partners identify proteins involved in signaling and metabolism. *Biology of reproduction*, 79, 1183-1191.

Puthalakath, H & Strasser, A (**2002**) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*, 9, 505-512.

Q

Quevedo, C, Salinas, M & Alcazar, A (**2003**) Initiation factor 2B activity is regulated by protein phosphatase 1, which is activated by the mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in insulin-like growth factor 1-stimulated neuronal cells. *J Biol Chem*, 278, 16579-16586.

Quimby, BB & Corbett, AH (**2001**) Nuclear transport mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, 58, 1766-1773.

Radel, C & Rizzo, V (**2005**) Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 288, H936-945.

R

Ragusa, MJ, Dancheck, B, Critton, DA, Nairn, AC, Page, R & Peti, W (**2010**) Spinophilin directs protein phosphatase 1 specificity by blocking substrate binding sites. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 459-464.

Rangachari, K, Dluzewski, A, Wilson, RJ & Gratzer, WB (**1986**) Control of malarial invasion by phosphorylation of the host cell membrane cytoskeleton. *Nature*, 324, 364-365.

Rangarajan, R, Bei, A, Henry, N, Madamet, M, Parzy, D, Nivez, MP, Doerig, C & Sultan, A (**2006**) Pbcrk-1, the Plasmodium berghei orthologue of P. falciparum cdc-2 related kinase-1 (Pfcrk-1), is essential for completion of the intraerythrocytic asexual cycle. *Exp Parasitol*, 112, 202-207.

Rao, R (**2009**) Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 1165, 62-68.

Read, M, Sherwin, T, Holloway, SP, Gull, K & Hyde, JE (**1993**) Microtubular organization visualized by immunofluorescence microscopy during erythrocytic schizogony in Plasmodium falciparum and investigation of post-translational modifications of parasite tubulin. *Parasitology*, 106 (Pt 3), 223-232.

Reininger, L, Billker, O, Tewari, R, Mukhopadhyay, A, Fennell, C, Dorin-Semblat, D, Doerig, C, Goldring, D, Harmse, L, Ranford-Cartwright, L & Packer, J (**2005**) A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *J Biol Chem*, 280, 31957-31964.

Reininger, L, Tewari, R, Fennell, C, Holland, Z, Goldring, D, Ranford-Cartwright, L, Billker, O & Doerig, C (**2009**) An essential role for the Plasmodium Nek-2 Nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. *J Biol Chem*, 284, 20858-20868.

Reininger, L, Wilkes, JM, Bourgade, H, Miranda-Saavedra, D & Doerig, C (**2011**) An essential Aurora-related kinase transiently associates with spindle pole bodies during Plasmodium falciparum erythrocytic schizogony. *Mol Microbiol*, 79, 205-221.

Riedl, SJ & Salvesen, GS (**2007**) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 405-413.

Riz, I & Hawley, RG (**2005**) G1/S transcriptional networks modulated by the HOX11/TLX1 oncogene of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, 24, 5561-5575.

Roach, P, Roach, PJ & DePaoli-Roach, AA (**1985**) Phosphoprotein phosphatase inhibitor-2. Identification as a species of molecular weight 31,000 in rabbit muscle, liver, and other tissues. *J Biol Chem*, 260, 6314-6317.

Rodriguez-Viciana, P, Oses-Prieto, J, Burlingame, A, Fried, M & McCormick, F (**2006**) A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. *Mol Cell*, 22, 217-230.

Rodriguez, P, Mitton, B, Waggoner, JR & Kranias, EG (**2006**) Identification of a novel phosphorylation site in protein phosphatase inhibitor-1 as a negative regulator of cardiac function. *J Biol Chem*, 281, 38599-38608.

Rogers, WO, Sem, R, Tero, T, Chim, P, Lim, P, Muth, S, Socheat, D, Ariey, F & Wongsrichanalai, C (**2009**) Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in southern Cambodia. *Malar J*, 8, 10.

Rogerson, SJ, Hviid, L, Duffy, PE, Leke, RF & Taylor, DW (**2007**) Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *The Lancet infectious diseases*, 7, 105-117.

Rogerson, SJ, Mwapasa, V & Meshnick, SR (**2007**) Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77, 14-22.

Rose, M, Dutting, E, Schroder, N, Sticht, H, Brandstatter, JH & Enz, R (**2008**) PNUTS forms a trimeric protein complex with GABA(C) receptors and protein phosphatase 1. *Mol Cell Neurosci*, 37, 808-819.

Rosenthal, PJ (**2003**) Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol*, 206, 3735-3744.

Ross-Macdonald, PB, Graeser, R, Kappes, B, Franklin, R & Williamson, DH (**1994**) Isolation and expression of a gene specifying a cdc2-like protein kinase from the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Eur J Biochem*, 220, 693-701.

Ross, R (**1897**) On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood. *Br Med J*, 2, 1786-1788.

S

Sacarlal, J, Aide, P, Aponte, JJ, Renom, M, Leach, A, Mandomando, I, Lievens, M, Bassat, Q, Lafuente, S, Macete, E, Vekemans, J, Guinovart, C, Sigauque, B, Sillman, M, Milman, J, Dubois, MC, Demoitie, MA, Thonnard, J, Menendez, C, Ballou, WR, Cohen, J & Alonso, PL (**2009**) Long-term safety and efficacy of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children. *J Infect Dis*, 200, 329-336.

Sacarlal, J, Aponte, JJ, Aide, P, Mandomando, I, Bassat, Q, Guinovart, C, Leach, A, Milman, J, Macete, E, Espasa, M, Ofori-Anyinam, O, Thonnard, J, Corachan, S, Dubois, MC, Lievens, M, Dubovsky, F, Ballou, WR, Cohen, J & Alonso, PL (**2008**) Safety of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children during a Phase IIb trial. *Vaccine*, 26, 174-184.

Sagara, J, Arata, T & Taniguchi, S (**2009**) Scapinin, the protein phosphatase 1 binding protein, enhances cell spreading and motility by interacting with the actin cytoskeleton. *PLoS One*, 4, e4247.

Sagara, J, Higuchi, T, Hattori, Y, Moriya, M, Sarvotham, H, Shima, H, Shirato, H, Kikuchi, K & Taniguchi, S (**2003**) Scapinin, a putative protein phosphatase-1 regulatory subunit associated with the nuclear nonchromatin structure. *J Biol Chem*, 278, 45611-45619.

Sangrador, A, Andres, I, Eguiraun, A, Lorenzo, ML & Ortiz, JM (**1998**) Growth arrest of Schizosaccharomyces pombe following overexpression of mouse type 1 protein phosphatases. *Molecular & general genetics : MGG*, 259, 449-456.

Sankaran, S, Crone, DE, Palazzo, RE & Parvin, JD (**2007a**) BRCA1 regulates gamma-tubulin binding to centrosomes. *Cancer Biol Ther*, 6, 1853-1857.

Sankaran, S, Crone, DE, Palazzo, RE & Parvin, JD (**2007b**) Aurora-A kinase regulates breast cancer associated gene 1 inhibition of centrosome-dependent microtubule nucleation. *Cancer Res*, 67, 11186-11194.

Santra, M, Santra, S, Roberts, C, Zhang, RL & Chopp, M (**2009**) Doublecortin induces mitotic microtubule catastrophe and inhibits glioma cell invasion. *J Neurochem*, 108, 231-245.

Sarrouilhe, D, di Tommaso, A, Metaye, T & Ladeveze, V (**2006**) Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie*, 88, 1099-1113.

Sassoon, I, Severin, FF, Andrews, PD, Taba, MR, Kaplan, KB, Ashford, AJ, Stark, MJ, Sorger, PK & Hyman, AA (**1999**) Regulation of Saccharomyces cerevisiae kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes Dev*, 13, 545-555.

Satinover, DL, Brautigan, DL & Stukenberg, PT (**2006**) Aurora-A kinase and inhibitor-2 regulate the cyclin threshold for mitotic entry in Xenopus early embryonic cell cycles. *Cell Cycle*, 5, 2268-2274.

Satinover, DL, Leach, CA, Stukenberg, PT & Brautigan, DL (**2004a**) Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8625-8630.

Satinover, DL, Leach, CA, Stukenberg, PT & Brautigan, DL (**2004b**) Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 8625-8630.

Sato, K, Ohkura, S, Kitahara, Y, Ohama, T, Hori, M, Sato, M, Kobayashi, S, Sasaki, Y, Hayashi, T, Nasu, T & Ozaki, H (**2007**) Involvement of CPI-17 downregulation in the dysmotility of the colon from dextran sodium sulphate-induced experimental colitis in a mouse model. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 19, 504-514.

Schillace, RV & Scott, JD (**1999**) Association of the type 1 protein phosphatase PP1 with the A-kinase anchoring protein AKAP220. *Curr Biol*, 9, 321-324.

Schneider, AG & Mercereau-Puijalon, O (**2005**) A new Apicomplexa-specific protein kinase family: multiple members in Plasmodium falciparum, all with an export signature. *BMC Genomics*, 6, 30.

Schrevel, J, Asfaux-Foucher, G, Hopkins, JM, Robert, V, Bourgouin, C, Prensier, G & Bannister, LH (**2008**) Vesicle trafficking during sporozoite development in Plasmodium berghei: ultrastructural evidence for a novel trafficking mechanism. *Parasitology*, 135, 1-12.

Selkoe, DJ (**1998**) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, 8, 447-453.

Senba, S, Eto, M & Yazawa, M (**1999**) Identification of trimeric myosin phosphatase (PP1M) as a target for a novel PKC-potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein (CPI17) in porcine aorta smooth muscle. *J Biochem*, 125, 354-362.

Seth, A, Sheth, P, Elias, BC & Rao, R (**2007**) Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer. *J Biol Chem*, 282, 11487-11498.

Shahabuddin, M (**1998**) Plasmodium ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation. *Parasitology*, 116 Suppl, S83-93.

Shi, W, Chang, C, Nie, S, Xie, S, Wan, M & Cao, X (**2007**) Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *Journal of cell science*, 120, 1216-1224.

Shi, W, Sun, C, He, B, Xiong, W, Shi, X, Yao, D & Cao, X (**2004**) GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol*, 164, 291-300.

Shi, Y (**2009**) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, 139, 468-484.

Shi, Y & Manley, JL (**2007**) A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock. *Mol Cell*, 28, 79-90.

Shima, H, Hatano, Y, Chun, YS, Sugimura, T, Zhang, Z, Lee, EY & Nagao, M (**1993**) Identification of PP1 catalytic subunit isotypes PP1 gamma 1, PP1 delta and PP1 alpha in various rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 192, 1289-1296.

Shirato, H, Shima, H, Sakashita, G, Nakano, T, Ito, M, Lee, EY & Kikuchi, K (**2000**) Identification and characterization of a novel protein inhibitor of type 1 protein phosphatase. *Biochemistry*, 39, 13848-13855.

Shmueli, A, Gdalyahu, A, Sapoznik, S, Sapir, T, Tsukada, M & Reiner, O (**2006**) Site-specific dephosphorylation of doublecortin (DCX) by protein phosphatase 1 (PP1). *Mol Cell Neurosci*, 32, 15-26.

Sidhu, AB, Valderramos, SG & Fidock, DA (**2005**) pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol*, 57, 913-926.

Sinou, V, Boulard, Y, Grellier, P & Schrevel, J (**1998**) Host cell and malarial targets for docetaxel (Taxotere) during the erythrocytic development of Plasmodium falciparum. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 45, 171-183.

Skinner, JA & Saltiel, AR (**2001**) Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targetting subunit of protein phosphatase 1. *Biochem J*, 356, 257-267.

Slater, AF (**1993**) Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in Plasmodium falciparum. *Pharmacol Ther*, 57, 203-235.

Snow, RW, Korenromp, EL & Gouws, E (**2004**) Pediatric mortality in Africa: plasmodium falciparum malaria as a cause or risk? *Am J Trop Med Hyg*, 71, 16-24.

Soldati-Favre, D (**2008**) Molecular dissection of host cell invasion by the apicomplexans: the glideosome. *Parasite (Paris, France)*, 15, 197-205.

Solyakov, L, Halbert, J, Alam, MM, Semblat, JP, Dorin-Semblat, D, Reininger, L, Bottrill, AR, Mistry, S, Abdi, A, Fennell, C, Holland, Z, Demarta, C, Bouza, Y, Sicard, A, Nivez, MP, Eschenlauer, S, Lama, T, Thomas, DC, Sharma, P, Agarwal, S, Kern, S, Pradel, G, Graciotti, M, Tobin, AB & Doerig, C (**2011a**) Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature communications*, 2, 565.

Solyakov, L, Halbert, J, Alam, MM, Semblat, JP, Dorin-Semblat, D, Reininger, L, Bottrill, AR, Mistry, S, Abdi, A, Fennell, C, Holland, Z, Demarta, C, Bouza, Y, Sicard, A, Nivez, MP, Eschenlauer, S, Lama, T, Thomas, DC, Sharma, P, Agarwal, S, Kern, S, Pradel, G, Graciotti, M, Tobin, AB & Doerig, C (**2011b**) Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nat Commun*, 2, 565.

Steen, RL, Beullens, M, Landsverk, HB, Bollen, M & Collas, P (**2003**) AKAP149 is a novel PP1 specifier required to maintain nuclear envelope integrity in G1 phase. *Journal of cell science*, 116, 2237-2246.

Steen, RL & Collas, P (**2001**) Mistargeting of B-type lamins at the end of mitosis: implications on cell survival and regulation of lamins A/C expression. *J Cell Biol*, 153, 621-626.

Steen, RL, Martins, SB, Tasken, K & Collas, P (**2000**) Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol*, 150, 1251-1262.

Stoute, JA, Slaoui, M, Heppner, DG, Momin, P, Kester, KE, Desmons, P, Wellde, BT, Garcon, N, Krzych, U & Marchand, M (**1997**) A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med*, 336, 86-91.

Sturm, A, Amino, R, van de Sand, C, Regen, T, Retzlaff, S, Rennenberg, A, Krueger, A, Pollok, JM, Menard, R & Heussler, VT (**2006**) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313, 1287-1290.

Sueyoshi, T, Moore, R, Sugatani, J, Matsumura, Y & Negishi, M (**2008**) PPP1R16A, the membrane subunit of protein phosphatase 1beta, signals nuclear translocation of the nuclear receptor constitutive active/androstane receptor. *Mol Pharmacol*, 73, 1113-1121.

Sugiyama, K, Sugiura, K, Hara, T, Sugimoto, K, Shima, H, Honda, K, Furukawa, K, Yamashita, S & Urano, T (**2002**) Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene*, 21, 3103-3111.

Suizu, F, Ryo, A, Wulf, G, Lim, J & Lu, KP (**2006**) Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Mol Cell Biol*, 26, 1463-1479.

Sullivan, A & Lu, X (**2007**) ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *Br J Cancer*, 96, 196-200.

Sutherland, EW, Jr. & Wosilait, WD (**1955**) Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature*, 175, 169-170.

Suzuki, Y, Lanner, C, Kim, JH, Vilardo, PG, Zhang, H, Yang, J, Cooper, LD, Steele, M, Kennedy, A, Bock, CB, Scrimgeour, A, Lawrence, JC, Jr. & DePaoli-Roach, AA (**2001**) Insulin control of glycogen metabolism in knockout mice lacking the muscle-specific protein phosphatase PP1G/RGL. *Mol Cell Biol*, 21, 2683-2694.

Svenningsson, P, Nairn, AC & Greengard, P (**2005**) DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. *Aaps J*, 7, E353-360.

Svenningsson, P, Nishi, A, Fisone, G, Girault, JA, Nairn, AC & Greengard, P (**2004**) DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 269-296.

Syin, C, Parzy, D, Traincard, F, Boccaccio, I, Joshi, MB, Lin, DT, Yang, XM, Assemat, K, Doerig, C & Langsley, G (**2001**) The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks Plasmodium falciparum development in infected erythrocytes. *Eur J Biochem*, 268, 4842-4849.

T

Takahashi, M, Shibata, H, Shimakawa, M, Miyamoto, M, Mukai, H & Ono, Y (**1999**) Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem*, 274, 17267-17274.

Takemiya, A, Ariyoshi, C & Shimazaki, K (**2009**) Identification and functional characterization of inhibitor-3, a regulatory subunit of protein phosphatase 1 in plants. *Plant physiology*, 150, 144-156.

Takenaka, I, Morin, F, Seizinger, BR & Kley, N (**1995**) Regulation of the sequence-specific DNA binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. *J Biol Chem*, 270, 5405-5411.

Talman, AM, Domarle, O, McKenzie, FE, Ariey, F & Robert, V (**2004**) Gametocytogenesis: the puberty of Plasmodium falciparum. *Malar J*, 3, 24.

Tamrakar, S & Ludlow, JW (**2000**) The carboxyl-terminal region of the retinoblastoma protein binds non-competitively to protein phosphatase type 1alpha and inhibits catalytic activity. *J Biol Chem*, 275, 27784-27789.

Tan, I, Ng, CH, Lim, L & Leung, T (**2001**) Phosphorylation of a novel myosin binding subunit of protein phosphatase 1 reveals a conserved mechanism in the regulation of actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 276, 21209-21216.

Tan, SL, Tareen, SU, Melville, MW, Blakely, CM & Katze, MG (**2002**) The direct binding of the catalytic subunit of protein phosphatase 1 to the PKR protein kinase is necessary but not sufficient for inactivation and disruption of enzyme dimer formation. *J Biol Chem*, 277, 36109-36117.

Tang, PM, Bondor, JA, Swiderek, KM & DePaoli-Roach, AA (**1991**) Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase. *J Biol Chem*, 266, 15782-15789.

Tang, X, Hui, ZG, Cui, XL, Garg, R, Kastan, MB & Xu, B (**2008**) A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, 28, 2559-2566.

Tanji, C, Yamamoto, H, Yorioka, N, Kohno, N, Kikuchi, K & Kikuchi, A (**2002**) A-kinase anchoring protein AKAP220 binds to glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) and mediates protein kinase A-dependent inhibition of GSK-3beta. *J Biol Chem*, 277, 36955-36961.

Tanuma, N, Kim, SE, Beullens, M, Tsubaki, Y, Mitsuhashi, S, Nomura, M, Kawamura, T, Isono, K, Koseki, H, Sato, M, Bollen, M, Kikuchi, K & Shima, H (**2008**) Nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP1) directs protein phosphatase-1 (PP1) to dephosphorylate the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) component, spliceosome-associated protein 155 (Sap155). *J Biol Chem*, 283, 35805-35814.

Tappan, E & Chamberlin, AR (**2008**) Activation of protein phosphatase 1 by a small molecule designed to bind to the enzyme's regulatory site. *Chem Biol*, 15, 167-174.

Taylor, HM, McRobert, L, Grainger, M, Sicard, A, Dluzewski, AR, Hopp, CS, Holder, AA & Baker, DA (**2010**) The malaria parasite cyclic GMP-dependent protein kinase plays a central role in blood-stage schizogony. *Eukaryot Cell*, 9, 37-45.

Terentyev, D, Viatchenko-Karpinski, S, Gyorke, I, Terentyeva, R & Gyorke, S (**2003**) Protein phosphatases decrease sarcoplasmic reticulum calcium content by stimulating calcium release in cardiac myocytes. *J Physiol*, 552, 109-118.

Terrak, M, Kerff, F, Langsetmo, K, Tao, T & Dominguez, R (**2004**) Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature*, 429, 780-784.

Terry-Lorenzo, RT, Carmody, LC, Voltz, JW, Connor, JH, Li, S, Smith, FD, Milgram, SL, Colbran, RJ & Shenolikar, S (**2002**) The neuronal actin-binding proteins, neurabin I and neurabin II, recruit specific isoforms of protein phosphatase-1 catalytic subunits. *J Biol Chem*, 277, 27716-27724.

Terry-Lorenzo, RT, Elliot, E, Weiser, DC, Prickett, TD, Brautigan, DL & Shenolikar, S (**2002**) Neurabins recruit protein phosphatase-1 and inhibitor-2 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 277, 46535-46543.

Terry-Lorenzo, RT, Inoue, M, Connor, JH, Haystead, TA, Armbruster, BN, Gupta, RP, Oliver, CJ & Shenolikar, S (**2000**) Neurofilament-L is a protein phosphatase-1-binding protein associated with neuronal plasma membrane and post-synaptic density. *J Biol Chem*, 275, 2439-2446.

Tewari, R, Straschil, U, Bateman, A, Bohme, U, Cherevach, I, Gong, P, Pain, A & Billker, O (**2010**) The systematic functional analysis of Plasmodium protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. *Cell Host Microbe*, 8, 377-387.

Thapa, R, Patra, V & Kundu, R (**2007**) Plasmodium vivax cerebral malaria. *Indian Pediatr*, 44, 433-434.

Thompson, LJ, Bollen, M & Fields, AP (**1997**) Identification of protein phosphatase 1 as a mitotic lamin phosphatase. *J Biol Chem*, 272, 29693-29697.

Toole, BJ & Cohen, PT (**2007a**) The skeletal muscle-specific glycogen-targeted protein phosphatase 1 plays a major role in the regulation of glycogen metabolism by adrenaline in vivo. *Cellular signalling*, 19, 1044-1055.

Toole, BJ & Cohen, PT (**2007b**) The skeletal muscle-specific glycogen-targeted protein phosphatase 1 plays a major role in the regulation of glycogen metabolism by adrenaline in vivo. *Cell Signal*, 19, 1044-1055.

Tountas, NA, Mandell, JW, Everett, AD & Brautigan, DL (**2004**) Juxtamembrane localization of the protein phosphatase-1 inhibitor protein PHI-1 in smooth muscle cells. *Histochemistry and cell biology*, 121, 343-350.

Trager, W (**2005**) What triggers the gametocyte pathway in Plasmodium falciparum? *Trends in parasitology*, 21, 262-264.

Trager, W & Jensen, JB (**1976**) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193, 673-675.

Tran, HT, Ulke, A, Morrice, N, Johannes, CJ & Moorhead, GB (**2004**) Proteomic characterization of protein phosphatase complexes of the mammalian nucleus. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 3, 257-265.

Traweger, A, Wiggin, G, Taylor, L, Tate, SA, Metalnikov, P & Pawson, T (**2008a**) Protein phosphatase 1 regulates the phosphorylation state of the polarity scaffold Par-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10402-10407.

Traweger, A, Wiggin, G, Taylor, L, Tate, SA, Metalnikov, P & Pawson, T (**2008b**) Protein phosphatase 1 regulates the phosphorylation state of the polarity scaffold Par-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10402-10407.

Treeck, M, Sanders, JL, Elias, JE & Boothroyd, JC (**2011**) The phosphoproteomes of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. *Cell Host Microbe*, 10, 410-419.

Trinkle-Mulcahy, L, Ajuh, P, Prescott, A, Claverie-Martin, F, Cohen, S, Lamond, AI & Cohen, P (**1999**) Nuclear organisation of NIPP1, a regulatory subunit of protein phosphatase 1 that associates with pre-mRNA splicing factors. *Journal of cell science*, 112 (Pt 2), 157-168.

Trinkle-Mulcahy, L, Andersen, J, Lam, YW, Moorhead, G, Mann, M & Lamond, AI (**2006**) Repo-Man recruits PP1 gamma to chromatin and is essential for cell viability. *J Cell Biol*, 172, 679-692.

Tsaytler, P, Harding, HP, Ron, D & Bertolotti, A (**2011**) Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science*, 332, 91-94.

Tung, HY, Wang, W & Chan, CS (**1995**) Regulation of chromosome segregation by Glc8p, a structural homolog of mammalian inhibitor 2 that functions as both an activator and an inhibitor of yeast protein phosphatase 1. *Mol Cell Biol*, 15, 6064-6074.

Tuteja, R (**2007**) Malaria - an overview. *Febs J*, 274, 4670-4679.

U

Ubersax, JA & Ferrell, JE, Jr. (**2007**) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 530-541.

Udho, E, Tedesco, VC, Zygmunt, A & Krucher, NA (**2002**) PNUTS (phosphatase nuclear targeting subunit) inhibits retinoblastoma-directed PP1 activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 297, 463-467.

Ulke-Lemee, A, Trinkle-Mulcahy, L, Chaulk, S, Bernstein, NK, Morrice, N, Glover, M, Lamond, AI & Moorhead, GB (**2007**) The nuclear PP1 interacting protein ZAP3 (ZAP) is a putative nucleoside kinase that complexes with SAM68, CIA, NF110/45, and HNRNP-G. *Biochim Biophys Acta*, 1774, 1339-1350.

Umlas, J & Fallon, JN (**1971**) New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis. *Am J Trop Med Hyg*, 20, 527-529.

V

Vader, G, Medema, RH & Lens, SM (**2006**) The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol*, 173, 833-837.

Vagnarelli, P, Hudson, DF, Ribeiro, SA, Trinkle-Mulcahy, L, Spence, JM, Lai, F, Farr, CJ, Lamond, AI & Earnshaw, WC (**2006**) Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat Cell Biol*, 8, 1133-1142.

Vaid, A & Sharma, P (**2006**) PfPKB, a protein kinase B-like enzyme from Plasmodium falciparum: II. Identification of calcium/calmodulin as its upstream activator and dissection of a novel signaling pathway. *J Biol Chem*, 281, 27126-27133.

Vaid, A, Thomas, DC & Sharma, P (**2008**) Role of Ca2+/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *J Biol Chem*, 283, 5589-5597.

Van Eynde, A, Beullens, M, Stalmans, W & Bollen, M (**1994**) Full activation of a nuclear species of protein phosphatase-1 by phosphorylation with protein kinase A and casein kinase-2. *Biochem J*, 297 (Pt 3), 447-449.

Van Eynde, A, Wera, S, Beullens, M, Torrekens, S, Van Leuven, F, Stalmans, W & Bollen, M (**1995**) Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *J Biol Chem*, 270, 28068-28074.

Vereshchagina, N, Bennett, D, Szoor, B, Kirchner, J, Gross, S, Vissi, E, White-Cooper, H & Alphey, L (**2004**) The essential role of PP1beta in Drosophila is to regulate nonmuscle myosin. *Mol Biol Cell*, 15, 4395-4405.

Vernes, A, Haynes, JD, Tapchaisri, P, Williams, JL, Dutoit, E & Diggs, CL (**1984**) Plasmodium falciparum strain-specific human antibody inhibits merozoite invasion of erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg*, 33, 197-203.

Vicogne, J, Cailliau, K, Tulasne, D, Browaeys, E, Yan, YT, Fafeur, V, Vilain, JP, Legrand, D, Trolet, J & Dissous, C (**2004**) Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth Schistosoma mansoni. *J Biol Chem*, 279, 37407-37414.

Vietri, M, Bianchi, M, Ludlow, JW, Mittnacht, S & Villa-Moruzzi, E (**2006**) Direct interaction between the catalytic subunit of Protein Phosphatase 1 and pRb. *Cancer Cell Int*, 6, 3.

Villa-Moruzzi, E, Tognarini, M, Cecchini, G & Marchisio, PC (**1998**) Protein phosphatase 1 delta is associated with focal adhesions. *Cell adhesion and communication*, 5, 297-305.

Virshup, DM & Shenolikar, S (**2009**) From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell*, 33, 537-545.

Vulliez-Le Normand, B, Tonkin, ML, Lamarque, MH, Langer, S, Hoos, S, Roques, M, Saul, FA, Faber, BW, Bentley, GA, Boulanger, MJ & Lebrun, M (**2012**) Structural and functional insights into the malaria parasite moving junction complex. *PLoS Pathog*, 8, e1002755.

W

Wakula, P, Beullens, M, Ceulemans, H, Stalmans, W & Bollen, M (**2003**) Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, 278, 18817-18823.

Wakula, P, Beullens, M, van Eynde, A, Ceulemans, H, Stalmans, W & Bollen, M (**2006**) The translation initiation factor eIF2beta is an interactor of protein phosphatase-1. *Biochem J*, 400, 377-383.

Waller, RF, Reed, MB, Cowman, AF & McFadden, GI (**2000**) Protein trafficking to the plastid of Plasmodium falciparum is via the secretory pathway. *Embo J*, 19, 1794-1802.

Wang, H & Brautigan, DL (**2002**) A novel transmembrane Ser/Thr kinase complexes with protein phosphatase-1 and inhibitor-2. *J Biol Chem*, 277, 49605-49612.

Wang, QM, Guan, KL, Roach, PJ & DePaoli-Roach, AA (**1995**) Phosphorylation and activation of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase by the mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 270, 18352-18358.

Wang, R, Kaul, A & Sperry, AO (**2010**) TLRR (lrrc67) interacts with PP1 and is associated with a cytoskeletal complex in the testis. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 102, 173-189.

Wang, R & Sperry, AO (**2008**) Identification of a novel Leucine-rich repeat protein and candidate PP1 regulatory subunit expressed in developing spermatids. *BMC Cell Biol*, 9, 9.

Wang, W, Cronmiller, C & Brautigan, DL (**2008**) Maternal phosphatase inhibitor-2 is required for proper chromosome segregation and mitotic synchrony during Drosophila embryogenesis. *Genetics*, 179, 1823-1833.

Wang, W, Stukenberg, PT & Brautigan, DL (**2008a**) Phosphatase inhibitor-2 balances protein phosphatase 1 and aurora B kinase for chromosome segregation and cytokinesis in human retinal epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 19, 4852-4862.

Wang, W, Stukenberg, PT & Brautigan, DL (**2008b**) Phosphatase inhibitor-2 balances protein phosphatase 1 and aurora B kinase for chromosome segregation and cytokinesis in human retinal epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 19, 4852-4862.

Wang, X, Liu, B, Li, N, Li, H, Qiu, J, Zhang, Y & Cao, X (**2008**) IPP5, a novel protein inhibitor of protein phosphatase 1, promotes G1/S progression in a Thr-40-dependent manner. *J Biol Chem*, 283, 12076-12084.

Wang, X, Zeng, W, Kim, MS, Allen, PB, Greengard, P & Muallem, S (**2007**) Spinophilin/neurabin reciprocally regulate signaling intensity by G protein-coupled receptors. *Embo J*, 26, 2768-2776.

Ward, GE, Fujioka, H, Aikawa, M & Miller, LH (**1994**) Staurosporine inhibits invasion of erythrocytes by malarial merozoites. *Exp Parasitol*, 79, 480-487.

Ward, P, Equinet, L, Packer, J & Doerig, C (**2004**) Protein kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics*, 5, 79.

Watanabe, R, Tambe, Y, Inoue, H, Isono, T, Haneda, M, Isobe, K, Kobayashi, T, Hino, O, Okabe, H & Chano, T (**2007**) GADD34 inhibits mammalian target of rapamycin signaling via tuberous sclerosis complex and controls cell survival under bioenergetic stress. *Int J Mol Med*, 19, 475-483.

Waters, NC, Woodard, CL & Prigge, ST (**2000**) Cyclin H activation and drug susceptibility of the Pfmrk cyclin dependent protein kinase from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 107, 45-55.

Wells, JA (**1996**) Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1-6.

Westphal, RS, Tavalin, SJ, Lin, JW, Alto, NM, Fraser, ID, Langeberg, LK, Sheng, M & Scott, JD (**1999**) Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science*, 285, 93-96.

White, NJ (**2004**) Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*, 113, 1084-1092.

White, NJ, Pongtavornpinyo, W, Maude, RJ, Saralamba, S, Aguas, R, Stepniewska, K, Lee, SJ, Dondorp, AM, White, LJ & Day, NP (**2009**) Hyperparasitaemia and low dosing are an important source of anti-malarial drug resistance. *Malar J*, 8, 253.

Williams, JP, Jo, H, Hunnicutt, RE, Brautigan, DL & McDonald, JM (**1995**) Tyrosine phosphorylation of phosphatase inhibitor 2. *J Cell Biochem*, 57, 415-422.

Woodrow, CJ & Krishna, S (**2006**) Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell Mol Life Sci*, 63, 1586-1596.

Wu, DY, Tkachuck, DC, Roberson, RS & Schubach, WH (**2002**) The human SNF5/INI1 protein facilitates the function of the growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) and modulates GADD34-bound protein phosphatase-1 activity. *J Biol Chem*, 277, 27706-27715.

Wu, J, Kleiner, U & Brautigan, DL (**1996**) Protein phosphatase type-1 and glycogen bind to a domain in the skeletal muscle regulatory subunit containing conserved hydrophobic sequence motif. *Biochemistry*, 35, 13858-13864.

Wu, J, Liu, J, Thompson, I, Oliver, CJ, Shenolikar, S & Brautigan, DL (**1998**) A conserved domain for glycogen binding in protein phosphatase-1 targeting subunits. *FEBS Lett*, 439, 185-191.

Wu, W, Baxter, JE, Wattam, SL, Hayward, DG, Fardilha, M, Knebel, A, Ford, EM, da Cruz e Silva, EF & Fry, AM (**2007**) Alternative splicing controls nuclear translocation of the cell cycle-regulated Nek2 kinase. *J Biol Chem*, 282, 26431-26440.

Wulf, G, Ryo, A, Liou, YC & Lu, KP (**2003**) The prolyl isomerase Pin1 in breast development and cancer. *Breast Cancer Res*, 5, 76-82.

Wulf, GM, Ryo, A, Wulf, GG, Lee, SW, Niu, T, Petkova, V & Lu, KP (**2001**) Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *Embo J*, 20, 3459-3472.

X

Xu, YX & Manley, JL (**2007**) The prolyl isomerase Pin1 functions in mitotic chromosome condensation. *Mol Cell*, 26, 287-300.

Y

Yamano, H, Ishii, K & Yanagida, M (**1994**) Phosphorylation of dis2 protein phosphatase at the C-terminal cdc2 consensus and its potential role in cell cycle regulation. *Embo J*, 13, 5310-5318.

Yamashiro, S, Yamakita, Y, Totsukawa, G, Goto, H, Kaibuchi, K, Ito, M, Hartshorne, DJ & Matsumura, F (**2008**) Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev Cell*, 14, 787-797.

Yamauchi, LM, Coppi, A, Snounou, G & Sinnis, P (**2007**) Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol*, 9, 1215-1222.

Yanagihori, S, Terunuma, M, Koyano, K, Kanematsu, T, Ho Ryu, S & Hirata, M (**2006**) Protein phosphatase regulation by PRIP, a PLC-related catalytically inactive protein--implications in the phospho-modulation of the GABAA receptor. *Adv Enzyme Regul*, 46, 203-222.

Yang, H, Sadda, MR, Li, M, Zeng, Y, Chen, L, Bae, W, Ou, X, Runnegar, MT, Mato, JM & Lu, SC (**2004**) S-adenosylmethionine and its metabolite induce apoptosis in HepG2 cells: Role of protein phosphatase 1 and Bcl-x(S). *Hepatology*, 40, 221-231.

Yang, J, Hurley, TD & DePaoli-Roach, AA (**2000**) Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif. *J Biol Chem*, 275, 22635-22644.

Yang, SD, Vandenheede, JR & Merlevede, W (**1981**) On the mechanism of activation of rabbit skeletal muscle ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *FEBS Lett*, 126, 57-60.

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

Yoshida, K, Watanabe, M, Kato, H, Dutta, A & Sugano, S (**1999**) BH-protocadherin-c, a member of the cadherin superfamily, interacts with protein phosphatase 1 alpha through its intracellular domain. *FEBS Lett*, 460, 93-98.

Yoshimura, K, Takeuchi, H, Sato, O, Hidaka, K, Doira, N, Terunuma, M, Harada, K, Ogawa, Y, Ito, Y, Kanematsu, T & Hirata, M (**2001**) Interaction of p130 with, and consequent inhibition of, the catalytic subunit of protein phosphatase 1alpha. *J Biol Chem*, 276, 17908-17913.

Yu, YM, Pace, SM, Allen, SR, Deng, CX & Hsu, LC (**2008**) A PP1-binding motif present in BRCA1 plays a role in its DNA repair function. *International journal of biological sciences*, 4, 352-361.

Yuda, M & Ishino, T (**2004**) Liver invasion by malarial parasites--how do malarial parasites break through the host barrier? *Cell Microbiol*, 6, 1119-1125.

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

Z

Zeke, A, Lukacs, M, Lim, WA & Remenyi, A (**2009**) Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol*, 19, 364-374.

Zeng, Q, Huang, Y, Zeng, L, Lan, X, He, S & Zhang, H (**2009**) Effect of IPP5, a novel inhibitor of PP1, on apoptosis and the underlying mechanisms involved. *Biotechnology and applied biochemistry*, 54, 231-238.

Zhang, C, Tang, J, Xie, J, Zhang, H, Li, Y, Zhang, J, Verpooten, D, He, B & Cao, Y (**2008**) A conserved domain of herpes simplex virus ICP34.5 regulates protein phosphatase complex in mammalian cells. *FEBS Lett*, 582, 171-176.

Zhang, J, Zhang, L, Zhao, S & Lee, EY (**1998**) Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry*, 37, 16728-16734.

Zhang, L, Qi, Z, Gao, Y & Lee, EY (**2008**) Identification of the interaction sites of Inhibitor-3 for protein phosphatase-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 377, 710-713.

Zhang, XS & Choi, JH (**2001**) Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *J Mol Evol*, 53, 214-224.

Zhao, S, Brandt, NR, Caswell, AH & Lee, EY (**1998**) Binding of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 to the ryanodine-sensitive calcium release channel protein. *Biochemistry*, 37, 18102-18109.

Zhao, S & Lee, EY (**1997**) A protein phosphatase-1-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *J Biol Chem*, 272, 28368-28372.

Zhou, XZ, Kops, O, Werner, A, Lu, PJ, Shen, M, Stoller, G, Kullertz, G, Stark, M, Fischer, G & Lu, KP (**2000**) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell*, 6, 873-883.

Le paludisme (ou malaria) est la parasitose la plus répandue à travers le monde (WHO, 2011). La moitié de la population mondiale est exposée à cette maladie causée par le protozoaire *Plasmodium*. La résistance aux traitements qui se développe chez le parasite représente un véritable obstacle à la mise en place de programmes de lutte globale. Le développement de nouveaux protocoles thérapeutiques plus efficaces ciblant les apicomplexes *Plasmodium* passe par une amélioration de nos connaissances concernant la biologie fondamentale des parasites. Par ce biais, nous pourrons identifier de nouvelles cibles originales visant des mécanismes essentiels et spécifiques au développement du pathogène. Chez *Plasmodium falciparum* (l'espèce responsable de la forme la plus mortelle de malaria), la phase érythrocytaire qui se déroule chez son hôte humain est relativement courte (48 heures). Le parasite y subit un grand nombre de changements morphologiques nécessitant une différentiation précise, spécifique et régulée au cours du temps. Parmi les éléments pouvant contrôler ces mécanismes, les phénomènes de phosphorylation réversibles semblent être des candidats de choix.

Chez les cellules eucaryotes, la balance des activités kinases/phosphatases permet le contrôle de fonctions essentielles telles que la croissance, la différenciation ou la division cellulaire. Parmi les protéines phosphatases, la sérine/thréonine phosphatase de type 1 (ou PP1) est une enzyme majeure. Elle est responsable à elle seule de près de 80% de l'activité phosphatase cellulaire (**Dombradi V. 1990**). La PP1 est formée d'une sous-unité catalytique (PP1c) qui possède la particularité de se fixer à un grand nombre de protéines régulatrices (≥ 200). La formation de cette large famille d'holoenzymes de PP1 permet à la sous-unité catalytique d'acquérir une spécificité de substrat, d'être redistribuée dans différents niveau subcellulaire ou encore de moduler son activité déphosphorylatrice (**Ceulemans H. 2004**).

Chez *Plasmodium falciparum,* la phosphatase de type 1 (appelée PfPP1), localisée au niveau nucléocytoplasmique (**Daher W.2006**), possède un rôle essentiel dans le développement asexuel du parasite (**Kumar R. 2002**) et est impliquée dans la libération des mérozoites infectieux (**Blisnick T. 2006**). Tous ces éléments font de cette protéine une enzyme majeure du développement du parasite. Cependant, relativement peu de choses sont connues concernant les sous-unités régulant son activité. Au laboratoire, une analyse du génome de *Plasmodium falciparum* nous a permis de mettre en évidence au moins 3 régulateurs potentiels de PfPP1. Le projet de cette thèse s'axe autour de l'étude de deux de ces protéines appartenant à une famille très bien étudiée et décrite chez l'homme, la levure ou les plantes : les inhibiteurs de PP1. Le travail porte plus particulièrement sur l'étude de l'inhibiteur 2 (appelé PfI2) et l'inhibiteur 3 (appelé PfI3).

Nous avons, dans un premier temps, entrepris la caractérisation de PfI2. Ce travail a permis d'identifier cette protéine comme étant un régulateur négatif de PfPP1 localisé au niveau nucléocytoplasmique et indispensable au développement érythrocytaire du parasite. Des études d'interaction *in vitro* et *in vivo* ont permis d'identifier un certain nombre de résidus impliqués dans la fixation et la fonction de PfI2. En nous basant sur ces résultats, nous avons entrepris une exploration plus précise des relations structure/fonction du complexe PfI2/PfPP1.

Concernant l'identification de PfI3, nous avons récemment publiée dans le Journal of Biological Chemistry (**Frèville A. 2012**) un travail montrant que chez le parasite, l'inhibiteur 3 est localisé au niveau nucléaire et est essentiel au développement asexuel du pathogène. Des expériences d'interaction *in vitro* ont permis de montrer que PfI3 est capable de se fixer *in vitro* à PfPP1 et ce principalement via le motif primaire RVxF. Chez des levures déplétées de leur inhibiteur 3, l'expression épisomique de PfI3 n'a pas permis de restaurer la croissance des cellules. Des expériences *in vitro* d'activités phosphatase révèlent une action positive de PfI3 sur PfPP1. Ce résultat, inverse de celui que l'on observe chez ses homologues chez la levure ou l'humain met en évidence une fonction différente et spécifique de PfI3 et font de cette protéine un régulateur nucléaire potentiel de PfPP1 chez *Plasmodium falciparum*.

L'ensemble de ce travail de thèse à permis d'identifier et de caractériser chez *Plasmodium falciparum* deux régulateurs potentiels de la phosphatase de type 1 mais également de mettre en évidence un certain nombre d'éléments spécifiques au fonctionnement et au développement du parasite faisant de ces protéines des cibles thérapeutiques intéressantes.