



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle du PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator chez Plasmodium falciparum : rôle dans la régulation de PP2A et de PP1

Audrey Vandomme

► **To cite this version:**

Audrey Vandomme. Caractérisation fonctionnelle du PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator chez Plasmodium falciparum : rôle dans la régulation de PP2A et de PP1. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S010 . tel-01084804

HAL Id: tel-01084804

<https://theses.hal.science/tel-01084804>

Submitted on 20 Nov 2014

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

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

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE
Ecole Doctorale Biologie - Santé
Faculté de Médecine Henri-Warembourg de Lille

N° d'ordre :

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Parasitologie et Mycologie

Présentée et soutenue publiquement par

Audrey VANDOMME

Le 25 avril 2014

**Caractérisation fonctionnelle du PhosphoTyrosyl
Phosphatase Activator chez *Plasmodium falciparum* :
rôle dans la régulation de PP2A et de PP1**

Devant le Jury composé de :

Président : Professeur Jean-François BODART

Rapporteurs : Professeur Philippe GRELLIER

Docteur Xavier CAYLA

Examineurs : Docteur Alphonse GARCIA

Docteur Jamal KHALIFE

Docteur Christine PIERROT

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Institut Pasteur de Lille - INSERM U1019 - CNRS UMR 8204 - Université Lille Nord de France
1 Rue du Professeur Calmette BP245 59019 Lille Cedex France

*À ma fille Chloé, pour sa patience, ses sourires et sa bonne humeur malgré les
longues heures d'absence.
A la mémoire de mon grand-père, qui m'a appris la valeur du travail et des
gens.
Cette thèse est pour vous.*

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE
École Doctorale Biologie - Santé
Faculté de Médecine Henri - Warembourg de Lille

N° d'ordre :

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Parasitologie et Mycologie

Présentée et soutenue publiquement par

Audrey VANDOMME

Le 25 avril 2014

**Caractérisation fonctionnelle du PhosphoTyrosyl
Phosphatase Activator chez *Plasmodium falciparum* :
rôle dans la régulation de PP2A et de PP1**

Devant le Jury composé de :

Président : Professeur Jean-François BODART

Rapporteurs : Professeur Philippe GRELLIER

Docteur Xavier CAYLA

Examineurs : Docteur Alphonse GARCIA

Docteur Jamal KHALIFE

Docteur Christine PIERROT

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Institut Pasteur de Lille - INSERM U1019 - CNRS UMR 8204 - Université Lille Nord de France
1 Rue du Professeur Calmette BP245 59019 Lille Cedex France

REMERCIEMENTS

Je remercie le Docteur Camille Loch, directeur du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL) pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de cette structure.

Je remercie le Docteur Raymond Pierce, qui dirige l'équipe 2 du CIIL, au sein de laquelle j'ai effectué mon master et ma thèse.

Je remercie sincèrement le Professeur Jean-François Bodart d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je vous remercie également d'avoir suivi mon travail de thèse par le biais du Comité de Suivi de Thèse. Merci pour les discussions très enrichissantes concernant le projet mais également tout ce qu'il y a autour.

Je tiens vivement à remercier le Professeur Philippe Grellier et le Docteur Xavier Cayla, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également le Docteur Alphonse Garcia d'avoir accepté d'en être l'examineur.

Au Docteur Jamal Khalife, j'adresse mes plus sincères remerciements. Merci de m'avoir accueillie dans votre groupe, de m'avoir fait confiance pour ce projet et les autres. Merci également pour votre aide scientifique et technique tout au long de ces quatre années.

Au Docteur Christine Pierrot, directrice de cette thèse, je pense qu'un seul merci n'est pas suffisant. Merci pour tout. À tes côtés et sous ta tutelle j'ai appris énormément tant au niveau technique que scientifique mais également personnel. Je pense que je n'en serais pas là aujourd'hui sans toi. Merci de m'avoir soutenue dans les bons moments mais également dans les difficiles. Tu m'as toujours poussée à donner le meilleur de moi-même. J'espère avoir été digne de ta confiance et de ton aide.

Je remercie personnellement Sophia Lafitte, technicienne au grand cœur de notre groupe. Tu m'as appris à « manipuler ». Si les ELISA, la « culture cell » et les manip animales n'ont plus de secrets pour moi, c'est grâce à toi. Ta gentillesse et ton sourire au quotidien ont fait de ces quatre années un moment que je n'oublierai jamais. Merci pour ton soutien dans les moments un peu difficiles. L'équipe 2 a beaucoup de chance de t'avoir.

Je remercie le reste de l'équipe 2, notamment Claude et Hadi qui sont partis vers d'autres horizons et Caro pour sa gentillesse et les parties de franche rigolade que nous avons eues. Sans toi, le labo serait un peu (pour ne pas dire beaucoup) plus morose !! Merci à Dionigia, Steph, Marion, Flo, Nico, Manu, Aline, Aurore, Muriel, Cléa, Thavy, Jacques, Gégé, Astrid, Alejandro et Thomas que j'ai côtoyés tout au long de ces quatre années. Je remercie également le Docteur Colette Dissous pour sa gentillesse, pour nos longues discussions lors des pauses du midi sur des sujets tellement variés.

Je remercie également le Docteur Katia Cailliau et le Docteur Alain Martoriati pour leur collaboration au projet. Votre aide a été très précieuse. Merci également pour les discussions toujours constructives qui ont permis de faire avancer ce projet.

Merci au Docteur Isabelle Landrieu d'avoir suivi ce projet dans le cadre du Comité de Suivi de thèse.

Merci également à Julien et Mathieu avec qui j'ai partagé le stress du master et de la thèse, votre amitié a été très importante.

A Nadège, merci pour ton amitié, pour ta gentillesse et pour ton soutien, j'espère revenir très vite te voir au pays des rennes et du père Noël !

À ma famille et ma belle-famille merci de votre soutien. Merci à mes parents qui m'ont toujours poussée à aller de l'avant, à approfondir mes connaissances et m'ont permis de suivre cette voie.

Je tiens maintenant à remercier deux personnes qui me sont très chères et qui ont beaucoup apporté et supporté pendant cette thèse. Nicolas, merci pour ton soutien au quotidien, pour ta patience aussi. Une thèse comme beaucoup le savent, ce sont des moments d'euphorie suivis (parfois de très près) de moments de fatigue et de stress intense qui au quotidien ne sont pas toujours faciles à gérer. Merci, d'avoir supporté mes sautes d'humeurs et d'avoir toujours su me remotiver. Ton aide et ta présence surtout en cette fin de thèse m'ont permis de donner le meilleur de moi-même. Merci pour tout et encore plus. Je remercie enfin ma fille Chloé. Tu es encore trop jeune pour tout saisir, mais tu as bien vu que ta maman n'était pas toujours aussi disponible que tu l'aurais voulu. Merci pour ta patience. Tes sourires, lorsque je rentrais tout juste pour te voir, m'ont permis de me dépasser encore plus. J'espère que ton père et moi saurons t'apprendre à toujours te dépasser et à faire ce qu'il te plaît.

La thèse est avant tout une fin, fin des études, mais également un début, début d'une carrière professionnelle. Je pense que mon passage au sein de cette équipe m'aura permis d'avoir des connaissances solides tant professionnellement que personnellement pour embrasser la carrière de chercheur. Merci à tous pour cela.

RESUME

Le paludisme est la première endémie parasitaire mondiale causée par le protozoaire *Plasmodium*. Cette parasitose est responsable de 219 millions de cas et 660 000 décès par an. La prévalence et la mortalité élevées sont liées notamment à la résistance des parasites aux traitements existants, ce qui rend primordial le développement de nouvelles thérapeutiques. Pour ce faire, une meilleure connaissance de la biologie fondamentale du parasite est nécessaire. Dans ce contexte l'un des axes de recherche concerne la régulation du cycle cellulaire chez *Plasmodium* et notamment les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation qui sont essentiels.

Parmi les nombreux acteurs des mécanismes de phosphorylation, la sérine/thréonine protéine phosphatase de type 2A (PP2A) est, avec PP1, l'une des phosphatases majeures. Cette phosphatase est impliquée dans de nombreux processus cellulaires notamment la mitose, la méiose ou encore l'apoptose. Elle est composée d'une sous-unité catalytique (PP2Ac), d'une sous-unité d'aide à l'agencement spatial (A) et d'une sous-unité régulatrice (B). Il existe quatre familles de sous-unités régulatrices contenant chacune plusieurs membres qui permettent de réguler la localisation, la spécificité et l'activité de PP2A. Il existe également des protéines régulatrices indépendantes, notamment les inhibiteurs 1 et 2, la protéine $\alpha 4$ et le PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator (PTPA).

Chez *Plasmodium falciparum*, la protéine phosphatase de type 2A ou PfPP2A a été identifiée et semble essentielle pour le développement asexué du parasite. Cependant, peu de choses sont connues sur sa régulation chez le parasite. En effet, seul l'inhibiteur 2 de PP2A a été décrit et caractérisé. Au cours de cette thèse, nous avons effectué par des études *in silico* un recensement des régulateurs putatifs de PfPP2A. Ces études nous ont permis d'identifier la sous-unité A et une unique sous-unité de type B. Parmi les régulateurs spécifiques, outre l'inhibiteur 2 déjà caractérisé, l'analyse du génome du parasite montre qu'il contient un orthologue de l'inhibiteur 1, d' $\alpha 4$ et de PTPA. Le projet de cette thèse s'articule autour de la caractérisation moléculaire et fonctionnelle de l'un de ces régulateurs : PfPTPA.

La caractérisation moléculaire de PfPTPA a permis de montrer dans ce travail la conservation de cette protéine au cours de l'évolution. L'analyse de sa séquence a révélé que cinq des six motifs de fixation à la PP2A identifiés chez l'homme sont conservés. Par des études *in vitro* et *in vivo* dans un modèle hétérologue, nous avons pu confirmer l'effet activateur de PfPTPA sur PP2A. Par une approche de mutation unique d'acides aminés, nous avons identifié trois résidus impliqués dans l'interaction et l'activité de PfPTPA notamment le résidu G292 qui est essentiel pour l'interaction PfPTPA/PfPP2A. Nous avons ensuite montré par des études de génétique inverse que PfPP2A et PfPTPA, qui sont présentes dans le même compartiment cellulaire au cours du cycle érythrocytaire, sont essentielles pour la complétion de cette phase du cycle du parasite.

En parallèle, l'analyse de la séquence de PfPTPA, a révélé la présence, spécifique au parasite, d'un motif de fixation à la PP1 (motif RVxF). L'identification de ce motif, nous a incités à étudier la relation entre PfPTPA et PfPP1. Nous avons ainsi pu montrer que PfPTPA était capable de se lier à PfPP1 même si elle est incapable de réguler son activité.

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de caractériser chez *Plasmodium falciparum* un activateur de la protéine phosphatase de type 2A et de montrer sa spécificité par rapport à la protéine humaine. Nos résultats, et notamment l'implication de PfPTPA dans la régulation du cycle cellulaire, font de ce régulateur une cible thérapeutique potentielle.

ABSTRACT

Malaria is the most deadly parasitic disease in the world caused by the *Apicomplexa* protozoan *Plasmodium falciparum*. This parasite is responsible for 219 million cases and 660 000 deaths per year and the drug resistance increases the prevalence and the morbidity. The emergence of multi-drug resistance requires the development of new therapeutics. Hence, a better understanding of parasitic fundamental biology is necessary. In this context, one research axis is the cell cycle regulation of *Plasmodium*, notably phosphorylation/dephosphorylation mechanisms which are essential for the parasite.

Among the actors of the reversible phosphorylation, the serine/threonine phosphatase type 2A (PP2A) in eukaryote is, with PP1, one of the major phosphatases. It is involved in several cell processes like mitosis, meiosis or apoptosis. PP2A is composed of a catalytic subunit (PP2Ac), a scaffold subunit (A) and a regulatory subunit (B). There are four regulatory subunit families which regulate location, specificity and activity of PP2A. Furthermore, several independent regulatory proteins including inhibitor 1 and 2, the $\alpha 4$ protein or the phosphotyrosyl phosphatase activator (PTPA) were identified.

In *Plasmodium falciparum*, the protein phosphatase type 2A named PfPP2A has been characterized and seems to be essential for the parasite asexual development as shown by the inhibition of parasitic growth after treatment with natural toxins inhibiting phosphatases. However, its regulation is still poorly understood in *Plasmodium*. Indeed, only the PP2A inhibitor 2 is characterized in *P. falciparum* and in *P. berghei* (a rodent specific *Plasmodium* species). Using an *in silico* study, we have identified a putative scaffold subunit and only one B subunit. Among the regulatory proteins, we have identified orthologs of the inhibitor 1, $\alpha 4$ and PTPA. The purpose of this thesis is to study PfPTPA both of the molecular and functional levels.

The molecular characterization of PfPTPA showed the evolutionary conservation of this protein. The PfPTPA sequence analysis revealed that five out of six amino acids involved in interaction with PP2A in human, are conserved in *P. falciparum*. *In vitro* binding and functional studies revealed that PfPTPA binds to and activates PfPP2A. Mutation studies showed that three residues (V283, G292 and M296) of PfPTPA are indispensable for the interaction and that G292 residue is essential for its activity. Localization studies indicated that PfPTPA and PfPP2A are localized in the same cellular compartment throughout the erythrocytic cycle of *P. falciparum*, suggesting a possible interaction of both proteins *in vivo*. In *Plasmodium falciparum*, genetic studies likely suggested the essentiality of PfPTPA for the completion of intraerythrocytic parasite lifecycle. Functional studies, using *Xenopus* oocyte, showed that PfPTPA blocked the G2/M transition.

Further analysis of PfPTPA sequence revealed that PfPTPA, unlike its human counterpart, possess one of the most canonical binding motif to PP1 (RVxF motif). The identification of this RVxF motif led us to study the role PfPTPA on PfPP1. Thus, we have shown that PfPTPA interacts with PfPP1 but was unable to regulate PfPP1 activity *in vitro*.

This work allowed characterizing the PfPTPA, an activator of protein phosphatase type 2A in *Plasmodium falciparum* and to show some specificities when compared to its human ortholog. Our data which suggest that this regulator could be involved in cell cycle regulation, together with its essentiality for the growth of *P. falciparum* strongly support the idea to explore it as potential drug target.

CADRE DE L'ETUDE

L'ensemble de ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de l'équipe 2 du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille localisé à l'Institut Pasteur de Lille. Les expérimentations utilisant les ovocytes de xénope ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Professeur Jean-François Bodart au sein du Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, à l'Université Lille I localisé à Villeneuve d'Ascq.

Une partie de ce travail de thèse a été publiée dans l'International Journal of Molecular Sciences et est présentée dans ce manuscrit. En parallèle de ma thèse, j'ai également pu participer à différents projets publiés dans Cell Microbiology, dans Encyclopedia of Malaria et dans FEBS Journal (soumis)

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	7
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
INTRODUCTION	13
A. LE PALUDISME	15
<i>I. La maladie et ses conséquences socio-économiques.....</i>	<i>15</i>
1. Un peu d'histoire	15
2. <i>Plasmodium</i> : parasite responsable du paludisme	16
3. La pathologie	16
a. L'accès palustre simple	17
b. Le neuropaludisme	17
c. Le paludisme de la femme primipare	18
d. Le paludisme chronique	18
4. Impacts humains et socio-économiques du paludisme	19
5. Lutte contre le paludisme.....	20
a. Mieux vaut prévenir que guérir	20
i. Diminution des populations vectorielles	20
ii. Évitement des piqûres de moustiques	21
b. Les traitements	21
i. Les molécules	21
ii. La résistance aux molécules	23
c. La vaccination.....	24
d. Les recommandations de l'OMS aux voyageurs	25
<i>II. Le parasite.....</i>	<i>26</i>
1. Physiologie du parasite	26
2. Cycle de vie.....	27
a. La phase asexuée chez le vertébré.....	27
i. La phase hépatique	27
ii. La phase érythrocytaire.....	29
iii. La gamétocytogénèse.....	31
b. La phase sexuée chez le moustique	31
B. LES PHÉNOMÈNES DE PHOSPHORYLATION/ DÉPHOSPHORYLATION CHEZ <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	32
<i>I. Les kinases</i>	<i>34</i>
1. Les ePKs.....	34
a. Les tyrosine kinases et les homologues des tyrosine kinases	34
b. La voie des MAP kinases	35
c. Les CamKs.....	35
d. Les AGC kinases.....	36
e. Les CDKs	36
f. Les protéine kinases orphelines.....	36
g. Les autres protéine kinases.....	37
2. Les FIKKs	37
<i>II. Les phosphatases</i>	<i>39</i>
1. Les protéine sérine/thréonine phosphatases.....	39
a. Les PPPs.....	39
i. PfPP1	40

ii.	PfPP2B.....	40
iii.	PfPPβ.....	40
iv.	PfPP5.....	40
v.	PfPP7 et PfPPJ.....	41
vi.	PfPPKL.....	41
vii.	PfSHLP1 et PfSHLP2.....	41
b.	Les PPMs.....	42
c.	Les FCP/SCP phosphatases asparagines.....	43
2.	Les protéine tyrosine phosphatases et les protéines homologues des tyrosine phosphatases.....	43
a.	Les protéine tyrosine phosphatases.....	43
i.	PfYVH1.....	43
ii.	PfPRL.....	43
b.	Les protéines homologues des tyrosine phosphatases.....	43
C.	LA PROTÉINE PHOSPHATASE DE TYPE 2A.....	44
I.	<i>PP2A, une phosphatase complexe</i>	44
1.	Découverte et identification.....	44
2.	Structure et composition de la PP2A.....	45
a.	La sous-unité catalytique (PP2Ac).....	45
b.	La sous-unité A.....	47
c.	Les sous-unités régulatrices de type B.....	47
i.	Les sous-unités B.....	47
ii.	Les sous-unités B'.....	48
iii.	Les sous-unités B''.....	48
iv.	Les sous-unités B'''.....	49
II.	<i>La régulation de PP2A</i>	49
1.	La composition des holoenzymes.....	49
2.	Les modifications post-traductionnelles.....	49
a.	La phosphorylation.....	49
b.	La méthylation.....	50
c.	Les modifications post-traductionnelles et la composition des holoenzymes.....	50
3.	Les régulateurs de PP2A.....	51
a.	Les inhibiteurs 1 et 2.....	51
b.	ENSA et ARPP19.....	52
c.	Les caséines kinases 2 α.....	52
d.	CIP2A.....	53
e.	TIPRL-1.....	53
f.	α4.....	54
g.	PTPA.....	55
h.	Autres régulateurs.....	56
4.	Les toxines naturelles.....	56
III.	<i>Rôle de PP2A</i>	57
1.	Implication de PP2A dans la régulation du cycle cellulaire.....	57
a.	Quelques rappels sur le cycle cellulaire chez les eucaryotes.....	57
b.	Le rôle de PP2A dans la régulation de la transition G1/S.....	58
c.	Implication dans la mitose.....	60
i.	Transition G2/M.....	60
ii.	Séparation des chromatides sœurs.....	62
iii.	Sortie de mitose.....	62
d.	Implication dans la méiose.....	62
2.	PP2A dans l'apoptose.....	63

3.	Autres rôles de PP2A	64
IV.	<i>PP2A et les pathologies</i>	64
1.	PP2A et la maladie d'Alzheimer	64
2.	PP2A et les maladies cardiaques	65
3.	PP2A et les cancers.....	65
4.	PP2A et les virus	66
V.	<i>PP2A chez les parasites</i>	67
VI.	<i>PP2A chez Plasmodium</i>	68

CADRE ET OBJECTIFS71

RESULTATS75

A.	IDENTIFICATION DES SOUS-UNITÉS ET DES RÉGULATEURS DE PP2A CHEZ <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> ET ÉTUDES PRÉLIMINAIRES	77
I.	<i>Identification des sous-unités de PfPP2A et de ses régulateurs</i>	77
II.	<i>Annotation de la séquence de PfPP2A</i>	78
III.	<i>Études préliminaires sur la caractérisation des inhibiteurs I1^{PP2A} et I2^{PP2A}</i>	80
1.	L'inhibiteur I1 ^{PP2A} de <i>P. falciparum</i>	80
a.	Annotation de la séquence de I1 ^{PP2A}	80
b.	Interaction de Pfl1 ^{PP2A} avec PP2A et PP1	82
i.	Étude de l'interaction avec PfPP2A	82
ii.	Étude de l'interaction avec PfPP1	83
2.	L'inhibiteur 2 de PP2A chez <i>Plasmodium falciparum</i>	84
a.	Annotation de la séquence de Pfl2 ^{PP2A}	84
b.	Interaction de Pfl2 ^{PP2A} avec PfPP2A et PfPP1.....	85
i.	Interaction Pfl2 ^{PP2A} /PfPP2A	85
ii.	Interaction Pfl2 ^{PP2A} /PfPP1	86
c.	Étude préliminaire du rôle de Pfl2 ^{PP2A} sur PP2A et PfPP1	87
i.	Effets de Pfl2 ^{PP2A} sur PP2A <i>in vivo</i>	87
ii.	Étude préliminaire du rôle de Pfl2 ^{PP2A} sur l'activité de PfPP1	87
3.	Conclusions des études préliminaires de Pfl1 ^{PP2A} et Pfl2 ^{PP2A}	87
B.	ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE LA PROTÉINE PHOSPHATASE DE TYPE 2A PAR PfPPTA.	89
I.	<i>Annotation de la séquence de PfPPTA</i>	89
II.	<i>Étude de l'interaction PfPPTA/PfPP2A et du rôle de PfPPTA dans la régulation de l'activité de PP2A.</i>	90
III.	<i>Interaction in vivo de PfPPTA et PfPP2A</i>	119
IV.	<i>Approches complémentaires pour l'étude du rôle de PfPPTA sur l'activité de PP2A</i>	121
1.	Rôle de PfPPTA sur l'activité sérine/thréonine phosphatase de PP2A	121
2.	Effet de PfPPTA sur l'activité ATPasique de PP2A	121
3.	Études complémentaires de l'implication de PfPPTA dans la transition G2/M en ovocyte de xénope.	122
4.	Étude du rôle de PfPPTA et PfPP2A chez le parasite	122
C.	RÉGULATION DE LA PROTÉINE PHOSPHATASE DE TYPE 1 (PP1) PAR PfPPTA.	125
I.	<i>Étude de l'interaction PfPPTA/PP1</i>	125
1.	Interaction entre PfPPTA et PfPP1	125
2.	Interaction entre PfPPTA et PP1.....	125
3.	Implication du motif KINF (RVxF) dans la liaison de PfPPTA à PP1	126
II.	<i>Régulation de l'activité de PfPP1 par PfPPTA in vitro</i>	127
III.	<i>Inhibition de l'interaction PfPPTA/PfPP1 in vivo par des peptides synthétiques</i>	128

MATERIEL ET METHODES 129

A.	MATÉRIEL.....	131
I.	Plasmides	131
II.	Anticorps	131
III.	Amorces	131
B.	MÉTHODES	132
I.	Analyse de bioinformatique comparative et analyse des séquences	132
II.	Le double hybride en levure	133
III.	Test de croissance des levures en milieu liquide	133
IV.	Test β -galactosidase sur filtre.....	134
V.	Extraction des protéines de levures et Western-Blot.....	134
VI.	Test d'interaction in vitro.....	134
VII.	Test d'activité in vitro de PfPP1 vis-à-vis du substrat pNPP.....	135
VIII.	Test d'activité sérine/thréonine phosphatase in vitro	135
IX.	Test d'activité ATPasique	135
X.	Induction de la GVBD en ovocyte de xénope par l'acide okadaïque	136
XI.	Extraction des protéines de parasites	136
1.	Extraction par cycles de congélation/décongélation	136
2.	Solubilisation séquentielle des protéines.....	136
XII.	Production de sérum anti-PfPTPA et anti-PfPP2A.....	136
1.	Immunisation de rats Fisher F344	136
2.	Immunisation de souris Balb/c.....	137
XIII.	Tests des sérums d'immunisation en Western-blot	137
XIV.	Interruption conditionnelle de gène chez <i>Plasmodium berghei</i>	137
1.	Préparation des plasmides	137
2.	Préparation des schizontes de <i>P. berghei</i>	138
3.	Transfection et injection aux animaux	138
4.	Vérification de la transfection	139
XV.	Elaboration de peptides dérivés du motif KINF.....	139
XVI.	Micro-injection de peptides dérivés du motif KINF en ovocyte de xénope.....	139
XVII.	Test des peptides dérivés du motif KINF sur la croissance de <i>Plasmodium falciparum</i> ..	139

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 141

I.	Identification des sous-unités régulatrices et des régulateurs de PfPP2A	143
1.	PfPP2A : un nombre d'holoenzymes limité	143
2.	Identification de protéines impliquées dans la régulation de l'activité de PP2A chez <i>Plasmodium</i>	146
II.	Études des inhibiteurs 1 et 2 de PfPP2A	148
1.	L'inhibiteur 1 de PP2A en est-il vraiment un ?	148
2.	PfI2 ^{PP2A} : interacteur de PfPP2A et PfPP1	148
III.	PfPTPA : un régulateur de PP2A.....	150
1.	PfPTPA : un interacteur de PP2A.....	150
2.	Rôle de PfPTPA sur l'activité de PP2A	154
3.	Rôle de PfPTPA et PfPP2A dans le cycle parasitaire	156
4.	Rôle de PfPTPA dans le cycle cellulaire	159
IV.	PfPTPA : un régulateur de PfPP1 ?.....	161
1.	PfPTPA est un interacteur de PfPP1	161

2. Le motif KINF est impliqué dans l'interaction PfPTPA/PP1	161
3. PfPTPA serait un régulateur de PfPP1 <i>in vivo</i>	162
BIBLIOGRAPHIE	165
ANNEXES	201
ANNEXE 1	203
ANNEXE 2	225

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Introduction

Figure 1 : Distribution des pays ou régions présentant un risque de transmission du paludisme	19
Figure 2 : Cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	27
Figure 3 : Phase exo-érythrocytaire du cycle biologique de <i>Plasmodium</i>	28
Figure 4 : Schématisation de l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte.....	29
Figure 5 : Structure des formes érythrocytaires du parasite.....	30
Figure 6 : Cycle de vie sexué de <i>Plasmodium</i>	32
Figure 7 : Schématisation des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation	33
Figure 8 : La phosphorylation chez <i>Plasmodium falciparum</i>	33
Figure 9 : Les grands groupes de protéine phosphatases chez les eucaryotes.	39
Figure 10 : Structure de la PP2A.....	45
Figure 11 : Séquence de la sous-unité catalytique de PP2A.	46
Figure 12 : Structure de la sous-unité catalytique de PP2A et visualisation des acides aminés impliqués dans la fixation de l'acide okadaïque	46
Figure 13 : Les différentes holoenzymes de PP2A.....	49
Figure 14 : Schématisation du rôle de l'inhibition de PP2A par I2 ^{PP2A}	52
Figure 15 : Illustration du rôle de CIP2A dans la transformation cellulaire.	53
Figure 16 : Schématisation du rôle de TIPRL dans la synthèse protéique et la réponse aux dommages à l'ADN.	54
Figure 17 : Illustration du rôle de chaperonne de $\alpha 4$	54
Figure 18 : Schématisation du cycle cellulaire chez les eucaryotes.	57
Figure 19 : Schématisation de la mitose.	58
Figure 20 : Illustration de l'activation de la transition G1/S par PP2A	59
Figure 21 : Schématisation de l'inhibition de la transition G1/S par PP2A _{T56}	60
Figure 22 : Régulation de la transition G2/M.	61
Figure 23 : Rôle de PP2A _{T56} dans la séparation des chromatides sœurs.....	62
Figure 24 : Rôle de PP2A _{T61} dans l'apoptose.....	63
Figure 25 : Alignement des séquences nucléotidiques et protéiques de PfPP2A	79
Figure 26 : Alignement des séquences humaine et plasmodiale de PP2A.	80
Figure 27 : Alignement des séquences codantes de Pfl1 ^{PP2A}	81
Figure 28 : Alignement des séquences protéiques de Pfl1 ^{PP2A} et de I1 ^{PP2A} humain.....	82
Figure 29 : Principe du double hybride de levure.	83
Figure 30 : Test d'interaction Pfl1 ^{PP2A} /PfPP1 biotinylée.....	84
Figure 31 : Alignement de Pfl2 ^{PP2A} et de son orthologue humain.	85
Figure 32 : Test d'interaction Pfl2 ^{PP2A} /PfPP2A en levure.....	86
Figure 33 : Test d'interaction en double hybride de levure Pfl2 ^{PP2A} /PfPP1.	86
Figure 34 : Rôle de Pfl2 ^{PP2A} sur l'activité de PfPP1 <i>in vitro</i>	87
Figure 35 : Alignement des séquences de PfPTPA	89
Figure 36 : Alignement des séquences protéiques de PfPTPA et de son orthologue humain.	90
Figure 37 : Expression des protéines PfPTPA-GFP et PfPP2A-GFP chez le parasite et optimisation de l'extraction des protéines.	119
Figure 38 : Analyse en western-blot des sérums anti-PfPTPA et anti-PfPP2A.	120
Figure 39 : Régulation de l'activité sérine/thréonine phosphatase de PP2A par PfPTPA.	121

Figure 40 : Rôle de PfPTPA sur la transition G2/M induite par l'acide okadaïque.....	122
Figure 41 : Génération de parasites <i>P. berghei</i> dans une stratégie d'interruption de gène conditionnelle. .	123
Figure 42 : Interaction entre PfPTPA et PfPPP1 <i>in vitro</i> . 125	
Figure 43 : Étude de la cinétique d'interaction de PfPTPA avec PP2A et PP1.	126
Figure 44 : Co-immunoprécipitation de PfPTPA avec le PP1 endogène.	126
Figure 45 : Étude de l'implication du motif KINF dans l'interaction PfPTPA/PP1.	127
Figure 46 : Étude de l'inhibition de PfPTPA vis-à-vis de PfPPP1 <i>in vivo</i>	128
Figure 47 : Illustration de la régulation de PP2A.	145
Figure 48 : Schématisation du cycle cellulaire lors de la phase érythrocytaire du cycle de <i>Plasmodium falciparum</i>	147
Figure 49 : Visualisation des résidus de PTPA humaine impliqués dans l'interaction avec PP2A	153
Figure 50 : Les différentes méthodes inductibles pour interrompre l'expression d'une protéine chez le parasite.	157
Figure 51 : Système de délétion de gène par une activité recombinase inductible chez <i>P. falciparum</i>	159
Figure 52 : Modélisation de la structure de PfPTPA.	162

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau 1 : Distribution des cas et des décès liés au paludisme dans le monde	20
Tableau 2 : Familles de molécules des principaux antipaludiques	22
Tableau 3 : Date de mise sur le marché et d'apparition des résistances des différents composés antipaludiques.....	23
Tableau 4 : Les protéine kinases putatives de <i>Plasmodium falciparum</i>	37
Tableau 5 : Les protéine phosphatases putatives de <i>Plasmodium falciparum</i>	42
Tableau 6 : Récapitulatif des modifications post-traductionnelles nécessaires à la formation des holoenzymes.	51
Tableau 7 : Effet des toxines naturelles sur l'activité des différentes sérine/thréonine phosphatases.....	56
Tableau 8 : PP2A et ses sous-unités existant chez <i>P. falciparum</i>	78
Tableau 9 : Amorces utilisées au cours de cette étude.....	131
Tableau 10 : Numéro d'accèsion des différentes sous-unités et protéines régulatrices recherchées dans le génome de <i>P. falciparum</i>	132
Tableau 11 : Comparaison entre l'homme et <i>Plasmodium falciparum</i> de l'implication des résidus de PTPA dans l'interaction avec PP2A.....	153
Tableau 12 : Comparaison du rôle des mutations des résidus V281 et M294 sur l'interaction PTPA/PP2A.	154

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABCK : ATP-Binding Cassette Kinase	HTLV-1 : Human T cell Leukemia lymphoma Virus type 1,
ANP32 : Acidic Nuclear Phosphoprotein 32	I1^{PP2A} : Inhibitor 1 of PP2A
AP-1 : Activator Protein 1	I2^{PP2A} : Inhibitor 2 of PP2A
APC/C : Anaphase Promoting Complex /Cyclosome	IC50 : Concentration Inhibitrice médiane
aPK : atypical Protein Kinase	IL-3 : Interleukin 3
APP : Amyloid-Precursor Protein	J20 : Jour 20
ARK : Aurora-Related Kinase	LCMT1 : Leucine CarboxyMethyl Transferase 1
ARP : Aspartate Rich Protein	LRR : Leucine Rich Repeat
ARPP19 : cAMP-Regulated PhosphoProtein 19	MAP : Mitogen-Activated Protein
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
ATR : Ataxia Telangiectasia Related	MAPKK : MAP Kinase Kinase
AB peptide : Peptide beta Amyloïde	MAPKKK/MAP3K : MAPKK Kinase
BAD : Bcl-2-Associated Death promoter protein	MAPKP : MAPK Phosphatase
BCL-2 : B Cell Leukemia protein 2	MBP : Myelin Basic Protein
Bti : <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i>	MDM2 : Murine Double Minute 2
CAK : CDK Activating Kinase	MEK : MAPK ERK Kinase
CamK : Protein Kinase Calcium or Calmoduline Dependent	MPF : Mitogen Promoting Factor
CDC : Cell Division Cycle	MRK : MO15-related protein
CDK : Cycline Dependent Kinase	MSP : Major Sperm Protein
CDPK : Calcium-Dependent Protein Kinase	mTORC : mammalian target of rapamycin complex 1
CHK1 : CHeck-point Kinase	NAPS : Nucleosome assembly protein
CIP2A : Cancerous Inhibitor of PP2A	NEK : NIMA like Kinase
CK : Casein Kinase	NIF : NLI Interacting Factor
CK2 : Casein Kinase 2	NIMA : Never-In-Mitosis/ <i>Aspergillus</i>
CLK : CDK Like Kinase	Pb : <i>Plasmodium berghei</i>
CRK1 : CDC2-Related protein Kinase 1	PES : PEScadillo
CTA : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine	PEXEL : Plasmodium Export Element Revisited
DDT : Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane	Pf : <i>Plasmodium falciparum</i>
DHFR : DiHydroFolate Reductase	PfEST : Exported Serine/Threonine protein kinase
DHPS : DihydroPteroate Synthase	PfKIN : <i>Plasmodium falciparum</i> KINase
EF-1B : Elongation Factor 1 beta	PHAP-1 : putative class II human histocompatibility leukocyte-associated protein I
EGF : Epidermal Growth Factor	PHAP-2 : putative class II human histocompatibility leukocyte-associated protein II
eIK : eukaryotic initiation factor 2 α kinase	pi : Post-invasion
ENSA : Alpha EndoSulfine	PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase
ePK : eucaryote Protein Kinase	PK7 : Protein Kinase 7
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases	PKA : Protein Kinase A
FCP/SCP : TFIIIF-associating Component of RNA polymerase II CTD Phosphatase/Small CTD Phosphatase	PKB : Protein Kinase B
FIKK Kinase : Kinase spécifique des apicomplexes contenant un motif Phe-Iso- Lys	PKC : Protein Kinase C
FKBP35 : FK506 Binding Protein 35	PKG : Protein Kinase G
GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase 3	PlasmoDB : <i>Plasmodium</i> DataBase
HEAT : Huntingtin, Elongation factor 3, PR65/A and TOR1)	PLK : Polo-Like Kinase
	PME-1 : Phosphatase Methyl Esterase 1
	PMP : Protein MetalloPhosphatases
	PP1 : Protein Phosphatase type 1
	PP2A : Protein Phosphatase type 2A

PP2Ac : Sous-unité catalytique de PP2A
PP2A_b : Dimère PP2Ac/A
PP2B : Protein Phosphatase type 2B
PP4 : Protein Phosphatase 4
PP5 : Protein Phosphatase 5
PP6 : Protein Phosphatase 6
PP7 : Protein Phosphatase 7
PPH : Protein PHosphatase
PPase : Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase
PPJ : Protein Phosphatase J
PPM : Protein Phosphatase Mn²⁺- or Mg²⁺-dependent
PPP : PhosphoProtein Phosphatase
PPα : Protein Phosphatase Alpha
PPβ : Protein Phosphatase Beta
pRB : Protein RetinoBlastome
PRL : Protein of Regenerating Liver
PSP : Protein Serine/threonine Phosphatase
PTP : Protein Tyrosine Phosphatase
PTP1B : Protein Tyrosine Phosphatase 1 B
PTPA : Phospho Tyrosyl Phosphatase Activator
RIO : Right Open reading frame-2 protein kinase
RRD : Resistant to Rapamycin Deletion
SAM : Sterile α Domain
SET : patient SE Translocation
SG2NA : S/G2 Nuclear Autoantigen
SGO : ShuGOshin
SHLP : SHewanella Like protein Phosphatase
SRPK : Serine arginine (R) Protein Kinase
STE Kinase : Sterile Kinase
TAP42 : Two A phosphatase Associated Protein 42
TIPRL : TIP41/Target of rapamycin (TOR) signaling Pathway Regulator-Like
TKL : Tyrosine Kinase Like
TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
YVH1 : Yeast gene VH1
ZDS : Zillion Different Screen

Introduction

A. LE PALUDISME

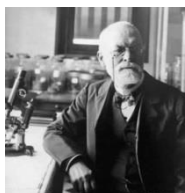
I. La maladie et ses conséquences socio-économiques

1. Un peu d'histoire ...

Le paludisme est une maladie parasitaire très ancienne présente dans la vallée du Nil depuis au moins 3000 ans avant notre ère (Miller, 1994). À l'époque, les papyrus décrivent une mystérieuse maladie épidémique envoyée chaque année à la saison des crues par la déesse Seckhmet (Ziskind, 2009). Le paludisme est un fléau pour l'homme depuis des millénaires et on peut citer parmi les victimes les plus célèbres Alexandre le Grand, Lord Byron et Dante Alighieri.

Les premières descriptions détaillées de la maladie furent faites par Hippocrate de Cos (400 ans avant Jésus Christ), qui décrit entre autres les fièvres intermittentes, la splénomégalie et la cachexie (affaiblissement profond de l'organisme) et qui les associa à la présence des marais.

L'origine parasitaire de la maladie fut, elle, décrite pour la première fois en 1880 par Alphonse Laveran dans les hématies de patients atteints de « fièvre des marais » ou « malaria ». Il a été le premier à faire la corrélation entre une structure étrangère présente dans les globules rouges et les symptômes de la maladie. Au cours de ses études, il essayait de comprendre l'origine de la mélanémie, c'est-à-dire la coloration brune de certains organes tels que le foie, la rate ou encore le cerveau, caractéristiquement observée dans les cas de paludisme. Il observe au niveau de ces organes la présence dans le sang de pigment libre ou d'éléments pigmentés présents dans des corps sphériques situés dans ou contre des hématies (Laveran, 1881). Ces corps sphériques sont mobiles et parfois flagellés, ce qui lui confirme l'origine parasitaire de la maladie. Il décrit un certain nombre de formes du parasite hématozoaire qu'il nomme *Oscillaria malariae*, notamment les formes jeunes, les formes âgées ou rosaces mais aussi les gamétocytes. Il montre également que l'administration de quinine détruit ce parasite (Laveran, 1882). Pour tous ses travaux sur le paludisme, il obtient en 1907 le prix Nobel de physiologie ou médecine.



A. Laveran
(1845-1922)



R. Ross
(1857-1932)

Ses observations furent confirmées en 1883 par Ettore Marchiafava (1847-1935) et Augusto Celli (1857-1914) (Ascenzi, 1999), qui nommèrent le parasite *Plasmodium* car le genre *Oscillaria* proposé par Laveran était déjà utilisé pour désigner une algue filamenteuse bleu-vert (Marchiafava, 1885).

Le vecteur du parasite est quant à lui identifié en 1897 par Ronald Ross. En effet, ses travaux sur le paludisme des oiseaux l'ont conduit à identifier des formes du parasite (oocystes) dans l'estomac de moustiques

mais également dans leurs glandes salivaires (sporozoïtes) (Ross, 1897). Il obtient en 1902 le prix Nobel de physiologie ou médecine pour ses travaux. Et c'est en 1898, que Gianni Battista Grassi (1854-1925) décrit avec Giuseppe Bastianelli (1862-1959) et Amico Bignami (1862-1929) le cycle de vie de *Plasmodium falciparum* chez l'anophèle et qu'ils montrent que celui-ci est le seul vecteur de *Plasmodium falciparum*. Marchiafava et Bignami ont contribué à l'identification de deux espèces de *Plasmodium* : *P. falciparum* et *P. vivax* (Ascenzi, 1999).

Camillo Golgi (1843-1926) a mis en relation les signes cliniques de la pathologie (fièvres) avec la phase de schizogonie de *Plasmodium*. Il a également montré que l'apparition de fièvre tierce et de fièvre quarte était causée par la présence respectivement de *P. vivax* et de *P. malariae* dans le sang des patients (Ascenzi, 1999).

2. *Plasmodium* : parasite responsable du paludisme

Plasmodium est donc le parasite responsable du paludisme. Il s'agit d'un protozoaire du genre *Plasmodium* appartenant au phylum des *Apicomplexa*, groupe des *Alveolata*, super groupe des *Chromoalveolata* (Adl, 2005 ; Adl, 2007 ; Dacks, 2008). Le genre *Plasmodium* comprend près de deux cents espèces regroupées en deux taxons principaux, le premier spécifique des mammifères et le second spécifique des oiseaux et des lézards (Martinsen, 2008). Toutes les espèces de *Plasmodiums* à l'exception de *P. mexicanum* sont transmises par la piqûre d'un moustique femelle hématophage de la famille des *Culicidae*. *P. mexicanum* (espèce infectant les lézards) a lui pour vecteur un insecte de la famille des *Psychodidae*. Toutes les espèces de *Plasmodium* spécifiques des mammifères sont transmises par un moustique du genre *Anopheles* de la famille des *Culicidae* indiquant que l'émergence des *Plasmodiums* chez les mammifères est associée à l'évolution et à l'acquisition de l'anophèle comme vecteur (Martinsen 2008).

Parmi les nombreuses espèces de *Plasmodiums*, les plus étudiées et les plus connues figurent les *Plasmodiums* murins tels *P. berghei*, *P. yoelii* ou encore *P. chabaudi* qui servent de modèle pour l'étude du paludisme et les espèces infectant l'homme. Cinq espèces de *Plasmodium* sont responsables du paludisme chez l'homme : *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* et *P. knowlesi*. Bien que *P. falciparum* soit considérée comme l'espèce la plus répandue, la plus pathogène et la plus mortelle, *P. vivax* est également très représentée et serait responsable d'un certain nombre de formes sévères de paludisme et de décès (Gething, 2012) (Cf. A I 4). Récemment, des cas de paludisme à *P. knowlesi*, espèce infectant les singes, ont été décrits chez l'homme (Singh, 2004) même si l'incidence reste faible et localisée à l'Asie du Sud-Est et à quelques voyageurs (Kantele, 2011).

3. La pathologie

Les manifestations cliniques de la maladie apparaissent au cours du développement érythrocytaire du parasite. La gravité de la pathologie dépend de l'espèce de *Plasmodium* infectante, de la quantité de parasites dans le sang et du statut

immunitaire de l'hôte. En effet, dans les zones endémiques, les infestations répétées induisent la mise en place d'une immunité permettant de réduire le nombre d'accès palustres et la sévérité de ceux-ci. *A contrario*, les voyageurs, les expatriés et les enfants en bas âge ne présentent pas de protection immunitaire et sont touchés par des formes plus sévères, souvent mortelles pour les enfants (Baird, 1998 ; Murphy, 2001).

a. L'accès palustre simple

La phase d'incubation, lors d'une primo-invasion, est silencieuse et peut durer jusqu'à plusieurs mois. Les premiers symptômes peu évocateurs sont une fièvre modérée accompagnée parfois de maux de tête, d'une myalgie, de troubles gastro-intestinaux et d'une cachexie. La pathologie évolue ensuite vers une phase d'état où l'on observe l'apparition des symptômes caractéristiques de l'infestation, à savoir, la succession d'accès palustres. Ceux-ci se caractérisent par une première phase d'hypothermie durant laquelle le patient souffre de frissons intenses, suivie d'une phase d'augmentation de la température corporelle qui peut alors atteindre 41°C et enfin une phase de suees accompagnée d'une sensation de bien-être annonçant la fin de l'accès palustre. En plus de ces symptômes très spécifiques, on observe parfois une anémie et une splénomégalie. Le rythme de ces accès fébriles dépend de l'espèce infestante. Ils s'enchainent tous les deux jours lors d'une infestation à *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce) et tous les trois jours lors d'une infection à *P. malariae* (fièvre quarte). Ces temps de latence correspondent à la durée de la phase érythrocytaire des espèces parasitaires incriminées et l'apparition des symptômes coïncide avec la libération des parasites dans le sang.

La maladie peut, en absence de traitement, évoluer vers une forme grave dans les cas de paludisme à *P. falciparum* et plus rarement à *P. vivax*. Les patients présentent alors une anémie sévère ainsi qu'une forte hypoglycémie et une acidose, conséquences d'une détresse respiratoire et d'une défaillance rénale.

b. Le neuropaludisme

La pathologie peut évoluer vers le neuropaludisme ou accès pernicleux. Les symptômes qui en découlent sont d'importantes convulsions suivies d'une perte de conscience d'au moins 30 minutes aboutissant parfois au coma. Ces symptômes très spécifiques s'accompagnent d'une hypoglycémie sévère, d'une acidose et de vomissements (Mishra, 2007). Le neuropaludisme est surtout observé chez les jeunes enfants et les symptômes diffèrent selon l'âge. Il est mortel dans 15 à 20% des cas et cause chez les survivants des séquelles neurologiques dans plus de 20% des cas (Boivin, 2007 ; John, 2008).

Les causes de cette forme de complication sont encore très discutées. Deux hypothèses sont principalement avancées : l'hypothèse de la séquestration et l'hypothèse de l'inflammation. L'hypothèse de la séquestration, formulée pour la première fois en 1894 par Marchiafava and Bignami (White, 2013), propose que l'adhésion des hématies parasitées aux capillaires cérébraux et aux érythrocytes sains conduirait à l'obstruction des vaisseaux, à une anoxie ainsi qu'à une accumulation de métabolites (notamment

l'acide lactique) dans le cerveau entraînant le coma (Dondorp, 2000 ; Idro, 2005). La seconde hypothèse postule que lors de la lyse des hématies parasitées, des toxines dérivées du parasite et des molécules intracellulaires de la cellule hôte sont relarguées dans la circulation induisant une réponse inflammatoire systémique conduisant à une coagulopathie, une dysfonction des cellules endothéliales cérébrales, une accumulation des leucocytes dans la micro-circulation du cerveau, une perte de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, des vasoconstrictions cérébrales et des œdèmes. Plus récemment, une nouvelle hypothèse a été avancée par Martins *et al.* en 2013. Selon eux, les dommages au foie causeraient tous les symptômes du neuropaludisme. En effet, la perte de fonction de détoxification du foie entraînerait l'accumulation de métabolites toxiques issus de la dégradation de l'ammoniaque dans le cerveau ayant pour conséquence une augmentation de la glutamine dans les astrocytes (Martins, 2013). Celle-ci entraînerait un œdème cérébral, une augmentation de la pression intracrânienne et une hernie du parenchyme cérébral. De plus, le dysfonctionnement du foie lui-même peut entraîner une augmentation de la prévalence des hémorragies, des dysfonctions cérébrales et un coma (Martins, 2013). Le foie étant le siège de la synthèse d'un certain nombre de facteurs de coagulation et de la thrombopoïétine régulant la production des plaquettes, la diminution des fonctions hépatiques peut expliquer la coagulopathie et la thrombocytopenie qui pourraient être la cause des hémorragies cérébrales. En l'absence de faits clairement établis, il est envisageable que le neuropaludisme soit causé par un mécanisme complexe impliquant des événements propres à chacune de ces hypothèses.

c. Le paludisme de la femme primipare

Le paludisme à *P. falciparum* chez la femme primipare est dangereux à la fois pour la femme gestante mais également pour le fœtus. En effet, on observe, lors de l'infestation, la séquestration des hématies parasitées au niveau de l'endothélium placentaire altérant les échanges mère/fœtus. Cela peut conduire à la mort de la mère gestante ou du fœtus, une prématurité à l'accouchement et/ou un petit poids de naissance dont les conséquences sont une augmentation du risque de mortalité périnatale et l'apparition de retard de développements physique et intellectuel (Rogerson, 2007).

L'accumulation et la séquestration des hématies parasitées sont causées par l'interaction de protéines parasitaires, exprimées à la surface des érythrocytes, avec un certain nombre de protéines de l'hôte exprimées à la surface de l'endothélium, du placenta et des hématies saines (Baruch, 1999).

d. Le paludisme chronique

Cette forme de paludisme concerne plus particulièrement les enfants autochtones et les personnes immunodéprimées.

Elle est caractérisée par des fièvres légères (37,5-38°C), une anémie, une pâleur, une dyspnée, une asthénie et une splénomégalie. L'anémie est le symptôme le plus grave pouvant conduire à une surmortalité, une aggravation de la dénutrition et enfin une cachexie (Onwuamaegbu, 2004). Chez les enfants atteints, on observe souvent un retard staturo-pondéral marqué. Il est à noter que la sous-alimentation est un facteur aggravant.

En effet, les décès liés au paludisme sont multipliés par deux chez les enfants souffrant de sous-alimentation partielle et par neuf chez les enfants sévèrement sous-alimentés (Caulfield, 2004).

4. Impacts humains et socio-économiques du paludisme dans le monde

Le paludisme est la première endémie parasitaire et est majoritairement présent dans les régions tropicales et subtropicales (Figure 1).

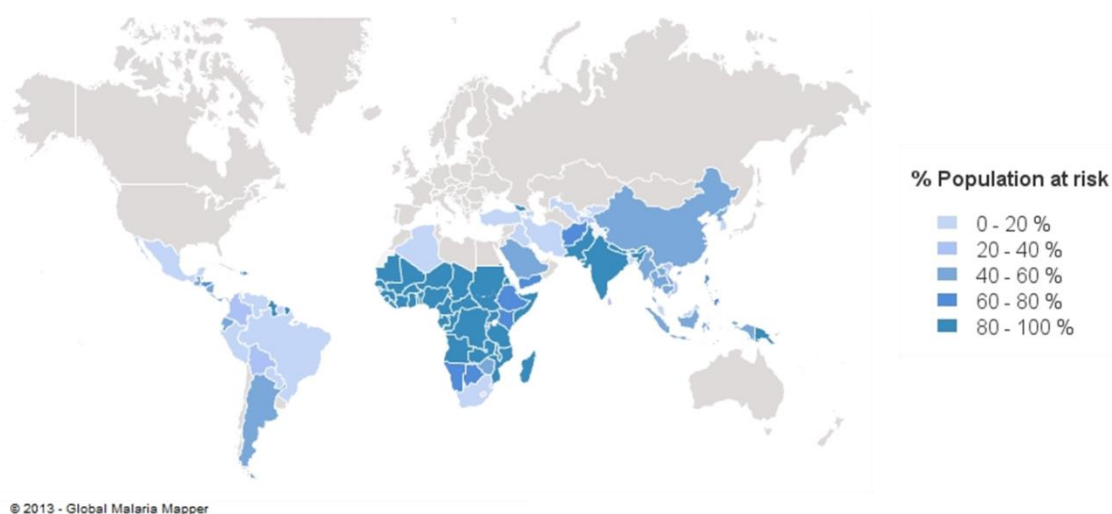


Figure 1 : Distribution des pays ou régions présentant un risque de transmission du paludisme (Source : Global Malaria Mapper 2013)

Selon les estimations de l’OMS dans son rapport sur le paludisme dans le monde en 2013, le paludisme est endémique dans 104 pays et 3,4 milliards de personnes, soit la moitié de la population mondiale, sont exposées au paludisme. À l’échelle mondiale, 207 millions d’épisodes palustres ont été recensés dont 90% sont imputables à *Plasmodium falciparum*. L’OMS estime à 627 000 le nombre de décès attribuables au paludisme en 2012 dont 77% ont concerné des enfants de moins de 5 ans (World Malaria Report 2013). L’Afrique est le continent le plus touché. Il représente à lui seul plus de 80% des épisodes palustres avérés et près de 90% des décès imputables au paludisme dans le monde (Tableau 1).

En plus d’avoir un coût humain important, le paludisme est également un frein au développement socio-économique des pays où il est endémique. En effet, il peut faire diminuer le Produit Intérieur Brut (PIB) de 1,3%. Les coûts sanitaires (individuels et publics) sont très importants. Dans les pays les plus durement touchés, le paludisme représente jusqu’à 40% des dépenses de santé publique, 30 à 50% des hospitalisations et jusqu’à 60% des consultations externes.

La lutte contre le paludisme reste donc une priorité pour l’OMS.

Tableau 1 : Distribution des cas et des décès liés au paludisme dans le monde (Source : World Malaria Report 2013). Les pourcentages de cas de paludisme à *P. falciparum* sont tirés du World Malaria Report 2012.

Région	Nombre de cas estimés		Nombre de décès estimés		
	Estimation	% de cas à <i>Plasmodium falciparum</i>	Nombre de décès	% du nombre total de décès	% de décès d'enfants moins de 5 ans par zone
Afrique	165 000 000	98%	562 000	89,6%	82%
Amériques	800 000	35%	800	0,2%	27%
Méditerranée orientale	13 000 000	83%	18 000	2,9%	37%
Europe	2 000		0		
Asie du Sud-Est	27 000 000	53%	42 000	6,7%	26%
Pacifique occidentale	1 000 000	79%	3 500	0,6%	46%
Monde	207 000 000	90%	627 000		77%

5. Lutte contre le paludisme

La transmission du paludisme dépend de différents facteurs et acteurs : le parasite lui-même, le vecteur anophèle, l'hôte humain et enfin l'environnement. La lutte contre le paludisme peut donc être située à différents niveaux.

a. Mieux vaut prévenir que guérir

À partir du constat simple que les moustiques sont responsables de la transmission de la maladie, la prévention du paludisme par la lutte contre le développement des anophèles est apparue comme primordiale. La présence du moustique dépend du climat, de la saison et enfin des moments de la journée car ces derniers piquent préférentiellement au crépuscule ou la nuit. Les températures élevées, une humidité ambiante importante et la présence d'eau douce sont indispensables à la prolifération du moustique. Ainsi, on observe généralement une recrudescence des cas de paludisme après la saison des pluies (Clements, 2009 ; Cohen, 2013).

Deux sortes d'actions sont envisageables afin de lutter contre l'anophèle. La première consiste en la diminution des populations vectorielles, la seconde en l'évitement des piqûres de moustiques.

i. Diminution des populations vectorielles

Historiquement, la première stratégie visant à diminuer la population vectorielle a consisté en l'assèchement des points d'eau stagnante, lieu de pontes des moustiques. C'est de cette façon que le paludisme a été éradiqué de certaines régions d'Europe tempérée et d'Amérique du Nord. Cependant, cette méthode n'est pas applicable aux régions tropicales et subtropicales où les précipitations sont abondantes et où la végétation luxuriante offre de nombreuses niches écologiques favorables à la ponte des œufs et au développement des larves.

Face à ces obstacles, des méthodes chimiques et biologiques ont été mises en place pour limiter la prolifération des anophèles. Tout d'abord, des insecticides capables de tuer à la fois les larves et les moustiques adultes ont été utilisés, notamment les organochlorés comme le DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane). Ces insecticides à action rémanente sont utilisés en pulvérisation intra-domiciliaire. L'OMS estime que 4% de la population mondiale est protégée par ces pulvérisations. Malheureusement, des moustiques résistants à ces insecticides sont apparus et chaque lancement sur le marché de nouveaux insecticides (successivement organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyréthrinoïdes) a été suivi de près par l'apparition de résistances (Cui, 2006 ; Dabire, 2008). Des résistances à au moins l'un des insecticides ont été décelées dans 64 pays à travers le monde selon l'OMS. L'apparition de ces résistances a nécessité une adaptation des pulvérisations intra-domiciliaires. En effet, pour pallier aux résistances des moustiques aux pyréthrinoïdes, l'utilisation d'insecticides non pyréthrinoïdes augmente. Cependant, ces insecticides ont un coût plus élevé ce qui entraîne une diminution des pulvérisations intra-domiciliaires.

Des approches biologiques utilisant des toxines de *Bacillus thuringiensis* spécifiques et actives contre les larves se sont également révélées efficaces (Ibrahim, 2013a). Les larves se nourrissant de bactéries, la stratégie consiste à introduire dans les nappes d'eau des spores de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*) qui contiennent un cristal protéique composé de plusieurs protéines toxiques (des pro-toxines). Ces pro-toxines sont solubilisées par le pH alcalin de l'intestin de la larve qu'elles atteignent une fois ingérées et sont activées en toxines. Ces toxines interagissent avec des récepteurs de la membrane plasmique (les cadhérines) conduisant à la perte de l'intégrité de celle-ci puis à la cytolysse et donc à la mort de la larve (Mittal, 2003 ; Ibrahim, 2013b).

ii. Évitement des piqûres de moustiques

La protection contre les piqûres de moustiques représente la seconde stratégie intéressante. Elle consiste en l'utilisation de répulsifs (sous forme de lotion, d'aérosol ou de crème) et le port de vêtements longs, imprégnés d'insecticides pour empêcher les piqûres de moustiques. La mise en place de grillages anti-moustiques aux portes et fenêtres ainsi que l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides à base de pyréthrinoïdes sont également des méthodes très efficaces. L'OMS estime que 42% de la population à risque est équipée de ces moustiquaires imprégnées d'insecticide. L'utilisation conjointe de ces moustiquaires avec la pulvérisation intra-domiciliaire reste la meilleure protection contre les moustiques (Beier, 2008). En effet, cette technique efficace et peu chère a permis de réduire la mortalité globale de 33% et la survenue de paludisme grave chez les enfants de moins de cinq ans de 44% (Nevill, 1996).

b. Les traitements

i. Les molécules

Bien que la mortalité causée par le paludisme soit élevée, cette maladie peut être curable si elle est prise en charge rapidement et efficacement.

L'un des premiers traitements efficaces administré fut la quinine extraite de l'écorce de l'arbre du genre *Cinchona* présent dans la Cordillère des Andes. Seuls le quinquina rouge et le quinquina jaune ont des propriétés antipaludiques. Ce traitement était administré pour soigner les fièvres tierces avant même l'identification du *Plasmodium*, cause de ces fièvres. La quinine, malgré les effets secondaires et les nouvelles molécules mises sur le marché, est encore utilisée aujourd'hui en cas de grossesse ou pour traiter les formes sévères de paludisme (Parija, 2011).

Les antipaludiques se classent en plusieurs groupes de composés, les 8-amino-quinoléines, les amino-4-quinoléines, les arylamino alcools, les antifolates et les dérivés de l'artémisinine (Tableau 2). Les amino-4-quinoléines et les arylamino-alcools sont des antipaludéens à effet intra-érythrocytaire, c'est-à-dire qu'ils traversent la membrane des hématies puis celle des parasites et enfin pénètrent dans leur vacuole digestive où ils s'accumulent. Les antifolates sont des molécules à effet intra-érythrocytaire qui ciblent également les sporozoïtes. La primaquine, elle, est efficace contre les sporozoïtes, les formes intra-hépatiques et les gamétocytes. L'artémisinine est une substance active médicamenteuse isolée de la plante Armoise annuelle *Artemisia annua*. La structure de l'artémisinine est complètement asymétrique rendant sa synthèse artificielle difficile. De ce fait, un certain nombre de dérivés semi-synthétiques comme l'artésunate ou l'artéméter ont été élaborés. Ils présentent un coût de synthèse plus faible et donc plus intéressant.

Tableau 2 : Familles de molécules des principaux antipaludiques

Famille de molécules	Nom des molécules	Formes parasitaires ciblées
8-Amino-quinoléine	Primaquine	Formes hépatocytaires, les gamétocytes, les hypnozoïtes, les sporozoïtes
Amino-4-quinoléine	Chloroquine, Amodiaquine	Les formes intra-érythrocytaires
Arylamino Alcool	Quinine, Méfloquine, Halofantrine, Luméfantrine, Primaquine	Les formes intra-érythrocytaires
Antifolate	Pyriméthamine, Triméthoprime, Proguanil	Les sporozoïtes et les formes intra-érythrocytaires
Dérivé de l'artémisinine	Artémisinine, Dihydroartémisinine, Artésunate, Artéméter	Les formes intra-érythrocytaires et les gamétocytes

Les mécanismes d'action de ces substances diffèrent. Le mode d'action des quinolines n'est pas encore complètement établi, mais l'une des hypothèses avancées est qu'elles inhibent la polymérisation du produit de dégradation de l'hème, l'hématine en hémozoïne dans la vacuole digestive du parasite. La formation de l'hémozoïne est indispensable pour protéger le parasite de la toxicité de l'hématine (Slater, 1993). Les antifolates, comme leur nom l'indique, inhibent la voie des folates, ainsi la

pyriméthamine inhibe la dihydrofolate reductase thymidylate synthase (DHFR) tandis que les sulphonamides inhibent la dihydropteroate synthase (DHPS) (Imwong, 2003). Le mécanisme d'action de l'artémisinine et de ses dérivés est encore sujet à débat. Deux hypothèses sont proposées, la première étant que ces composés entraînent la production de radicaux libres conduisant à l'alkylation des protéines. La seconde suggère que l'artémisinine inhibe l'ATPase dépendante du calcium du réticulum sarco-endoplasmique (Krishna, 2006).

ii. La résistance aux molécules

Le problème majeur actuellement dans le traitement du paludisme est la résistance des parasites aux molécules présentes sur le marché. En effet, la commercialisation de nouvelles molécules est suivie de près par l'apparition de résistances (Tableau 3). L'apparition de ces résistances est multifactorielle et fait intervenir principalement la pression médicamenteuse, la non observance du traitement, les migrations de l'hôte et la capacité d'adaptation du parasite à son environnement.

Tableau 3 : Date de mise sur le marché et d'apparition des résistances des différents composés antipaludiques

Molécule	Date de mise sur le marché	Date d'apparition de la résistance
Quinine	1630	1910
Chloroquine	1945	1957
Amodiaquine	1948	1980
Proguanil	1948	1949
Pyriméthamine	1952	1953
Mefloquine	1977	1982
Artémisinine	1979	2004
Atovaquone	1996	1996

La résistance des parasites est responsable de la recrudescence de cas de paludisme dans des pays où l'incidence diminuait. Elle touche principalement *P. falciparum* même si des cas de *P. vivax* résistants à la chloroquine ont été décrits (Baird, 2009). Les mécanismes de résistance chez le parasite sont connus. La mutation du gène *pfcr1* à la position 76 entraîne l'efflux de la chloroquine hors de la vacuole digestive (Foley, 1997). De même, le polymorphisme du gène *pfmdr1* est impliqué dans la résistance du parasite à la chloroquine *in vitro* (Dorsey, 2001), à la méfloquine, à l'artésunate (Price, 1999), à la quinine et à la dihydroartémisinine (Duraisingh, 2000). La résistance aux antifolates est due à une mutation dans le gène *dhfr* diminuant l'affinité des antifolates à la DHFR (Imwong, 2003). Il existe également des souches résistantes à plusieurs drogues. Les régions où les parasites sont résistants aux quinolines, aux antifolates et aux dérivés de l'artémisinine sont classifiées comme des zones de résistances multi-drogues établies. Ces régions semblent localisées aux frontières Thaïlandaises avec

le Cambodge et la Birmanie. Quelques régions en Amazonie rapportent également des cas sporadiques de résistance à la méfloquine et présentant une sensibilité à la quinine diminuée. Les régions où l'on observe une résistance à la chloroquine, aux antifolates et où il y a potentiellement une résistance à un autre groupe d'antipaludique sont considérées comme des zones d'émergence de multi-résistances (Wongsrichanalai, 2002).

Pour éviter la propagation de ces foyers de multi-résistances, l'OMS préconise depuis 2001 une Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine (CTA) dans les cas de paludisme sans complication. Les artémisinines entraînent une clairance parasitaire rapide et une disparition rapide des symptômes. Cette combinaison permet de diminuer le nombre d'échecs observés lors de la monothérapie d'autant plus que la demi-vie courte des dérivés de l'artémisinine est palliée par l'association à des composés ayant une demi-vie plus longue (Woodrow, 2006 ; Eastman, 2009). Cinq CTA sont communément administrées : artéméther + luméfantine, artésunate + amodiaquine, artésunate + méfloquine, artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine et enfin dihydroartémisinine + pipéraquline. Le choix de la CTA dépend des résistances aux drogues partenaires observées sur le terrain. Il est conseillé également par l'OMS d'administrer une dose unique de primaquine en plus d'une CTA pour empêcher la transmission, car la primaquine est plus efficace que les artémisinines pour détruire les gamétocytes. Malheureusement, les CTA restent inefficaces dans les zones où des résistances multi-drogues sont établies (Rogers, 2009).

c. La vaccination

A l'heure actuelle, aucun vaccin n'existe pour lutter contre le paludisme malgré de nombreuses recherches. L'absence de réussite en dépit des études peut s'expliquer par le cycle de vie complexe du parasite (Cf. A.II.2), qui présente un polymorphisme antigénique impressionnant. Ce polymorphisme a pour conséquence l'impossibilité pour l'homme de créer une immunité efficace, complète et stable. En effet, l'immunité mise en place ne protège jamais complètement et nécessite des expositions fréquentes au pathogène. Cela se vérifie chez les expatriés qui ne sont plus protégés et sont susceptibles aux accès palustres lors de leur retour dans le pays d'origine. Plusieurs stratégies sont en cours de développement et ciblent trois mécanismes essentiels : la pénétration et le développement des sporozoïtes dans les hépatocytes, la pénétration des mérozoïtes et leur développement dans les érythrocytes et enfin la transmission en induisant notamment chez le moustique la production d'anticorps empêchant la maturation des stades sexuels.

Le vaccin le plus prometteur et le plus abouti est le RTS,S développé par GlaxoSmithKline (GSK). Le RTS,S cible le stade sporozoïte de *P. falciparum*. Il s'agit d'une protéine de fusion comprenant 207 à 395 acides aminés de la protéine circumsporozoïte et un antigène de surface du virus de l'hépatite B (RTS), co-exprimée dans *Saccharomyces cerevisiae* avec un antigène de surface du virus de l'hépatite B (S). Le polypeptide résultant forme spontanément des particules semblables aux particules virales auxquelles est ajouté l'adjuvant AS01 de la société Agenus. Ce vaccin est actuellement en étude clinique de phase III. Les premiers résultats montrent que le vaccin réduit les épisodes cliniques et les formes sévères de paludisme d'environ 50% chez les enfants de 5 à 17 mois

même si la protection diminue au cours du temps (12 mois après la troisième injection) (Agnandji, 2011). Malheureusement, ce vaccin ne permet pas de protéger les bébés de 6 à 12 semaines (Rts, 2012). De plus, ce vaccin ne dispense pas de l'utilisation de moyens préventifs notamment l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (Richie, 2012). Depuis ces premiers résultats obtenus en phase III, de nouvelles analyses des données obtenues au cours de la phase II montrent que l'efficacité du vaccin diminue lorsque la prévalence augmente. En effet, le vaccin est efficace dans 48% des cas dans des zones où la prévalence est faible (10%) et l'efficacité chute à 7% dans des zones à haut risque (prévalence de 70%). De plus, l'efficacité diminue au cours du temps et la vaccination n'a plus aucun effet après trois ans (Bejon, 2013). Ainsi, bien que les premières données de la phase II soient plutôt positives sur l'efficacité du vaccin chez les enfants mais également chez les adultes vivant dans les zones endémiques (Bojang, 2001 ; Alonso, 2004b ; Bojang, 2006 ; Aponte, 2007 ; Bejon, 2008 ; Sacarlal, 2008 ; Bojang, 2009 ; Polhemus, 2009 ; Sacarlal, 2009), les nouvelles données nuancent l'efficacité du vaccin. Cependant, le directeur général de GSK, Andrew Witty, estime que même si l'efficacité du vaccin diminue au cours du temps et que l'efficacité est un peu plus faible qu'espérée, le nombre de cas et surtout de cas graves évités en font un outil efficace (Riedmann, 2013). Les résultats définitifs 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).

d. Les recommandations de l'OMS aux voyageurs

Étant donné les risques encourus et la gravité potentielle des infections palustres chez les personnes non-immunes, l'OMS recommande une chimioprophylaxie aux voyageurs se rendant dans un pays à risque de transmission du paludisme. Celle-ci dépendra du groupe d'appartenance du pays de destination. En effet, les régions impaludées sont classées en trois groupes selon le niveau de résistance à la chloroquine.

Pour le groupe un, c'est-à-dire les régions où il n'y a pas de résistance à la chloroquine, la chloroquine commercialisée sous le nom de Nivaquine®100 est le seul médicament préconisé. Le traitement doit être initié le jour du départ et poursuivi quatre semaines après le retour.

Dans les pays du groupe deux, où l'on observe la chloroquino-résistance, deux options sont envisageables. Soit le voyageur prend un traitement associant la chloroquine au proguanil (Nivaquine®100 + Paludrine®100 ou Savarine®), à commencer dès l'arrivée dans le pays à risque et à continuer quatre semaines après le retour, soit un traitement associant l'Atovaquone et le Proguanil (Malarone®) à débiter le jour de l'arrivée dans le pays concerné et à poursuivre une semaine après le retour. Il faut préciser que les enfants ne peuvent être traités par la Savarine®, mais qu'il n'existe aucune contre-indication pour les femmes enceintes. Par contre la Malarone® est, elle, déconseillée aux femmes enceintes car les données sur la relation entre le suivi de grossesse et l'Atovaquone sont insuffisantes. De plus l'administration de Malarone® doit être limitée à trois mois.

Dans les zones de prévalence élevée de chloroquino-résistance ou de multi-résistances appartenant au troisième groupe, trois possibilités sont proposées. D'abord la méfloquine sous forme de Lariam®250. Il est conseillé de commencer le traitement dix jours avant le départ afin de vérifier l'absence d'effets secondaires puis poursuivre le traitement trois semaines après avoir quitté la zone d'endémie. Ensuite la Malarone® peut également être administrée et enfin le monohydrate de Doxycycline (Doxypalu® ou Granudoxy®) ou l'hyclate de Doxycycline (Doxy®100 Gé ou Doxy®50 Gé). La doxycycline est contre-indiquée avant l'âge de huit ans et à partir du deuxième trimestre de grossesse et déconseillée lors du premier trimestre. Le traitement est à commencer le premier jour du voyage et est à poursuivre quatre semaines après le retour.

Il est évident que la prévention contre les piqûres de moustique est à mettre en place, c'est-à-dire porter des vêtements longs imprégnés d'insecticide, appliquer un produit répulsif sur les parties découvertes du corps, éviter de sortir entre 22h et 5h du matin, période d'activité des moustiques, et dormir sous une moustiquaire imprégnée d'insecticide.

II. Le parasite

1. Physiologie du parasite

L'apicomplexe *Plasmodium*, responsable du paludisme, est un parasite intracellulaire obligatoire. Les apicomplexes, dont fait également partie *Toxoplasma*, sont caractérisés par la présence d'un organite homologue au chloroplaste chez les plantes : l'apicoplaste. Cet apicoplaste résulte d'une symbiose ancestrale entre un organisme phagotrophique et une algue apparentée aux algues rouges. Il est indispensable au parasite pour sa multiplication asexuée (Fichera, 1997 ; He, 2001). Il possède un ADN circulaire encodant toute la machinerie nécessaire à sa réplication. Le rôle de ce plaste n'est pas très bien connu. Contrairement au chloroplaste, il ne permet pas la photosynthèse mais son ADN code pour un système de biosynthèse des acides gras (Waller, 1998). Il coopérerait également avec la mitochondrie dans la synthèse de l'hème (Ralph, 2004 ; Nagaraj, 2008 ; Nagaraj, 2009a ; Nagaraj, 2009b ; Nagaraj, 2010a ; Nagaraj, 2010b). De plus, l'apicoplaste possède une voie de synthèse de l'isopentenyl diphosphate impliquée dans la biosynthèse des isoprénoïdes qui permettent la production des stéroïdes et des stérols (Jomaa, 1999).

Les apicomplexes possèdent également un complexe apical composé d'organites sécréteurs dont les rophtries, les micronèmes et les granules denses. Ces organites sécrètent des protéines nécessaires à l'adhérence et à l'invasion des cellules de l'hôte comme nous le verrons par la suite.

Plasmodium contient également une mitochondrie unique, un réticulum endoplasmique granuleux et un appareil de Golgi.

2. Cycle de vie

Le cycle de vie de *Plasmodium* est complexe et fait intervenir deux hôtes. Un hôte intermédiaire, vertébré au sein duquel se déroule la phase asexuée et un hôte définitif, la femelle hémaphysogone d'un moustique du genre *Anopheles*, siège de la phase sexuée (Figure 2).

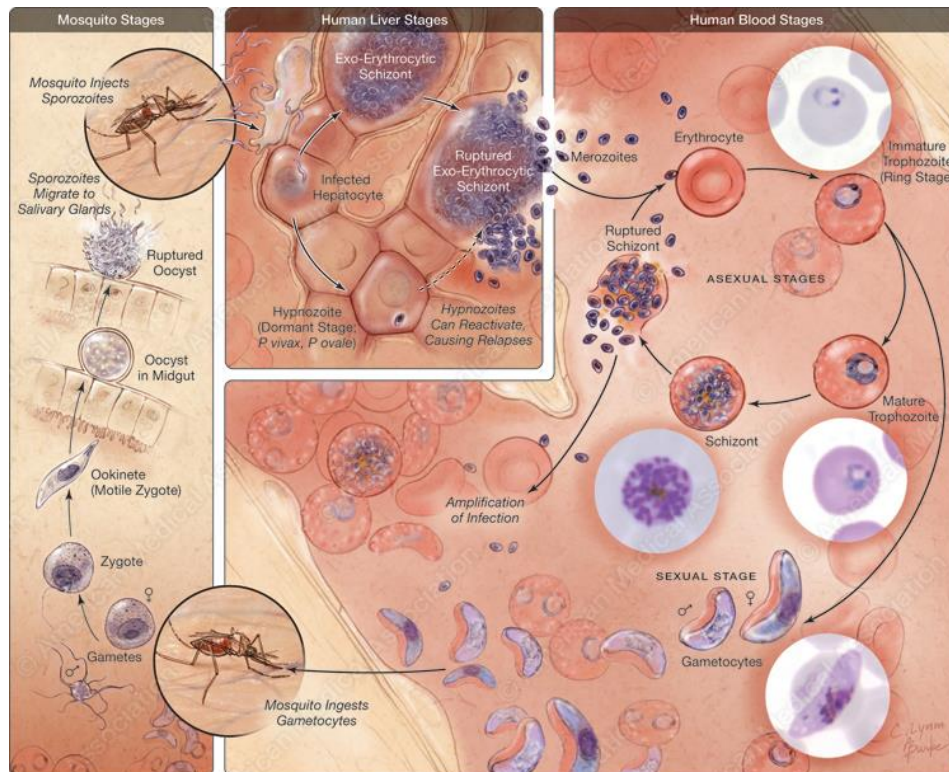


Figure 2 : Cycle de vie de *Plasmodium* (d'après (Griffith, 2007)). Le parasite effectue la phase sexuée de son cycle chez le moustique et migrera dans les glandes salivaires de l'insecte (cadre de gauche). Ces parasites seront inoculés à l'homme, lors de la piqûre, dans lequel ils effectueront leur phase asexuée (cadres de droite). Après l'injection, ils se dirigeront vers le foie, siège de la phase hépatique (cadre au centre en haut) où ils se multiplieront. Puis les parasites envahiront les érythrocytes dans lesquels se déroule le cycle érythrocytaire (cadre en bas à droite).

a. La phase asexuée chez le vertébré

La phase asexuée du cycle biologique se déroule en deux phases, une phase hépatique et un cycle érythrocytaire.

i. La phase hépatique

Lors d'un repas sanguin, la femelle anophèle introduit des sporozoïtes *via* sa salive dans la circulation sanguine. Ces parasites mobiles se déplacent dans la peau et 50% d'entre eux finiront par s'immobiliser et mourir. Les autres se dirigent vers la circulation sanguine (70% d'entre eux) et vers la circulation lymphatique (30% d'entre eux) durant l'heure suivant la piqûre du moustique (Amino, 2007 ; Yamauchi, 2007) (Figure 3). Vingt-cinq pourcents des sporozoïtes injectés dans la circulation lymphatique se retrouvent

piégés dans le ganglion lymphatique le plus proche et la majorité d'entre eux sont phagocytés par les cellules dendritiques, tandis que certains commencent à se développer en forme exo-érythrocytaire. Cependant, leur différenciation ne sera pas complète et ils finiront par être détruits par le système immunitaire de l'hôte (Amino, 2007). Les sporozoïtes empruntant la circulation sanguine se dirigent vers le foie.

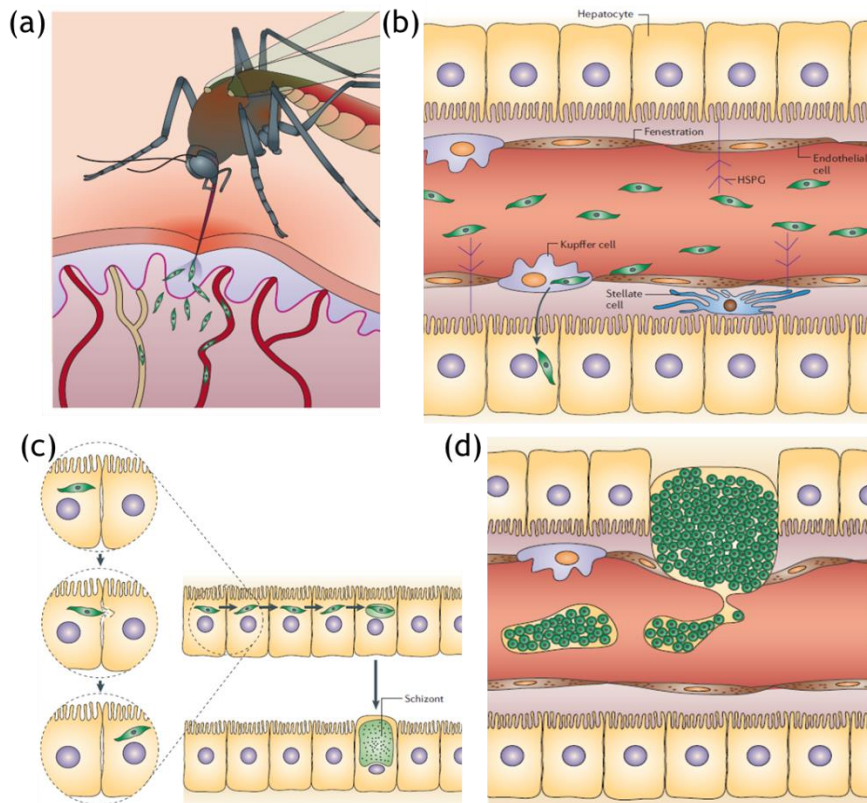


Figure 3 : Phase exo-érythrocytaire du cycle biologique de *Plasmodium*. a) Les sporozoïtes injectés par la piqûre du moustique empruntent la circulation lymphatique (jaune) ou la circulation sanguine (rouge). b) Dans les sinusoides hépatiques, le sporozoïte traverse l'endothélium par les cellules de Kupffer avant de pénétrer dans un hépatocyte. c) Le parasite traverse plusieurs hépatocytes avant de s'installer dans une vacuole parasitophore dans un hépatocyte. Là, il se développe en un schizonte déformant l'hépatocyte. Ce schizonte libère des milliers de mérozoïtes directement dans le sang ou des mérosomes. Ceux-ci vont, après migration, libérer des mérozoïtes infectieux dans le sang. Ces mérozoïtes vont alors débiter le cycle érythrocytaire (D'après (Prudencio, 2006)).

Au niveau des sinusoides hépatiques, les sporozoïtes franchissent l'endothélium par les cellules de Kupffer *via* une vacuole parasitophore les protégeant de la dégradation par les lysosomes (Pradel, 2001). Une fois dans l'espace de Disse, le sporozoïte traverse plusieurs hépatocytes sans leur causer de dommages avant d'envahir un hépatocyte dans lequel il se loge dans une vacuole parasitophore afin de mettre en place la phase exo-érythrocytaire de son cycle (Mota, 2001). Il perd alors ses organites sécréteurs afin de former un trophozoïte hépatique uninucléé. Le parasite commence ensuite une division cellulaire conduisant à la formation d'un schizonte hépatique composé de milliers de mérozoïtes, formes infectieuses des hématies. La rupture de la membrane de la vacuole parasitophore et de la membrane plasmique de l'hépatocyte permet alors la libération des

mérozoïtes directement dans le sang ou de mérosomes, qui après avoir circulés dans le sang libéreront les mérozoïtes dans les capillaires pulmonaires, où ils débiteront le cycle érythrocytaire (Baer, 2007) (Figure 3 et Figure 2). Dans les infections à *P. ovale* et *P. vivax*, certains des trophozoïtes hépatiques resteront sous une forme quiescente appelée hypnozoïte. Ces hypnozoïtes sont à l'origine des rechutes observées plusieurs semaines voire plusieurs années après la primo-infection.

ii. Le cycle érythrocytaire

Les mérozoïtes libérés dans le sang vont envahir les érythrocytes selon un schéma séquentiel caractéristique. Les micronèmes sécrètent à la surface du mérozoïte des adhésines permettant l'interaction avec la membrane de l'érythrocyte. Cette interaction induit une réorientation du mérozoïte dont le pôle apical va se fixer de façon irréversible à la membrane de l'hématie. Des jonctions serrées vont s'établir entre le parasite et l'érythrocyte. Les rophtries vont alors libérer leur contenu qui permet la formation de la membrane de la vacuole parasitophore et le déplacement du parasite dans cette vacuole. Les jonctions serrées vont se déplacer au fur et à mesure de l'entrée du parasite dans l'érythrocyte. Quand l'invasion sera complète, les membranes de l'érythrocyte vont fusionner formant la vacuole parasitophore grâce aux protéines sécrétées par les granules denses (Pour revue (Cowman, 2012)) (Figure 4). Dès qu'il est entré dans l'érythrocyte, le mérozoïte va commencer à se différencier en anneau.

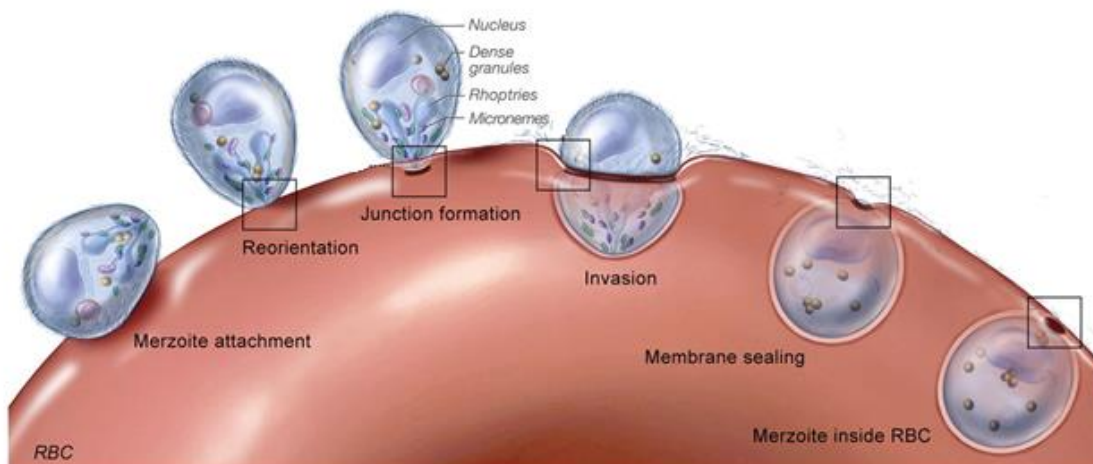


Figure 4 : Schématisation de l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte (D'après (Srinivasan, 2011)).

L'anneau (entre 1 heure et 18 heures post-invasion (pi)) est caractérisé par une zone centrale claire. Dès ce stade précoce, le parasite endocyte le contenu de l'hématie par le cytostome et le digère. Le catabolisme de l'hémoglobine résulte en la formation de dérivés de l'hème qui sont convertis en un cristal inerte brun appelé hémozoïne. L'hémozoïne s'accumule dans des vacuoles pigmentaires qui fusionneront en une seule et unique vacuole au cours du développement. De plus, un système tubulo-vésiculaire, permettant l'exportation de protéines parasites vers le cytoplasme de l'érythrocyte hôte, est mis en place (Figure 5). Le volume du parasite augmente et il se transforme en trophozoïte (de 19 heures à 30 heures pi). Ce stade se caractérise par une augmentation

de l'exportation des protéines parasites à la surface de l'hématie. Ces protéines vont s'agréger et former de petites protubérances à la surface de l'érythrocyte appelées « knobs ». On observe une augmentation de la synthèse protéique. Le stade schizonte, ultime stade de développement du parasite dans l'hématie, débute dès la première division cellulaire. Il s'agit d'une endomitose, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de disparition de l'enveloppe nucléaire. Le noyau se divise en moyenne quatre fois conduisant à la formation de seize noyaux fils. En parallèle, il y a multiplication des mitochondries et des apicoplastes, de même que le réticulum endoplasmique et les ribosomes prolifèrent et qu'une vacuole lipidique est créée pour servir de citerne pour la mise en place des membranes. Des centres de formation de mérozoïtes sont créés dans lesquels s'accumulent les organites et structures indispensables au mérozoïte notamment les rhoptries. Ces centres se placent à la périphérie du parasite et sont responsables de la forme de rosace caractéristique observable en microscopie. Les mitochondries, les apicoplastes ainsi que les noyaux migrent vers les mérozoïtes. Des cercles de constriction séparent ensuite chaque mérozoïte du corps résiduel du schizonte qui contient encore la vacuole pigmentaire. Finalement, les membranes de la vacuole parasitophore et de l'érythrocyte perdent leur intégrité et les mérozoïtes sont alors libérés dans la circulation où ils pourront envahir de nouveaux érythrocytes (Bannister, 2000) (Figure 5 et Figure 2).

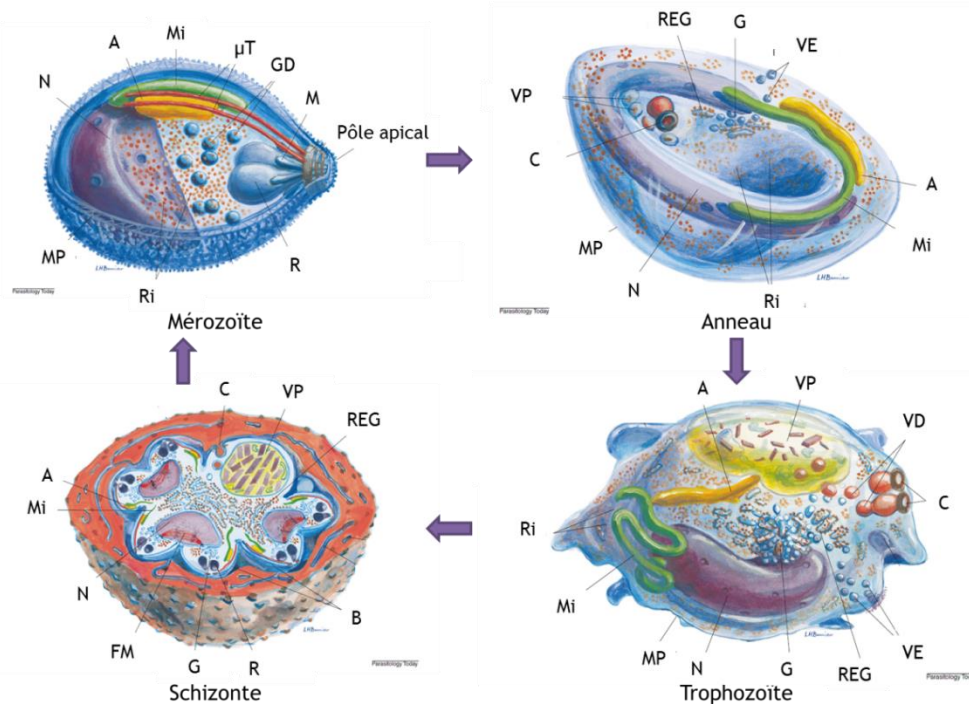


Figure 5 : Structure des formes érythrocytaires du parasite. Le mérozoïte qui envahit l'érythrocyte se développe rapidement en un anneau puis en trophozoïte. Le stade schizonte commence dès la première division cellulaire par endomitose. Il y a ensuite individualisation des mérozoïtes autour des noyaux fils et la synthèse des organites propres au mérozoïte (Rhoptries, micronèmes, granules denses). Pour plus de lisibilité les structures ont été annotées par des lettres dont voici la signification : N, Noyau; A, Apicoplaste; Mi, Mitochondrie; μ T, microtubules; GD, Granule Dense; M, Micronème; R, Rhoptrie; Ri, Ribosome; MP, Membrane Plasmique; REG, Réticulum Endoplasmique Granuleux; G, Appareil de Golgi, VE, Vésicule d'Endocytose; C, Cytostome; VP, Vacuole Pigmentaire; VD, Vacuole Digestive; pT, petit tubule; lT, long tubule; FM, Fuseau Mitotique (Bannister, 2000).

iii. La gamétocytogénèse

En parallèle du cycle érythrocytaire, certains mérozoïtes vont se différencier en gamétocytes mâles ou femelles. Le destin des mérozoïtes est prédéterminé. En effet, tous les mérozoïtes issus d'un même schizonte partagent le même destin vers la prolifération asexuée ou la différenciation sexuée (Bruce, 1990). De plus, si leur destin est de se différencier en gamétocytes, les mérozoïtes donneront tous le même sexe (Silvestrini, 2000). Les facteurs expliquant cette différenciation *in vivo* sont encore mal connus (Trager, 2005). Mais il est établi que l'anémie et une faible densité parasitaire entraînent la gamétogénèse (Cameron, 2013). *In vitro*, de nombreux facteurs induisent la gamétocytogénèse tels que la chloroquine, des lysats d'érythrocytes, des hormones, un taux important de réticulocytes ou encore certains inhibiteurs de synthèse d'acides nucléiques (Baker, 2010). Les gamétocytes sont séquestrés dans la rate et la moelle osseuse puis le dernier stade de leur développement, qui comporte cinq stades, est libéré dans la circulation sanguine et pourront lors d'un repas sanguin infecter un anophèle femelle et ainsi poursuivre la phase sexuée de leur cycle chez le moustique.

b. La phase sexuée chez le moustique

L'ingestion des gamétocytes par le moustique lors d'un repas sanguin active la formation de gamètes mâles et femelles dans la lumière de l'intestin moyen (sorte d'estomac). Un gamète mâle et un gamète femelle fusionnent et forment un zygote, seule forme diploïde du cycle de *Plasmodium*. Dès la formation du zygote, la méiose et la recombinaison génétique débutent et le zygote devient oocinète. L'oocinète mobile traverse la membrane pérित्रophique entourant le repas sanguin et pénètre dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen par le pôle apical pour en ressortir par le pôle basal. Cette transmigration permet l'activation de l'oocinète qui perd sa mobilité et se fixe au pôle basal. Là, l'oocinète se transforme en oocyste, seul stade de développement du parasite qui soit extracellulaire. Plusieurs mitoses successives et une invagination interne de la membrane plasmique conduisent à la formation d'une cellule syncytiale composée de lobes contenant chacun un noyau. Ces lobes sont appelés sporoblastes. Les sporozoïtes vont ensuite bourgeonner et se détacher de façon asynchrone et semblent bourgeonner par vagues successives du sporoblaste. L'oocyste contient alors des milliers de sporozoïtes qui acquièrent peu à peu leur mobilité. Les sporozoïtes sont ensuite libérés dans l'hémolymphe. Ils atteindront pour certains d'entre eux les cellules acineuses des glandes salivaires qu'ils traverseront afin d'atteindre les canaux des glandes salivaires. Ainsi, lors d'un prochain repas sanguin de la femelle moustique, des sporozoïtes seront injectés à l'hôte et poursuivront le cycle de vie du parasite (Pour revue (Aly, 2009)) (Figure 2 et Figure 6).

Tous ces éléments permettent de comprendre que *Plasmodium* a un cycle de vie très complexe. De ce fait, le développement du parasite à travers des stades structurellement et métaboliquement différents nécessite une régulation très fine. Celle-ci fait intervenir de nombreuses protéines régulées entre autres par des modifications post-traductionnelles.

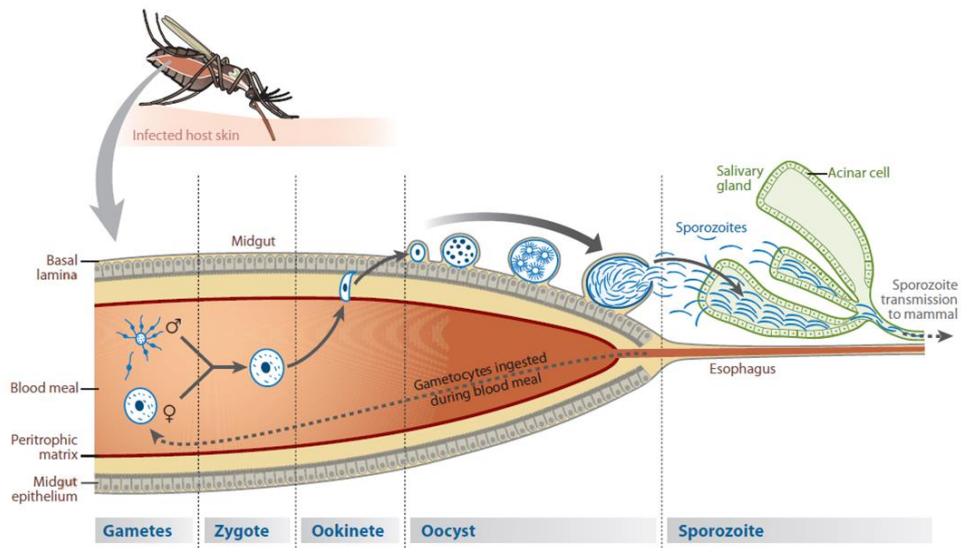


Figure 6 : Cycle de vie sexué de *Plasmodium* (D'après (Aly, 2009)).

B. LES PHENOMENES DE PHOSPHORYLATION/DEPHOSPHORYLATION CHEZ *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Les modifications post-traductionnelles regroupent un certain nombre de modifications enzymatiques permettant l'activation, l'inhibition, la séquestration, la relocalisation ou encore l'interaction des protéines. Elles interviennent après la synthèse de la protéine et consistent en la modification des acides aminés qui la composent. Parmi les modifications post-traductionnelles on retrouve la méthylation, l'acétylation, la glycosylation, l'ancrage lipidique, l'ubiquitination ou encore la phosphorylation. Ces modifications sont catalysées par des enzymes spécifiques et sont toutes catalysées chez *P. falciparum* (Pour revue (Chung, 2009)).

L'une des modifications post-traductionnelles les plus étudiées est la phosphorylation/déphosphorylation catalysées respectivement par les kinases et les phosphatases. La phosphorylation est la réaction d'estérification de la chaîne latérale d'un acide aminé, par addition d'un groupement phosphate (Figure 7). Il faut savoir que les kinases et les phosphatases n'ont pas que des protéines comme substrat, elles peuvent également (dé)phosphoryler des lipides (lipide kinase/lipide phosphatase) ou encore des nucléotides (nucléoside et nucléotide kinase/nucleotidase). De plus, même si la phosphorylation sur les protéines est généralement réalisée sur des résidus sérines, thréonines ou tyrosines, certaines enzymes sont capables de (dé)phosphoryler des histidines, des lysines ou encore des arginines (pour revue (Ciesla, 2011)). Cependant par souci de simplicité, seules les kinases et les phosphatases ayant pour substrat des protéines (protéine kinases/protéine phosphatases) sur des résidus sérines, thréonines et tyrosines seront énumérées et décrites ci-dessous.

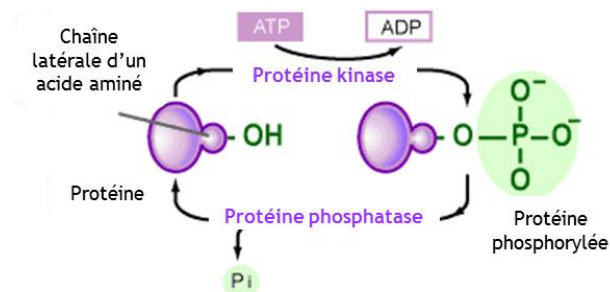


Figure 7 : Schématisation des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. Une protéine kinase transfère un groupement phosphate d'une molécule d'ATP sur la chaîne latérale d'un acide aminé, tandis que la protéine phosphatase le retire.

Chez *Plasmodium*, 26% des protéines prédites sont phosphorylées (Treec, 2011). Plusieurs acides aminés peuvent être phosphorylés dont des sérines dans 89,1% des cas chez *P. falciparum*, des thréonines dans 10,4% des cas et enfin des tyrosines qui ne représentent que 0,51% des résidus phosphorylés (Treec, 2011) (Figure 8a). Le taux de phosphorylation des tyrosines chez *P. falciparum* mais également chez *Toxoplasma gondii* est beaucoup plus faible que chez les autres organismes. En effet, les tyrosines ne représentent que 0,51% et 0,25% des résidus phosphorylés chez *P. falciparum* et *T. gondii* respectivement (Treec, 2011) alors qu'elles représentent de 1 à 4% des résidus phosphorylés chez les autres organismes (souris, levure...) (Huttlin, 2010 ; Tan, 2012). Les phosphorylations régulent l'activité de protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la réplication de l'ADN, la protéolyse, le métabolisme ou encore le cycle cellulaire (Figure 8b).

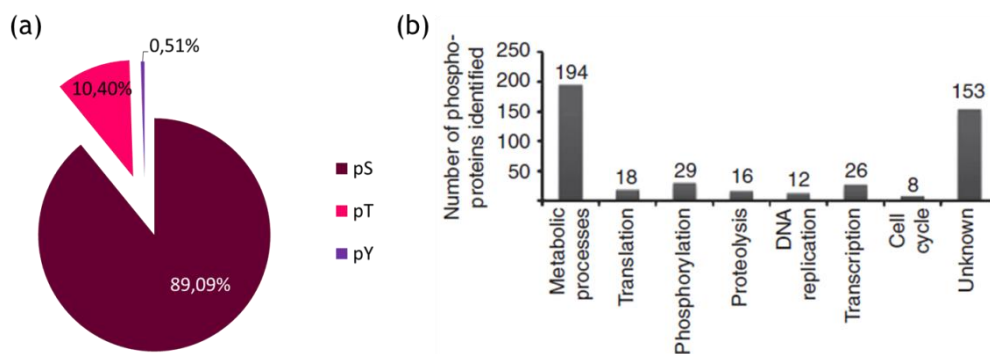


Figure 8 : La phosphorylation chez *Plasmodium falciparum*. (a) Distribution des sites de phosphorylation (D'après Treec, 2011). (b) Implication des protéines phosphorylées dans les principaux mécanismes cellulaires chez *P. falciparum* (D'après (Solyakov, 2011)).

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux protéine kinases et phosphatases de *Plasmodium falciparum*. Nous listerons ainsi les protéines identifiées et/ou caractérisées chez le parasite. Les protéines ont été identifiées selon leur nom déposé sur PlasmoDB, soit le nom qui leur a été donné soit leur numéro d'accèsion. Les protéines qui ont fait l'objet d'études sont écrites en gras dans les différents tableaux.

I. Les kinases

Le génome de *Plasmodium falciparum* code pour quatre-vingt-neuf (Ward, 2004) ou quatre-vingt-dix-neuf protéine kinases (Anamika, 2005) selon les études, ce qui correspond à 1,1 - 1,6% du génome complet. Ces enzymes catalysent le transfert du groupe phosphate en position γ de l'ATP sur le groupement OH de la sérine, de la thréonine ou de la tyrosine des protéines cibles. Le kinome de *Plasmodium falciparum* comporte entre soixante-cinq (Ward, 2004) et soixante-douze (Talevich, 2011) protéine kinases spécifiques des eucaryotes (ePKs) et quatre protéine kinases atypiques (aPK). Il code également pour un groupe de vingt et une protéine kinases spécifiques des apicomplexes nommées FIKK (Tableau 4). Parmi toutes les kinases, trente-sept ont été étudiées voire caractérisées biochimiquement (Tableau 4). De plus, une étude systématique d'interruption de gènes des kinases putatives a été faite par Solyakov *et al.* et a montré l'essentialité de trente-six protéine kinases et la non-essentialité de vingt-quatre protéine kinases (Tableau 4) (Solyakov, 2011).

1. Les ePKs

a. Les tyrosine kinases et les homologues des tyrosine kinases

Il est intéressant de noter que *P. falciparum* ne possède aucune protéine tyrosine kinase. Ce n'est pas vraiment surprenant puisque c'est le cas d'un grand nombre d'organismes unicellulaires dont la levure. En effet, les tyrosine kinases sont impliquées majoritairement dans les voies de signalisation liées aux récepteurs aux hormones ce qui en fait des acteurs essentiels dans la communication intercellulaire. On pensait même que seuls les organismes pluricellulaires possédaient des protéine tyrosine kinases. Or, une étude phylogénétique a montré en 2004 que quelques organismes unicellulaires comme l'algue verte (Chlorophyta) *Chlamydomonas reinhardtii*, l'hétérokonte *Phytophthora infestans* et le protozoaire Lobosa *Entamoeba histolytica* possédaient des protéine tyrosine kinases (Shiu, 2004). *P. falciparum* n'a donc pas de tyrosine kinase mais par contre il code pour des protéines sérines-thréonines kinases ayant des homologies de séquence avec des protéine tyrosine kinases. Ces protéines sont conservées au cours de l'évolution de l'homme aux plantes. Initialement, cinq de ces protéines ont été identifiées (Ward, 2004). Une analyse plus fine a permis de montrer que le génome de *P. falciparum* ne code en fait que pour quatre protéines orthologues des tyrosine kinases PFTKL1, PFTKL2, PFTKL3 et PFTKL4 (Abdi, 2010). Parmi ces protéines, PFTKL2 et PFTKL3 ont été caractérisées et sont catalytiquement actives. PFTKL2 est une protéine ubiquitairement exprimée au cours du cycle érythrocytaire et dans les gamétocytes, qui est sécrétée dans l'érythrocyte hôte et le milieu de culture. Cette protéine pourrait être impliquée dans la modulation du système immunitaire permettant la survie du parasite (Abdi, 2013). PFTKL3 est une protéine essentielle pour la complétion du cycle érythrocytaire. Son activité catalytique nécessite la présence d'un domaine SAM (sterile α domain) qui est impliqué dans les interactions protéine/protéine et dans le cas de PFTKL3 de l'homodimérisation (Abdi, 2010).

Bien qu'aucune protéine tyrosine kinase à proprement parlé ne soit codée par le génome de *P. falciparum*, il existe deux protéines, PfMAP1 et PfNEK3, qui ont été décrites comme des kinases à double spécificité c'est-à-dire capables de phosphoryler des sérines ou des thréonines mais également des tyrosines (Graeser, 1997 ; Low, 2012). Cependant, la capacité de PfMAP1 à phosphoryler une tyrosine semble limitée aux phénomènes d'autophosphorylation (Graeser, 1997).

b. La voie des MAP kinases

La voie des MAP kinases est constituée de protéines MAP (Mitogen-activated protein) kinases (MAPK) et de protéines participant à la cascade de signalisation des MAP kinases. Parmi ces protéines on retrouve les protéines MAP kinases kinases (MAPKK) qui phosphorylent les MAPK et les MAP kinases kinases kinases (MAPKKK ou MAP3K) qui phosphorylent les MAPKK. Les MAPKK et les MAP3K appartiennent à la famille des STE kinases (Stérile kinases). Cette voie est impliquée dans la prolifération cellulaire en induisant la transcription de gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et à la mitose.

Dans le génome de *P. falciparum* deux MAP kinases ont été identifiées, PfMAP1 et PfMAP2 (Doerig, 1996 ; Dorin, 1999). Ces deux kinases ont été caractérisées et sont des MAP kinases fonctionnelles (Graeser, 1997 ; Dorin, 1999 ; Rangarajan, 2005 ; Dorin-Semlat, 2007). MAP2 est essentielle pour la complétion du cycle érythrocytaire chez *P. falciparum* mais pas chez *P. berghei* (Rangarajan, 2005 ; Dorin-Semlat, 2007). En effet, chez *P. berghei* il a été montré que cette protéine est essentielle uniquement pour la gamétogénèse mâle dans le moustique (Rangarajan, 2005). PfMAP1 n'est, elle, pas essentielle pour le cycle érythrocytaire du *Plasmodium* mais les parasites dont le gène PfMAP1 a été interrompu présentent une augmentation de l'expression de PfMAP2. Ceci pouvant signifier un rôle important de PfMAP1 compensé par PfMAP2 (Dorin-Semlat, 2007).

Par contre, aucune kinase du groupe des STE kinases n'a été identifiée dans le génome de *P. falciparum*. La seule protéine présentant une homologie de séquence avec une MAPKK est PfPK7. En effet, sa partie C-terminale est homologue à une MAPKK tandis que sa partie N-terminale est homologue à la PKA (Dorin, 2005). Mais cette protéine ne présente pas d'activité kinase vis-à-vis des MAP kinases de *P. falciparum* (Dorin, 2005). Cependant, des études récentes ont montré que les protéines PfNEK1 et PfNEK3 du groupe des protéines NIMA étaient capables de réguler la protéine MAP kinase PfMAP2 et seraient ainsi des MAPKK atypiques (Dorin, 2001 ; Lye, 2006 ; Low, 2007). Toutes ces données permettent d'envisager une régulation de la voie des MAP kinases originale et spécifique à *Plasmodium* différente des autres eucaryotes.

c. Les CamKs

Dix-sept kinases putatives dépendantes du calcium ou de la calmoduline (CamK) ont été annotées dans le génome de *Plasmodium* dont sept ont été caractérisées. Ce nombre important de CamK laisse à penser que le calcium et les voies de signalisations associées sont très importants pour le parasite. Parmi ces kinases, il existe sept protéine kinases PfCDPK qui ont une structure proche des protéine kinases dépendantes du calcium

retrouvées exclusivement chez les plantes et les ciliés (ces protéines sont absentes chez les métazoaires). Ces protéines sont caractérisées par la présence de quatre domaines EF permettant la fixation du calcium. Seule PfCDPK7 ne possède qu'un seul domaine EF. PfCDPK1, PfCDPK2, PfCDPK3, PfCDPK4 et PfCDPK5 ont été caractérisées. Toutes ont une activité catalytique dépendante du calcium et de leur autophosphorylation (Farber, 1997 ; Li, 2000 ; Billker, 2004 ; Green, 2008 ; Dvorin, 2010). L'activité de PfCDPK1 et de PfCDPK5 est essentielle pour la libération des mérozoïtes et la réinvasion (Green, 2008 ; Kato, 2008b ; Dvorin, 2010 ; Bansal, 2013), tandis que PfCDPK3 et PfCDPK4 sont impliquées dans l'invasion chez le moustique (Li, 2000 ; Billker, 2004 ; Ishino, 2006 ; Ranjan, 2009). PfPK2 et PfPK9 ont également été caractérisées et sont catalytiquement actives (Zhao, 1992 ; Philip, 2007 ; Kato, 2008a). PfPK2 est impliquée dans la libération des mérozoïtes (Kato, 2008a) tandis que PfPK9 est impliquée dans l'ubiquitination (Philip, 2007).

d. Les AGC kinases

Le génome de *P. falciparum* code pour une protéine kinase A (PKA), une protéine kinase B (PKB) et une protéine kinase G (PKG) qui ont été caractérisées et sont toutes trois catalytiquement actives (Deng, 2002 ; Vaid, 2006 ; Wurtz, 2009). Comme ses orthologues, PfPKA est activé par AMPc. Cette protéine est impliquée dans la multiplication du parasite (Syn, 2001). L'activité de PfPKB est, elle, dépendante de la calmoduline et est impliquée dans l'invasion des mérozoïtes (Vaid, 2006 ; Vaid, 2008). Quant à PfPKG, elle est catalytiquement active et son activité dépend du GMPc. Il existe néanmoins des différences majeures avec ses orthologues concernant la sensibilité aux inhibiteurs de PKG (Deng, 2002). Cette protéine est impliquée dans la gamétogénèse, la libération des mérozoïtes, la différenciation et la mobilité des oocinètes (McRobert, 2008 ; Moon, 2009 ; Taylor, 2010 ; Collins, 2013b). Par contre, le génome de *P. falciparum* ne code pour aucune PKC. Il semblerait que la fonction de la PKC soit assumée par les PfCDPK ou d'autres kinases appartenant au groupe des CamKs (Doerig, 2005).

e. Les CDKs

Neuf protéine kinases dépendantes des cyclines (CDK) sont codées par le génome de *P. falciparum*. Ces protéines sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Cf. C III 1 a). Deux d'entre elles sont régulées par des cyclines, PfPK5 et PfMRK (Le Roch, 2000 ; Merckx, 2003 ; Chen, 2006). PfCRK1 est catalytiquement active mais son activité ne semble pas régulée par les cyclines (Iwanaga, 2013). PfPK6 est active et est sensible aux inhibiteurs de CDK. Sa séquence présente des identités avec les CDK mais également avec les MAPK (Bracchi-Ricard, 2000). Toutes les CDK n'ont pas été étudiées à ce jour, et il est envisageable que d'autres CDKs puissent également être régulées par des cyclines.

f. Les protéine kinases orphelines

Plasmodium possède dix-huit protéine kinases n'ayant aucun orthologue connu chez les autres eucaryotes. Seules trois d'entre elles ont été caractérisées, PfKIN qui est uniquement exprimée dans les gamétocytes (Bracchi, 1996), PfPK7 (Cf. B11b) et PfEST qui est exportée dans l'érythrocyte hôte (Kun, 1997).

g. Les autres protéine kinases

Quatre protéines NIMA (Never In Mitosis/*Aspergillus*) ont été annotées (PfNEK1-4), de même que trois protéines AURORA (PfARK1-3). Toutes ces protéines sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. PfNEK1 est essentielle pour le cycle érythrocytaire du parasite et est impliquée dans la schizogonie et la gamétogénèse mâle (Dorin-Semlat, 2011). PfNEK1 et PfNEK3 sont impliquées dans la voie des MAP kinases et seraient des MAPKK atypiques (Cf. B I b). PfNEK2 et PfNEK4, quant à elles, sont impliquées dans la phase sexuée du parasite et notamment dans la gamétogénèse femelle. PfNEK4 est essentielle pour la phase sexuée et est impliqué dans la méiose (Reininger, 2012). PfARK1 serait un orthologue d'AURORA A et serait impliquée dans la mitose de *P. falciparum* (Read, 1993 ; Reininger, 2011). PfARK2 est spécifique des *Plasmodiums* tandis que PfARK3 est spécifique de *Plasmodium*, de *Toxoplasma* et de *Neospora*. Seule PfARK2 est active *in vitro*. Les trois protéines sont essentielles pour le parasite (Carvalho, 2013).

Il existe également chez *P. falciparum* quatre protéine kinases homologues des CDK (CDK-like kinase). Les protéines PfCLK1 et PfSRPK2 (CLK2) sont essentielles pour la phase asexuée du parasite et régulent certainement les modifications post-transcriptionnelles des ARNm (Agarwal, 2011). PfCLK3 et PfSRP2 (CLK4) n'ont, elles, pas été caractérisées.

2. Les FIKKs

Les FIKK sont des kinases spécifiques des apicomplexes. Elles doivent leur nom au motif phénylalanine-isoleucine-lysine-lysine situé dans la région N-terminale de leur domaine kinase. *P. falciparum* est le seul à exprimer un groupe aussi important de FIKK. En effet, à l'exception de *P. reichenowi* dont le génome code pour six FIKKs, les autres apicomplexes comme *P. berghei*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *Toxoplasma gondii* ou encore *Cryptosporidium parvum* n'expriment qu'une FIKK et certains comme *P. chabaudi* n'en expriment aucune. Toutes les protéines FIKK possèdent un motif PEXEL permettant leur exportation vers l'érythrocyte hôte (Schneider, 2005) à l'exception de la protéine PFIKK8 et sont souvent exprimées à la membrane de l'érythrocyte comme PFIKK4.1, PFIKK9.3 et PFIKK9.6 (Nunes, 2007). PFIKK9.2 n'est, quant à elle, pas exportée vers l'érythrocyte bien qu'elle possède un motif PEXEL. Les protéines FIKK sont majoritairement exprimées aux stades anneaux et schizontes et permettraient entre autre le remodelage de la membrane érythrocytaire (Nunes, 2010).

Ainsi, *Plasmodium falciparum* possède un grand nombre de kinases, d'enzymes et de voies de signalisation qui lui sont propres. Même si certaines protéine kinases ont été caractérisées, leurs implications chez le parasite ne sont pas encore complètement comprises. Pourtant, les mécanismes de phosphorylation semblent essentiels pour le développement du parasite.

Tableau 4 : Les protéine kinases putatives de *Plasmodium falciparum*. Tableau réalisé à partir des données du kinome de *P. falciparum* (Ward, 2004), corrigé par les données issues des articles de (Solyakov, 2011) et (Talevich, 2011) ainsi que de la base de données génomique de *Plasmodium* PlasmoDB. Les protéines écrites

en violet ont été caractérisées. Les # symbolisent les protéines essentielles pour le parasite, tandis que Δ représentent les protéines non essentielles d'après l'étude de Solyakov (Solyakov, 2011).

	Nom du groupe	Nombre de kinase	Nom ou numéro d'accension PlasmoDB des kinases	Rôle
ePK	CK1	1	PfCK1#	
	AGC	5	PfPKA# , PfPKG# , PfPKB# , PF3D7_1121900# et PF3D7_1145200#.	
	CamK	17	PfPK2# , PfPK9# , PfCDPK1# , PfCDPK2# , PfCDPK3# , PfCDPK4Δ , PfCDPK5 , PfCDPK6Δ , PfCDPK7Δ , PF3D7_0214600Δ, PF3D7_0311400, PF3D7_0704500Δ, PF3D7_0926000, PF3D7_1104900Δ, PF3D7_1423600Δ et PF3D7_1441300. Après analyse des protéine kinases orphelines, une CamK putative a été annotée : PF3D7_0715300.	Signalisation intracellulaire du calcium
	CMGC	18	9 CDK : PfPK5# , Pfmrk# , PfCRK1# , PfCK2# , PfCRK3# , PfCRK4# , PfCRK5Δ , PfPK6# et PF3D7_1338900 Δ.	Régulation du cycle cellulaire
			2 MAPK : PfMAP1 et PfMAP2# .	Transduction des signaux intra- et extracellulaires
			3 GSK3 : PfPK1Δ , PfGSK3# et PF3D7_1316000	Régulation de la prolifération cellulaire
			2 CLK : PfCLK1# , PfCLK3# . 2 SRPK : PfSRPK1# et PfSRPK2#	Épissage des ARNm
	TKL	4	PfTKL1# , PfTKL2Δ , PfTKL3# et PfTKL4Δ .	
	NIMA	4	PfNEK1# , PfNEK2Δ , PfNEK3Δ et PfNEK4Δ	Régulation du cycle cellulaire
	AURORA	3	PfARK1# , PfARK2# et PfARK3#	Progression dans le cycle cellulaire
eIF2α	3	PfelK1Δ , PfelK2Δ et PfPK4#		
Kinase orpheline	18	PfKIN# , PfFEST# , PfPK7Δ , PF3D7_0107600, PF3D7_0203100Δ, PF3D7_0321400, PF3D7_0724600, PF3D7_0926100Δ, PF3D7_0926300, PF3D7_0928800, PF3D7_1106800, PF3D7_1148000#, PF3D7_1247500Δ, PF3D7_1331300, PF3D7_1441300Δ, PF3D7_1433900, PF3D7_1474700, PF3D7_1450000Δ.		
aPK	RIO	2	PfRIO1 et PfRIO2	Processing des ARNr (levure, (Geerlings, 2003))
	ABC1	2	PfABCK1 et PfABCK2	
	FIKK	21	PfFIKK, PfFIKK1, PfFIKK3, PfFIKK4.1 , PfFIKK4.2, PfFIKK5, PfFIKK7.1 , PfFIKK7.2, PfFIKK8, PfFIKK9.1, PfFIKK9.2 , PfFIKK9.3 , PfFIKK9.4, PfFIKK9.5, PfFIKK9.6 , PfFIKK9.7, PfFIKK10.1, PfFIKK10.2, PfFIKK11, PfFIKK12 et PfFIKK14	

II. Les phosphatases

L'autre pendant de la balance phosphorylation/déphosphorylation est assuré par les phosphatases. Ces enzymes sont, à l'inverse des kinases, capables d'hydrolyser une liaison ester monophosphate afin de déphosphoryler un résidu. Le nombre de protéine phosphatases est plus faible que le nombre de protéine kinases, de ce fait, les protéine phosphatases sont moins sélectives que les kinases vis-à-vis du substrat. Cependant, le faible nombre de phosphatases est contrebalancé par le grand nombre de régulateurs responsables notamment de la spécificité de substrat.

L'analyse du génome de *Plasmodium* a permis d'identifier initialement vingt-sept séquences putatives de protéine phosphatases appartenant aux quatre grandes familles décrites chez l'homme (Wilkes, 2008) ayant pour substrat des protéines phosphorylées sur des résidus sérines, thréonines ou tyrosines. Une nouvelle analyse des données génomiques de la base de données PlasmoDB a permis à notre laboratoire d'affiner ce nombre à quarante-et-une protéine phosphatases (Khalife, In press). Cette analyse montre que les protéine phosphatases se répartissent en deux grands groupes décrits ci-après (Tableau 5) et que deux classes de protéine tyrosine phosphatases sont absentes chez *P. falciparum* (Figure 9).

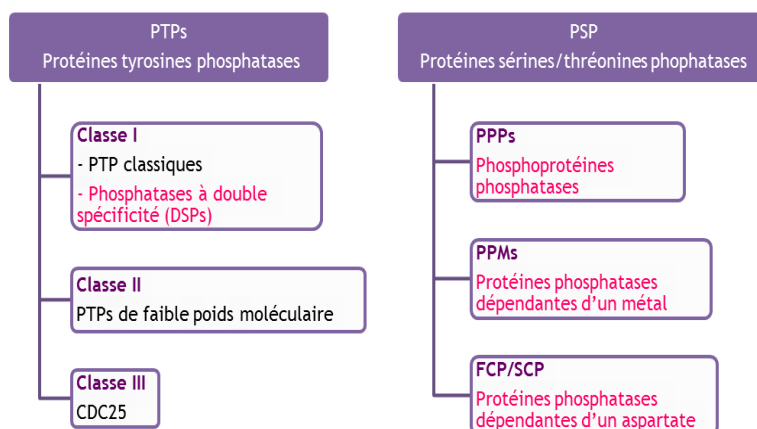


Figure 9 : Les grands groupes de protéine phosphatases chez les eucaryotes. Les groupes et classes présents chez *P. falciparum* sont écrits en rose.

1. Les protéine sérine/thréonine phosphatases

Le premier groupe de phosphatases présent chez *P. falciparum* est composé des protéine sérine/thréonine phosphatases (PSPs). Il est lui-même subdivisé en trois classes, les phosphoprotéine phosphatases (PPPs), les protéine phosphatases dépendantes d'un métal (PPMs) et les phosphatases asparagines (FCP/SCP).

a. Les PPPs

Les PPPs sont des sérine/thréonine phosphatases dont le site actif contient un ion métallique fer et un ion métallique zinc. Ce groupe est composé chez *P. falciparum* de 18

membres. Neuf de ces enzymes ont été décrites et caractérisées. Parmi celles qui n'ont pas été caractérisées, une appartient au groupe PP2A/PP4/PP6 (PF3D7_0927700), PF3D7_1403900 s'aligne avec une PP2B-like, et PF3D7_1018200 présente une homologie de séquence avec PP1 α/γ . Les protéine phosphatases caractérisées sont décrites ci-après à l'exception de PP2A, un chapitre lui étant consacré dans la suite de cette introduction.

i. PfPP1

Cette phosphatase est responsable de la majorité de l'activité phosphatase de *P. falciparum* (Yokoyama, 1998 ; Cayla, 2000 ; Bhattacharyya, 2002). Elle est essentielle pour la complétion du cycle érythrocytaire du parasite. En effet, l'interruption de l'expression de PfPP1 par de petits ARN interférents bloque la progression du cycle érythrocytaire (Kumar, 2002), de même que l'inhibition de cette protéine par une toxine naturelle, l'acide okadaïque (Yokoyama, 1998 ; Bhattacharyya, 2002). De plus cette protéine permet la libération des mérozoïtes infectieux dans le sang (Blisnick, 2006). L'étude de régulateurs de PfPP1 (PflRR1, Pfl2 et Pfl3) a montré que ceux-ci étaient aussi essentiels au parasite que la phosphatase elle-même ((Khalife, résultats non publiés) ; (Daher, 2007b ; Freville, 2012 ; Freville, 2013)).

ii. PfPP2B

La PfPP2B ou calcineurine, dont l'activité dépend de la calmoduline, est inhibée par PffKBP35 *in vitro* et par la cyclosporine A (Dobson, 1999 ; Kumar, 2005). Par contre, elle est insensible à l'acide okadaïque contrairement à PfPP1 et PfPP2A (Dobson, 1999). Cette phosphatase est impliquée dans l'invasion des hématies par les mérozoïtes en permettant la sécrétion des micronèmes par dépolymérisation de l'actine du pôle apical (Singh, 2013).

iii. PfPP8

Initialement identifiée comme une PP2A putative (Li, 1997), PfPP8 est une chimère appartenant au groupe des PP2A/PP4/PP6 qui possède une partie C-terminale présentant 47% d'identité et 75% d'homologie avec PfPP2A et une extension N-terminale de cent cinquante et un acides aminés ne présentant aucun domaine conservé. La fonction de cette protéine n'est actuellement pas connue. Des analyses par northern blot ont permis de montrer que son expression est maximale dans les gamétocytes.

iv. PfPP5

Le rôle *in vivo* de cette protéine phosphatase nucléaire n'est pas connu. Cependant, des études ont montré que PfPP5 était activable par des acides gras polyinsaturés tels que l'acide arachidonique bien que son seuil d'activation soit plus élevé que la PP5 des autres eucaryotes. Elle possède plusieurs domaines TRP (tetratricopeptide repeat) qui auto-inhibent PfPP5 en se fixant sur les treize derniers acides aminés en C-terminal. Cette liaison est inhibée par la fixation d'acides gras polyinsaturés (Lindenthal, 2002). Cette protéine interagit avec PfHSP90 (Heat Shock Protein) (Dobson, 2001b) qui est

connue chez les eucaryotes pour être une protéine chaperonne importante pour la structure et la fonction de PP5 (Chen, 1996 ; Russell, 1999).

v. PfPP7 et PfPPJ

PfPPJ a été la première forme décrite de cette phosphatase (Dobson, 2001a). Il s'est avéré par la suite que PfPPJ, avec ses deux-cent-quatre-vingt-quatorze acides aminés, était une forme épissée de PfPP7 correspondant à son corps catalytique sans les domaines régulateurs EF présents dans la partie C-terminale de PfPP7. Ceci explique les différences observées au niveau de l'activité de la phosphatase. Les deux formes sont donc retrouvées dans le parasite même si PfPPJ est prédominante. Les domaines EF sont importants pour la fixation du calcium. De ce fait, l'activité de PfPPJ dépend des ions Mn^{2+} uniquement tandis que PfPP7 voit son activité basale stimulée par le Mn^{2+} multipliée par quatre en présence de Ca^{2+} (Kumar, 2004b).

vi. PfPPKL

Cette phosphatase, nommée PfPP α à l'origine (Li, 1998), est majoritairement exprimée dans les schizontes, les gamétocytes femelles, le zygote, l'oocinète et les sporozoïtes. Sa partie C-terminale est similaire au domaine phosphatase de PP1 tandis que sa partie N-terminale contient cinq domaines Kelch. Cette association est uniquement trouvée chez les alvéolés et les plantes. Cette protéine est surtout exprimée au niveau apical de l'oocinète. L'interruption de ce gène chez *P. berghei* montre son implication dans la motilité, la morphologie et la capacité infectieuse des oocinètes et donc la transmission du parasite (Guttery, 2012 ; Philip, 2012).

vii. PfSHLP1 et PfSHLP2

Il existe chez *P. falciparum* deux protéine phosphatases *Shewanella*-like (SHLP). Ce sous-groupe de protéine phosphatases n'existe que chez les bactéries, les hétérokotes, les plantes, les champignons et certains protozoaires. SHLP1 est exprimée à tous les stades parasitaires érythrocytaires et chez le moustique. Elle est active et n'est pas régulée par phosphorylation (Patzewitz, 2013). Cette phosphatase joue un rôle important mais pas essentiel dans la formation et la différenciation de l'oocinète et dans l'invasion de l'estomac *via* les micronèmes comme l'ont montré des expériences d'interruption de gène chez *P. berghei* (Patzewitz, 2013). PfSHLP2 quant à elle, présente une activité tyrosine phosphatase clairement établie. Cette phosphatase est exprimée dans les schizontes et les mérozoïtes. Elle est transportée vers l'érythrocyte hôte où elle déphosphoryle la protéine membranaire Band 3 impliquée dans l'adhésion du parasite à l'érythrocyte au cours de l'invasion (Fernandez-Pol, 2013).

Tableau 5 : Les protéine phosphatases putatives de *Plasmodium falciparum*. Données issues de l'analyse du phosphatome publié par Wilkes et Doerig en 2008 et de l'analyse du génome de *Plasmodium falciparum* publié par notre laboratoire (Khalife, In press). En violet sont notées les protéines caractérisées.

	Famille de protéine phosphatases	Nombre de protéine phosphatases	Nom et/ou numéro d'accèsion PlasmoDB des protéine phosphatases
PSP	PPP	18	PfPP1 , PfPP2A , PfPP2B , PfPP5 , PfPP7/PfPPJ , PfPPB , PfPPKL/PfPPα , PfGAP50, PfSHLP1 , PfSHLP2 , PF3D7_0107800, PF3D7_0912400, PF3D7_0927700, PF3D7_1018200, PF3D7_1340600 (DBR1), PF3D7_1403900, PF3D7_1406700 et PF3D7_1464600.
	PPM/PP2C	11	PfPP2C , PfPP2C-like, PF3D7_0410300, PF3D7_0520100, PF3D7_0810300, PF3D7_0810500, PF3D7_1009600, PF3D7_1135100, PF3D7_1208900, PF3D7_1249300 et PF3D7_1455000
	FCP/SCP	4	PF3D7_0515900, PF3D7_0726900, PF3D7_1012700 et PF3D7_1355700
PTP et homologues	PTP	4	PfYVH1 , PfPRL , PF3D7_1127000 et PF3D7_1455100
	PTP-like	1	PF3D7_1331600
	Rhodanese	2	PfMAPKP1 et PF3D7_1206400
	mRNA capping phosphatase SU	1	PF3D7_0322100

b. Les PPMs

Les PPMs sont des enzymes dont le site catalytique comprend soit un ion manganèse soit un ion magnésium. Chez *P. falciparum*, ce groupe contient PP2C et dix homologues de PP2C. L'implication de ces protéine phosphatases dans la réponse au stress chez les plantes peut expliquer l'étendue de ce groupe chez *Plasmodium* en comparaison à l'homme.

Seule PP2C est décrite chez *P. falciparum*. Elle est composée de deux parties Pf2C-1 et Pf2C-2 qui sont toutes deux homologues à des PP2C mais qui présentent entre elles quelques différences. De plus, la taille de cette PfPP2C, qui est le double de celle des PP2C des autres eucaryotes, suggère que la PfPP2C résulte de la fusion ancestrale de deux phosphatases. Cette phosphatase est exprimée à tous les stades érythrocytaires. Les deux parties de PfPP2C sont catalytiquement actives et sont activées soit par le Mn²⁺ soit par le Mg²⁺. Pourtant, l'activité observée pour chaque partie est plus faible que l'activité de la protéine totale. De plus, *in vivo* la protéine est active lorsqu'elle est dimérisée *via* des interactions entre les parties Pf2C-1 et Pf2C-2. La phosphatase PfPP2C est impliquée dans la réponse aux stress tels que le changement d'osmolarité ou un choc thermique comme la PP2C de levure (Mamoun, 1998). L'un de ses substrats est le facteur d'élongation Pfef-1B. PfPP2C déphosphoryle Pfef-1B et empêche l'élongation et donc la traduction des protéines (Mamoun, 2001).

c. Les FCP/SCP phosphatases asparagines

Les FCP/SCP phosphatases asparagines (TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD phosphatase/small CTD phosphatase), utilisent lors de l'hydrolyse de la liaison du phosphate, un intermédiaire asparagine phosphorylé. Ce groupe comprend quatre membres qui sont des homologues des phosphatases NIF. Aucune n'a été caractérisée.

2. Les protéine tyrosine phosphatases et les protéines homologues des tyrosine phosphatases

a. Les protéine tyrosine phosphatases

Le deuxième groupe de phosphatases est le groupe des tyrosine phosphatases. Étant donnée l'absence de protéine tyrosine kinases classiques chez *Plasmodium*, le faible nombre de protéine tyrosine phosphatases (quatre) n'est pas surprenant. En plus de leur faible représentation, il est à noter l'absence de protéines CDC25 très importantes pour la progression du cycle cellulaire chez les eucaryotes (Cf. C III 1 a).

i. PfYVH1

L'une des protéines de ce groupe est PfYVH1. C'est une phosphatase à double spécificité c'est-à-dire capable de déphosphoryler aussi bien des résidus sérines que des résidus tyrosines. Cette phosphatase possède un domaine unique de fixation au zinc qui permet d'activer la protéine. Cette protéine est exprimée à tous les stades intra-érythrocytaires et est cytoplasmique sauf au stade trophozoïte où elle est nucléocytoplasmique. PfYVH1 interagit avec la protéine nucléaire PfPES, l'homologue de la protéine Pescadillo du poisson zèbre impliquée dans la prolifération cellulaire au cours de l'embryogénèse. PfPES peut être phosphorylée et serait un substrat de PfYVH1. Sa déphosphorylation au stade trophozoïte, seul stade où les deux protéines sont localisées dans le même compartiment cellulaire, l'activerait et permettrait son action sur le cycle cellulaire (Kumar, 2004a).

ii. PfPRL

PfPRL (protein of regenerating liver) est une protéine tyrosine phosphatase exprimée au stade trophozoïte et majoritairement au stade schizonte dans le réticulum endoplasmique, le pôle apical des schizontes et dans la vacuole digestive. Cette phosphatase peut être prenylée et farnesylée (Pendyala, 2008 ; Singh, 2009). Elle est exportée vers l'érythrocyte où elle est capable de déphosphoryler des protéines érythrocytaires.

b. Les protéines homologues des tyrosine phosphatases

Quatre protéine phosphatases peuvent être classées dans ce groupe, une protéine homologue des tyrosine phosphatases (PF3D7_1331600), deux protéines possédant des

domaines rhodaneses (MAPKP1 et PF3D7_1206400) et une sous-unité permettant la mise en place de la coiffe des ARNm (PF3D7_0322100).

La seule protéine caractérisée de ce groupe est la PfMAPKP1. Cette phosphatase possède un domaine rhodanese et un domaine phosphatase à double spécificité (DUSP). Cette double caractéristique permet de la classer dans les MAPK phosphatases. Des mutations dans le gène de cette protéine induisent une croissance plus lente du parasite même si celui-ci présente un développement normal sans différence morphologique apparente. PfMAPK1 régule en fait la transition trophozoïte/schizonte (Balu, 2013).

C. LA PROTEINE PHOSPHATASE DE TYPE 2A

Parmi les protéine sérine/thréonine phosphatases, on compte également la protéine phosphatase de type 2A, objet de l'étude de cette thèse. Ce chapitre lui est consacré. Cependant, peu de données sont disponibles sur la PP2A de *Plasmodium*. Aussi, nous nous attacherons dans un premier temps à présenter les PP2A décrites chez d'autres eucaryotes, afin d'apprécier l'étendue du rôle de cette phosphatase et l'intérêt de notre étude.

I. PP2A, une phosphatase complexe

1. Découverte et identification

L'activité de la PP2A a été observée dès 1945 par sa capacité à transformer la phosphorylase kinase a en phosphorylase kinase b moins active (Cori, 1945). Par contre, la protéine elle-même n'a été identifiée que plus tard. En effet, Krebs *et al.* ont démontré que c'est une déphosphorylation qui inactive cette kinase montrant l'implication d'une phosphorylase kinase phosphatase (Krebs, 1956). Il a été montré qu'il existait en fait deux phosphatases distinctes, une ciblant la sous-unité α , la α -phosphorylase kinase phosphatase et une ciblant la sous-unité β , la β -phosphorylase kinase phosphatase (Antoniw, 1976). Les phosphatases ont ensuite été classées en deux groupes selon leur capacité à déphosphoryler l'une ou l'autre des sous-unités de la phosphorylase kinase. Ainsi, les β -phosphorylases kinases phosphatases sensibles aux inhibiteurs 1 et 2 sont classées comme des phosphatases de type 1, tandis que les α -phosphorylases kinases phosphatases insensibles aux inhibiteurs 1 et 2 sont classées comme des phosphatases de type 2 (Ingebritsen, 1980 ; Cohen, 1981). La PP2A est l'une des premières phosphatases de ce groupe identifiée avec la PP2B et la PP2C. Elles ont été différenciées par leur activité indépendante (PP2A) ou dépendante des ions divalents Ca^{2+} ou Mg^{2+} (PP2B et PP2C respectivement). La PP2A est responsable avec PP1 de plus de 90% des déphosphorylations qui ont lieu dans les cellules eucaryotes (Depaoli-Roach, 1994).

2. Structure et composition de la PP2A

La phosphatase PP2A est une holoenzyme qui peut être constituée de deux ou trois sous-unités. Environ un tiers de PP2A est présent sous forme dimérique. Dans ce cas, elle est appelée PP2A core et contient la sous-unité catalytique, qui comme son nom l'indique porte l'activité phosphatase et la sous-unité A, qui permet la bonne conformation de l'enzyme (Kremmer, 1997). Les deux tiers restants sont sous forme trimérique constituée du core et d'une sous-unité régulatrice de type B qui permet la régulation de l'enzyme (Figure 10). Il existe quatre familles de sous-unités régulatrices de type B. Dans la suite de cet exposé, le dimère sera noté PP2A_D et les trimères seront notés PP2A_T avec en indice le nom de la sous-unité de type B (par exemple PP2A_{T55} : trimère constitué du core et de la sous-unité B55).

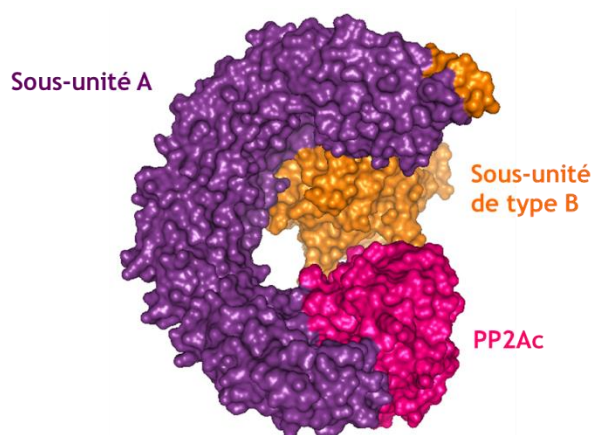


Figure 10 : Structure de la PP2A. Structure d'une holoenzyme de PP2A. La sous-unité catalytique est représentée en rose, la sous-unité A en forme de fer à cheval en violet et la sous-unité régulatrice en orange. La sous-unité régulatrice ici représentée est la sous-unité PR55 (d'après (Xu, 2008)).

a. La sous-unité catalytique (PP2Ac)

Des études de clonage moléculaire ont permis de montrer l'existence de deux isoformes de cette sous-unité (α et β) codées par deux gènes différents présentant une identité de 97% dans leur séquence primaire (Green, 1987 ; Stone, 1987 ; Arino, 1988). Récemment, il a été découvert qu'il existait deux variants d'épissage alternatif de l'isoforme α . Le variant α_2 , ayant perdu l'exon cinq, est catalytiquement inactif et est incapable de se fixer à la sous-unité A. Il reste minoritairement exprimé par rapport au variant α_1 (Migueletti, 2012). Les deux isoformes α et β sont ubiquitaires mais PP2Ac α est dix fois plus abondante que PP2Ac β (Khew-Goodall, 1988). Cette enzyme est très conservée au cours de l'évolution de l'homme à la levure en passant par les plantes.

PP2Ac est une protéine de trois cent neuf acides aminés ayant un poids moléculaire théorique de 36kDa. La séquence peptidique de PP2Ac comporte le site catalytique spécifique des protéine sérine/thréonine phosphatases caractérisé par les motifs GDxHG, GDxVDRG et RGNHE (Barton, 1994) (Figure 11).

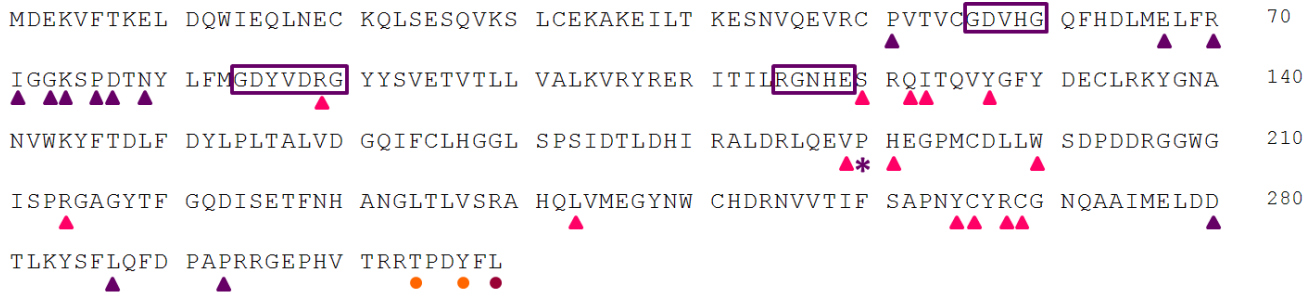


Figure 11 : Séquence de la sous-unité catalytique de PP2A. Caractérisation de la sous-unité catalytique de PP2A isoforme α (numéro d'accèsion : NP_002706.1). Le site catalytique spécifique est encadré en violet. Les triangles roses représentent les acides aminés impliqués dans la fixation des toxines naturelles des phosphatases (acide okadaïque et microcystine-LR), tandis que les triangles violets symbolisent les acides aminés impliqués dans l'interaction avec la sous-unité A. La méthylation activatrice de PP2A est identifiée par un point violet et les points orange représentent les sites de phosphorylation inhibitrice. Le site d'activation de PP2Ac par PTPA est symbolisé par une étoile violette.

Elle possède également des motifs d'interaction avec des toxines naturelles qui inhibent les PPPs dont l'acide okadaïque et la microcystine-LR, notamment une poche hydrophobe dans laquelle se loge la partie terminale hydrophobe de la toxine et délimitée par les résidus glutamine en position 122 (Q122), isoleucine en position 123 (I123), histidine en position 191 (H191) et tryptophane en position 200 (W200). Une deuxième poche comprenant les résidus leucine en position 243 (L243), tyrosine en position 265 (Y265), cystéine en position 266 (C266), arginine en position 268 (R268) et cystéine en position 269 (C269) est impliquée dans l'interaction avec les toxines par des liaisons de Van der Waals (Xing, 2006). Les résidus arginine, sérine, tyrosine, valine, et arginine en position 89, 120, 127, 189 et 214 respectivement (R89, S120, Y127, V189 et R214) sont également impliqués dans cette interaction (Figure 11, Figure 12). Certains acides aminés impliqués dans la fixation des toxines inhibitrices présents dans PP2A sont absents de PP1. De même, la poche formée sur PP2A est plus profonde que celle formée sur PP1 (Peti, 2013), ce qui peut expliquer la différence de sensibilité à l'acide okadaïque des deux phosphatases. En effet, alors qu'une dose de 0.1nM d'acide okadaïque est suffisante pour inhiber 50% de PP2A ($IC_{50} = 0.1nM$), une dose de 10nM est nécessaire pour obtenir le même taux d'inhibition pour la PP1 (MacKintosh, 1990).

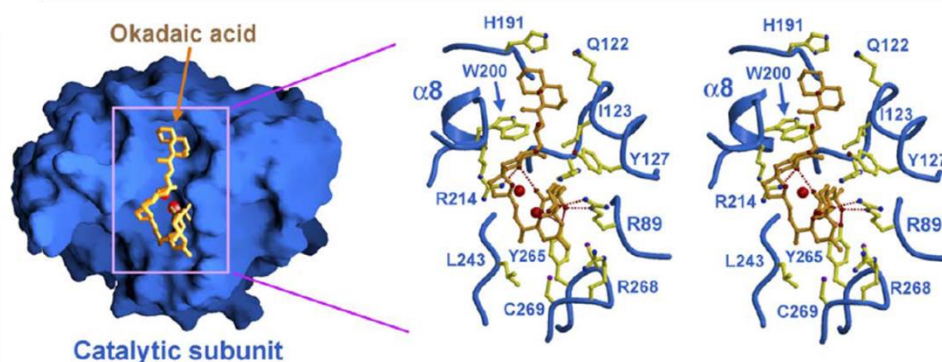


Figure 12 : Structure de la sous-unité catalytique de PP2A et visualisation des acides aminés impliqués dans la fixation de l'acide okadaïque. D'après (Xing, 2006).

La sous-unité catalytique PP2Ac est instable et est rapidement dégradée en absence de la sous-unité A ou d'une sous-unité B (Li, 2002 ; Silverstein, 2002 ; Strack, 2004). De plus, PP2Ac est essentielle au développement et à la survie des organismes eucaryotes. En effet, l'interruption du gène de l'isoforme α conduit à une mort rapide des embryons de souris (entre 5 et 6 jours de développement), ceci montre également que les deux isoformes ne sont pas redondants chez la souris (Gotz, 1998). De plus, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, bien que l'interruption d'une seule isoforme ne présente que peu d'effet, la double interruption est létale (Sneddon, 1990).

b. La sous-unité A

La sous-unité A, encore nommée PR65, est une protéine de 65kDa dont il existe deux isoformes, α et β présentant 87% d'identité entre elles (Hemmings, 1990). L'isoforme α est prédominante dans les hétérodimères et les hétérotrimères (Hendrix, 1993b). Cependant, chez le xénope, l'isoforme β est essentiellement retrouvée dans les holoenzymes de PP2A dans les ovocytes. Puis au cours du développement, les holoenzymes contenant l'isoforme α deviennent majoritaires dans les cellules de xénope (Hendrix, 1993b ; Bosch, 1995).

PR65 est composée de quinze motifs HEAT repeats (Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), PR65/A, and TOR1) (Hemmings, 1990). Chaque motif HEAT repeat forme deux hélices α antiparallèles A et B conférant à la protéine une structure en double couche d'hélices α dans laquelle les hélices A forment la face externe convexe d'un fer à cheval et les hélices B forment la couche interne concave (Groves, 1999). La sous-unité A permet la bonne conformation de la protéine PP2A et l'interaction avec les sous-unités régulatrices (Figure 10). L'interaction entre la sous-unité A et la sous-unité catalytique se fait entre les domaines HEAT repeats onze à quinze de la sous-unité A d'une part et les acides aminés prolines en position 51, 76 et 293 (P51, P76 et P293), glutamate en position 67 (E67), arginines en position 70 et 110 (R70 et R110), isoleucine en position 71 (I71), glycine en position 73 (G73), lysine en position 74 (K74), aspartates en position 77 et 280 (D77 et D280), asparagine en position 79 (N79) et leucine en position 287 (L287) de la sous-unité catalytique d'autre part (Figure 11). L'interaction avec les sous-unités B fait intervenir, quant à elle, les dix derniers HEAT repeats du côté N-terminal (Groves, 1999).

c. Les sous-unités régulatrices de type B

Quatre familles de sous-unités régulatrices de type B sont connues, les sous-unités B, les sous-unités B', les sous-unités B'' et les sous-unités B''''. Chaque famille comprend trois à quatre membres pouvant présenter de un à trois variants (Figure 13). Ces sous-unités régulatrices régulent l'activité, la localisation mais également la spécificité de la phosphatase PP2A.

i. Les sous-unités B

Les sous-unités B également appelées PR55 contiennent quatre membres (PR55 α , β , γ , δ) encodés par quatre gènes (*ppp2r2a*, *ppp2r2b*, *ppp2r2c* et *ppp2r2d*). Chaque isoforme présente une distribution tissu-spécifique (Healy, 1991 ; Mayer, 1991 ;

Zolnierowicz, 1994 ; Strack, 1998). En effet, PR55 α et PR55 δ ont une répartition ubiquitaire, tandis que PR55 β et PR55 γ sont surtout exprimées dans le cerveau. De plus, elles présentent une localisation spécifique des compartiments cellulaires. Ainsi, dans les cellules de Purkinje (neurones), PR55 α est majoritairement exprimée au niveau du corps cellulaire et du noyau alors que PR55 β est absente du noyau mais est exprimée dans les dendrites (Strack, 1998). Ces protéines contiennent cinq motifs WD-40 qui permettent l'interaction protéine/protéine (Neer, 1994).

ii. Les sous-unités B'

Ces sous-unités B', B56 ou PR61, comprennent au moins cinq membres (PR61 α , β , γ , δ , ϵ) encodés par cinq gènes différents (*ppp2r5a*, *ppp2r5b*, *ppp2r5c*, *ppp2r5d* et *ppp2r5e*) sur des chromosomes différents. Il existe également deux variants d'épissage pour la sous-unité PR61 β (β 1 et β 2) et trois pour la sous-unité PR61 γ (γ 1, γ 2 et γ 3). Toutes les protéines B' présentent une région centrale très conservée avec 80% d'identité et des régions C-terminale et N-terminale variables. PR61 α , PR61 β et PR61 ϵ sont concentrées dans le noyau tandis que PR61 γ est localisée dans le noyau. PR61 δ est, elle, présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Toutes les isoformes sont phosphorylées à l'exception de PR61 γ 1 (McCright, 1996). En ce qui concerne l'expression tissulaire des isoformes B', PR61 α et PR61 γ sont fortement exprimées au niveau du cœur et des muscles squelettiques tandis que PR61 β et PR61 δ sont surtout localisées au niveau du cerveau (McCright, 1995 ; Csontos, 1996 ; Tehrani, 1996).

iii. Les sous-unités B''

Le premier membre de la troisième famille des sous-unités régulatrices a été initialement isolé à partir de muscles squelettiques de lapin. Cette protéine d'un poids moléculaire de 72kDa a été nommée PR72. Un autre membre a été découvert dans le cerveau humain, sa partie C-terminale est identique à PR72 mais sa partie N-terminale est très différente. Cet autre membre présente ainsi un poids moléculaire de 130kDa. Cette sous-unité a été nommée PR130 et Hendrix *et al.* suggérèrent qu'il s'agissait d'un variant d'épissage alternatif de PR72 (gène *ppp2r3a*). PR72 est exprimée exclusivement dans le cœur et le muscle squelettique tandis que PR130 a une distribution beaucoup plus large avec cependant des taux supérieurs au niveau du cœur et des muscles (Hendrix, 1993a). Deux autres isoformes ont ensuite été identifiées, PR59 (gène *ppp2r3c*), qui est spécifique aux souris et PR48 (gène *ppp2r3b*) (Voorhoeve, 1999 ; Yan, 2000). PR48 est en fait une version tronquée d'une sous-unité B'' PR70 ubiquitaire (Stevens, 2003) et dont il existe une autre isoforme PPP2R3L exprimée dans le cœur et le muscle squelettique (Schiebel, 2000). PR59 est exprimée dans les testicules, les reins, le foie, le cerveau, le cœur et les poumons. Ces deux protéines semblent impliquées dans la régulation du cycle cellulaire car leur surexpression inhibe le cycle cellulaire et bloque les cellules en phase G1 (Voorhoeve, 1999). De plus, PR48 qui est nucléaire interagit avec CDC6 qui est requise pour l'initiation de la réplication de l'ADN (Yan, 2000). Une autre sous-unité B'' existe, la protéine G5PR, celle-ci est capable de se fixer à PP2A (Kono, 2002). Toutes ces sous-unités contiennent deux domaines EF permettant la fixation du calcium.

iv. Les sous-unités B'''

La dernière famille est composée de la striatine ou PR110, de SG2NA (S/G2 nuclear autoantigen) ou PR93 et de zinedine codées par trois gènes différents (*strn*, *strn3* et *strn4*). Ces trois protéines contiennent des motifs WD-40 comme PR55 et interagissent avec PP2A. Elles fixent toutes trois la calmoduline et cette fixation dépend du calcium. La striatine est localisée au niveau post-synaptique des dendrites neuronales alors que la SG2NA est nucléaire (Moreno, 2000).

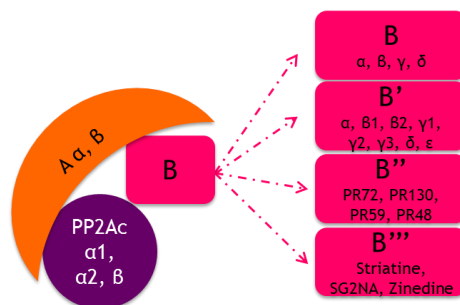


Figure 13 : Les différentes holoenzymes de PP2A

II. La régulation de PP2A

1. La composition des holoenzymes

L'assemblage des deux isoformes de PP2Ac, des deux isoformes de PR65/A, des quatre isoformes B, des huit isoformes B', des quatre isoformes B'' et des trois isoformes B''' permet la formation de soixante-seize holoenzymes dimériques ou trimériques (Figure 13). La composition des holoenzymes est un moyen de réguler l'activité de PP2A de façon spatio-temporelle. En effet, comme cela a été décrit précédemment, les différentes sous-unités sont localisées dans des compartiments cellulaires, des tissus et des types cellulaires différents et à des stades différents. Mais il existe d'autres niveaux de régulation comme les modifications post-traductionnelles ou des protéines régulatrices.

2. Les modifications post-traductionnelles

L'activité de PP2A peut être régulée par des modifications post-traductionnelles. En effet, la sous-unité catalytique de PP2A peut-être phosphorylée ou méthylée, ce qui régule directement son activité mais également la composition des holoenzymes. Les sous-unités régulatrices peuvent-elles aussi être régulées par phosphorylation.

a. La phosphorylation

La PP2Ac peut être phosphorylée sur la tyrosine 307 (Y307) (Figure 11). Cette phosphorylation inhibe la sous-unité catalytique (Chen, 1992). Plusieurs protéines peuvent phosphoryler PP2Ac. Ainsi, *in vitro*, il a été montré que PP60V-SRC, PP56LCK, le récepteur à l'EGF ainsi que le récepteur à l'insuline phosphorylent le résidu Y307 de PP2Ac (Chen,

1992). Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, la protéine tyrosine kinase SRC, activée par le zinc, phosphoryle PP2Ac sur la tyrosine 307 (Chen, 1992 ; Xiong, 2013). L'inactivation de PP2Ac par phosphorylation sur le résidu Y307 est réversible grâce à la protéine tyrosine phosphatase PTP1B (Shimizu, 2003).

PP2Ac peut également être inhibée par une phosphorylation sur la thréonine 304 (T304) (Figure 11) par l'autophosphorylation-activated protein kinase (Guo, 1993a ; Damuni, 1994).

Il est intéressant de voir que la protéine PP2A est capable de s'auto-déphosphoryler sur ces deux résidus (Y307 et T304) (Chen, 1992 ; Guo, 1993b).

Les sous-unités régulatrices peuvent également être phosphorylées et vont alors moduler l'activité de PP2A. Ainsi, il a été montré *in vitro* que la phosphorylation de la sous-unité PR61 δ par la PKA modifiait la spécificité de substrat du trimère PP2A_{T61 δ} (Usui, 1998). De la même façon, la phosphorylation de la sous-unité PR61 α par la PKR (double-stranded-RNA-dependent protein kinase) augmente l'activité de l'holoenzyme (Xu, 2000). De plus, toutes les sous-unités PR61 à l'exception de PR61 γ 1 sont phosphorylées sur une sérine (McCright, 1996).

b. La méthylation

La méthylation est également une modification post-traductionnelle qui régule l'activité de la PP2Ac. En effet, la PP2Ac peut être méthylée sur son résidu leucine 309 (Figure 11) (Rundell, 1987 ; Lee, 1993 ; Xie, 1994) et cette méthylation multiplie l'activité phosphatase de la PP2A par deux (Favre, 1994). La Leucine Carboxyl Méthyl Transférase (LCMT1) qui catalyse cette méthylation (Lee, 1993 ; De Baere, 1999) et la protéine Phosphatase Méthyl Estérase (PME-1) qui déméthyle PP2Ac ont été identifiées (Lee, 1996 ; Ogris, 1999). Longin *et al.* ont montré que PME-1 forme *in vivo* un complexe avec un dimère PP2Ac/A inactif ce qui constitue un autre mécanisme de régulation de la PP2A (Longin, 2004). Au cours du cycle cellulaire, la méthylation de PP2Ac varie. Ainsi, la sous-unité catalytique est déméthylée dans le cytoplasme au cours de la phase G1 tandis qu'au niveau du noyau la déméthylation est observée au cours des phases S et G2 (Turowski, 1995). La réversibilité de la méthylation est indispensable au bon développement de l'organisme. En effet, chez la souris l'interruption du gène PME-1 induit la mort du souriceau le jour de la naissance bien que le développement *in utero* soit normal (Ortega-Gutierrez, 2008). On observe dans ces souriceaux une diminution de l'activité de PP2A surtout au niveau du cerveau conduisant à une augmentation de la phosphorylation (Ortega-Gutierrez, 2008).

c. Les modifications post-traductionnelles et la composition des holoenzymes

La phosphorylation et la méthylation régulent la formation de certains hétérotrimères. En effet, la déphosphorylation de la tyrosine 307 est nécessaire à la fixation de PR61 α , PR61B1 et PR61 ϵ avec le dimère PP2A_D (Longin, 2007) (Tableau 6). Par contre, la phosphorylation sur la thréonine 304 empêche la fixation de la sous-unité PR55 sur PP2A_D

(Longin, 2007). De plus, chez la levure, la méthylation permet la fixation des sous-unités B et B' (Wu, 2000 ; Wei, 2001) (Tableau 6). De même, l'interaction du dimère PP2A_D avec la sous-unité B (PR55) nécessite que PP2Ac soit méthylée, tandis que la fixation avec les sous-unités B' et B'' ne dépend pas de cette méthylation (Longin, 2007) (Tableau 6).

Tableau 6 : Récapitulatif des modifications post-traductionnelles nécessaires à la formation des holoenzymes.

Sous-unité régulatrice	Phosphorylation PP2Ac sur T304	Phosphorylation PP2Ac sur Y307	Méthylation PP2Ac sur L309	Queue C terminale
B (PR55)	Inhibe l'interaction		Obligatoire	Obligatoire
B'' (PR61) α, β1, ε	Pas nécessaire	Inhibe l'interaction	Pas nécessaire	Obligatoire
B''' (PR70, PR72) et B'' δ1	Pas nécessaire	Pas nécessaire	Pas nécessaire	Pas impliquée

3. Les régulateurs de PP2A

Outre les sous-unités régulatrices de type B, un certain nombre de protéines peuvent réguler l'activité de PP2A.

a. Les inhibiteurs 1 et 2

Deux protéines inhibant PP2A ont été identifiées dans des extraits de rein de bœuf (Li, 1995). Ces inhibiteurs nommés I1^{PP2A} et I2^{PP2A} se fixent directement sur la sous-unité catalytique de PP2A et sont capables d'inhiber plusieurs holoenzymes de PP2A (Li, 1995).

I1^{PP2A} est également nommé PHAP-I (histocompatibility leukocyte antigens class II-associated protein I) ou ANP32a. L'isoforme e de l'ANP32 est également capable d'inhiber PP2A. Cette protéine est impliquée dans la signalisation intracellulaire permettant la régulation de la transcription (Vaesen, 1994 ; Seo, 2001) mais aussi la différenciation cellulaire et la prolifération (Millward, 1999 ; Huelsken, 2002 ; Theodosiou, 2002). La phosphorylation de I1^{PP2A} sur une tyrosine encore inconnue permet de dissocier le complexe I1^{PP2A}/PP2A. Cette protéine est présente dans le noyau et le cytoplasme.

I2^{PP2A} est quant à lui une version tronquée en C-terminal de SET, de PHAP-II et de TAF (Template activating factor). Il est lui-même régulé par phosphorylation sur les sérines 9 et 24 (S9 et S24) probablement par la PKC car autour de ces résidus un motif consensus de fixation de la PKC a été identifié (Adachi, 1994). Son rôle d'inhibiteur de PP2A empêche la déphosphorylation de c-JUN sur la sérine 63 et induit l'activité transcriptionnelle de la protéine activatrice AP-1 (Al-Murrani, 1999) (Figure 14).

I2^{PP2A} est impliqué dans une autre voie de signalisation. En effet, la phosphorylation d'I2^{PP2A} par la PI3Kγ sur les sérines 9 et 93 permet l'interaction entre I2^{PP2A} et PP2A et donc l'inhibition de cette dernière. Cette inhibition empêche le recyclage des récepteurs adrénergiques β vers la membrane. Or, l'absence de recyclage de ces récepteurs cause certaines pathologies comme les défaillances cardiaques ou l'asthme (Vasudevan, 2011) (Figure 14). Il est impliqué dans la leucémie *via* son rôle d'inhibiteur de PP2A (Li, 1996 ; Adler, 1997) (Cf. C IV 3).

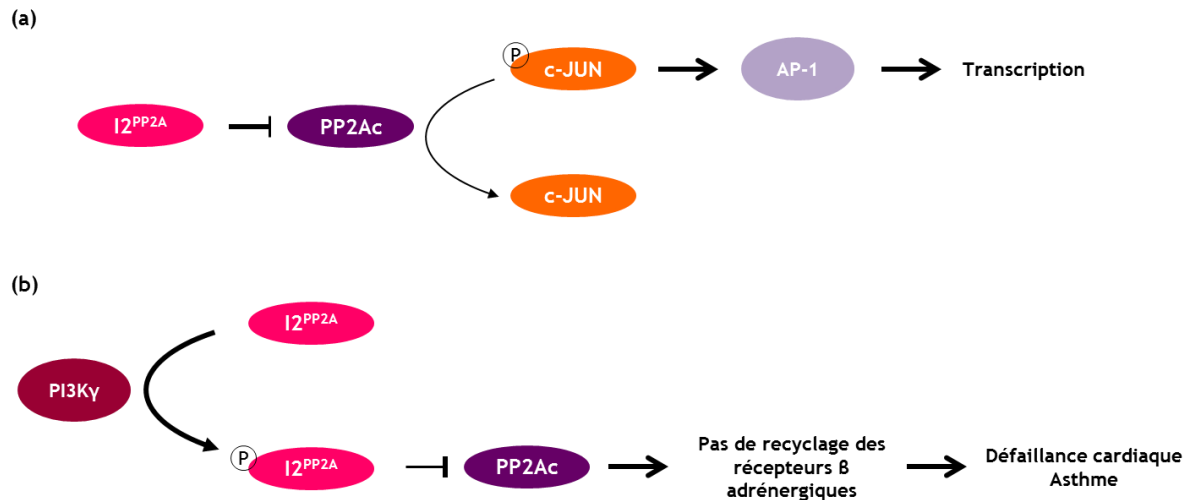


Figure 14 : Schématisation du rôle de l'inhibition de PP2A par I2^{PP2A}. (a) Activation de la transcription par I2^{PP2A}. (b) Implication de I2^{PP2A} dans les défaillances cardiaques et l'asthme.

Les deux inhibiteurs I1^{PP2A} et I2^{PP2A} possèdent une partie C-terminale acide qui permettrait leur fixation à la PP2Ac.

Leur activité inhibitrice est spécifique à PP2A. Cependant, en présence de Mn²⁺, Katayose *et al.* montrent que ces deux protéines augmentent l'activité de PP1 vis-à-vis de la MBP (Myelin Basic Protein) et de l'histone H1 de quinze ou vingt fois mais pas vis-à-vis de la phosphorylase a (Katayose, 2000).

b. ENSA et ARPP19

ENSA (α-endosulfine) et ARPP19 (c-AMP-Regulated PhosphoProtein 19) sont des substrats de diverses protéine kinases dont PKA, Greatwall et le complexe CDK2/Cycline A. Lorsque ces deux protéines sont phosphorylées par Greatwall sur la sérine 62 pour ARPP19 et la sérine 67 pour ENSA, elles présentent une activité inhibitrice contre l'holoenzyme PP2A_D/PR55δ (Mochida, 2010). L'inhibition de PP2A_D/PR55δ par ARPP19 entraîne l'entrée en mitose (Gharbi-Ayachi, 2010) (Cf. C III 1 a).

c. Les caséines kinases 2 α

PP2A_D peut se lier à la sous-unité catalytique de la caséine kinase 2 (CK2α) qui va phosphoryler la sous-unité catalytique et l'activer. MEK1 est alors déphosphorylée et inactivée inhibant ainsi le cycle cellulaire et la prolifération (Heriche, 1997). La sous-unité CK2α', quant à elle, inhibe PP2A et empêche la déphosphorylation de la protéine TAU impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Perez, 1999). De façon intéressante, la protéine CK2α' est spécifiquement présente dans les dendrites où s'accumule la protéine TAU phosphorylée tandis que la CK2α est, elle, présente dans le reste du neurone où la protéine TAU n'est pas phosphorylée (Papazosomenos, 1987 ; Moreno, 1999). Il est à noter que l'interaction des sous-unités CK2α (catalytique et régulatrice) se fait grâce au même

motif consensus que l'antigène petit t de SV40 qui lui inhibe la PP2A avec les conséquences que l'on décrira par la suite (Heriche, 1997) (Cf. C IV 4).

d. CIP2A

Lors d'une recherche de nouveaux partenaires de PP2A dans des cellules cancéreuses humaines, la protéine CIP2A (Cancerous Inhibitor of PP2A) a été identifiée (Junttila, 2007). Cette protéine de 90kDa interagit avec le complexe PP2A_D/c-MYC en se fixant sur la sérine 62 de l'oncogène c-MYC. CIP2A empêche la déphosphorylation de c-MYC sur la sérine 62 par PP2A augmentant la stabilité de c-MYC. Ce dernier va alors induire la transformation de la cellule (Figure 15). CIP2A serait donc un oncogène inhibant PP2A dans les cellules malignes. Cette hypothèse est soutenue par le fait que cette protéine est surexprimée dans deux cancers humains dont le cancer du côlon (Junttila, 2007).

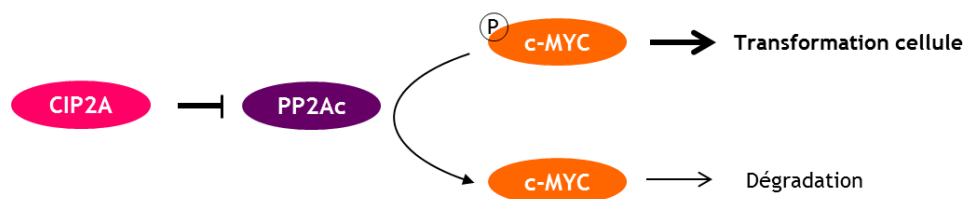


Figure 15 : Illustration du rôle de CIP2A dans la transformation cellulaire.

e. TIPRL-1

TIPRL-1 (target of rapamycin signaling pathway regulator-like) interagit directement avec PP2Ac, PP4 et PP6 (Smetana, 2007). L'interaction entre PP2Ac et TIPRL-1 est directe et ne nécessite pas le soutien de la sous-unité A mais on trouve parfois TIPRL-1 avec le dimère PP2A_B. L'interaction entre PP2A et TIPRL-1 se fait préférentiellement lorsque la sous-unité catalytique est méthylée (Nakashima, 2013).

L'interaction TIPRL-1/PP2Ac inhiberait PP2Ac (McConnell, 2007 ; Smetana, 2007) permettant d'activer le complexe mTORC1 qui pourra ainsi phosphoryler un certain nombre de substrats et induire la synthèse protéique (Figure 16a). TIPRL-1 jouerait également un rôle dans la signalisation en réponse aux dommages à l'ADN en régulant PP2A. En effet, lors de dommages à l'ADN, il y a activation de la voie ATM/ATR qui phosphoryle plusieurs substrats afin de bloquer les différents points de contrôle du cycle cellulaire (Cf. C III 1 a) et d'empêcher la prolifération des cellules ayant des dommages à l'ADN. TIPRL-1 inhibe PP2A qui déphosphoryle les protéines phosphorylées sous la dépendance de ATM/ATR, ce qui permet une réponse correcte aux dommages à l'ADN (McConnell, 2007) (Figure 16b). TIP41 (TIPRL-1) interagit avec Tap42 (α 4) chez la levure et empêche alors la fixation de SIT4 (PP6) (Jacinto, 2001). Cependant, chez les mammifères cette interaction n'est pas directe et nécessite la fixation à PP2Ac (Smetana, 2007).

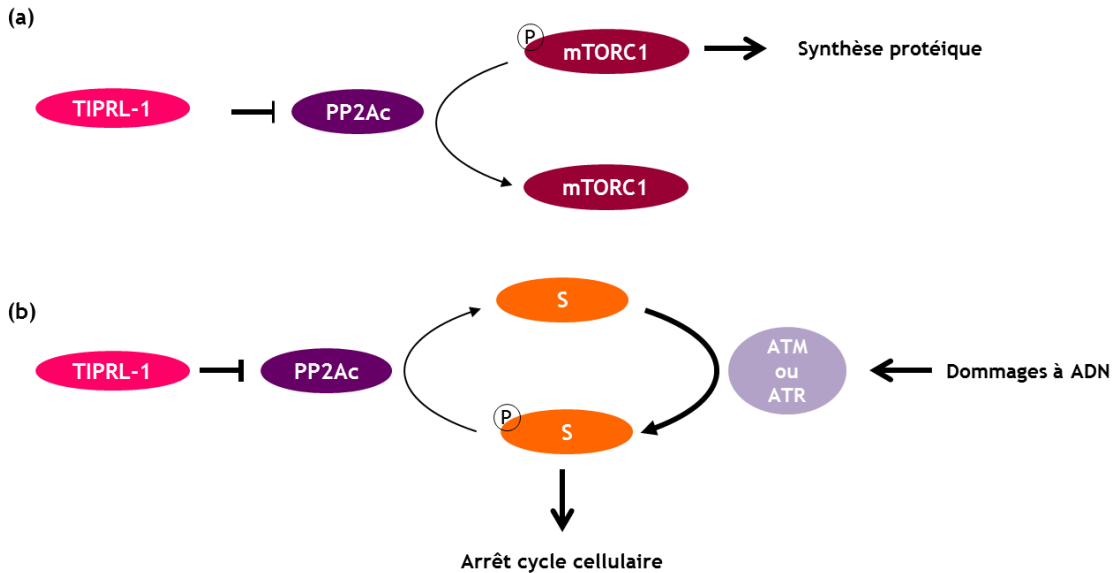


Figure 16 : Schématisation du rôle de TIPRL dans la synthèse protéique et la réponse aux dommages à l'ADN. S signifie substrat.

f. $\alpha 4$

Cette protéine joue plus un rôle de protéine chaperonne que de régulateur. En effet, elle permet la stabilisation de PP2A et empêche sa dégradation. Elle joue le même rôle auprès des autres membres du groupe PP2A, c'est-à-dire PP4 et PP6.

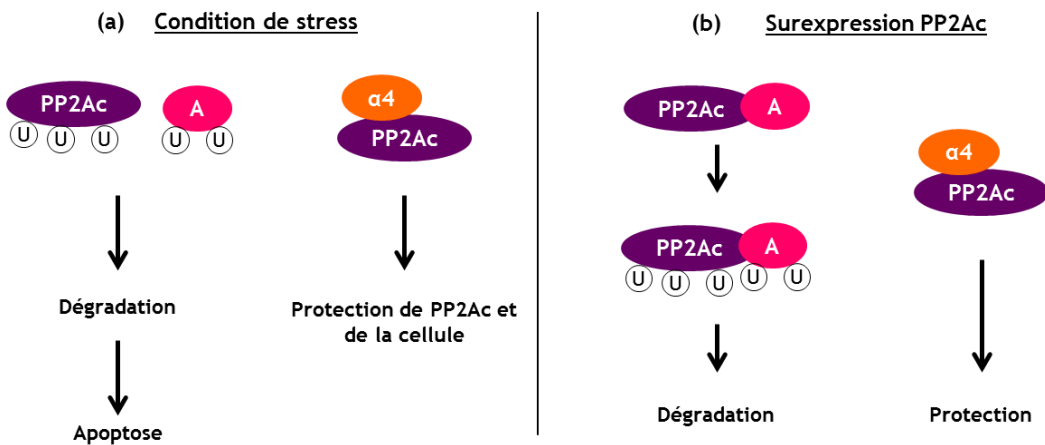


Figure 17 : Illustration du rôle de chaperonne de $\alpha 4$. (a) En condition de stress, $\alpha 4$ empêche l'ubiquitinylation de PP2Ac et donc sa dégradation et l'entrée en apoptose de la cellule. U signifie Ubiquitine. (b) Lors d'une surexpression de PP2Ac, seuls les complexes PP2Ac/ $\alpha 4$ ne seront pas dégradés. U signifie Ubiquitine.

En effet, la déplétion de $\alpha 4$ entraîne la dégradation de PP2Ac, PP4 et PP6 *in vivo* (Kong, 2009). $\alpha 4$ interagit avec PP2Ac lorsque celle-ci est néo-synthétisée ou en conditions de stress. Environ 2% de PP2Ac sont fixés à $\alpha 4$ (Di Como, 1996). Ce complexe

PP2Ac/ α 4 ne montre que peu d'activité phosphatase *in vitro* envers divers substrats (Kong, 2009). Par contre, bien qu' α 4 maintienne PP2Ac inactive, elle permet la formation des différentes holoenzymes actives de la PP2A. En conditions de stress, PP2Ac interagit préférentiellement avec la protéine α 4 plutôt qu'avec la sous-unité A qui est un partenaire de PP2Ac en conditions normales. En condition de stress, la sous-unité A est rapidement ubiquitinylée conduisant à sa dégradation. En l'absence d' α 4, la PP2Ac est également ubiquitinylée et la cellule entre en apoptose *via* des voies de signalisation dépendantes de c-JUN et de p53. Ainsi α 4 protège effectivement PP2Ac de la dégradation mais protège également la cellule contre l'apoptose (Kong, 2009) (Figure 17a). De même, dans un contexte de surexpression, la PP2Ac néo-synthétisée interagit avec la protéine α 4 ce qui empêche son ubiquitinylation et donc sa dégradation (Figure 17b). Cette protection contre la dégradation est spécifique de α 4, car si PP2Ac est surexprimée et se lie avec la sous-unité A, les complexes PP2A_D sont dégradés. De plus, α 4 permet de réguler la réponse aux dommages à l'ADN induits par un stress.

g. PTPA

Isolé à partir de muscle squelettique de lapin et d'ovocyte de xénope, le PhosphoTyrosyl phosphatase Activator (PTPA) a été caractérisé comme un activateur de PP2A (Cayla, 1990). Il est codé chez l'homme par un gène unique (*ppp2r4*) et son épissage alternatif permet l'expression de sept isoformes dont quatre sont actives (Janssens, 2000). Chez la levure, il est codé par deux gènes (*rrd1* et *rrd2*) qui permettent l'expression de deux isoformes (YPA1 et YPA2) ayant des propriétés différentes. En effet, YPA1 interagit avec la PP4 et la PP6 de levure (respectivement PPH3 et SIT4) tandis qu'YPA2 interagit avec les 2 isoformes de PP2A (PPH21 et PPH22) avec une préférence pour PPH21. Les deux isoformes interagissent directement avec la PP2Ac sans aucune autre sous-unité chez la levure (Van Hoof, 2005).

Le premier rôle décrit de PTPA est un rôle activateur de l'activité tyrosine phosphatase de PP2A_D aux dépens de son activité sérine/thréonine phosphatase. En effet, sa fixation à PP2A_D en présence d'ATP diminue l'activité sérine/thréonine phosphatase de la PP2A mais augmente son activité tyrosine phosphatase *in vitro* (Cayla, 1990 ; Van Hoof, 1994). De plus, PTPA augmente l'activité ATPasique de PP2A (Van Hoof, 1994 ; Chao, 2006). Une étude chez la levure *in vivo* montre, au contraire, que la déplétion en PTPA augmente l'activité tyrosine phosphatase et que PTPA permet une spécificité de substrat pour les sérines et les thréonines phosphorylées (Fellner, 2003). Plus récemment, il a été montré que PTPA en présence d'ATP-Mg²⁺ réactive l'activité sérine/thréonine phosphatase du complexe inactif PP2Ac/PME-1 (Longin, 2004). Les auteurs ont de ce fait proposé de modifier le nom de PTPA en phosphatase two A phosphatase activator. Il a été confirmé que PTPA activait également PP2A par un autre mécanisme. En effet, PTPA a un rôle de peptidyl-prolyl cis/trans-isomérase (PPIase) sur la proline 190 (P190) de la PP2Ac (Figure 11) activant de ce fait la PP2Ac (Jordens, 2006).

Le PTPA humain a été cristallisé (Chao, 2006 ; Leulliot, 2006 ; Magnusdottir, 2006). Néanmoins, ces trois études proposent des structures différentes. En effet, alors que Magnusdottir *et al.* et Leulliot *et al.* décrivent une structure contenant respectivement

treize ou quatorze hélices α , Chao *et al.* obtiennent une structure contenant dix-sept hélices α et quatre petits feuillets β (Chao, 2006). Chao *et al.* ont, grâce à cette cristallisation, identifié six résidus impliqués dans l'interaction de PTPA à PP2A chez l'homme. Il s'agit des résidus valines en position 209 et 281, acide glutamique en position 270, glycine en position 290, méthionine en position 294 et lysine en position 302 (V209, E270, V281, G290, M294 et K302). Les sites de fixation de l'ATP sont situés dans des zones très conservées identifiées par Van Hoof *et al.* (Van Hoof, 1998).

h. Autres régulateurs

PP2A peut interagir avec de nombreux autres partenaires cellulaires moins spécifiques tels que des protéine kinases, des récepteurs ou encore des facteurs de transcription (pour revue, (Eichhorn, 2009 ; Guernon, 2011)). Certains seront décrits dans la suite de ce manuscrit.

4. Les toxines naturelles

PP2A a été identifiée initialement grâce à sa capacité à être inhibée par l'acide okadaïque, une toxine naturelle issue d'un dinoflagellé marin, et plus particulièrement sa plus grande sensibilité à cette toxine en comparaison à PP1 (IC_{50} de 0.1-0.3 contre 15-50 pour PP1) (Bialojan, 1988). Depuis, un certain nombre d'autres toxines naturelles capables d'inhiber l'activité des sérine/thréonine phosphatases ont été découvertes ayant chacune des spécificités pour l'une ou l'autre des phosphatases (Tableau 7). Les inhibiteurs les plus efficaces de la PP2A sont l'acide okadaïque, la microcystine-LR et la nodularine issues de cyanobactéries, la calyculine A purifiée à partir d'une éponge marine et la fostriecine issue de *Streptomyces pulveraceus*. Cependant, à part la nodularine qui est spécifique de la PP2A, les autres toxines sont capables d'inhiber d'autres phosphatases, souvent PP4 qui est de la même famille que PP2A et parfois PP1 (Swingle, 2007) (Tableau 7).

Tableau 7 : Effet des toxines naturelles sur l'activité des différentes sérine/thréonine phosphatases. ND : non déterminé. D'après (Swingle, 2007) (Mitsubishi, 2001).

Inhibition de l'activité sérine/thréonine phosphatase (IC_{50} nM)						
Composé	PP1	PP2A	PP2B	PP4	PP5	PP7
Acide okadaïque	15-50	0.1-0.3	>4 000	0.1	3.5	>1 000
Microcystine-LR	0.3-1	<0.1-1	>1 000	0.15	1	>1 000
Nodularine	2.4	0.3	>1 000	ND	>4	>1 000
Calyculine A	0.4	0.25	>1 000	0.4	3	>1 000
Tautomycine	0.23-22	0.94-32	>1 000	0.2	10	ND
Tautomycétine	1.6	62				
Canthadrine	1 100	194	>10 000	50	600	ND
Fostriecine	45 000-58 000	1.5-5.5	>100 000	3	50 000-70 000	ND

III. Rôle de PP2A

PP2A est impliquée dans de nombreux processus cellulaires grâce au nombre important de sous-unités et de protéines régulatrices, avec parfois des effets complètement différents selon la composition de l'holoenzyme. En fait, on ne peut pas parler du rôle de PP2A mais plutôt du rôle des PP2A en fonction de leur composition.

1. Implication de PP2A dans la régulation du cycle cellulaire

a. Quelques rappels sur le cycle cellulaire chez les eucaryotes

Le cycle cellulaire des eucaryotes est complexe et extrêmement bien régulé afin d'éviter la prolifération de cellules anormales pouvant conduire à des dégénérescences cellulaires et/ou des pathologies (cancers ...).

Le cycle cellulaire eucaryote se déroule en deux grandes étapes : l'interphase et la mitose. L'interphase est une phase de préparation de la cellule mère à sa division prochaine tant au niveau de la préparation du matériel génétique qu'au niveau de la synthèse de la machinerie nécessaire pour la mitose proprement dite. L'interphase est subdivisée en 4 phases : la phase G₀ qui est une phase de quiescence de la cellule, la phase G₁ ou phase de croissance de la cellule, la phase S ou phase de réplication de l'ADN et enfin la phase G₂ ou phase de préparation de la mitose (Figure 18). Il est intéressant de voir qu'au cours de l'interphase, on observe des phases intermittentes de synthèse d'ADN (phase S), tandis que la synthèse de l'ARN et des protéines se déroule tout au long de l'interphase. Par contre la synthèse des protéines qui contrôlent l'entrée dans les différentes phases est cyclique.

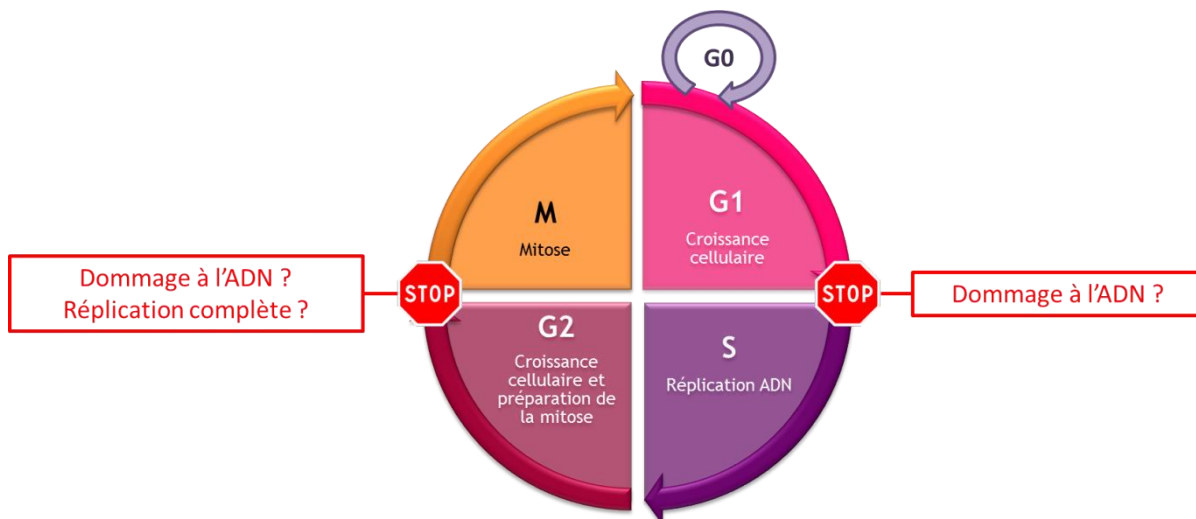


Figure 18 : Schématisation du cycle cellulaire chez les eucaryotes.

La mitose est la phase de division cellulaire proprement dite qui permet l'obtention de deux cellules filles à partir d'une cellule mère. Elle se compose de 4 phases : la prophase durant laquelle on observe la disparition de l'enveloppe nucléaire et

la condensation des chromosomes, les chromatides sœurs vont ensuite s'aligner sur le plan équatorial du fuseau mitotique au cours de la métaphase, puis être séparées de part et d'autre de ce plan équatorial vers les pôles lors de l'anaphase. Enfin, les chromosomes se décondenseront, l'enveloppe nucléaire se reformera et les cellules filles seront créées par cytotéiérèse au cours de la télophase (Figure 19).

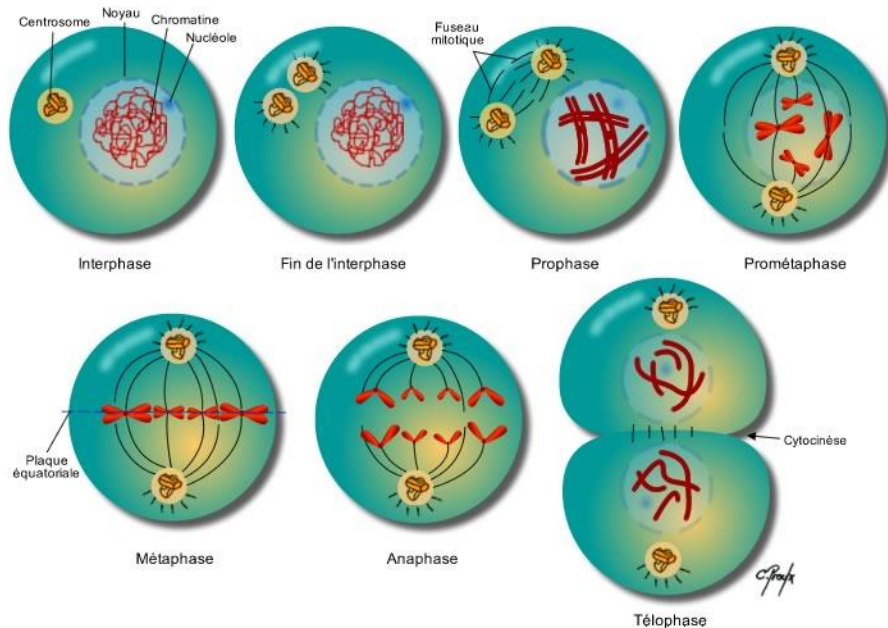


Figure 19 : Schématisation de la mitose.

Au cours de ce cycle cellulaire, le passage d'une phase à une autre est finement régulé par des points de contrôle afin d'empêcher la prolifération de cellules anormales ou dont le déroulement d'une phase se serait mal passé. Il existe deux points de contrôle principaux : la transition G1/S et la transition G2/M. Le contrôle de la transition G1/S permet d'empêcher la réplication de l'ADN lorsque celui-ci est lésé, tandis que le contrôle de la transition G2/M empêche les cellules n'ayant pas fini de répliquer leur ADN ou qui présentent un défaut dans leur ADN, d'entrer en mitose (Figure 18). Le passage de ces deux points de contrôle est indispensable et la bonne mise en place de ceux-ci est la condition *sine qua none* d'une multiplication cellulaire normale.

Le déroulement de chaque étape du cycle cellulaire et du contrôle de ces étapes est régulé par un certain nombre de protéines, notamment les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK), qui sont elles-mêmes régulées par des modifications post-traductionnelles et surtout les phosphorylations/déphosphorylations. PP2A est l'un des acteurs de la régulation du cycle cellulaire, notamment en régulant les transitions.

b. Le rôle de PP2A dans la régulation de la transition G1/S

Le rôle de PP2A dans la transition G1/S diffère selon l'holoenzyme étudiée et le modèle. En effet, plusieurs études montrent que certaines PP2A activent la transition

G1/S tandis que d'autres inhibent cette transition. Les premières études montrent que PP2A active la transition G1/S. En effet, l'inhibition de PP2A bloque la transition G1/S par la déphosphorylation de pRB. pRB est une protéine qui est inactivée par déphosphorylation totale par PP1 ou par hyperphosphorylation via les CDK (CDK2/CDK4 et CDK6) (Figure 20). Cette protéine, lorsqu'elle est active, inhibe des facteurs de transcription et empêche la transition G1/S. L'inhibition de PP2A empêche l'expression des CDK qui permettent cette hyperphosphorylation et augmente l'expression des inhibiteurs de CDK comme p27 ou p21. Ainsi, pRB est maintenue active (Yan, 1999) (Figure 20). De plus, PP2A induit l'expression de CDC2 et de la cycline A qui sont indispensables à la progression en phase S (Schonthal, 1993). Dans les cellules transformées au contraire, l'inhibition de PP2A induit l'expression des cyclines A et B et de CDC2 (You, 1995). De plus, PP2A permet le recrutement de la protéine CDC45 dans le complexe de pré-réplication qui permet lui-même le recrutement de l'ADN polymérase et la réplication de l'ADN et donc l'entrée en phase S (Chou, 2002).

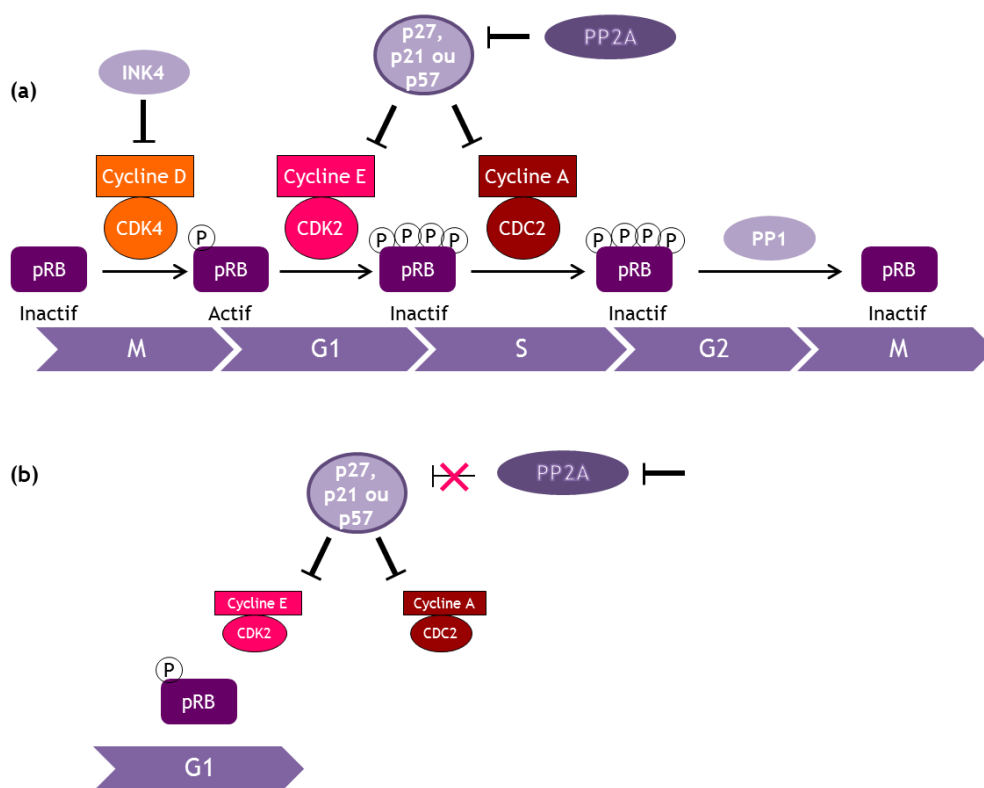


Figure 20 : Illustration de l'activation de la transition G1/S par PP2A d'après (Schonthal, 1993 ; Yan, 1999). (a) Régulation de pRB au cours du cycle cellulaire. (b) Lorsque PP2A est inhibée, le cycle est bloqué en phase G1 car il y a diminution de l'expression des CDK et des cyclines et une augmentation de l'expression de p27 et p21.

Contrairement aux études citées précédemment, Lee *et al.* montrent que PP2A_{T56} inhibe la transition G1/S (Lee, 2010). En effet, dans les cellules NIH3T3, PP2A associée aux sous-unités B56γ2 ou B56γ3 déphosphoryle p27. Or, la réplication de l'ADN qui a lieu durant la phase S est réprimée durant la phase G1 notamment par la protéine p27. Cette

dernière inhibe la kinase CDK2 en empêchant sa phosphorylation activatrice par la kinase CAK (CDK activating kinase). CDK2 ainsi inhibée ne peut activer les facteurs de transcriptions E2F empêchant ainsi la réplication de l'ADN. La phosphorylation de p27 sur sa thréonine 187 va entraîner sa dégradation et donc une levée de l'inhibition de CDK2 débutant ainsi la réplication de l'ADN et par conséquent l'entrée en phase S (Lee, 2010) (Figure 21).

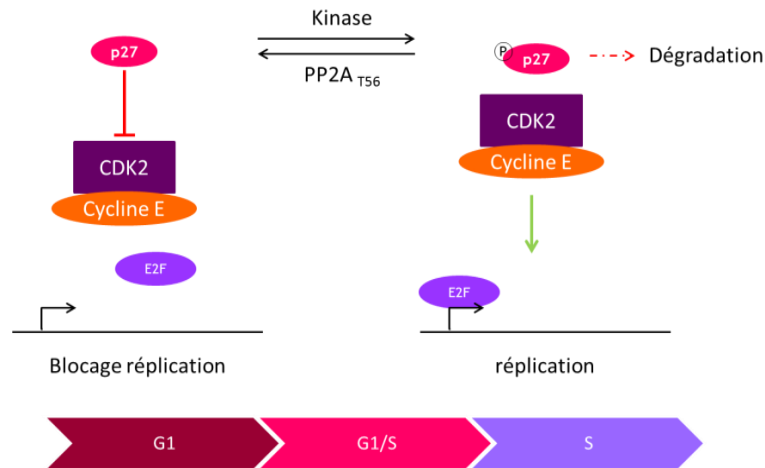


Figure 21 : Schématisation de l'inhibition de la transition G1/S par PP2A_{T56} d'après (Lee, 2010).

c. Implication dans la mitose

i. Transition G2/M

Chez les eucaryotes, l'implication de PP2A dans l'entrée en mitose est complexe et se fait à plusieurs niveaux. L'entrée en mitose est régulée par le MPF (Mitogen promoting factor) qui est composé de la CDK1 et de la cycline B. Ce complexe est inactivé en phase G2 par deux phosphorylations inhibitrices sur la thréonine 14 et la tyrosine 15 de CDK1, ces phosphorylations étant catalysées par les kinases WEE1 et MYT1 (Mueller, 1995). PP2A_{T55δ}, en déphosphorylant WEE1, la maintient dans une forme active capable d'inhiber CDK1 (Figure 22a). De plus, la phosphatase CDC25 qui permet de déphosphoryler CDK1 est séquestrée par les protéines 14.3.3 grâce à la déphosphorylation de la thréonine 138 de CDC25 par PP2A_{T56δ} activée par la phosphorylation de sa sous-unité B par CHK1 (Margolis, 2006). L'activation de la CDK2 au cours de la transition G2/M active CDC25 qui va alors se dissocier de ses protéines chaperonnes. CDC25 va ainsi pouvoir déphosphoryler CDK1 et donc l'activer (Figure 22b). Ce dernier pourra alors activer Greatwall qui activera par phosphorylation les protéines ARPP19 et ENSA qui vont inhiber PP2A_{T55} (Gharbi-Ayachi, 2010 ; Mochida, 2010) (Figure 22c). Ainsi PP2A ne pourra plus activer WEE1 et inhiber CDC25. De plus, CDK1 va inhiber directement les kinases WEE1 et MYT1. Ainsi par ces divers mécanismes (rétrocontrôles direct et indirect), le MPF sera pleinement actif et la cellule pourra entrer en phase de mitose (Figure 22d). En résumé, l'activité de PP2A bloque la transition G2/M.

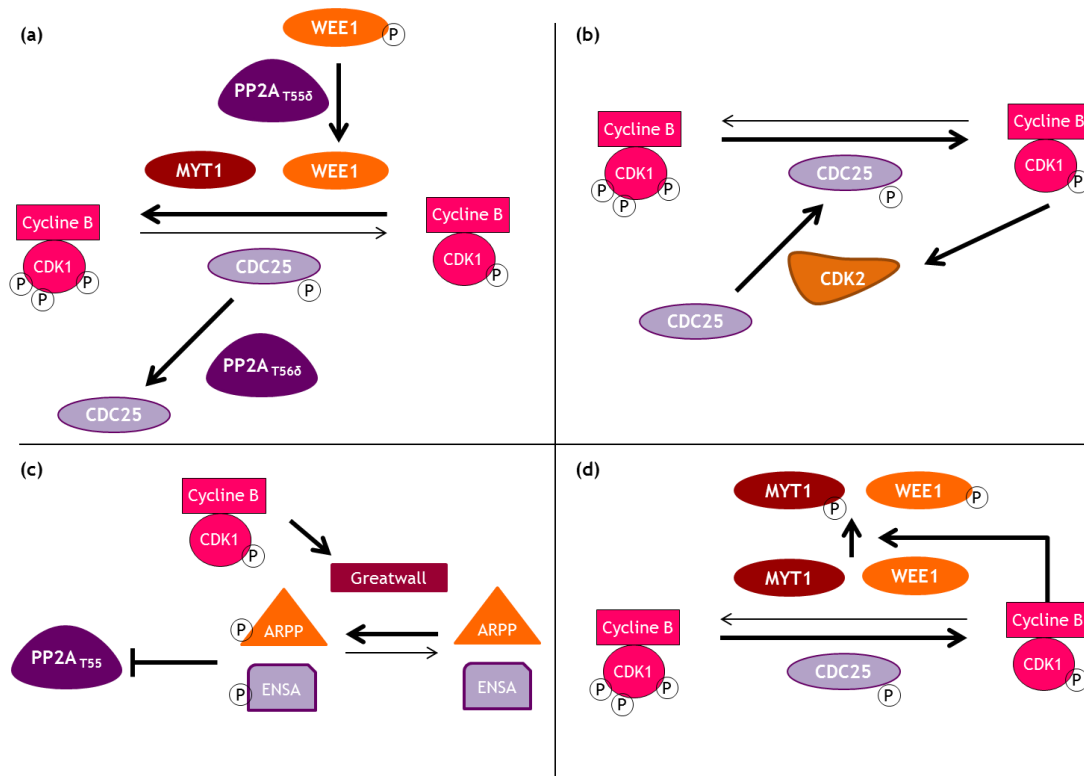


Figure 22 : Régulation de la transition G2/M. (a) Lors de la phase G2, le MPF (Cycline B/CDK1) est maintenu inactif (hyperphosphorylé) sous l'action de MYT1 et WEE1 activé lui par PP2A_{T556} et par l'inhibition de CDC25 par PP2A_{T566}. (b) Lors de la transition G2/M, CDK2 est activée et va à son tour activer CDC25 ce qui entraînera l'activation du MPF qui pourra alors activer CDK2 et permettre la mise en place d'un rétrocontrôle. (c) L'activation du MPF va également phosphoryler et activer Greatwall qui va phosphoryler ARPP et ENSA qui pourront alors inhiber PP2A_{T55}. Cela entrainera (d) l'activation complète de CDC25 et de WEE1 qui sera, avec MYT, inhibé par CDK1. Le MPF sera alors pleinement actif et la cellule entrera en mitose.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le rôle de PP2A est un peu différent. En effet, dans cet organisme, contrairement aux autres eucaryotes, l'activation de l'orthologue de CDC25 (MIH1) et l'inhibition de l'orthologue de WEE1 (SWE1) par PP2A_D/CDC55 ne semblent pas impliquées dans la transition G2/M (Booher, 1993 ; Yang, 2000). Cependant, Rossio *et al.* et Juanes *et al.* montrent que l'inhibition de CDC25 (MIH1) ou de WEE1 (SWE1) bloque cette transition (Rossio, 2011 ; Juanes, 2013). Bien que *S. cerevisiae* possède des orthologues des endosulfines (IGO1 et IGO2) et un orthologue de Greatwall (RIM15) qui inhibent PP2A_D/CDC55 *in vitro*, ces protéines activent PP2A_D/CDC55 *in vivo* (Juanes, 2013). Or, chez *S. cerevisiae* contrairement aux autres eucaryotes dont *Schizosaccharomyces pombe*, PP2A_D/CDC55 induit la transition G2/M (Lin, 1995 ; Evans, 1997). Juanes *et al.* ont montré que IGO1 et IGO2 permettent la translocation au cytoplasme de PP2A_D/CDC55 induisant ainsi la transition G2/M (Juanes, 2013). De même, les protéines ZDS1 et ZDS2 (Zillion different screens) induisent la séquestration de PP2A_{T55} dans le cytoplasme lors de la phase M. Dans le cytoplasme, cette holoenzyme séquestrerait WEE1 (SWE1) dans le cytoplasme, contenant des inhibiteurs de WEE1, conduisant à l'inhibition de WEE1 (SWE1) et donc à l'activation du MPF (Rossio, 2011).

ii. Séparation des chromatides sœurs

Au cours de la prophase et de la prometaphase, les chromatides sœurs vont se dissocier partiellement restant liées au niveau des centromères. La protéine PLK1 (polo-like kinase 1) va phosphoryler la sous-unité SA des cohésines impliquées dans la cohésion des chromatides sœurs et permettre ainsi de dissocier les bras des chromosomes. Au niveau du centromère par contre, la protéine shugoshin 1 (SGO1) va recruter PP2A_{T56} pour contrebalancer l'action de PLK1 jusqu'à l'anaphase (Kitajima, 2006 ; Riedel, 2006 ; Tang, 2006) (Figure 23). Ainsi, les chromatides resteront associées uniquement au niveau de leur centromère, leurs donnant la forme de X bien connue, et pourront par ce biais s'attacher au fuseau mitotique.

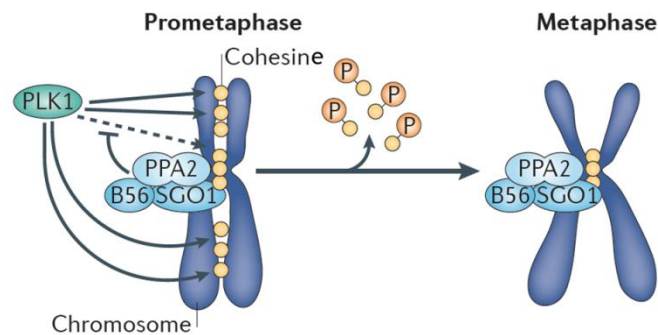


Figure 23 : Rôle de PP2A_{T56} dans la séparation des chromatides sœurs (d'après (Wurzenberger, 2011)).

iii. Sortie de mitose

À la fin de la mitose dans les cellules mammifères, l'ubiquitine ligase APC/C (Anaphase-promoting complex/cyclosome) va ubiquitinyler la cycline B et les sécurines conduisant à leur dégradation. Ainsi, le MPF sera inactif, permettant la sortie de mitose et les séparases, préalablement inhibées par les sécurines, pourront cliver les liaisons entre les cohésines et permettre la séparation totale des chromatides sœurs à l'anaphase. De plus, Greatwall et ENSA sont déphosphorylées réactivant de ce fait PP2A_{T55}.

Chez la levure, la sortie de mitose est contrôlée par CDC14. Cette phosphatase est inhibée par NET1 et CFI1. Ces deux inhibiteurs sont actifs lorsqu'ils sont déphosphorylés par PP2A_{T55}. La phosphorylation par CDK1 et l'inhibition de PP2A_{T55} par ZDS1 et ZDS2, certainement par translocation au cytoplasme, entraînent l'activation de CDC14 durant l'anaphase permettant la sortie de mitose (Rossio, 2011).

d. Implication dans la méiose

Au cours de la métaphase I, PP2A_{T55} entraîne la séquestration et donc l'inhibition de CDC14 *via* NET1 et CFI1. Lors de l'anaphase I, les chromatides sœurs seront séparées sauf au niveau des centrosomes grâce à l'action de PP2A_{T56} qui, comme durant la mitose, contrebalance le rôle de PLK1. De plus, les séparases vont inhiber PP2A_{T55} ce qui relâchera CDC14 qui induira la formation du fuseau mitotique autour de chaque chromosome individualisé au cours de la méiose I. En métaphase II, PP2A_{T55} entraîne à nouveau la

séquestration de CDC14 et B55 empêche la formation des complexes PP2A_{T56} protégeant les centrosomes des séparases. De plus, I2^{PP2A} va inhiber PP2Ac permettant l'action des séparases (Chambon, 2013). Ainsi, les chromatides sœurs vont se séparer et l'inhibition à l'anaphase II de PP2A_{T55} par les séparases entraîne la libération de CDC14 et la sortie de méiose.

2. PP2A dans l'apoptose

Le rôle de PP2A dans l'apoptose ou mort cellulaire programmée semble différer d'un organisme à l'autre. En effet, PP2A est pro-apoptotique chez les mammifères et anti-apoptotique chez la drosophile. PP2A agit au niveau de la voie intrinsèque ou mitochondriale de l'apoptose, l'autre voie étant la voie des récepteurs de mort. La voie intrinsèque est activée par des drogues, les UV, les dommages à l'ADN ou encore la privation en facteurs essentiels. L'un des acteurs principaux de cette voie de l'apoptose est la protéine BCL-2 (B cell Leukemia protein-2). Cette protéine est anti-apoptotique et empêche l'activation des caspases. Les caspases sont des protéases qui clivent un grand nombre de substrats tels que des kinases, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN mais également BCL-2 et leurs clivages entraînent l'apoptose.

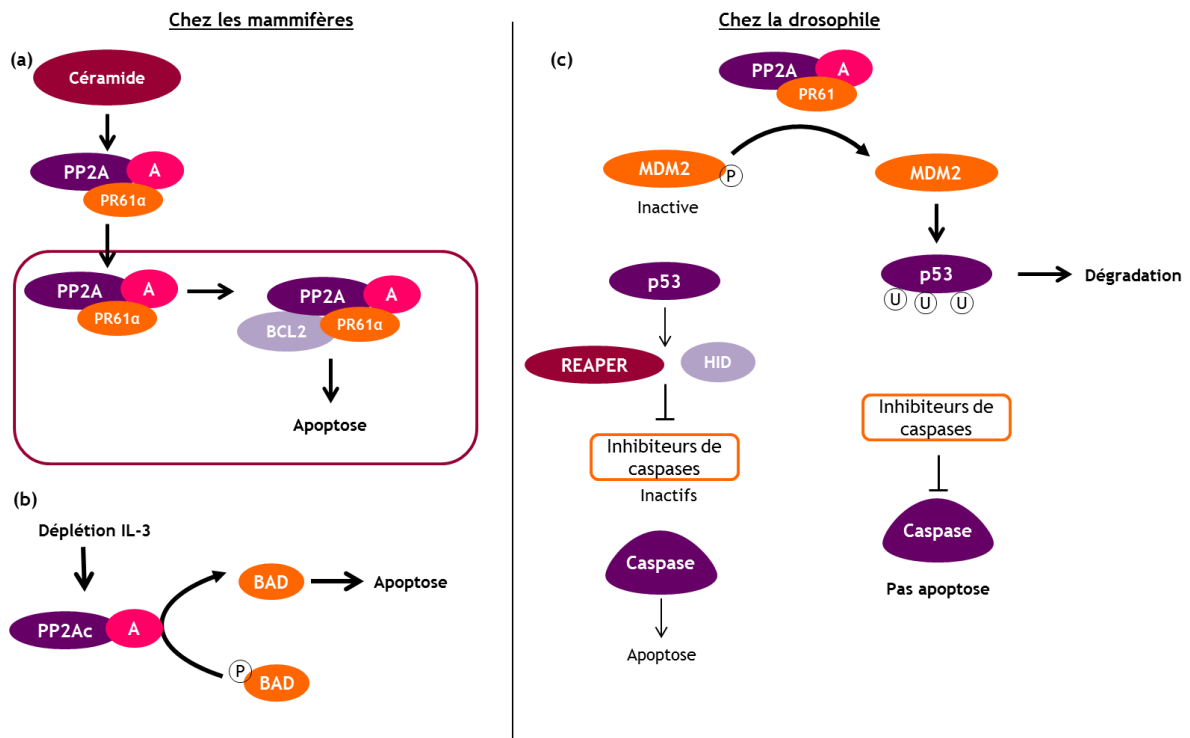


Figure 24 : Rôle de PP2A_{T61} dans l'apoptose. Chez les mammifères, PP2A est pro-apoptotique. (a) En effet, les céramides transloquent PP2A_{T61α} à la mitochondrie où elle séquestrera BCL-2 et induira l'apoptose. (b) De même, la déplétion en IL-3 du milieu induit l'activation de BAD qui va initier l'apoptose. (c) Chez la drosophile au contraire, PP2A_{T61} est anti-apoptotique. L'apoptose est induite par l'inactivation de MDM2. En effet, lorsque MDM2 est inactivé par phosphorylation, p53 peut alors activer les protéines REAPER et HID qui inhibent les inhibiteurs de caspases. Ceux-ci seront alors inactifs et les caspases pourront induire l'apoptose. PP2A_{T61}, elle va activer MDM2 qui conduira à la dégradation de p53 et donc à l'inhibition de l'apoptose.

Chez les mammifères, les céramides qui sont les seconds messagers dans la signalisation de l'apoptose, activent PP2A_{T61α} et induisent sa translocation à la membrane mitochondriale. Là, PP2A se fixe sur la protéine anti-apoptotique BCL-2 et l'inhibe (Deng, 1998 ; Galadari, 1998 ; Ruvolo, 1999 ; Ruvolo, 2002) (Figure 24a). Dans un milieu déplété en IL-3, PP2A déphosphoryle BAD qui est une protéine pro-apoptotique de la famille BCL-2 (Figure 24b). Enfin, suite à une activation des caspases par un signal apoptotique, la caspase 3 clive la sous-unité A. PP2Ac libérée est très active et induit l'apoptose (Santoro, 1998).

Chez la drosophile, il semblerait au contraire que l'hétérotrimère PP2A_{T61} soit anti-apoptotique. La cycline G1 recrute PP2A_{T61} pour déphosphoryler MDM2 (Murine double minute 2), une ubiquitine ligase. Celle-ci va alors ubiquitinyler le facteur de transcription p53 et donc induire sa dégradation (Okamoto, 2002). De ce fait, les protéines REAPER et HID ne seront pas transcrites et incapables de séquestrer les inhibiteurs de caspases. Ceux-ci vont alors inhiber les caspases et protéger la cellule de l'apoptose (Li, 2002) (Figure 24c).

3. Autres rôles de PP2A

PP2A est impliquée dans la contraction des muscles lisses en régulant l'activité des canaux calciques (pour revue (Butler, 2013)). De même, PP2A est impliquée dans le développement du cœur (Varadkar, 2014). Elle est également impliquée dans la réponse aux stimuli nocicepteurs conduisant à la diminution de la sensibilisation centrale à la douleur, dans l'induction et la maintenance de la plasticité synaptique et dans la transmission synaptique (pour revue (Wang, 2013)).

IV. PP2A et les pathologies

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses sous-unités régulatrices de PP2A sont localisées préférentiellement au niveau du cerveau et du cœur. Il n'est donc pas surprenant que PP2A soit impliquée dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou qu'elle soit associée à des problèmes cardiaques. De plus, l'implication de PP2A dans le cycle cellulaire et son contrôle en font une cible de choix dans les cancers.

1. PP2A et la maladie d'Alzheimer

PP2A est un acteur majeur dans la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée par des neurodégénérescences neurofibrillaires liées à l'absence de transmission de molécules essentielles au neurone et à la formation de plaques séniles. L'absence de transmission de composés indispensables au neurone cause la mort cellulaire. C'est l'enchevêtrement des neurofibrilles qui empêche la transmission du message. Les neurofilaments et les microtubules s'enchevêtrent *via* la protéine TAU hyperphosphorylée. Les plaques séniles sont des agrégats de peptides bêta-amyloïdes AB

issus d'un mauvais clivage de la protéine APP (Amyloid-precursor protein) et conduisent à l'apoptose du neurone.

Dans 20% des cas de maladie d'Alzheimer, on observe une augmentation de l'activité des inhibiteurs $I1^{PP2A}$ et $I2^{PP2A}$ dans le cerveau (Tanimukai, 2005 ; Chen, 2008). Or, l'augmentation de l'activité des deux inhibiteurs conduit à l'hyperphosphorylation de TAU. De plus, $I1^{PP2A}$ induit la dégradation du cytosquelette neuronal et l'inhibition de la croissance des neurites (Saito, 1995 ; Chen, 2008), tandis que la surexpression de $I2^{PP2A}$ entraîne une neuro-dégénérescence, une augmentation de l'expression intraneuronale de A β et une aggravation de la perte de mémoire (Wang, 2010). L'expression de PME-1, enzyme déméthylant PP2A, conduit également à l'hyperphosphorylation de TAU mais aussi au clivage de l'APP induite par sa phosphorylation et donc l'accumulation de peptides A β (Sontag, 2004a ; Sontag, 2007 ; Sontag, 2008 ; Zhou, 2008). On peut également noter que la diminution de l'expression de la sous-unité B55 α au niveau des cortex frontaux et temporaux est corrélée avec une hyperphosphorylation de TAU (Sontag, 1999 ; Sontag, 2004b).

2. PP2A et les maladies cardiaques

La régulation fine du système adrénergique est importante voire essentielle dans le bon fonctionnement du muscle cardiaque et une mauvaise régulation induit des pathologies. La régulation se fait par une balance kinases/phosphatases. Par exemple, une augmentation de l'activité de la GSK-3 est liée à la mort cellulaire des cardiomyocytes dans les cas d'ischémie/reperfusion (Miura, 2009). PP2A semble impliquée dans cette régulation. Toutes les sous-unités régulatrices de PP2A, à l'exception de B55 γ , sont exprimées dans le muscle cardiaque et présentent une distribution spécifique. Les sous-unités C et A sont, par exemple, exprimées dans tout le myocyte tandis que B56 γ est présent dans le noyau et que B'' est exprimée dans les lignes Z et M des cardiomyocytes. DeGrande *et al.* montrent que dans les cas d'insuffisance cardiaque ischémique, l'expression de PP2A et de certaines de ses sous-unités régulatrices est augmentée (DeGrande, 2013). De plus, ils observent une augmentation de PP2Ac inactivée par phosphorylation sur la tyrosine 307, dans les défaillances cardiaques non ischémiques et une diminution de PP2Ac méthylée dans les insuffisances cardiaques. Ces deux modifications post-traductionnelles induisent une perte d'interaction de PP2A $_D$ avec les sous-unités B55. Le rôle exact de PP2A dans ces maladies cardiaques n'est pas encore clairement établi, bien que cette phosphatase soit impliquée dans ces pathologies (DeGrande, 2013).

3. PP2A et les cancers

La dérégulation de PP2A et de ses sous-unités est associée au développement de certains cancers. Il a été observé que la sous-unité A β est mutée dans 15% des tumeurs primaires du poumon et des carcinomes colorectaux et on observe une perte de l'hétérozygotie pour ce locus dans 30 à 50% des carcinomes généralisés (seins, poumons,

ovaires, col de l'utérus) et des mélanomes et dans 15% des lymphomes non-hodgkiniens et des leucémies lymphoïdes chroniques (Wang, 1998). La surexpression de l'inhibiteur $I2^{PP2A}$ est observée dans différentes tumeurs malignes humaines dont la tumeur de Wilms et les leucémies (Fornerod, 1995 ; Carlson, 1998).

PP2A est généralement considérée comme un suppresseur de tumeur (Janssens, 2005). Cependant, des études récentes montrent que son rôle est controversé et selon les sous-unités impliquées, on constate un effet suppresseur de tumeur ou un effet oncogénique (Eichhorn, 2009).

PP2A peut avoir un rôle suppresseur de tumeur. En effet, en réponse aux dommages à l'ADN, l'holoenzyme $PP2A_{T56Y}$ est activée et va stimuler la voie p53. $PP2A_{T56Y}$ stabilise la protéine suppresseur de tumeur p53 qui va activer la transcription de BAX, acteur de l'apoptose (Dohoney, 2004 ; Li, 2007). De même, $PP2A_{T61\alpha}$ déphosphoryle c-MYC qui sera alors dégradé et ne pourra plus induire la transformation de la cellule. Ainsi dans certains cancers, on observe l'augmentation de CIP2A qui inhibe PP2A et entraîne la stabilisation de c-MYC et la cancérisation (Junttila, 2007) (Cf. C II 3 d). $PP2A_{T55\alpha}$ joue également son rôle de suppresseur de tumeur en inhibant la kinase oncogène AKT (ou PKB), qui induit la tumorigenèse (Kuo, 2008). PP2A empêche aussi la tumorigenèse en inhibant la voie des MAP kinases qui induit la prolifération cellulaire. En effet, $PP2A_{T55Y}$ inhibe la kinase c-SRC qui active la voie MAPK (Eichhorn, 2007). De plus, $PP2A_D$ associée à PR61B ou PR61 γ peut directement déphosphoryler ERK empêchant ainsi l'activation de la transcription (Letourneux, 2006). La surexpression de $I2^{PP2A}$ augmente l'activation de c-JUN et de ERK (Al-Murrani, 1999 ; Harmala-Brasken, 2003) et l'inhibition de PP2A par $I2^{PP2A}$ est nécessaire pour la tumorigenèse de la leucémie myéloïde chronique induite par BCR/ABL. Cette inhibition est contrebalancée par le traitement à l'imatinib méthylé (Gleevec® STI571) qui inhibe l'expression de $I2^{PP2A}$ et restaure l'activité de PP2A et l'inhibition de BCR/ABL (Neviani, 2005). La régulation de la voie WNT par PP2A, entre autres, permet d'éviter la prolifération anarchique et la tumorigenèse. En effet, l'accumulation de β -caténine, substrat de WNT, est observée dans de nombreux cancers. La surexpression des sous-unités PR61 de PP2A inhibe la voie WNT (Seeling, 1999). Mais d'autres sous-unités sont également impliquées dans cette inhibition (pour revue (Eichhorn, 2009)).

PP2A peut également avoir un rôle d'oncogène. Par exemple, en réponse aux facteurs de croissance, PR55 α est recrutée par le complexe $PP2A_D/RAF1/KSR1$. RAF1 et KSR1 seront alors déphosphorylés sur des sites de fixation à la protéine 14-3-3 résultant en l'activation de la voie des MAP kinases et à la prolifération cellulaire (Adams, 2005).

4. PP2A et les virus

Un certain nombre de virus, comme les virus transformant à ADN de la famille des *papovae* et des *papillomae* ou comme le rétrovirus HTLV-1, expriment des protéines capables d'interagir avec PP2A et d'induire soit la transformation cellulaire soit l'apoptose des cellules (pour revue (Guernon, 2011)). L'apoptose des cellules va avoir

lieu dans les stades tardifs des infections virales. En effet, le virus dans les premières phases de l'infection met en place des mécanismes pour éviter l'apoptose de la cellule mais dans les phases tardives au contraire, il va induire l'apoptose pour pouvoir se propager.

Dans les infections virales à adénovirus, PP2A empêche l'apoptose de la cellule. En effet, PP2A/B55 α se lie à E4orf4 *via* B55 α , l'active et par ce biais inhibe la transcription de JUN-B, hypophosphoryle E1A et c-FOS ce qui réprime la transcription du gène E4orf4 du virus (Kleinberger, 1993). De même, E4orf4 peut se lier à une autre holoenzyme de PP2A, PP2A_D/PR61 et dans ce cas il inhibe sa transcription et induit son épissage alternatif (Kleinberger, 1993 ; Bondesson, 1996 ; Kanopka, 1998). Par contre, dans le cas des adénovirus infectant les cellules tumorales, PP2A est impliquée dans l'apoptose induite par la protéine virale E4orf4 indépendamment de la voie p53. En effet, E4orf4 se lie à la sous-unité B55 activant ainsi PP2A (Kleinberger, 1993) qui induira l'apoptose (Shtrichman, 1999 ; Marcellus, 2000).

Les *papovavirus*, eux, codent pour des antigènes impliqués dans la transformation et la réplication. Parmi ces antigènes, on peut citer l'antigène petit t du virus simien 40 (SV40) et les antigènes petit t et moyen T du polyoma virus. Ces trois antigènes sont capables de se lier à PP2A (Pallas, 1990). Les antigènes petit t et moyen T du polyoma virus favorisent l'activité tyrosine phosphatase de PP2A et la transformation de la cellule (Cayla, 1993). L'interaction de l'antigène petit t de SV40 est observée avec le dimère PP2A_D. En fait, *in vitro* il dissocie les trimères de PP2A dépendamment de la sous-unité B impliquée (Chen, 2007) et *in vivo*, il serait capable de se lier directement aux dimères néo-synthétisés et de diminuer la synthèse des sous-unités B (Sontag, 1997 ; Nunbhakdi-Craig, 2003). L'antigène petit t de SV40 inhibe PP2A (Kamibayashi, 1994) et de ce fait induit la prolifération cellulaire notamment en activant la transition G1/S, empêche l'apoptose par des voies anti-apoptotiques et induit des modifications du cytosquelette (pour revue (Sablina, 2008)).

V. PP2A chez les parasites

Malgré le rôle primordial de PP2A dans un grand nombre de processus cellulaires et de pathologies chez les eucaryotes, l'étude de cette phosphatase chez les parasites et dans les maladies parasitaires en est encore au stade embryonnaire. Cependant, les études réalisées démontrent l'importance de la protéine phosphatase de type 2A et sa régulation dans les infections parasitaires.

Chez certains parasites, l'étude du rôle de leur PP2A démontre son importance dans le développement et la survie du parasite. Par exemple, chez le protozoaire *Trypanosoma cruzi*, Gonzalez *et al.* ont montré que PP2A est impliquée dans la transformation du trypomastigote en amastigote (Gonzalez, 2003). Chez son cousin *Trypanosoma brucei*, PP2A inhibe la transition G2/M (Li, 2006) et est impliquée dans la cytokinèse et la ségrégation des génomes des organites (Das, 1994). PP2A régule chez *Giardia lamblia* la formation des kystes qui le protège contre l'environnement ainsi que la

sortie du parasite hors du kyste pour pouvoir se développer (Lauwaet, 2007). Chez le nématode *Ascaris*, PP2A est impliquée dans la motilité du sperme (Yi, 2009). En effet, le sperme d'*Ascaris* se déplace en rampant, impliquant la protrusion de la partie antérieure du ver et la rétractation de sa partie postérieure. PP2A est impliquée *via* la déphosphorylation de la protéine Major Sperm Protein (MSP) fiber protein 3 dans la rétractation de la partie postérieure du ver. L'importance de PP2A chez les parasites a incité Solano-Parada *et al.* à mettre au point un vaccin ciblant la PP2A du nématode parasite *Angiostrongylus costaricensis* (Solano-Parada, 2010). Ce vaccin s'est avéré efficace chez la souris et prévient l'infection parasitaire.

Certains parasites sont également capables de réguler l'activité de la protéine PP2A de l'hôte afin de se protéger mais également de se propager. Ainsi, l'apicomplexe *Theileria parva* exprime une caséine kinase 2 α et augmente l'activité de la CK2 α de l'hôte dans les lymphocytes des bovins qu'il infeste (ole-MoiYoi, 1993). Or, la CK2 α active PP2A qui déphosphoryle alors MEK, ce qui empêche la prolifération cellulaire et donc protège le parasite (Heriche, 1997). De même, le protozoaire *Leishmania donovani* est capable d'activer la PP2A des macrophages de l'hôte qu'il infecte. En effet, l'infection induit une augmentation de la production des céramides dans le macrophage. Ceux-ci vont activer la PKC ζ qui activera à son tour PP2A. Cela entraîne alors la déphosphorylation de PKB et de la voie des MAP kinases, notamment ERK. Tout ceci induit l'inhibition de l'activité du macrophage notamment la production d'acide nitrique et de TNF α et protège le macrophage infecté du système immunitaire (Dey, 2007 ; Kar, 2010). Enfin, *Toxoplasma gondii*, un apicomplexe, exporte au noyau de l'hôte la protéine GRA16 issue des granules denses. Cette protéine va entraîner la translocation au noyau de PP2Ac et de la sous-unité PR55 (Bougdour, 2013). Or l'holoenzyme PP2A_{T55} inhibe la transition G2/M laissant ainsi au parasite l'opportunité de se développer (Brunet, 2008 ; Molestina, 2008). Néanmoins le rôle exact de PP2A dans cet arrêt du cycle cellulaire n'a pas été vérifié.

La protéine PP2A des parasites et la régulation de la PP2A de l'hôte par les parasites semblent donc primordiales lors des infections parasitaires pour la protection du parasite et son développement.

VI. PP2A chez *Plasmodium*

Bien que PP2A soit une phosphatase majeure, peu de choses sont connues sur cette phosphatase chez *Plasmodium*.

En 1998, Yokoyama *et al.* déterminent qu'une activité phosphatase liée à PP2A existe dans le parasite *Plasmodium falciparum* mais que PP1 présente une activité plus importante (Yokoyama, 1998). De plus, ces phosphatases sont essentielles pour le parasite car leur inhibition par l'acide okadaïque et la calyculine A inhibe la croissance des parasites (Yokoyama, 1998).

Par la suite, Dobson *et al.* caractérisent la PfPP2A en purifiant l'activité phosphatase d'extrait de *P. falciparum* (Dobson, 1999). Dobson *et al.* obtiennent trois fractions dont l'une présente une activité phosphatase indépendante de la calmoduline.

Après purification de cette fraction, il s'avère que c'est un complexe de trois protéines ayant des masses moléculaires de 35, 53 et 57kDa, s'apparentant respectivement aux sous-unités catalytiques, B et A de la PP2A humaine. La PfPP2Ac possède une activité phosphatase dépendante du Mn^{2+} , elle déphosphoryle préférentiellement, comme ses homologues, la sous-unité α de la phosphorylase kinase et montre une inhibition de 50% de son activité en présence de 0,2nM d'acide okadaïque. Par micro-séquençage, ils déterminent que la PfPP2A correspond à la séquence MP03041 du centre Sanger qui correspond à l'actuelle PF3D7_0314400 présente dans la base de données des génomes de *Plasmodium* PlasmoDB (Dobson, 1999). Cette séquence présente 54,2% d'identité avec la PP2Ac de l'homme et plus de 60% avec la PPH21 de la levure. De plus, elle comporte les motifs du site catalytique des sérine/thréonine phosphatases et également le site de fixation à l'acide okadaïque.

Un inhibiteur de cette phosphatase a été identifié chez *P. falciparum*. Dénommé PfARP, cet inhibiteur est un homologue d' $I2^{PP2A}$. PfARP inhibe spécifiquement PfPP2A avec un IC50 de 8nM similaire à l'IC50 observé avec son homologue bovin (Dobson, 2003). $PfI2^{PP2A}$ est l'inhibiteur principal de PfPP2A. De même que ses homologues, il est capable d'activer AP-1 *via* c-JUN en inhibant PP2A dans des cellules de mammifères. PfARP est une protéine cytoplasmique présente à tous les stades parasitaires intra-érythrocytaires (Dobson, 2003). Cette protéine avait été décrite chez *P. berghei* (PbB7) comme étant une protéine nucléaire présente à tous les stades asexués du parasite (Birago, 1996). Il existe deux transcrits de PbB7, l'un de 1,4kb spécifique des stades érythrocytaires et l'autre de 1,8kb exprimé dans les gamétocytes (Pace, 1998). Une étude de 2005, confirme la présence des deux isoformes de cette protéine nommées PfnAPS et PfnAPL respectivement (Nucleosome assembly protein short ou long) (Chandra, 2005). Chandra *et al.* montrent que l'expression de PfnAPL est cytoplasmique tout au long du cycle érythrocytaire du parasite et dans les gamétocytes tandis que celle de PfnAPS est préférentiellement nucléaire (Chandra, 2005). Enfin, Pace *et al.* montrent que les deux variants sont en fait sous le contrôle de deux promoteurs différents, l'isoforme de 1,4kb nucléaire est exprimée dans les stades asexués, les gamétocytes, les oocinètes et l'oocyste, tandis que l'isoforme de 1,8kb est, elle, exprimée dans les gamétocytes avec une surexpression dans les gamétocytes mâles et dans les oocinètes (Pace, 2006).

Cadre et objectifs

Les phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation sont essentiels pour *Plasmodium*. En effet, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, l'interruption, l'interférence ou l'inhibition d'un certain nombre de kinases ou de phosphatases induit la mort du parasite. De plus, ces enzymes sont impliquées dans de nombreux mécanismes biologiques comme la régulation du cycle cellulaire, les mécanismes de réinvasion, la virulence du parasite et la régulation de l'activité de la cellule hôte pour permettre sa survie. La régulation de ces enzymes est donc primordiale.

L'étude de la régulation de ces protéines est de ce fait un enjeu majeur dans la compréhension de la biologie du parasite et à plus long terme dans la lutte contre le parasite. L'étude des régulateurs de phosphatases est donc cruciale. En effet, comme nous l'avons expliqué précédemment, le nombre de phosphatases est plus faible que le nombre de kinases. Cette différence est compensée par l'existence et l'activité de sous-unités ou de protéines régulatrices des phosphatases qui contrôlent l'activité, la localisation ou encore la spécificité vis-à-vis du substrat des phosphatases.

Dans ce contexte, notre laboratoire s'intéresse à l'étude de la régulation de deux phosphatases majeures de *P. falciparum* : PfPP1 et PfPP2A. Il est apparu que les régulateurs des phosphatases sont aussi importants et essentiels que les phosphatases elles-mêmes. L'étude de trois régulateurs de PfPP1, PfLRR1, PfI2 et PfI3 a montré qu'ils sont essentiels à la survie du parasite au cours du cycle érythrocytaire. En effet, l'interruption de ces gènes ne permet pas d'observer de parasite viable (Freville, 2012 ; Freville, 2013). De plus, l'interruption mécanique de l'interaction entre PfPP1 et deux de ses régulateurs, PfI2 et PfI3, par l'utilisation de peptides spécifiques dérivés de leurs motifs d'interaction, diminue la croissance parasitaire ((Freville, 2013) ; Freville *et al.* article en préparation).

En ce qui concerne la protéine phosphatase PP2A et sa régulation chez *P. falciparum*, peu d'études ont été faites. En effet, la sous-unité catalytique a été identifiée chez le parasite mais son rôle exact n'a pas été déterminé bien qu'elle semble essentielle pour le parasite (Yokoyama, 1998 ; Dobson, 1999) (Cf. Introduction C IV). Parmi les régulateurs de PfPP2A, seul l'inhibiteur PfI2^{PP2A} a été identifié et caractérisé (Cf. Introduction C IV). Ce régulateur est essentiel pour la survie du parasite car l'interruption de ce gène n'est pas viable et n'a jamais pu être observée (<http://www.pberghei.eu/index.php?rmgm=246>).

L'objectif de cette thèse est donc d'étudier la régulation de PP2A chez *Plasmodium falciparum*. Pour cela, un recensement des régulateurs putatifs de PfPP2A identifiés par des études de bio-informatique comparatives a été fait afin d'établir une vue d'ensemble des mécanismes potentiels de la régulation de PfPP2A. Trois orthologues putatifs de régulateurs, PfI1^{PP2A}, PfI2^{PP2A} et PfPTPA présentant respectivement 27%, 27,5% et 32% d'identité avec leurs orthologues humains ont été caractérisés moléculairement. Nous avons ensuite focalisé notre attention sur la caractérisation fonctionnelle de l'un d'entre eux, le PfPTPA et notamment sur son rôle dans la régulation de PP2A. Ainsi, dans un premier temps, l'interaction entre PfPTPA et PfPP2A a été vérifiée, puis des études fonctionnelles ont permis d'explorer les effets de PfPTPA sur l'activité de PP2A *in vitro* et *in vivo* dans un modèle hétérologue. Ensuite, des études sur la relation structure/fonction ont été mises en place pour déterminer les motifs essentiels à l'interaction et à l'activité de la protéine parasitaire. Enfin, des approches *in vivo*

chez le parasite et dans un modèle hétérologue nous ont permis d'appréhender son rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Au cours de cette étude, une caractéristique spécifique de la protéine parasitaire PfPTPA nous a amenés à étudier le rôle de PfPTPA dans la régulation d'une autre phosphatase : la PfPP1. Nous avons ainsi mis en place l'étude de l'interaction directe entre les deux protéines et de la régulation de PP1 par PfPTPA.

Cette étude permet d'avoir une meilleure compréhension de la régulation de la phosphatase de type 2A chez le parasite *Plasmodium falciparum* et de son rôle dans la biologie du parasite.

Résultats

A. IDENTIFICATION DES SOUS-UNITES ET DES REGULATEURS DE PP2A CHEZ *PLASMODIUM FALCIPARUM* ET ETUDES PRELIMINAIRES

I. Identification des sous-unités de PfPP2A et de ses régulateurs

Des analyses de bio-informatique comparative ont permis d'identifier dans le protéome de *Plasmodium falciparum* plusieurs sous-unités et quelques régulateurs de PP2A. Ces analyses ont été faites en alignant les séquences protéiques des diverses sous-unités sur la banque de données de *Plasmodium falciparum*, PlasmoDB (base de données génomiques et protéiques des *Plasmodiums*). Nous avons ainsi recherché des orthologues des sous-unités humaines de PP2A notamment les isoformes α et β de la sous-unité A, des orthologues des isoformes α , β , γ , et δ de la famille des sous-unités B, des orthologues des isoformes α , β , γ , δ et ϵ de la famille des sous-unités B', des orthologues des isoformes PR72, PR130, PR59 et PR48 de la famille des sous-unités B'' et des orthologues de la Striatine, de la SG2NA et de la Zinedine. Nous avons également recherché des orthologues des protéines régulatrices humaines de PP2A comme LCMT1, PME-1, $\alpha 4$, I1^{PP2A}, I2^{PP2A}, PTPA, CIP2A, ENSA, ARPP-19 et TIPRL.

Cette recherche nous a permis de retrouver la sous-unité catalytique de PfPP2A précédemment identifiée par Dobson *et al.* dans des fractions d'extrait soluble de *P. falciparum* (Dobson, 1999). Le séquençage de la partie N-terminale de la protéine identifie la protéine PfPP2A comme la protéine sous le numéro d'accèsion de PlasmoDB PF3D7_0314400 (ancien numéro d'accèsion plasmoDB : PFC0595c, ancien numéro d'accèsion du centre Sanger : MP03041).

Le génome de *P. falciparum* possède une sous-unité A, annotée comme telle dans PlasmoDB, présentant environ 20% d'identité avec son orthologue humain. En ce qui concerne les sous-unités B, une protéine s'aligne avec les sous-unités B α , B γ 2 et B δ humaines. Mais une analyse plus poussée montre que seuls les domaines WD40 s'alignent et qu'il ne s'agit donc pas d'une sous-unité B. Aucun orthologue de sous-unité B' n'a été retrouvé. Par contre, il existe un orthologue des sous-unités B'' dont la partie C-terminale s'aligne avec PR130 et PR72 et qui est annoté comme sous-unité régulatrice de PP2A dans PlasmoDB (Tableau 8).

Notre étude a également révélé que *P. falciparum* possède des orthologues des inhibiteurs I1^{PP2A} et I2^{PP2A} qui présentent 27% d'identité avec leurs orthologues humains. Cependant, bien que I2^{PP2A} soit identifié comme NAPS (Nucleosome assembly protein short isoform), l'un des autres noms de I2^{PP2A}, I1^{PP2A} n'a, quant à lui, pas été annoté. Un orthologue de PTPA a été annoté. Il présente plus de 32% d'identité avec son orthologue humain. Un orthologue de $\alpha 4$ est aussi annoté dans le protéome de *P. falciparum*, de même qu'une LCMT1 qui est connue pour méthyle PP2A (Tableau 8). L'interrogation de la banque de données PlasmoDB n'a pas permis d'obtenir une séquence orthologue à la PME-1 humaine, qui à l'inverse de LCMT1 déméthyle PP2A. La protéine PME-1 de l'homme s'aligne avec une α/β hydrolase qui présente 25% d'identité sur une zone couvrant

uniquement 25% de la protéine totale. Enfin, les régulateurs ENSA, ARPP19 et TIPRL n'ont pas d'orthologue chez *P. falciparum*.

Tableau 8 : PP2A et ses sous-unités existant chez *P. falciparum*.

Nom	Description dans PlasmoDB	Numéro d'accèsion	Couverture alignement	Identité sur l'alignement	Identité	Références
PfPP2Ac	protéine serine/threonine phosphatase, putative	PF3D7_0314400	97%	55%	54,2%	(Dobson, 1999)
PfA	PP2A sous-unité régulatrice A, putative	PF3D7_1319700	90%	25%		
PfB''	PP2A sous-unité régulatrice, putative	PF3D7_1356400	30%	31%		
PfPTPA	phosphotyrosyl phosphatase activator, putative	PF3D7_1430100	90%	32%	32,3%	(Vandomme, 2014)
PfI1	Protéine inconnue	PF3D7_1427900	65%	34%	27%	
PfI2	nucleosome assembly protein (NAPS)	PF3D7_0919000	82%	30%	26,7%	(Dobson, 2003)
PfLCMT1	leucine carboxyl methyltransferase, putative	PF3D7_1439700	83%	33%		
Pfα4	immunoglobulin-binding protein 1-related, putative	PF3D7_0724200	89%	23%		

Afin d'affiner le cadre de ce travail, nous avons mené en parallèle des études préliminaires sur les régulateurs de PP2A : I1^{PP2A}, I2^{PP2A} et PTPA. Notre choix s'est porté sur ces régulateurs car l'unique sous-unité B implique une régulation de PP2A différente de celle de ses orthologues et la présence de ces trois protéines, capables de réguler PP2A quelle que soit l'holoenzyme de PP2A, nous a amenés à nous interroger sur leurs rôles dans la régulation de PP2A. Nos études avaient pour but d'aller plus loin que Dobson *et al.* dans l'étude de l'inhibiteur 2 de PfPP2A (Dobson, 2003) notamment en étudiant les mécanismes d'interaction et de caractériser moléculairement l'inhibiteur 1 de PfPP2A et PfPTPA sur lesquels aucune étude n'avait été menée.

II. Annotation de la séquence de PfPP2A

La protéine PfPP2A identifiée par Dobson *et al.* a été micro-séquencée, ce qui a permis de déterminer qu'il s'agissait de la protéine PF3D7_0314400 (Dobson, 1999). Cependant, aucun séquençage complet ni aucune analyse de la séquence n'avait été fait. Dans le but d'annoter la séquence de PfPP2A, la séquence codante de 927 nucléotides de PfPP2A a été amplifiée par PCR sur l'ADN génomique de *P. falciparum*. La PCR a été faite sur l'ADN génomique afin de vérifier que le gène ne possédait pas d'intron. Nous avons ainsi confirmé l'absence d'intron. Par contre, nous avons observé une différence par rapport à la séquence présente dans la banque de données PlasmoDB : une guanine remplace une adénine en position 101 modifiant la lysine en position 34 en une arginine

(Figure 25). Néanmoins, la charge globale de la protéine ne varie pas puisque les deux sont des acides aminés chargés positivement.

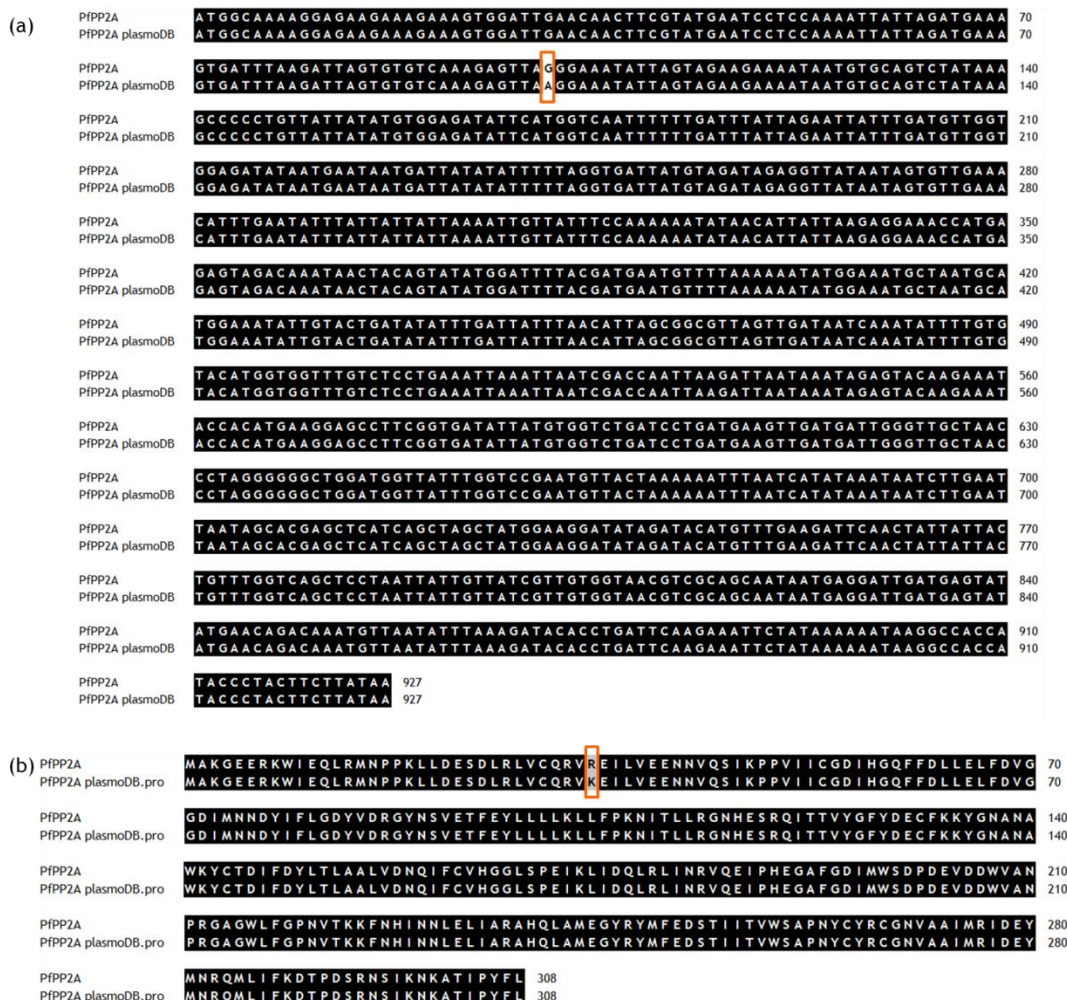


Figure 25 : Alignement des séquences nucléotidiques (a) et protéiques (b) de PfPP2A vérifiées et présentes dans PlasmoDB.

L'alignement des séquences protéiques de PfPP2A et de son orthologue humain montre une identité de séquence de 54% avec une conservation des motifs consensus du site catalytique spécifique des sérine/thréonine phosphatases qui sont GDxHG, GDxVDRG et RGNHE (Barton, 1994) (Figure 26). De plus, à l'exception de la valine en position 189 (V189), tous les acides aminés impliqués dans l'interaction avec l'acide okadaïque et la microcystine-LR sont conservés. Par contre, peu d'acides aminés connus pour être impliqués dans l'interaction avec la sous-unité A chez l'homme sont conservés (5 sur 13). Les sites de phosphorylation et de méthylation connus chez l'homme (T304, Y307 et L309 chez l'homme, respectivement T303, Y306 et L308 chez *P. falciparum*) sont conservés de même que le site de cis/trans-prolyl-isomérisation (P190 chez l'homme et P188 chez *P. falciparum*) (Figure 26). Cependant, l'étude du phosphoprotéome n'identifie pas PfPP2A comme une protéine phosphorylée *in vivo* (Treeck, 2011).

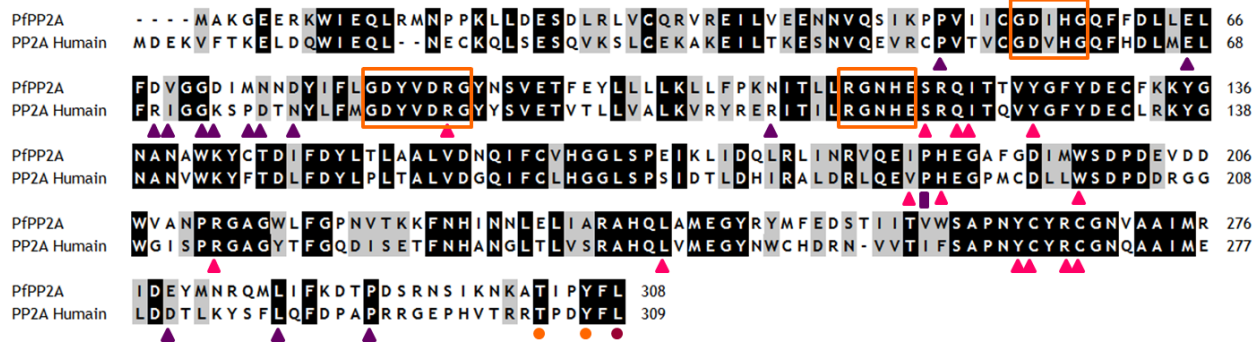


Figure 26 : Aligment des séquences humaine et plasmodiale de PP2A. Aligment des sous-unités catalytiques de PP2A de *P. falciparum* (numéro d'accèsion PlasmoDB : PF3D7_0314400) et de l'homme (numéro d'accèsion : NP_002706.1). Le site catalytique est encadré en orange. Les triangles roses représentent les acides aminés impliqués dans la fixation des toxines naturelles des phosphatases (acide okadaïque et microcystine-LR) tandis que les triangles violets symbolisent les acides aminés impliqués dans l'interaction avec la sous-unité A. La méthylation activatrice de PP2A est identifiée par un rond violet et les ronds orange représentent les sites de phosphorylation inhibitrice. Le site d'activation de PP2Ac par PTPA est symbolisé par un rectangle violet.

III. Études préliminaires sur la caractérisation des inhibiteurs I1^{PP2A} et I2^{PP2A}

1. L'inhibiteur I1^{PP2A} de *P. falciparum*

a. Annotation de la séquence de I1^{PP2A}

Dans le but de caractériser l'inhibiteur 1 de PP2A (I1^{PP2A}), nous avons tout d'abord vérifié sa séquence nucléotidique. Pour ce faire, la séquence codante de PfI1^{PP2A} (qui ne possède pas d'intron) a été amplifiée par PCR sur l'ADN génomique de *P. falciparum* avec des amorces dessinées à partir de la séquence prédite sur PlasmoDB. L'analyse de cinq clones nous a permis de confirmer la séquence codante exempte d'intron de 846 nucléotides à l'exception de la guanine en position 525 qui est une adénine. Cependant, cette modification de la séquence nucléotidique ne modifie pas la séquence d'acides aminés déduite (Figure 27).

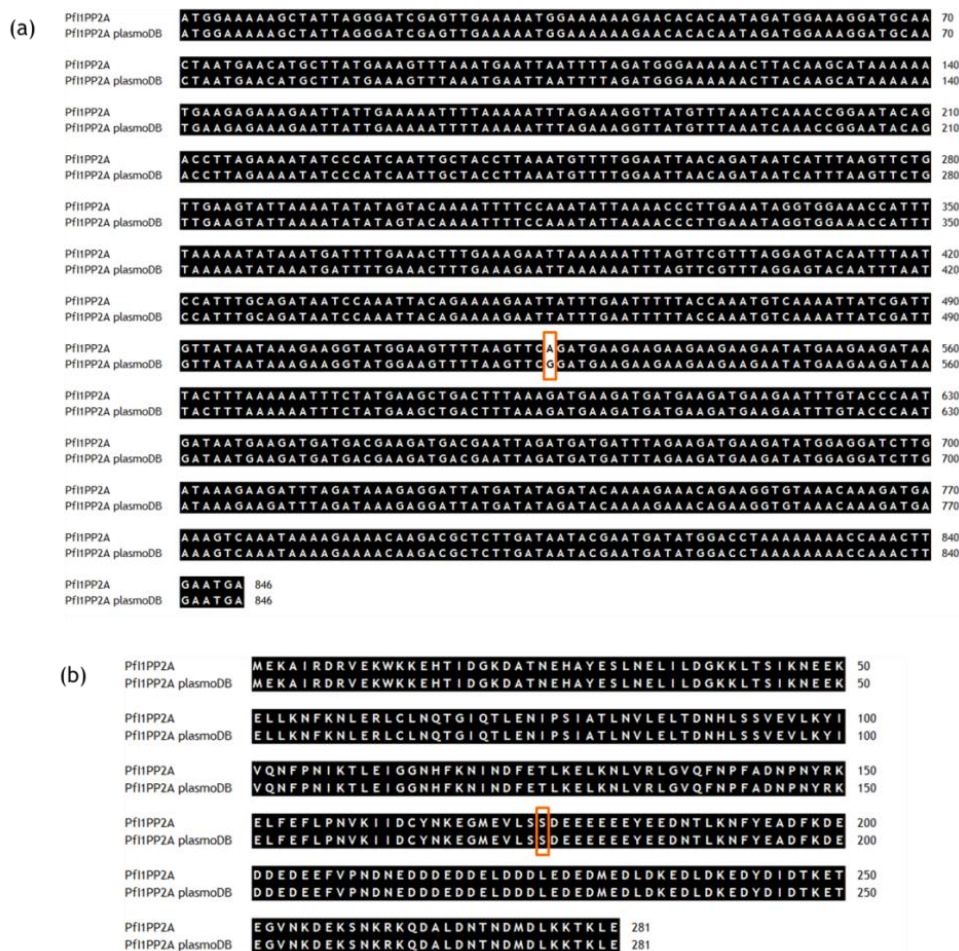


Figure 27 : Alignement des séquences codantes prédites disponibles dans PlasmODB et vérifiées de Pf11^{PP2A}

Nous avons ensuite comparé sa séquence à celle de son orthologue humain. Cette comparaison montre que les deux protéines présentent une identité de séquence de 27% (Figure 28). La protéine de *Plasmodium* est constituée de 281 acides aminés avec un poids moléculaire attendu de 33kDa, tandis que la protéine humaine est composée de 249 acides aminés pour un poids moléculaire de 28,6kDa. Les deux protéines possèdent une partie C-terminale riche en acides aminés acides. En utilisant un logiciel d'identification de motifs (www.lrrfinder.com) et en affinant manuellement, on peut également mettre en évidence dans la région N-terminale de cette protéine plusieurs motifs riches en leucine (LRR) qui permettent l'interaction protéine-protéine. La séquence consensus de ce motif est LxxLxLxxNxL, où x peut être n'importe quel acide aminé et où les L peuvent être une leucine, une valine ou une isoleucine. Un motif court (LxxLxL) est identifié et présent dans les deux protéines, trois motifs longs sont également conservés et un motif long est lui, uniquement présent chez *Plasmodium* (Figure 28). Les deux protéines sont des phosphoprotéines mais les sites de phosphorylation diffèrent. En effet, alors que la protéine I1^{PP2A} humaine est phosphorylée sur les résidus thréonine 15 et sérine 17

(Dephoure, 2008), son orthologue chez *Plasmodium* est phosphorylé sur les sérines 174 et 175 et sur la thréonine 270 (Treeck, 2011) (Figure 28).

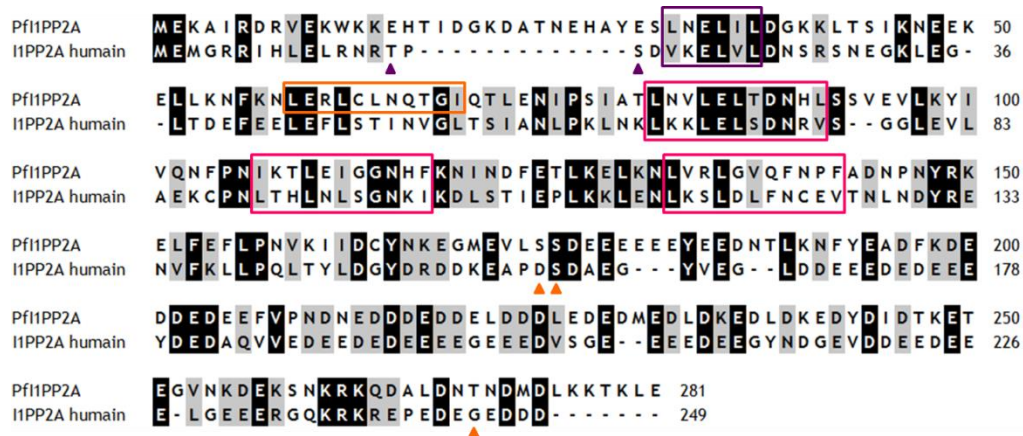


Figure 28 : Alignement des séquences protéiques de Pf11^{PP2A} et de I1^{PP2A} humain. Les séquences de Pf11^{PP2A} (PlasmoDB : PF3D7_1427900) et de I1^{PP2A} humain (NP_006296.1) sont alignées par ClustalW en utilisant le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor. Les acides aminés identiques sont surlignés en noir tandis que les acides aminés similaires sont surlignés en gris. Les cadres roses représentent les sites LRRs identifiés par le serveur LRRfinder (<http://www.lrrfinder.com/>) qui sont conservés entre les deux espèces et le cadre orange représente un domaine LRR spécifique à *P. falciparum*. Le cadre violet représente un site LRR court présent chez les deux espèces. Les triangles orange symbolisent les sites de phosphorylation sur Pf11^{PP2A} et les triangles violets représentent les sites de phosphorylation sur I1^{PP2A} humain.

b. Interaction de Pf11^{PP2A} avec PP2A et PP1

i. Étude de l'interaction avec PfPP2A

Étant donnée l'homologie de séquence de Pf11^{PP2A} avec son orthologue humain, nous avons testé la capacité d'interaction de cette protéine avec la phosphatase PP2A. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle couramment utilisé dans le laboratoire pour l'étude des interactions protéine/protéine : le double hybride en levure.

Dans ce modèle, deux souches de levures de polarités sexuelles différentes, les AH109 qui sont de polarité sexuelle MAT α et les Y187 qui sont de polarité sexuelle MAT α , sont transformées respectivement avec les vecteurs pGAD-T7 et pGBK-T7. Dans le vecteur pGAD-T7 est insérée la séquence codante de Pf11^{PP2A} fusionnée avec un épitope hémagglutinine (HA) et le domaine d'activation du facteur de transcription Gal4 (Gal4-AD). Celui-ci est également fusionné avec un signal de localisation du SV40 permettant la localisation nucléaire des protéines. Le domaine d'activation du facteur de transcription Gal4 est sous la dépendance du promoteur constitutivement actif *ADH1*. De plus, ce vecteur porte un gène rapporteur LEU2 qui permet à la levure de synthétiser elle-même la leucine (Figure 29b). Dans le vecteur pGBK-T7, c'est la séquence codante de PfPP2A ou de la laminine, qui sert de contrôle, qui est insérée. Ces séquences sont fusionnées à un épitope c-MYC et au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 (Gal4-DBD). Ce vecteur comprend également le gène rapporteur TRP1 qui permet à la levure de synthétiser le tryptophane (Figure 29a). Les deux souches de levures sont ensuite fusionnées pour obtenir des levures diploïdes contenant à la fois le vecteur pGBK-T7 et le

vecteur pGAD-T7 (Figure 29c). Cette levure diploïde est capable de se développer sur un milieu dépourvu en leucine et en tryptophane et exprime les deux protéines Pfl1^{PP2A} et PfPP2A dans son noyau. Si Pfl1^{PP2A} interagit avec PfPP2A, le Gal4-AD sera suffisamment proche du Gal4-DBD pour activer le facteur de transcription Gal4 qui pourra ainsi se fixer sur les séquences activatrices de gènes cibles dont HIS3 et LacZ. La transcription du gène HIS3 permet à la levure de synthétiser l'histidine (Figure 29d). Ainsi pour sélectionner les levures diploïdes, on observe leur capacité à se développer sur un milieu dépourvu en tryptophane et en leucine et pour étudier l'interaction elles sont étalées sur un milieu dépourvu en tryptophane, en leucine et en histidine (-LWH).

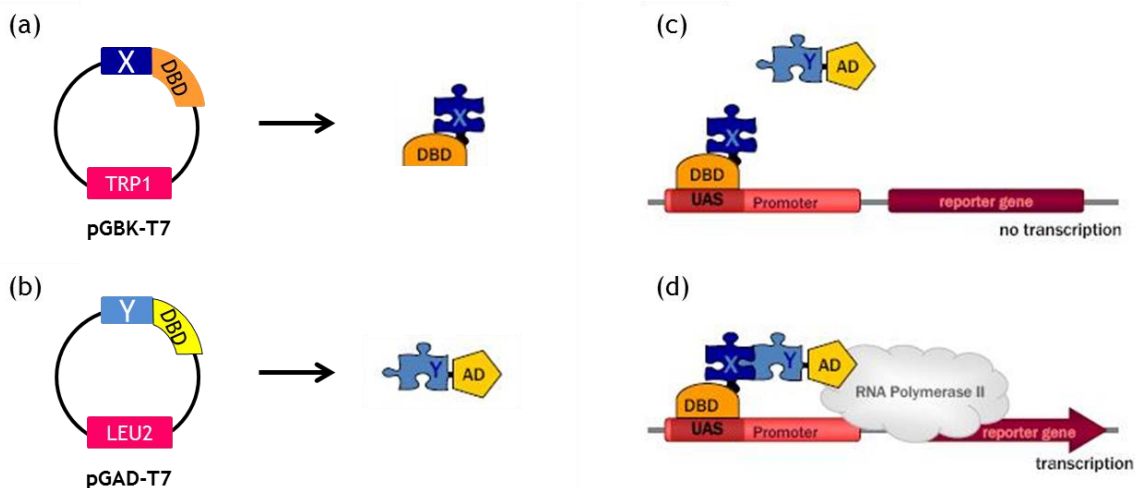


Figure 29 : Principe du double hybride de levure.

Nous avons vérifié que les levures transformées avec la construction pGAD-T7-Pfl1^{PP2A} exprimaient la protéine parasitaire. Pour cela, nous avons extrait les protéines de levures haploïdes transformées avec le vecteur pGAD-T7-Pfl1^{PP2A}. Une analyse par western-blot en utilisant un anticorps anti-HA révèle l'absence de la protéine Pfl1^{PP2A} dans les levures. Ce modèle ne nous permet donc pas d'étudier l'interaction entre Pfl1^{PP2A} et PfPP2A.

ii. Étude de l'interaction avec PfPP1

La présence de motif LRR dans la séquence de Pfl1^{PP2A} nous a permis d'envisager son interaction avec PfPP1. En effet, l'interaction de PP1 avec certains de ses régulateurs se fait *via* des motifs LRR (Ceulemans, 2002), et Katayose *et al.* montrent que la protéine I1^{PP2A} humaine peut se fixer et réguler PP1 (Katayose, 2000). Nous avons donc étudié l'interaction entre les protéines recombinantes Pfl1^{PP2A} et PfPP1 *in vitro* par un test ELISA. Au cours de cette expérience, nous avons observé que la protéine Pfl2^{PP1} interagit avec PfPP1 biotinyllée. Par contre, aucune interaction n'est décelable avec Pfl1^{PP2A} ou la BSA (Figure 30). Pfl1^{PP2A} n'est donc pas capable de se lier à PfPP1.

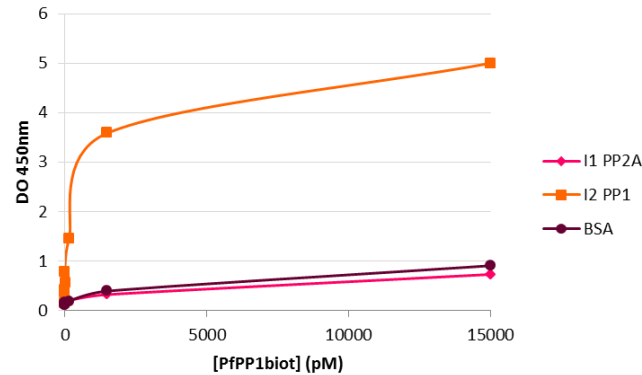


Figure 30 : Test d'interaction Pfl1^{PP2A}/PfPP1 biotinylée. Les protéines recombinantes Pfl1^{PP2A}, Pfl2^{PP1} et la BSA commerciale sont adsorbées sur une plaque ELISA à une concentration de 2µg/ml. Pfl2^{PP1} est notre témoin positif d'interaction tandis que la BSA sert de témoin négatif. Des doses croissantes de PfPP1 biotinylée sont ajoutées et les interactions sont lues par spectrophotométrie à 450nm. Test représentatif de deux expériences.

L'absence de résultats dans les études préliminaires de la caractérisation de l'inhibiteur 1 de PP2A nous a amenés à mettre de côté cette étude et à nous focaliser sur Pfl2^{PP2A} et PfPTPA.

2. L'inhibiteur 2 de PP2A chez *Plasmodium falciparum*.

a. Annotation de la séquence de Pfl2^{PP2A}

Comme pour Pfl1^{PP2A} nous avons d'abord confirmé la séquence prédite sur PlasmoDB. Sachant que Pfl2^{PP2A} possède deux introns, la PCR a été réalisée sur l'ARN rétrotranscrit de *P. falciparum*. Nous confirmons que Pfl2^{PP2A} a une séquence codante de 810 nucléotides codant pour une protéine de 269 acides aminés avec un poids moléculaire attendu de 31,8 kDa comme précédemment publié par Dobson *et al.* (Dobson, 2003).

L'alignement de la séquence codante de Pfl2^{PP2A} avec son orthologue humain montre que ces deux protéines présentent 26,7% d'identité entre-elles (Figure 31). La protéine humaine a trois sérines qui sont phosphorylées (S9, S24 et S93) (Adachi, 1994 ; Vasudevan, 2011) tandis que la protéine de *P. falciparum* possède quatre sites potentiels de phosphorylation, les sérines 6, 9 et 174 et la thréonine 143 (S6, S9, T143 et S174) (Treeck, 2011). La séquence de *P. falciparum* possède également trois sites RVxF dont la séquence consensus est la suivante : (K/R)-x(0-1)-(V/I)-{p}-(F/W), où x peut être soit absent soit un résidu qui peut être n'importe quel acide aminé et {p} peut être n'importe quel acide aminé sauf la proline (Figure 31). Ces sites RVxF sont des sites qui permettent potentiellement l'interaction avec la phosphatase PP1 (Egloff, 1997). L'un de ces sites est conservé entre l'homme et le parasite.



Figure 31 : Alignement de Pf12^{PP2A} et de son orthologue humain. Alignement des séquences de Pf12^{PP2A} (numéro d'accèsion PlasmDB : PF3D7_0919000) et de I2^{PP2A} humain (numéro d'accèsion : AAQ79833.1) par ClustalW avec le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor. Les sites de phosphorylation décrits chez les eucaryotes sont symbolisés par un triangle violet tandis que ceux identifiés chez *P. falciparum* sont identifiés par des triangles roses. Le site de phosphorylation commun est symbolisé par un triangle orange. Les motifs RVxF présents chez *P. falciparum* sont encadrés en orange. L'encadré violet représente un motif RVxF commun aux deux espèces.

b. Interaction de Pf12^{PP2A} avec PfPP2A et PfPP1

i. Interaction Pf12^{PP2A}/PfPP2A

Pour l'étude de l'interaction de cette protéine avec PfPP2A, nous avons également utilisé le modèle de double hybride de levure (Cf. III1b) (Figure 29). Dans un premier temps, nous avons vérifié que les levures transformées avec les constructions pGAD-T7-Pf12^{PP2A} et pGBK-T7-PP2A exprimaient les protéines parasites. Un western-blot réalisé sur les extraits protéiques des levures transformées a révélé la présence de bandes aux tailles attendues de ces protéines fusionnées à l'épitope HA (Pf12^{PP2A}) ou au domaine Gal4-DBD (PfPP2A) (Figure 32a).

Afin de mettre en place les études d'interaction, nous avons étudié la croissance des levures transformées et observé que les levures transformées avec le vecteur portant le gène de Pf12^{PP2A} ne montrent pas de différence de taux de croissance par rapport aux levures transformées avec les vecteurs vides (Figure 32b). L'interaction des protéines a ensuite été étudiée sur un milieu sélectif dépourvu de tryptophane, de leucine et d'histidine (Milieu -LWH). Seules les levures diploïdes possédant le vecteur pGAD-T7-Pf12^{PP2A} et le vecteur pGBK-T7-PfPP2A se développent sur milieu -LWH montrant ainsi que les deux protéines interagissent (Figure 32c). Pour confirmer l'interaction, nous avons effectué un test au β-galactosidase sur filtre. En effet, lorsqu'il y a interaction entre les deux protéines, le facteur de transcription Gal4 va activer la transcription du gène HIS3, comme nous l'avons vu précédemment, mais également la transcription du gène LacZ. Ce gène code pour la β-galactosidase capable d'hydrolyser le X-gal en un indol formant par oxydation un composé bleu qui est insoluble et qui précipite. Ainsi, les levures contenant les deux protéines qui interagissent seront bleues en présence de X-gal. Nous observons sur le filtre l'apparition d'une coloration bleue au niveau des colonies de levures diploïdes contenant les vecteurs pGAD-T7-Pf12^{PP2A} et pGBK-T7-PfPP2A (Figure 32d). Aucune coloration n'est visible sur les filtres des autres croisements (données non présentées). Grâce à ce test, nous avons pu confirmer l'interaction entre Pf12^{PP2A} et PfPP2A dans le modèle de la levure.

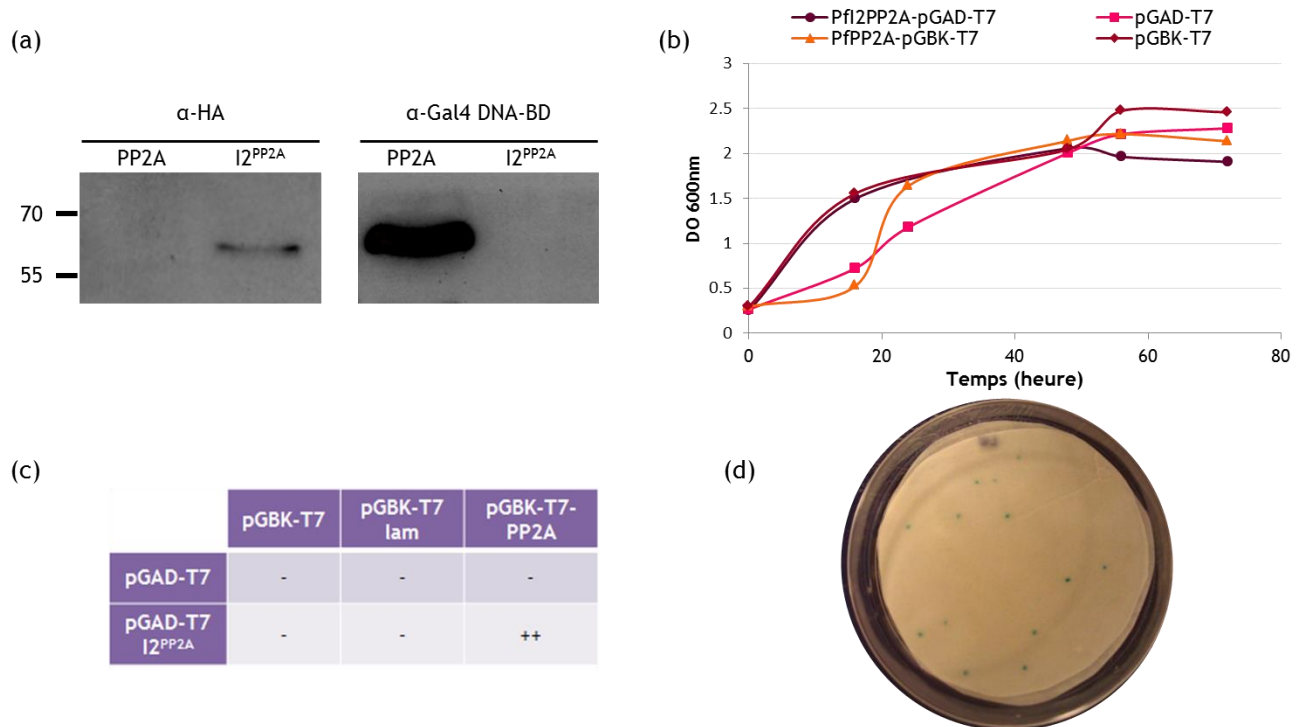


Figure 32 : Test d'interaction Pfl2^{PP2A}/PflPP2A en levure. (a) Western-blot sur les extraits protéiques des levures haploïdes transformées avec pGAD-T7-Pfl2^{PP2A}-HA ou pGBK-T7-PflPP2A-Gal4-DBD. Le western blot est révélé avec un anticorps anti-HA et un anticorps anti-Gal4-DBD. (b) Test de croissance des levures haploïdes transformées avec le vecteur Pfl2^{PP2A}-pGAD-T7, le vecteur pGAD-T7 vide, le vecteur PflPP2A-pGBK-T7 ou le vecteur pGBK-T7 vide. (c) Résultats des étalements des levures diploïdes sur milieu sélectif -LWH. - signifiant qu'aucune colonie ne s'est développée et ++ que des colonies se sont développées. (d) Test au β -galactosidase sur filtre des levures diploïdes pGAD-T7-Pfl2^{PP2A}/pGBK-T7-PflPP2A-Gal4-DBD. Les points bleus montrant les colonies de levures dont les protéines codées par les vecteurs interagissent.

ii. Interaction Pfl2^{PP2A}/PflPP1

L'analyse de la séquence protéique de Pfl2^{PP2A} montre la présence de trois motifs RVxF (Cf. III2a). Or, ces motifs peuvent être impliqués dans l'interaction avec PP1 (Egloff, 1997). De plus, il a été montré chez l'homme que I2^{PP2A} interagissait avec PP1 et régulait son activité (Katayose, 2000). Nous avons donc étudié l'interaction de ces deux protéines chez *P. falciparum* en utilisant comme précédemment le modèle de double hybride de levure. Nous avons observé que seules les levures diploïdes exprimant PflPP1 et Pfl2^{PP2A} étaient capables de se développer sur un milieu -LWH démontrant une interaction entre les deux protéines (Figure 33).

	pGBK-T7	pGBK-T7 lam	pGBK-T7-PP1
pGAD-T7	-	-	-
pGAD-T7 I2 ^{PP2A}	-	-	++

Figure 33 : Test d'interaction en double hybride de levure Pfl2^{PP2A}/PflPP1. Résultats des étalements des levures diploïdes sur milieu sélectif -LWH. - signifiant qu'aucune colonie ne s'est développée et ++ que des colonies se sont développées.

c. Étude préliminaire du rôle de Pfl2^{PP2A} sur PP2A et PfPPP1

i. Effets de Pfl2^{PP2A} sur PP2A *in vivo*

Dans le but d'étudier le rôle des régulateurs de phosphatases, le modèle des ovocytes de xénope est utilisé dans le laboratoire. Dans ce modèle, les ovocytes de *Xenopus laevis* sont bloqués en prophase I de méiose sous l'action d'un certain nombre de protéines dont la phosphatase PP2A qui lorsqu'elle est active empêche la transition G2/M (Cf Introduction C III 1 c i et Introduction C III 1 d). Ainsi, si on inhibe PP2A, la transition G2/M aura lieu et l'ovocyte maturera jusqu'à la métaphase II. Cette maturation est caractérisée par la rupture de la vésicule germinative visualisable par l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal de l'ovocyte. Cependant, lors de deux expériences distinctes, l'injection de la protéine Pfl2^{PP2A} dans l'ovocyte (40 et 100 ng) n'a pas déclenché la maturation de l'ovocyte. Ainsi, cette protéine ne semble pas avoir d'effets sur PP2A dans ce modèle.

ii. Étude préliminaire du rôle de Pfl2^{PP2A} sur l'activité de PfPPP1

Étant donné que Pfl2^{PP2A} et PfPPP1 interagissent et que I2^{PP2A} est capable de réguler PP1 chez l'homme (Katayose, 2000), des études *in vitro* de régulation de l'activité de PfPPP1 par Pfl2^{PP2A} ont été mises en place. Dans le laboratoire, un test d'activité phosphatase ayant pour substrat le para-nitrophenyl phosphate (pNPP) est utilisé pour doser l'activité de PfPPP1 et étudier l'effet de ses régulateurs (Daher, 2006). Ainsi, nous avons mesuré l'effet de Pfl2^{PP2A} sur l'activité de PfPPP1 vis-à-vis du substrat pNPP. Dans cette étude préliminaire, nous avons observé que de faibles concentrations de Pfl2^{PP2A} (100 à 400nM) activent PfPPP1 tandis que de fortes concentrations inhibent PfPPP1 (Figure 34).

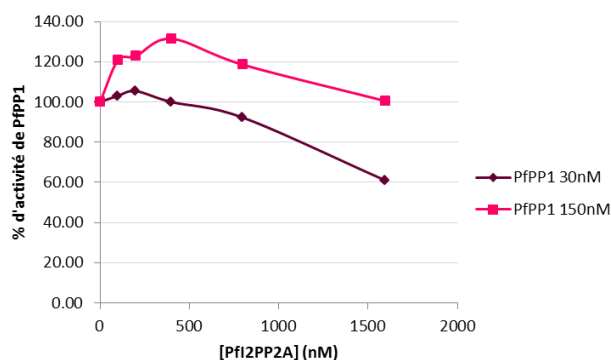


Figure 34 : Rôle de Pfl2^{PP2A} sur l'activité de PfPPP1 *in vitro*. Test d'activité présentant l'activité phosphatase de PfPPP1 vis-à-vis du pNPP modulée par l'ajout de doses croissantes de Pfl2^{PP2A}. Deux concentrations de PfPPP1 ont été utilisées (30 et 150nM) et la concentration de Pfl2^{PP2A} varie entre 0 et 1600nM. Les résultats sont présentés en pourcentage d'activité de PfPPP1.

3. Conclusions des études préliminaires de Pfl1^{PP2A} et Pfl2^{PP2A}

Les trois protéines Pfl1^{PP2A}, Pfl2^{PP2A} et PfPTPA ont été étudiées en parallèle au début de ce travail. Les différentes approches utilisées ne nous ont pas permis d'étudier

l'interaction de Pf11^{PP2A} avec PfPP2A mais nous ont montré que Pf11^{PP2A} était incapable d'interagir avec PfPP1. Ces données nous ont amenés à laisser en suspens l'étude de cette protéine. De même, malgré des résultats encourageants quant à l'interaction de Pf12^{PP2A} avec PfPP2A et PfPP1, l'absence d'effet de cette protéine sur l'activité de la phosphatase PP2A et les résultats obtenus en parallèle sur la protéine PfPTPA, nous ont encouragés à focaliser notre étude sur le rôle de PfPTPA dans la régulation de PfPP2A.

B. ÉTUDE DE LA REGULATION DE LA PROTEINE PHOSPHATASE DE TYPE 2A PAR PfPTPA.

I. Annotation de la séquence de PfPTPA

Nous avons confirmé la séquence codante de 960 nucléotides de PfPTPA présente dans PlasmoDB par PCR sur l'ADNc de *P. falciparum*, car les données de PlasmoDB indiquent que PfPTPA possède quatre introns (Figure 35). Cette séquence code pour une protéine de 319 acides aminés ayant un poids moléculaire théorique de 37,4 kDa.

PfPTPA	ATGGGTGATGTAATAGCTTGAGTTATAAAATAATTAACGATGAAAGTATTATAAGATTTACGAAAAGTT	70
PfPTPA plasmoDB	ATGGGTGATGTAATAGCTTGAGTTATAAAATAATTAACGATGAAAGTATTATAAGATTTACGAAAAGTT	70
PfPTPA	CTATATAAATGATATAAATTGAATTTATTACGAATTTAAATAAATCAGTTGTCGGTGTTGAAATGAAACC	140
PfPTPA plasmoDB	CTATATAAATGATATAAATTGAATTTATTACGAATTTAAATAAATCAGTTGTCGGTGTTGAAATGAAACC	140
PfPTPA	TTTAGAAGATTTTAAATTTATGTAATGAAAATGATATGATTAATAATGACAATTTTTTATTCTTATCAAAA	210
PfPTPA plasmoDB	TTTAGAAGATTTTAAATTTATGTAATGAAAATGATATGATTAATAATGACAATTTTTTATTCTTATCAAAA	210
PfPTPA	AATGTATATAATATTTTTCAATTGATAAAAAATATGAACAAGTGTATTGATTCTTGTCCACCTATAAATC	280
PfPTPA plasmoDB	AATGTATATAATATTTTTCAATTGATAAAAAATATGAACAAGTGTATTGATTCTTGTCCACCTATAAATC	280
PfPTPA	AATCATCTCGATTTGGTAATAGAGGATTTCAACATTTTTGTGATGCATATTATAAAGAAGTTGATGAGTA	350
PfPTPA plasmoDB	AATCATCTCGATTTGGTAATAGAGGATTTCAACATTTTTGTGATGCATATTATAAAGAAGTTGATGAGTA	350
PfPTPA	TTTACCTCATGCTTTATCAGAATCAAACATACCTAATATATCTGAACATACTTATCAAATATCTTATTAT	420
PfPTPA plasmoDB	TTTACCTCATGCTTTATCAGAATCAAACATACCTAATATATCTGAACATACTTATCAAATATCTTATTAT	420
PfPTPA	TTAAAGAATTCCATTGGAAATAAAAAGAGAATAGATTATGGAACGGGCATGAATTAATTTTTGCTTT	490
PfPTPA plasmoDB	TTAAAGAATTCCATTGGAAATAAAAAGAGAATAGATTATGGAACGGGCATGAATTAATTTTTGCTTT	490
PfPTPA	TCCTCTTTTGCCTAAATAAAATAAATTTCTTTATTTCCTTCCGATTACAAGCACCTCGTCTTTGTTTTATA	560
PfPTPA plasmoDB	TCCTCTTTTGCCTAAATAAAATAAATTTCTTTATTTCCTTCCGATTACAAGCACCTCGTCTTTGTTTTATA	560
PfPTPA	TCGACAGTATTTAGAAGGAGTAAGAAGAGTGCAGATAATTTACACTGTGGAACCTGCAGGTAGTAGAGGG	630
PfPTPA plasmoDB	TCGACAGTATTTAGAAGGAGTAAGAAGAGTGCAGATAATTTACACTGTGGAACCTGCAGGTAGTAGAGGG	630
PfPTPA	GCATGGGGATTGGATGATTTTCAATTTCTTGTTCCTTTTGGCGCAGCTCAACTTTCTTACAACAGGA	700
PfPTPA plasmoDB	GCATGGGGATTGGATGATTTTCAATTTCTTGTTCCTTTTGGCGCAGCTCAACTTTCTTACAACAGGA	700
PfPTPA	AAATAAAAACGGACGATATTGAAAAAAAAGAATTGTTGGAATTGTGGGCACCGAAATATTTATATTTTGA	770
PfPTPA plasmoDB	AAATAAAAACGGACGATATTGAAAAAAAAGAATTGTTGGAATTGTGGGCACCGAAATATTTATATTTTGA	770
PfPTPA	TGCTCTTAAGTATATATCAATGATAAAACATGCACCTTTTCATGAATCATCCCAAATGTTGTATGATATA	840
PfPTPA plasmoDB	TGCTCTTAAGTATATATCAATGATAAAACATGCACCTTTTCATGAATCATCCCAAATGTTGTATGATATA	840
PfPTPA	TCTGGAGTTGAAAACATGGGAAAAAATATGTAATGGATTACTTAAAAATGTATCAAGCTGAAATAATACAAA	910
PfPTPA plasmoDB	TCTGGAGTTGAAAACATGGGAAAAAATATGTAATGGATTACTTAAAAATGTATCAAGCTGAAATAATACAAA	910
PfPTPA	AGCGACAAATATTACAACACATATTTTGGAAATTTGATAGACTTTTAA	960
PfPTPA plasmoDB	AGCGACAAATATTACAACACATATTTTGGAAATTTGATAGACTTTTAA	960

Figure 35 : Alignement des séquences prédites disponibles dans la base de données PlasmoDB et séquencées de PfPTPA

L'alignement de la séquence humaine et de celle de *Plasmodium* montre une identité de séquence de 32,3% (Figure 36). Cinq des six résidus décrits pour être impliqués dans l'interaction avec PP2A chez l'homme sont conservés, il s'agit des acides glutamiques en position 270 et 272 respectivement chez l'homme et chez *P. falciparum* (E270 et E272), des valines en position 281 et 283 (V281 et V283), des glycines en position 290 et 292 (G290 et G292), des méthionines en position 294 et 296 (M294 et M296) et des lysines en position 302 et 304 (K302 et K304) (Chao, 2006) (Figure 36). La protéine du parasite possède un motif RVxF qui est absent chez son orthologue humain (Figure 36).

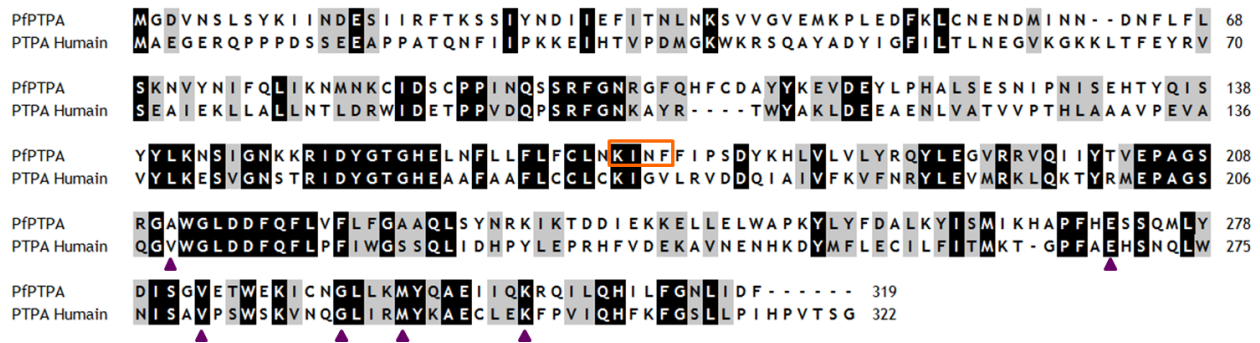


Figure 36 : Alignement des séquences protéiques de PfPTPA et de son orthologue humain. La séquence protéique de PfPTPA (numéro d'accèsion PlasmoDB : PF3D7_1430100) est alignée avec celle du PTPA humain (numéro d'accèsion : CAA60163.1). Un motif RVXF spécifique à *Plasmodium* est représenté par un cadre orange. Les résidus connus pour être impliqués dans l'interaction avec la protéine PP2A humaine sont symbolisés par des triangles violets.

II. Étude de l'interaction PfPTPA/PfPP2A et du rôle de PfPTPA dans la régulation de l'activité de PP2A.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la régulation de PP2A par le phosphotyrosyl phosphatase activator (PTPA) chez *Plasmodium falciparum*. Dans, un premier temps, nous avons confirmé l'appartenance de notre PfPTPA putatif à la famille des PTPA. De plus, nous avons montré la conservation de la protéine au cours de l'évolution, et que cinq des six résidus connus pour être impliqués dans l'interaction entre PTPA et PP2A sont conservés. Nous avons ensuite montré par une étude de la distribution des protéines PfPTPA et PfPP2A dans le parasite, que les deux protéines sont localisées dans les mêmes compartiments cellulaires au cours du cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum*. Cette distribution identique nous permettait d'envisager que les protéines puissent interagir entre-elles. En effet, deux approches différentes ont montré que PfPTPA interagissait avec PfPP2A. Des expériences de mutagenèse dirigée nous ont permis de montrer l'implication des résidus V283, G292 et M296 dans cette interaction. L'étude de la régulation de l'activité de PP2A par PfPTPA, a montré que cette dernière augmentait l'activité phosphatase de PP2A vis-à-vis du substrat pNPP et l'utilisation des mutants a montré le rôle essentiel du résidu G292 dans l'activité de PfPTPA. Des études de génétique inverse ont montré que les protéines semblent avoir un rôle essentiel dans la complétion du cycle érythrocytaire du parasite. Enfin, des études de la régulation de la transition G2/M chez le xénope ont montré l'importance de PfPTPA dans la régulation du cycle cellulaire. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication intitulée : "PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator of *Plasmodium falciparum* : Identification of its residues involved in binding to and activation of PP2A." présentée ci-après.

PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator of *Plasmodium falciparum*: Identification of Its Residues Involved in Binding to and Activation of PP2A

Audrey Vandomme¹, Aline Fréville¹, Katia Cailliau², Hadidjatou Kalamou¹, Jean-François Bodart², Jamal Khalife^{1,*} and Christine Pierrot^{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, Lille 59019, Cedex, France; E-Mails: audrey.vandomme@pasteur-lille.fr (A.V.); alinekatia.freville@gmail.com (A.F.); hkalamou@gmail.com (H.K.)

² EA4479, IFR147, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq 59655, France; E-Mails: katia.maggio@univ-lille1.fr (K.C.); Jean-Francois.Bodart@univ-lille1.fr (J.-F.B.)

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: jamal.khalife@pasteur-lille.fr (J.K.); christine.pierrot@pasteur-lille.fr (C.P.); Tel.: +33-3-2087-7968 (J.K. & C.P.); Fax: +33-3-2087-7888 (J.K. & C.P.).

Abstract: In *Plasmodium falciparum* (Pf), the causative agent of the deadliest form of malaria, a tight regulation of phosphatase activity is crucial for the development of the parasite. In this study, we have identified and characterized PfPTPA homologous to PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator, an activator of protein phosphatase 2A which is a major phosphatase involved in many biological processes in eukaryotic cells. The PfPTPA sequence analysis revealed that five out of six amino acids involved in interaction with PP2A in human are conserved in *P. falciparum*. Localization studies showed that PfPTPA and PfPP2A are present in the same compartment of blood stage parasites, suggesting a possible interaction of both proteins. *In vitro* binding and functional studies revealed that PfPTPA binds to and activates PP2A. Mutation studies showed that three residues (V²⁸³, G²⁹² and M²⁹⁶) of PfPTPA are indispensable for the interaction and that the G²⁹² residue is essential for its activity. In *P. falciparum*, genetic studies suggested the essentiality of PfPTPA for the completion of intraerythrocytic parasite lifecycle. Using *Xenopus* oocytes, we showed that PfPTPA blocked the G2/M transition. Taken together, our data suggest that PfPTPA could play a role in the regulation of the *P. falciparum* cell cycle through its PfPP2A regulatory activity.

Keywords: *Plasmodium*; PTPA; PP2A; phosphatase; dephosphorylation

1. Introduction

Most processes in eukaryotic cells are under the control of protein-protein interactions, notably in the case of enzymes which are regulated not only by post translational modifications but also by protein interacting partners that direct and control their activities. Protein phosphatases are a group of enzymes that counterbalance the action of kinases to modulate proteins functions via the modifications of their phosphorylation status. Unlike kinases, phosphatases belong to several distinct protein/gene families and their number, putatively or experimentally identified in different organisms, is still fewer than kinases [1,2]. This difference, together with the fact that phosphatases dephosphorylate diverse substrates *in vitro*, has often raised the question about the specificity of phosphatases and their regulation. Based on the observations accumulated in the past decade, mainly on the two major serine/threonine phosphatases PP1 and PP2A, there is now clear-cut evidence that the localization, substrate specificity and magnitude of activity is accomplished by the capacity of the catalytic subunit to interact with diverse regulatory proteins. For PP1, more than 200 interacting proteins have been identified using a variety of biochemical, functional and genetic approaches among which 129 proteins have been characterized [3–5]. In contrast, there are only seven regulators described for PP2A [6–11] including I2^{PP2A} and PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator (PTPA) which are the best characterized regulators. For both phosphatases, it has been observed that several regulators are as essential as the catalytic subunit itself. In the case of PP2A, converging studies have demonstrated the involvement of PTPA, known also as PP2A activator protein, in the activation loop of PP2A and in cell growth and survival [12–16]. PTPA was first purified from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes, for its specific capacity to activate PP2A *in vitro* [6]. This activation has been shown to be ATP- and Mg²⁺-dependent [6]. Subsequently PTPA was cloned from several species and sequence alignment revealed a high degree of identity (>85%) [17,18]. More recently, PTPA was described to exhibit a peptidyl prolyl isomerase activity (PPIase) [19] and the target seems to be the proline 190 (P¹⁹⁰) of PP2A which is conserved in all PP2A. This novel activity seems to be associated with the ability of PTPA to activate PP2A as it requires the presence of ATP-Mg²⁺ and the mutant PTPA with abolished PP2A activating function did not show any PPIase activity. In addition, the mutated version of PP2A (P¹⁹⁰A) has been shown to be partially active but became insensitive to the activation by PTPA [19], indicating that this proline is essential for the activation process to take place.

The crystal structures of human PTPA (HuPTPA) and yeast orthologs have been determined [20–22]. These structures showed that PTPA has an overall α -helical structure and identified a highly conserved cleft as a potential region for interaction. On the basis of HuPTPA structure, the interaction between PP2A and different PTPA mutants investigated by GST-pull down revealed that six residues out of 18 (V²⁰⁹, E²⁷⁰, V²⁸¹, G²⁹⁰, M²⁹⁴ and K³⁰²) strongly contributed to the binding to PP2A [20]. Although the diverse biochemical functions of PTPA on PP2A detected *in vitro* remain to be better defined under the global cellular spatiotemporal constraints, *in vivo* studies revealed that its disruption is lethal in yeast by controlling the progression of the G1 phase of the cell cycle [15] and the G2/M transition [13].

In *Plasmodium falciparum*, the most virulent and deadly parasite for humans, a number of phosphatases have been characterized, including PP1 and PP2A [23–39]. Despite the importance of these enzymes and their direct implication in cell cycle shown in many eukaryotic cells other than *Plasmodium*, very few experimental approaches have been carried out to identify their regulators. Recently, we have characterized three regulators of PfPP1, named PfLRR1 [40], Inhibitor 2 (PfI2) [41] and Inhibitor 3 (PfI3) [42]. PfLRR1 and PfI2, as expected, showed a strong capacity to inhibit the PfPP1

activity although they exhibit substantial differences in the binding motifs to PP1. Unexpectedly, PfI3, unlike its human counterpart clearly revealed an activation of PP1 and a lack to complement Inhibitor 3 deficient yeast [42]. Additionally, reverse genetic studies suggested that the above regulators seem to be essential for blood parasite growth. Finally, peptides derived from PfI2 and PfI3 competing with the main binding site to PP1 exhibited an anti-plasmodial activity against blood stage parasites *in vitro* [41,42].

With respect to PP2A, biochemical and chromatography approaches combined with a micro-sequencing procedure suggested the presence of a PP2A-like catalytic subunit in this parasite [26]. Subsequently, the availability of the *P. falciparum* genome, together with transcriptomic and proteomic studies confirmed its expression by different parasite stages. The first regulator of PfPP2A has been characterized by Dobson *et al.* [43]. These authors reported the expression by *P. falciparum* of a homolog to Inhibitor 2 of PP2A (PfI2^{PP2A}), based on the fact that the primary structure of PfI2^{PP2A} exhibited an overall identity of 28% and 55% similarity with its human counterpart, that the PfI2^{PP2A} specifically inhibited PP2A and that its overexpression in HeLa cells led to an increase of phosphorylation of transcription factors. This protein is essential during the asexual erythrocytic cycle of *Plasmodium berghei* (rodent *Plasmodium* specie). Indeed, the Leiden Malaria Research Group and the Istituto Superiore di Sanita failed to disrupt the PbI2^{PP2A} gene by double crossing over (<http://www.pberghei.eu/index.php?rmgm=246>) despite the accessibility of its locus by PbI2^{PP2A}-GFP tagging integration (<http://www.pberghei.eu/index.php?rmgm=218>). Although the exact physiological function of PfI2^{PP2A} is still to be examined, its location in the cytoplasm of *P. falciparum* strongly suggests that its regulatory function could take place in this compartment. No other regulators of PfPP2A have been characterized so far.

In the present study, we report the characterization of PfPTPA, the *P. falciparum* homolog of the human PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator and show that this protein is able to directly bind to PP2A. *In vitro* binding studies with recombinant wild type or mutated proteins showed that three residues (V²⁸³, G²⁹² and M²⁹⁶) of PfPTPA are important for this interaction. Functional studies revealed that PfPTPA activates PP2A *in vitro* and that five residues (E²⁷², V²⁸³, G²⁹², M²⁹⁶ and K³⁰⁴) are involved in a dramatic loss of function for the mutated PfPTPA G²⁹²A protein. In *P. falciparum*, genetic studies suggested the essentiality of PfPTPA for the completion of the intraerythrocytic parasite life cycle. Further studies, using a heterologous model, showed that PfPTPA interacted with endogenous PP2A and that the microinjection of PfPTPA to *Xenopus* oocytes blocked the G2/M transition.

2. Results and Discussion

2.1. Molecular Cloning and Sequence Analysis of PfPTPA

The *P. falciparum* genome encodes a single putative PTPA (PF3D7_1430100, 319 amino acids, 37.4 kDa). The predicted gene contained 5 exons but had not yet been cloned and identified experimentally. We isolated a RT-PCR product from *P. falciparum* blood stage total RNA using primers spanning the full length sequence. The complete sequencing of five independent clones showed an open reading frame of 960 bp (Supplementary Figure S1), confirming the ORF annotated in PlasmoDB [44] (www.plasmodb.org). Reciprocal BLASTP analysis using the deduced amino acid sequence as query confirmed the homology of this gene product with other known PTPA. The comparison with its human counterpart revealed an overall identity of 32% (54% homology), reaching a maximum of 40% in the C-terminal region of the sequence (Figure 1a). PfPTPA orthologs are also present in all sequenced rodent and human *Plasmodium* species. The ClustalW program was then used to generate an alignment of the *Plasmodium* PTPA sequences with those of other species including human and *Toxoplasma gondii* sequences. As outgroups, inhibitors of PP1 and PP2A were included. The resulting alignment was used to generate a maximum likelihood phylogenetic tree. The data presented in Figure 1b clearly shows that *Plasmodium* PTPAs form a divergent subgroup along with *T. gondii* but cluster in the group of other known PTPAs, confirming the relatedness of PfPTPA to PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator family (Figure 1b).

For the human PTPA, it should be noted that the analysis of the crystal structure combined with amino acid mutation studies revealed that six amino acids present in the C-terminal region of the protein (V²⁰⁹, E²⁷⁰, V²⁸¹, G²⁹⁰, M²⁹⁴ and K³⁰²) are critical for its function on PP2A [20]. In *P. falciparum* five amino acids out of six were found to be conserved in PfPTPA and correspond to E²⁷², V²⁸³, G²⁹², M²⁹⁶ and K³⁰⁴ positions (Figure 1a). To shed further light on the position of these conserved residues in the global structure of PfPTPA, a 3D model was built using human PTPA (PDB: 2IXM) as a template (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi>) (Figure 1c,d).

The overall structure showed some differences between human and *P. falciparum* homologs. Indeed, human PTPA is composed of thirteen α helices and four β sheets while PfPTPA is composed of sixteen α helices but no β sheet. The α helices are localized almost identically between both proteins however four helices in HuPTPA are subdivided into eight shorter helices in PfPTPA (Supplemental Figure S2). This model shows that residues involved in PP2A interaction in human are on identical structures except residues G²⁹² and K³⁰⁴ which are in an α helix structure in human but not in *P. falciparum*. Despite these differences, both the crystal of human PTPA and the PfPTPA model showed that all residues are at the periphery as shown in Figure 1c,d. This similarity suggests that some of the residues involved in the binding domain to PP2A could be conserved in human and *P. falciparum* PTPA.

Figure 1. Molecular cloning and sequence analysis of PfPTPA. **(a)** Analysis of PfPTPA (PF3D7_1430100) amino acid sequence. PfPTPA was aligned with the human PTPA (CAA60163.1) using ClustalW Multiple Alignment (BioEdit). The identical residues are highlighted in black and similar residues in grey. Stars symbolized amino acids involved in PTPA/PP2A interaction in human; **(b)** Phylogenetic tree of the PTPA family. A maximum likelihood tree was generated from the 21 PTPA sequences using MEGA5 [45] under the JTT + G + I model with 100 bootstrap repetitions. Outgroups are formed by PP2A inhibitor 2 orthologs ($I2^{PP2A}$, outgroup 1) PP1 inhibitor 2 orthologs ($I2^{PP1}$, outgroup 2) and PP1 inhibitor 3 orthologs ($I3^{PP1}$, outgroup 3); **(c)** Crystal structure of HuPTPA (PDB: 2IXM). Amino acid residues involved in PTPA/PP2A interaction are shown in red; **(d)** Structural model of PfPTPA based on the crystal structure of HuPTPA (PDB: 2IXM) using the ModBase server [46]. Amino acid residues studied in this work for the PTPA/PP2A interaction are shown in red.

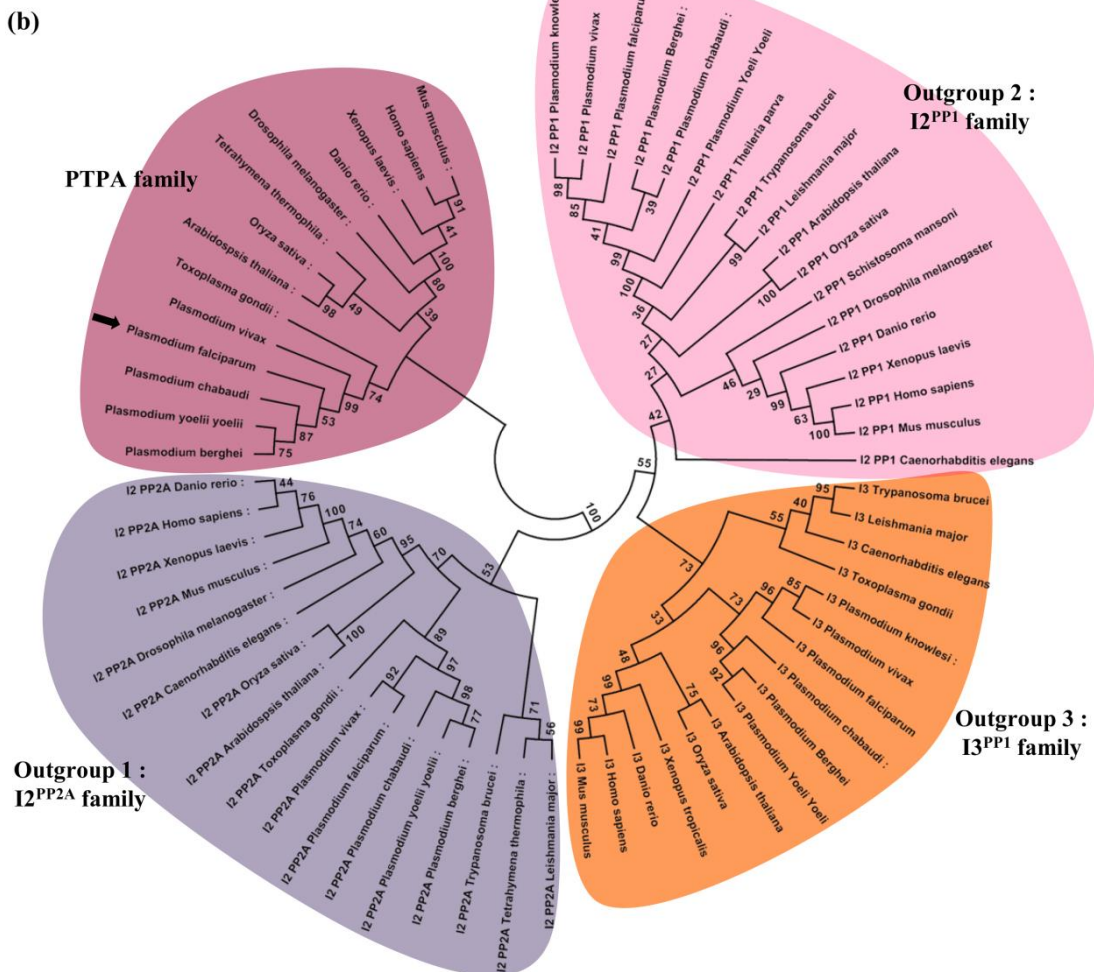
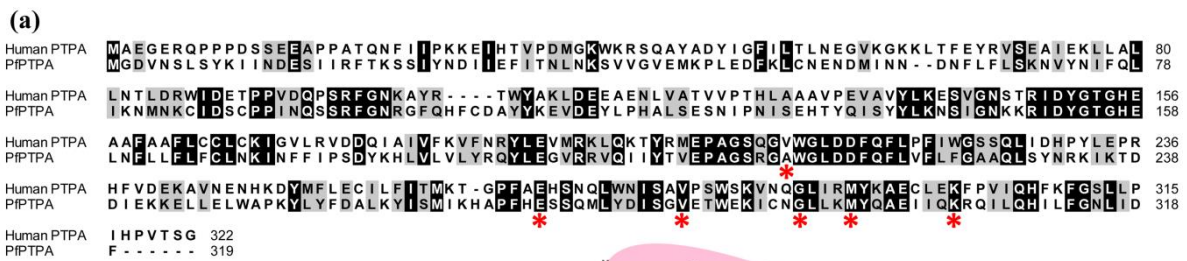
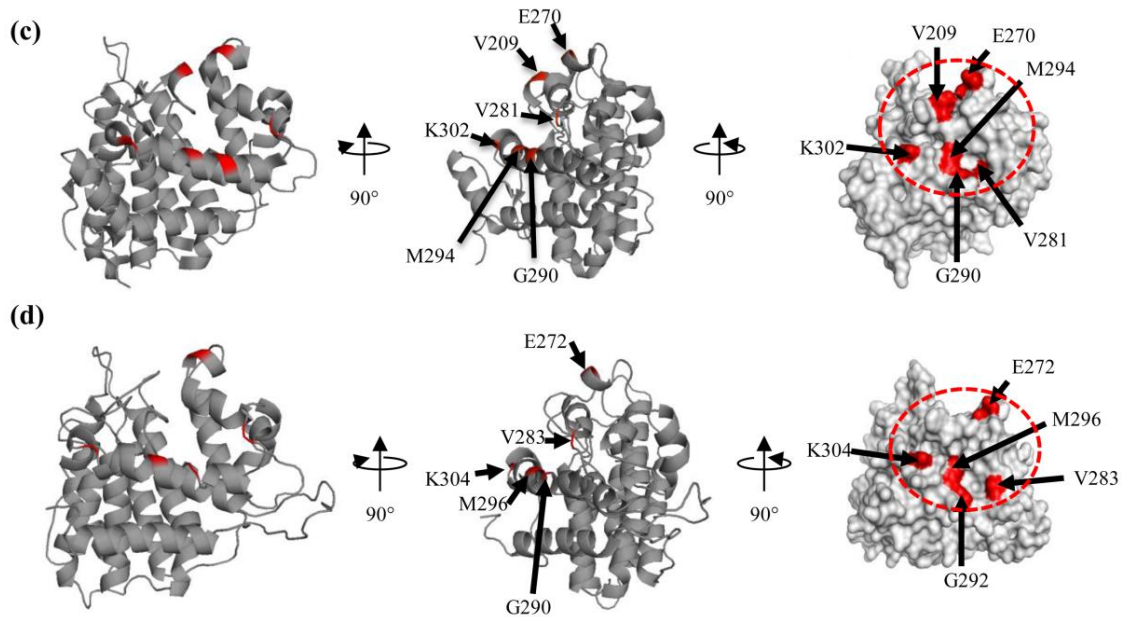


Figure 1. Cont.



2.2. Expression of PfPTPA and PfPP2A by *Plasmodium falciparum* and Localization

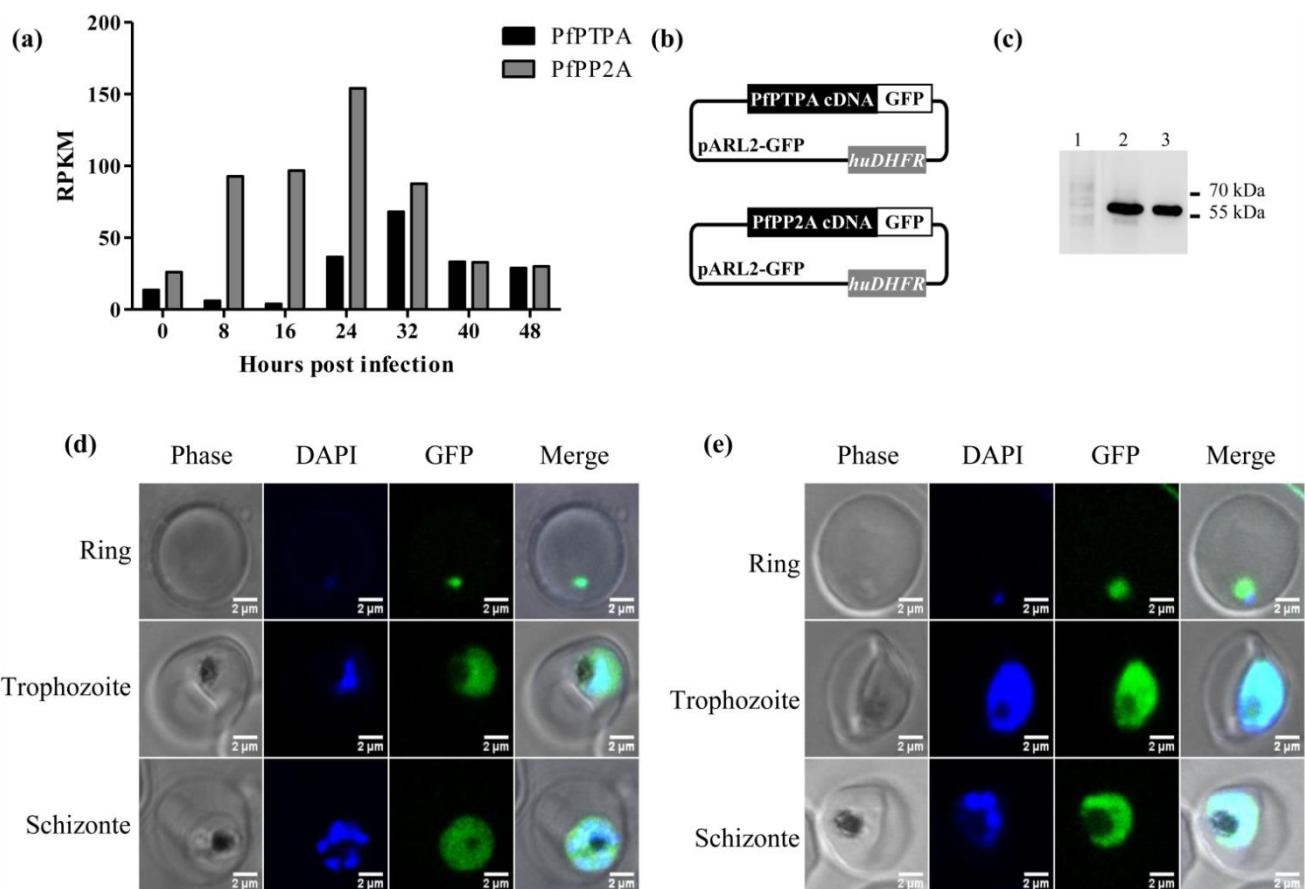
RNA-Seq data available at the PlasmoDB [44] showed that the gene was transcribed in blood stage parasites, with a peak in late trophozoites (32 h). PfPTPA transcripts were also identified in gametocytes and the protein was detected via proteomics in all asexual and sexual parasites examined [47–49]. Because PTPA is an activator of PP2A [6,20,50], we plotted the RNA-Seq data of the latter along with those obtained for PfPTPA. Results depicted in Figure 2a showed that both transcripts were detectable at early stage trophozoites with a higher level for PP2A transcripts (24 h post infection). In late trophozoites/schizonts (32–40 h post infection), the relative abundance of both transcripts was similar, suggesting that PfPP2A could be activated through PfPTPA during the late developmental stages of the intraerythrocytic lifecycle.

Based on the above observations, we sought to follow up the distribution of PfPTPA and PfPP2A during the intraerythrocytic development cycle. To this end, the *P. falciparum* 3D7 strain was transfected with pARL2 constructs mediating the episomal expression of *pfptpa* or *pfpp2a-gfp* full-length sequences (Figure 2b). The use of this vector by Kuhn *et al.* showed that the trafficking was dependent on the fused protein rather than on the *pfert* promoter used [51]. Using a monoclonal anti-GFP antibody, immunoblot analysis of a total extract of blood stage parasites expressing either PfPTPA-GFP or PP2A-GFP revealed the presence of specific bands at the expected size of each fused protein (Figure 2c, lanes 2 and 3), demonstrating the integrity of the fused protein in transfected parasites.

Examination of live parasites transfected with *pfptpa-gfp* showed that the signal was confined within the parasite where the distribution is nucleo-cytoplasmic in rings, trophozoites and schizonts (Figure 2d), as the fluorescence partially overlapped DNA staining. Parasites transfected with the construct containing *pfpp2a-gfp* showed a nucleo-cytoplasmic distribution in rings and schizonts with an intense accumulation in the nucleus of late trophozoites (Figure 2e). These results are in accordance with

previous localization studies in mammalian cells showing that PTPA and PP2A have a nucleo-cytoplasmic localization with an accumulation in the nucleus when human cells progressed into S phase [52], and in the Fission Yeast [12] respectively. The PfPTPA-GFP or PfPP2A-GFP signal was completely absent from the digestive food vacuole and the cytoplasm of red blood cells (Figure 2d,e). The presence of PfPP2A and PfPTPA in both cytoplasm and nuclear compartments of the parasite suggests a potential interaction between these proteins and raises the question of a potential regulatory effect on PP2A activity.

Figure 2. Expression of *pfptpa* and *pfpp2a* gene by *Plasmodium falciparum* and localization (a) Representation of *pfptpa* (black bars) and *pfpp2a* (grey bars) RNA expression during the erythrocytic life cycle of *P. falciparum*. Data plotted are from PlasmoDB [44]; (b) Schematic representation of the pARL2-*pfptpa-gfp* and pARL2-*pfpp2a-gfp* vectors used for episomal expression of both PfPTPA and PfPP2A; (c) The expression of both proteins was checked by western blotting with anti-GFP antibodies after separation on 15% SDS-PAGE. Lane 1 represents the extract of wild type parasites. Lane 2 and 3 represent extracts from PfPTPA and PfPP2A transfected parasites respectively. Expression and localization of PfPTPA-GFP (d) and PfPP2A-GFP (e) throughout the erythrocytic cell cycle of *P. falciparum* were analyzed by fluorescence microscopy after transfection as described under experimental section.

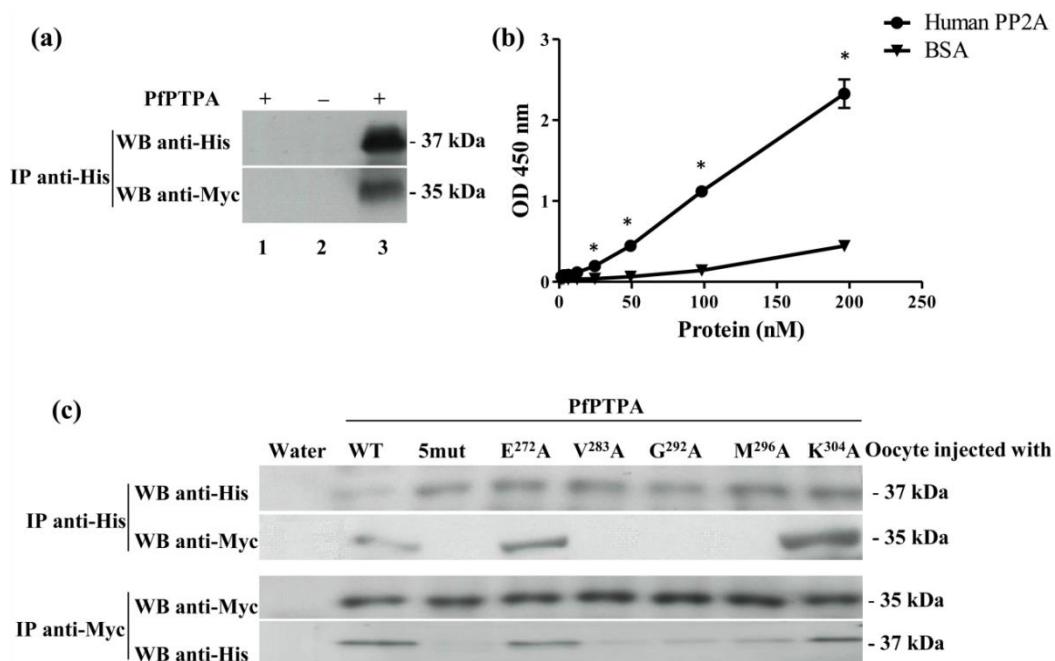


2.3. Binding of PfPTPA to PP2A

Next, the interaction of PfPTPA and PfPP2A was investigated. The production of these proteins in *E. coli* revealed that PfPTPA could be produced soluble under non-denaturing conditions, while PfPP2A could not be obtained under its active form as it did not show any activity against pNPP, a canonical substrate for phosphatases. In order to overcome this point, we used *Xenopus* oocytes which we previously reported to be able to produce *Plasmodium* proteins [40]. Hence, we injected oocytes with the recombinant His tagged-PfPTPA protein and the cRNA corresponding to Myc tagged-PfPP2A protein. Oocyte lysates were prepared as mentioned in the Experimental section and used for co-immunoprecipitation/western blot experiments. As shown in Figure 3a, immunoblot analysis of PfPTPA immunoprecipitates using anti-tag antibodies showed that PfPP2A had been co-immunoprecipitated with PfPTPA. To further ascertain a direct interaction of PfPTPA with PP2A, together with the fact that PP2A is highly conserved among different species, a human PP2A commercially available was used for binding in an ELISA based assay. Results presented in Figure 3b evidenced the capacity of PfPTPA to bind to coated HuPP2A and the intensity of the signal was dependent on the amount of PfPP2A added. Taken together, our data demonstrate that PfPTPA physically interacts with PfPP2A and support previous results showing a direct interaction between PTPA and PP2A [53].

The fact that PTPA is conserved across species suggests that it may use a conserved set of amino acids to interact with PP2A. Based on the sequence comparison depicted in Figure 1a, five out of six residues involved in human PTPA/PP2A interaction are conserved in *Plasmodium*. To further explore the role of conserved residues of PfPTPA in binding to PfPP2A, five PfPTPA versions containing a single mutation of a critical amino acid residue were produced as recombinant proteins and used in co-immunoprecipitation assays. As control, a PfPTPA protein containing the five mutations (PfPTPA 5mut) was also produced and tested under the same conditions. Co-immunoprecipitation assays were performed on lysates from oocytes injected with wild or mutant His tagged-PfPTPA proteins (PfPTPA E²⁷²A, PfPTPA V²⁸³A, PfPTPA G²⁹²A, PfPTPA M²⁹⁶A and PfPTPA K³⁰⁴A) along with the cRNA translating the Myc tagged-PfPP2A. Results showed that the binding of mutants E²⁷²A and K³⁰⁴A was not impaired while the binding of mutants V²⁸³A, G²⁹²A and M²⁹⁶ was abolished (Figure 3c). These results suggest a differential binding domain in human and *Plasmodium*. Indeed, in HuPTPA the E²⁷⁰ residue is essential for the interaction as well as residues G²⁹⁰ and M²⁹⁴ while the residues V²⁸¹ and K³⁰² are less important. Finally, the major difference between human and *Plasmodium* binding of PTPA to PP2A concerns the E²⁷⁰ residue (corresponding to E²⁷² in *P. falciparum*) which is critical in human but not in *Plasmodium*. This difference suggests a differential binding domain that may be related to a difference in the tertiary structure of PTPA in both organisms. It is notable that the version of PfPTPA protein containing all five mutations did not interact with PfPP2A. Taken together, our data confirm that V²⁸³, G²⁹² and M²⁹⁶ residues of PfPTPA are involved in interaction with PfPP2A.

Figure 3. Interaction studies of PfPTPA to PP2A. (a) Binding of PfPTPA with PfPP2A in *Xenopus* oocyte. Co-immunoprecipitation of the PfPTPA-PfPP2A complex with anti-His antibodies (recognizing recombinant PfPTPA tagged with 6-His) (lanes 2 and 3) from microinjected *Xenopus* extracts. The anti-mouse IgG antibody (lane 1) was used as a control. Immunoprecipitates from *Xenopus* oocytes microinjected with water (-) or PfPTPA (+) were eluted and separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblot analysis was performed with anti-His antibodies (recognizing PfPTPA) (**upper panel**) or anti-Myc antibodies (recognizing PfPP2A) (**lower panel**); (b) Interaction of PfPTPA with HuPP2A *in vitro* assessed by ELISA based assay. Increasing quantities of biotinylated recombinant PfPTPA were added to wells coated with human PP2A (100 ng/well) or BSA (100 ng/well) as a negative control. Results are means \pm SEM of two independent experiments performed in duplicate (stars (*) represent significant differences $p = 0.01$); (c) Binding of mutated PfPTPA with PfPP2A in *Xenopus* oocytes. Co-immunoprecipitation experiment of the PfPTPA-PfPP2A complexes with anti-His antibodies (recognizing recombinant wild type and mutated PfPTPA) (**upper panel**) or with anti-Myc antibodies (recognizing PfPP2A) (**lower panel**) from microinjected *Xenopus* oocytes. Immunoprecipitates from *Xenopus* oocytes microinjected with water, WT or mutated PfPTPA were eluted and separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblot analysis was performed with anti-His or anti-Myc antibodies.

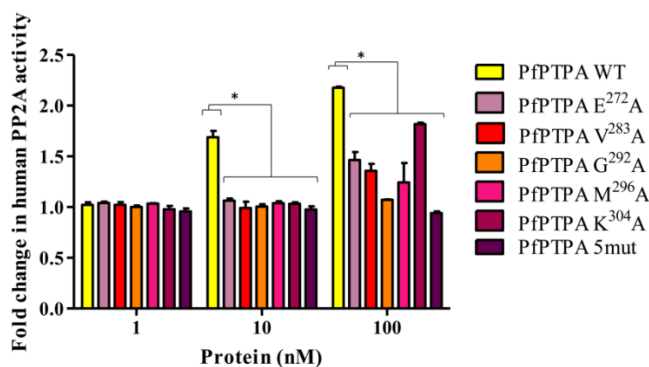


2.4. Effect of PfPTPA on the Activity of PP2A

It has been previously reported that PTPA proteins are able to regulate PP2A by increasing its activity towards different substrates including, but not limited to, pNPP substrate [6]. Because all assays to produce recombinant active PfPP2A were unsuccessful, and as PfPTPA is able to bind HuPP2A (Figure 3b), the function of PfPTPA on the activity of HuPP2A was assessed. Using a concentration of

human PP2A within a range producing linear release of phosphate, the effect of wild-type and mutated recombinant PfPTPA proteins was evaluated as described in the Experimental section. Results showed a significant increase in the phosphatase activity (up to 200%) when the PP2A was preincubated with PfPTPA wild type (Figure 4). When PfPTPA mutated proteins were tested at 10 nM, we observed that all mutations led to an almost complete loss of function of PfPTPA (Figure 4). At higher concentration (100 nM), only the PfPTPA G²⁹²A protein was still unable to activate PP2A, however the other four mutated proteins showed a slight increase of PP2A activity. The PfPTPA protein containing the five mutations was inactive at any concentration used. These data, together with the co-immunoprecipitation experiments suggest that G²⁹² is a vital and a primary residue for the activity of PfPTPA. It is important to remember that in human PTPA all residues except K³⁰² are equally essential for its activity [20]. The fact that PfPTPA exhibits only five residues out of six, together with the key role of G²⁹², suggest a particular interaction between PfPTPA and PfPP2A to adequately adapt the activation of this enzyme towards specific substrate in *Plasmodium*.

Figure 4. Effect of wild type and mutated PfPTPA proteins on PP2A activity. The capacity of PfPTPA (WT or mutated) to regulate HuPP2A was assessed using pNPP activity tests. The human PP2A activity was measured at 405 nm by the release of p-nitrophenol after incubation with different concentration of recombinant WT or mutated PfPTPA proteins. Results presented as fold change in human PP2A activity are means \pm SEM of three independent experiments (stars (*) represent significativity $p = 0.01$).



2.5. Genetic Manipulations of *pfptpa* and *pfpp2a* in *Plasmodium falciparum*

It has been previously shown that the disruption of *pp2a* or *ptpa* ortholog genes in yeast results in lethality [14,54]. In mice, it was also reported that the homozygous null for PP2A detected at the embryonic stage were not viable [55]. To study whether the lack of PfPTPA and PfPP2A expression could affect the *Plasmodium* blood stage life cycle, we attempted to disrupt these genes by single crossing-over homologous recombination using the pCAM vector system (Figure 5a,b). We transfected blood ring stage parasites of the 3D7 strain with a pCAM-BSD-*pfptpa* or pCAM-BSD-*pfpp2a* constructs containing 5' fragments derived from the respective genomic sequences and the *bsd* gene conferring resistance to blasticidin (Figure 5a,b). After transfections and drug treatments, the presence of each construct was checked by a plasmid rescue approach as previously described (data not shown). The integration in viable parasites was then analyzed by PCR on genomic DNA, using oligonucleotides presented in Supplemental Table S1. Template DNA from wild parasites was used as control. The

amplicons corresponding to the wild locus as well as to the amplicons diagnostic for PfPTPA and PfPP2A were detectable in transfected parasites (Figure 5c lanes 1 and 3, Figure 5d lanes 1 and 3). The generation of mutant parasites demonstrates the accessibility of the locus. In order to further examine the phenotype of mutant parasites, we attempted to establish stable clonal lines by limiting dilution. Unexpectedly, we were unable to obtain viable clones which did not express either *pfptpa* or *pfpp2a* genes. This was confirmed by the fact that cloned parasites expressed PfPTPA or PfPP2A as detected by RT-PCR (not shown). This suggests that the initial genomic integration was transitory and/or that both genes are in fact essential at some stage for the completion of the intraerythrocytic cycle. The results related to PfPP2A are supported by previous studies reporting that okadaic acid, an inhibitor of phosphatase activities, was able to drastically block blood parasite growth *in vitro*, suggesting the essentiality of phosphatases including PfPP2A [56]. Further studies are still required to examine the essential functions and the precise timing of when and where these proteins are critical for the parasite growth/development. This should await the development of a powerful and robust inducible expression system for *Plasmodium falciparum* proteins. A complementary approach to study the function of these genes could be the use of the inducible system in rodent *Plasmodium* or *T. gondii*.

Figure 5. Genetic studies of *pfptpa* and *pfpp2a*. (a,b) Gene-targeting construct for gene disruption by single homologous recombination using the pCAM-BSD, and the locus resulting from integration of the knockout *pfptpa* (a) or *pfpp2a* (b) construct. (c,d) Analysis of pCAM-BSD-*pfptpa* (c) and pCAM-BSD-*pfpp2a* (d) transfected 3D7 culture by PCR; lanes 1–3 correspond to DNA extracted from transfected parasites; lanes 4–6 correspond to DNA extracted from wild type parasites. Lanes 1 and 4 represent the detection of the full length wild type locus (PCR with p9-p8 and p31-p30 respectively); lanes 2 and 5 represent the detection of episomal DNA (PCR with p10 and p11); and lanes 3 and 6 represent the detection of integration of the insert (PCR with p9-p11 and p31-p11 respectively).

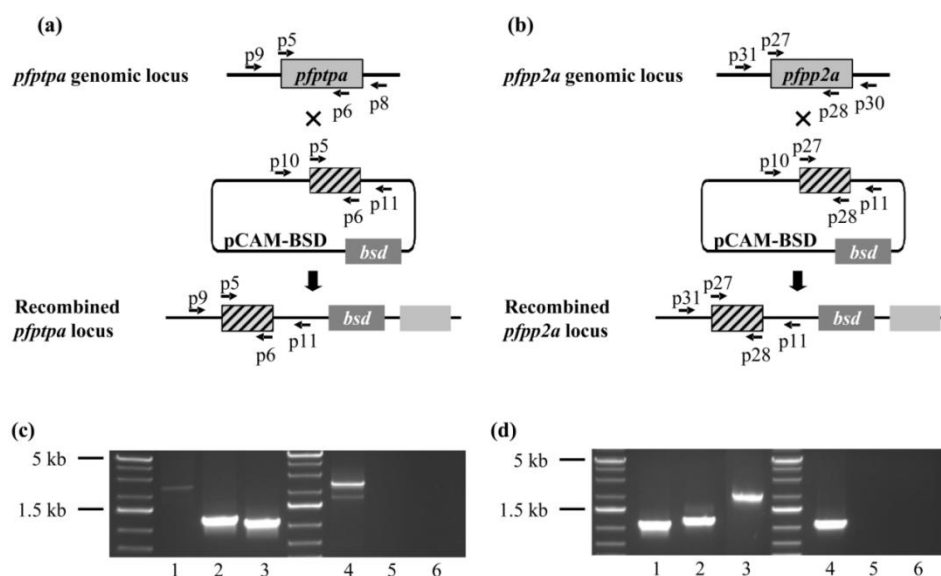
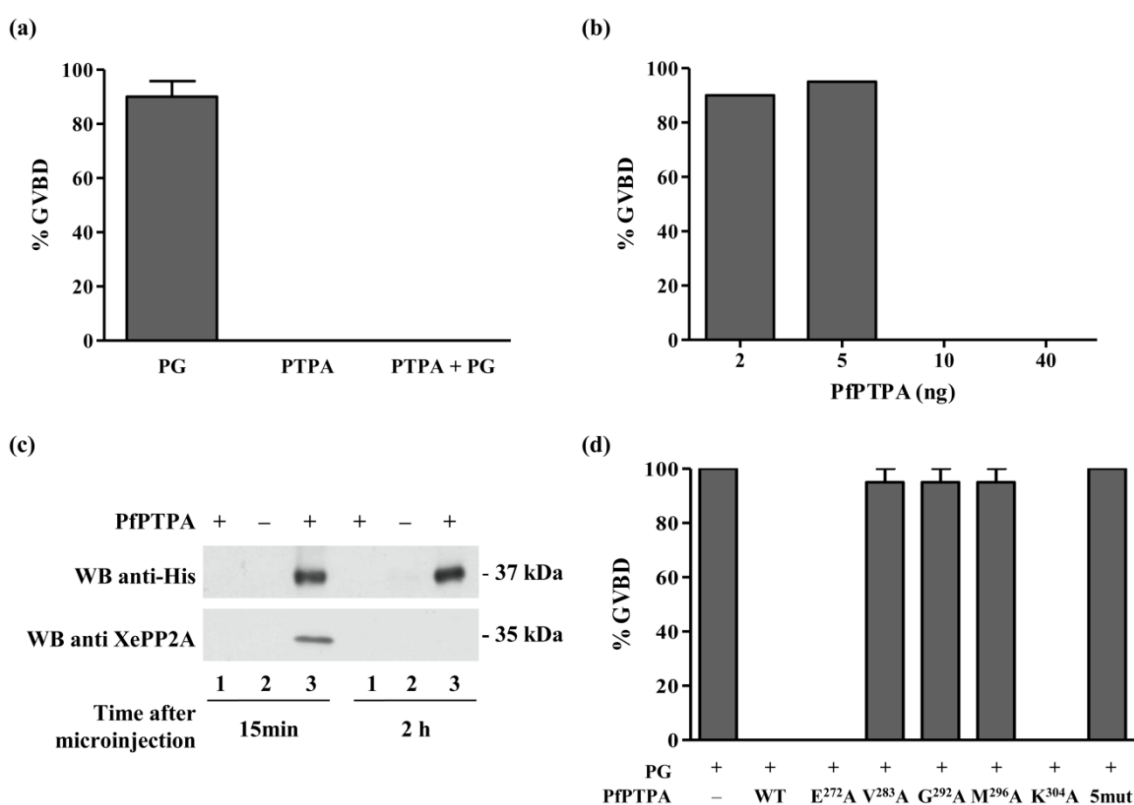


Figure 6. Inhibition of G2/M transition of *Xenopus* oocytes by PfPTPA. **(a)** Percentage of GVBD induced by the progesterone (PG), PfPTPA or the microinjection of PfPTPA followed by PG incubation; **(b)** Percentage of GVBD induced by PG incubation after microinjection of different amount of PfPTPA; **(c)** Binding of PfPTPA with XePP2A in *Xenopus* oocytes. Co-immunoprecipitation experiment of the PfPTPA-XePP2A complex with anti-His antibodies (recognizing recombinant PfPTPA tagged with 6-His) (lanes 2 and 3) from microinjected *Xenopus* oocytes. The anti-mouse IgG antibody (lanes 1) was used as a control. Immunoprecipitates from *Xenopus* oocytes microinjected with water (-) or PfPTPA (+) were eluted, separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblot analysis was performed with anti-His antibodies (recognizing PfPTPA) (upper panel) or anti-XePP2A antibodies (lower panel); **(d)** Effect of PfPTPA on progesterone-dependent GVBD in *Xenopus* oocytes. Percentage of GVBD induced by PG after the microinjection of 10 ng of PfPTPA WT or mutated ($n = 2$).



2.6. Inhibition of G2/M Transition of *Xenopus* oocytes by PfPTPA

PP2A is one of the major Ser/Thr phosphatases which dephosphorylate diverse proteins involved in the control of eukaryotic cell cycle [57–59]. In the context of *Xenopus* oocytes, inhibition of PP2A promotes G2/M transition by enabling the activation of the M-Phase Promoting Factor, universal factor of M-Phase entry. Thus, activity of PP2A contributes to block of oocytes in the G2-like state while antagonizing MPF activation [60]. G2/M transition in *Xenopus* oocytes can be triggered *in vitro* by hormonal stimulation through addition of progesterone in the medium [61], provoking an oocyte Germinal Vesicle Breakdown or GVBD. If PfPTPA activates PP2A, its preinjection in oocytes will lead to an inhibition of progesterone-induced maturation. With this rationale in mind, we assessed the impact

of PfPPTA on the G2/M transition induced by progesterone. First, it is important to emphasize that the microinjection of PfPPTA alone did not produce any GVBD (Figure 6a), however, as expected the progesterone induced GVBD (Figure 6a). Results presented in Figure 6a showed that PfPPTA was able to block the GVBD induced by progesterone. The threshold of this inhibition started to be observed at 10 ng/oocyte (Figure 6b). In parallel, it was important to verify whether PfPPTA can bind *Xenopus* PP2A (XePP2A). As shown in Figure 6c, the use of specific PP2A antibodies for immunoblot analysis of eluates co-immunoprecipitated with anti-His antibodies revealed the presence of XePP2A in the complex as early as 15 mn post injection. This complex was not detectable 2 and 18 h post-injection, although PfPPTA was still present in oocyte extracts, suggesting an early detection and rapid action of PfPPTA. In this model, we propose that PfPPTA would activate PP2A which consequently dephosphorylates a key substrate required for the signal pathway activated by progesterone.

Next, we used this approach to evaluate the contribution to this activity of the amino acid residues involved in PP2A binding. Results showed that the mutations V²⁸³A, G²⁹²A and M²⁹⁶A completely abrogated the function of PfPPTA as GVBD was still observed after progesterone treatment (Figure 6d). It is notable that co-immunoprecipitation experiments showed that these three mutated proteins exhibited a strong decrease of their binding capacity to XePP2A (Supplemental Figure S4). Concerning E²⁷²A and K³⁰⁴A mutated proteins, no loss of function was detectable. Altogether, these data confirmed the role of the residue G²⁹² and showed that the residues V²⁸³ and M²⁹⁶ participate also in the function of PfPPTA. However, the residues E²⁷² and K³⁰⁴ did not seem to affect either the binding or the function of PfPPTA.

3. Experimental Section

3.1. Materials

Plasmid pETDuet-1 was purchased from Novagen. Plasmids pCAM-BSD and pCAM-BSD-HA were kind gift from C. Doerig (Monash University, Melbourne, Australia) and plasmid pARL was kind gift from the C. Sanchez (Heidelberg, Germany). Protein phosphatase 2A C subunit (human recombinant) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI 48108, USA). Monoclonal antibodies anti-PP2A alpha, anti-GFP, anti-penta His and horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG were purchased from Abcam (Cambridge, UK), Roche (Basel, Switzerland), Qiagen (Venlo, The Netherlands) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) respectively.

3.2. Phylogenetic Analyses and Secondary Structure Prediction

Protein sequences (listed in Supplemental Table S2) were aligned using the ClustalW algorithm implemented in the BioEdit v7.1 software (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), and manually corrected. Maximum likelihood trees were built using MEGA5 [45] under the JTT + I + G model, with 100 bootstrap repetitions of the following species: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium yoelii yoelii*, *Toxoplasma gondii*, *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Trypanosoma brucei*, *Tetrahymena thermophila*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Theileria parva*, *Drosophila melanogaster*, *Leishmania major*, *Oryza sativa*, *Caenorhabditis elegans* and *Schistosoma mansoni*.

PfPTPA secondary prediction was carried out using the ModWeb server [46].

3.3. Preparation of Parasites

P. falciparum 3D7 clone was grown according to Trager *et al.* [62], in RPMI-1640 medium supplemented with 0.5% AlbuMAXTMII (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), 0.2 mM Hypoxanthin (CCPro, Oberdorla, Germany) and 20 µg/mL Gentamycin (Invitrogen), in the presence of O+ erythrocytes. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO₂). Parasites were synchronized by a double sorbitol treatment as previously described [63]. To isolate total DNA or protein, parasitized erythrocytes were lysed by saponine [64] and pelleted. Soluble protein extracts were prepared by resuspending parasite pellet in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 and EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Boulogne Billancourt, France) for one hour on wheel at 4 °C followed by a sonication step. Total DNA was extracted using the KAPA Express Extract kit (KAPABioSystem, Montrouge, France) according to the manufacturer's protocol. Genomic DNA (gDNA) was resuspended parasite pellet in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 µg/mL proteinase K and 2% SDS) during 2 h at 55 °C followed by two extraction steps with phenol-chloroform (addition of 1 volume). gDNA was then precipitated with 1/10th volume of sodium acetate and 2 volumes of Ethanol 100%. gDNA was washed twice and resuspended in H₂O.

3.4. Localization of PfPTPA and PfPP2A

All primers used throughout this study are listed in Supplemental Table S1. For an episomal expression of PfPTPA-GFP or PfPP2A-GFP, the full-length coding region of *pfptpa* (Pf3D7_1430100) and *pfpp2a* (Pf3D7_0314400) were amplified from first strand cDNA by PCR using the primers p3-p4 and p25-p26 respectively containing XhoI and KpnI restriction sites. PCR fragments were cloned into PCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, San Diego, CA, USA) and their nucleotide sequences were verified by sequencing (Eurofins, Ebersberg, Germany). PCR products were then subcloned in frame with GFP into pARL vector [51] digested with XhoI and KpnI. The plasmid carries the human *dhfr* gene for selection with WR99210 and the *pfert* promoter. Ring stages 3D7 parasites were transfected with 100 µg of plasmid DNA by electroporation, according to Sidhu *et al.* [65]. The populations of stably transfected parasites were obtained after six weeks. Live parasites were analyzed and images were recorded by fluorescence microscopy (LSM710, Zeiss, Marly le Roi, France).

3.5. Generation of *P. falciparum* Transgenic Parasites

The disruption of *pfptpa* and *pfpp2a* was performed by the insertion of a PCR product corresponding to a 5' portion from the PfPTPA (765 bp) and PfPP2A (800 bp) sequences into the pCAM-BSD vector that contains a cassette conferring resistance to blasticidin. The insert was obtained using 3D7 genomic DNA as template and the oligonucleotides p5-p6 and p27-p28 which contain PstI and BamHI restriction sites respectively.

P. falciparum parasites (ring stages) were transfected as described above. 48 h after transfection, in order to select transformed parasites, blasticidin (Invivogen, San Diego, CA, USA) was added to a

final concentration of 2.5 µg/mL. Resistant parasites appeared after three to four weeks and were maintained under drug selection. Populations of stably transfected parasites were obtained after six weeks.

3.6. Genotype and Phenotype Analysis of *P. falciparum* Transfectants

Genotype of *pfptpa* and *pfpp2a* knock-out parasites was analyzed by PCR on genomic DNA using the primers p9 and p31 respectively (derived from the 5' non-translated region and absent in the construct) and p11 specific for the pCAM-BSD vector.

In order to study the phenotype of knock-out parasites, cloning by limiting dilution was performed. Limiting dilutions were set up in 96-well plates at 3% hematocrit in RPMI-1640 medium supplemented with 0.5% AlbuMAX™II, 0.2 mM Hypoxanthin, 20 µg/mL Gentamycin and 2.5 µg/mL blasticidin. Each well contained 200 µL of medium and an average of 0.1–0.5 parasite. Medium was changed at two or three day intervals beginning at day seven. At day 21, smears were performed to select positive wells. Six positive wells were selected and amplified. Cloning was verified by PCR on genomic extracted DNA with primers p9-p8 for *pfptpa* and p31-p30 for *pfpp2a*.

3.7. Recombinant Proteins Expression and Purification

In order to obtain the coding region of PfPPTA, primers p1 and p2 (Supplemental Table S1) were designed according to the sequence of putative PfPPTA (Pf3D7_1430100) available in *Plasmodium* Data Base (PlasmoDB) (<http://plasmodb.org/plasmo/>). PCR was performed on first strand cDNA from unsynchronized blood cultures of *P. falciparum* 3D7 with the p1 and p2 primers using the Advantage 2 PCR kit (Clontech, St. Germain-en-Layes, France). PCR products were cloned in PCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced. Comparative analyses were performed with BIOEDIT software and ClustalW algorithm. After sequence analysis, the coding region of PfPPTA was subcloned in pETDuet-1 which allows the expression of a protein fused with six histidines tag.

With the purpose to produce a recombinant PfPP2A protein, PCR was performed on first strand cDNA from unsynchronized blood cultures of *P. falciparum* 3D7 with the p23 and p24 primers. PCR products were sequenced and subcloned in pETDuet-1 as describe above.

To obtain the PfPPTA mutant constructs, we carried out a PCR-based site-directed mutagenesis strategy using ISIS Proofreading DNA Polymerase. pETDuet-PfPPTA was used as template with primers p13-p14 (PfPPTA E²⁷²A), p15-p16 (PfPPTA V²⁸³A), p17-p18 (PfPPTA G²⁹²A), p19-p20 (PfPPTA M²⁹⁶A) and p21-p22 (PfPPTA K³⁰⁴A). The PCR conditions consisted of 1 min at 95 °C followed by 16 cycles at 95 °C (30 s), 50 °C (1 min) and 72 °C (9 min). The parental DNA plasmid was digested with DpnI and an aliquot was used to transform XL10-Gold Ultracompetent cells (Stratagene, Amsterdam Zuidoost, The Netherlands). Mutated plasmids were checked by sequencing and then used for the expression of mutated PfPPTA recombinant proteins. A *pfptpa-5mut* gene containing all five mutations with optimized codons has been synthesized (Genscript, Piscataway, NJ, USA) (Sequence presented in Supplemental Figure S3). In order to express PfPPTA-5mut recombinant protein, this synthetic gene was subcloned in pETDuet vector.

Expression of PfPPTA-6His and mutated PfPPTA-6His was carried out in the *E. coli* BL21 strain in the presence of 0.5 mM IPTG at 16 °C overnight. Proteins were extracted in lysis buffer (20 mM

Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, lysozyme 1 mg/mL and Protease inhibitor Cocktail (Roche)) during 1 h at 4 °C on wheel followed by a sonication step. The extract was loaded on a 1 mL nickel Ni-NTA column (Protino NiNTA, Macherey Nagel, Düren, Germany). Washing steps were carried out with a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl and 20 mM Imidazole. Proteins eluted with Imidazole gradient were dialyzed against 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl. Under these conditions, the purity checked by SDS-PAGE followed by SimplyBlue™ safe staining (Invitrogen, San Diego, CA, USA) was >90%.

Several attempts to produce PfPP2A were made using pETDuet plasmid containing the coding region of PfPP2A. Unfortunately, we could not produce a concentrated, soluble and active recombinant PfPP2A protein. Considering sequence homology between PfPP2A and mammalian PP2A, activity and interaction tests were performed using *Xenopus* (endogene) or Human PP2A (Cayman, Tallinn, Estonia).

3.8. RNA Synthesis of PfPP2A

Capped mRNA (cRNA) was synthesized using a T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX, USA). cRNA was transcribed from 1 µg of PfPP2A-pGBKT7 linearized by BamHI (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). cRNA was precipitated by 2.5 M LiCl, washed in 70% ethanol resuspended in 20 µL diethyl pyrocarbonate-treated water and quantified by spectrophotometry. Finally 1 µg of cRNA was analyzed with a denaturing agarose gel. Gel staining with 10 µg/mL ethidium bromide allowed confirmation of the size of PfPP2A cRNA and the absence of abortive transcript.

3.9. Induction of *Xenopus* Oocytes Germinal Vesicle Breakdown and Co-Immunoprecipitation

Preparation of *Xenopus laevis* oocytes and microinjection experiments were performed as previously described [66]. Two approaches were used.

Briefly, in each assay, 20 oocytes removed from at least two or three animals were pre-injected with His6-PfPPTA (wild type or mutated) recombinant proteins 1 h before incubation with 10 µM of human progesterone (Sigma, St. Louis, MO, USA). Progesterone alone was used as positive control of oocyte maturation. Preliminary experiments using different concentrations ranging from 2 to 40 ng per injection showed that 10 ng of PfPPTA was sufficient to inhibit dramatically progesterone induced GVBD. GVBD was detected by the appearance of a white spot at the apex of the animal pole after 15 h.

In order to carry out immunoprecipitation, oocyte extracts from 20 oocytes removed from at least two or three animals were prepared 15 min after the microinjection of PfPPTA (WT or mutated) as follows: oocytes were lysed in buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05% SDS, 0.5% Triton X100, 5 mM MgCl₂, 1 mg/mL bovine serum albumin, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL soybean trypsin inhibitor, 10 µg/mL benzamidine, 1 mM PMSF, 1 mM sodium vanadate) and centrifuged at 4 °C for 15 min at 10,000g. To detect His6-PfPPTA proteins, electrophoresis followed by western-blot analysis was performed on oocyte extracts. The membranes were developed with anti-penta His antibodies (Qiagen, Courtaboeuf, France).

A second approach was used in order to test for PfPPTA interaction with PfPP2A. In each assay, 20 oocytes removed from at least two or three different animals were pre-injected with PfPP2A cRNA 18 h before microinjection with wild-type or mutated PfPPTA proteins. As a control, PfPPTA

recombinant protein was injected alone. Oocyte extracts were prepared 15 min after microinjection to detect interaction of PfPP2A with PfPPTA proteins. 180 μ L of oocyte lysate in PY buffer [67] were incubated with 2 μ L of antibodies during 3 h at 4 °C with rotation. Then, 50 μ L of 50% solution protein A sepharose (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added during 1 h. After three washes of 15 min, beads were resuspended in 6 μ L of buffer and electrophoresis followed by western-blot analysis was performed. Co-immunoprecipitations were done using anti-His antibodies (Qiagen, Courtaboeuf, France), anti-Myc (Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) or anti-mouse antibodies as control. The membranes were revealed either by anti-Myc antibodies (Santa-Cruz Biotechnology) or by anti-His antibodies (Qiagen) (dilution 1/1000). Antibodies complexes were detected using the Western blotting Luminol Reagent (sc-2048, Santa-Cruz Biotechnology).

3.10. Assays for PP2A and Effect of PfPPTA

Phosphatase assays were carried out in buffer containing 40 mM Tris-HCl pH 8.4, 34 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.05 mg/mL Bovine serum albumin (BSA) and 1 mM ATP at 37 °C during 30 min with 20 mM para-NitroPhenyl Phosphate substrat (pNPP). Initial experiments were performed to determine the optimal conditions for human PP2A activity. The reaction was started by adding 20 mM pNPP in a final volume of 200 μ L. After an incubation period of 30 min at 37 °C, the liberated para-Nitrophenol was quantified by measurement of absorbance at 405 nm. To investigate the role of PfPPTA on PP2A, 0.04 μ g of human PP2A was preincubated with different quantities ranging from 0 to 0.4 μ g of recombinant WT or mutated PfPPTA during 30 min at 37 °C before testing the PP2A phosphatase activity.

3.11. Measurement of Binding of PfPPTA to PP2A

Binding of PfPPTA to human PP2A was assessed by an ELISA-based assay. Plates were coated with 1 μ g/mL of human PP2A or BSA in PBS overnight at 4 °C. Following washings with PBS-Tween 20 0.1%, plates were blocked with PBS-gelatin 1% for 1 h at room temperature. Coated plates were then incubated with different concentrations of PfPPTA (WT or mutated), previously labeled with biotin-*N*-hydroxysuccinimide according to the manufacturer's instructions (Calbiochem, Nottingham, UK). Incubation of biotinylated-PfPPTA with the different proteins was performed in PBS-Tween 20 0.1% at 37 °C for 2 h. Following five washes (as described above), binding was detected using streptavidin-horseradish peroxidase. After an incubation time of 20 min and five washes, tetramethylbenzidine (TMB) (Uptima, Montluçon, France) was added, and the reaction was stopped by using 2N HCl. The optical density was measured on an ELISA plate reader at 450 nm.

4. Conclusions

In this work, we report the first characterization of PfPPTA, the homolog of the human Phosphotyrosyl Phosphatase Activator, a regulator of PP2A. We showed the direct interaction of PfPPTA with PfPP2A and assessed the importance of the V²⁸³, G²⁹² and M²⁹⁶ residues in this interaction in absence of another interacting site. As expected, PfPPTA activates PP2A *in vitro* with a critical

contribution of the G²⁹² residue for this activity. Using the *Xenopus* oocyte model, we observed that the microinjection of PfPTPA blocked the G2/M transition. PfPTPA seems to be essential for the completion of the intraerythrocytic lifecycle of the parasite. However, in order to elucidate the exact role of PTPA in the parasite cell cycle, assays for conditional KO in *Plasmodium berghei* are under investigation. The confirmation of an essential role of PTPA, would suggest the consideration of this protein as a new lead for drug design.

Acknowledgments

We thank Sophia Lafitte and Caroline De Witte for technical assistance and Mathieu Vanderstraete for his advice in the phylogenetic analysis. We also thank Alain Martoriati for helpful discussions. This work is supported by Inserm, CNRS and University Lille Nord de France.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Manning, G.; Whyte, D.B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*, 1912–1934.
2. Sacco, F.; Perfetto, L.; Castagnoli, L.; Cesareni, G. The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2732–2739.
3. Bollen, M.; Peti, W.; Ragusa, M.J.; Beullens, M. The extended PP1 toolkit: Designed to create specificity. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 450–458.
4. Fardilha, M.; Esteves, S.L.; Korrodi-Gregorio, L.; da Cruz e Silva, O.A.; da Cruz e Silva, F.F. The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interacting proteins to health and disease. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3996–4017.
5. Hendrickx, A.; Beullens, M.; Ceulemans, H.; Den Abt, T.; van Eynde, A.; Nicolaescu, E.; Lesage, B.; Bollen, M. Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 365–371.
6. Cayla, X.; Goris, J.; Hermann, J.; Hendrix, P.; Ozon, R.; Merlevede, W. Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activator from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry* **1990**, *29*, 658–667.
7. Junttila, M.R.; Puustinen, P.; Niemela, M.; Ahola, R.; Arnold, H.; Bottzauw, T.; Ala-aho, R.; Nielsen, C.; Ivaska, J.; Taya, Y.; *et al.* CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* **2007**, *130*, 51–62.
8. Kong, M.; Ditsworth, D.; Lindsten, T.; Thompson, C.B. Alpha4 is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Mol. Cell* **2009**, *36*, 51–60.
9. Li, M.; Guo, H.; Damuni, Z. Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry* **1995**, *34*, 1988–1996.
10. Mochida, S.; Maslen, S.L.; Skehel, M.; Hunt, T. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science* **2010**, *330*, 1670–1673.

11. Smetana, J.H.; Zanchin, N.I. Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, alpha 4 and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL). *FEBS J.* **2007**, *274*, 5891–5904.
12. Bernal, M.; Sanchez-Romero, M.A.; Salas-Pino, S.; Daga, R.R. Regulation of fission yeast morphogenesis by PP2A activator pta2. *PLoS One* **2012**, *7*, e32823.
13. Mitchell, D.A.; Sprague, G.F., Jr. The PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator, Ncs1p (Rrd1p), functions with Cla4p to regulate the G(2)/M transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 488–500.
14. Rempola, B.; Kaniak, A.; Migdalski, A.; Rytka, J.; Slonimski, P.P.; di Rago, J.P. Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which encode two putative activators of the PhosphoTyrosyl Phosphatase Activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.: MGG* **2000**, *262*, 1081–1092.
15. Van Hoof, C.; Janssens, V.; de Baere, I.; de Winde, J.H.; Winderickx, J.; Dumortier, F.; Thevelein, J.M.; Merlevede, W.; Goris, J. The *Saccharomyces cerevisiae* homologue YPA1 of the mammalian PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator of protein phosphatase 2A controls progression through the G1 phase of the yeast cell cycle. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302*, 103–120.
16. Van Hoof, C.; Janssens, V.; de Baere, I.; Stark, M.J.; de Winde, J.H.; Winderickx, J.; Thevelein, J.M.; Merlevede, W.; Goris, J. The *Saccharomyces cerevisiae* PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator proteins are required for a subset of the functions disrupted by protein phosphatase 2A mutations. *Exp. Cell Res.* **2001**, *264*, 372–387.
17. Cayla, X.; van Hoof, C.; Bosch, M.; Waelkens, E.; Vandekerckhove, J.; Peeters, B.; Merlevede, W.; Goris, J. Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15668–15675.
18. Van Hoof, C.; Janssens, V.; Dinisliotou, A.; Merlevede, W.; Goris, J. Functional analysis of conserved domains in the PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator. Molecular cloning of the homologues from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12899–12908.
19. Jordens, J.; Janssens, V.; Longin, S.; Stevens, I.; Martens, E.; Bultynck, G.; Engelborghs, Y.; Lescrinier, E.; Waelkens, E.; Goris, J.; *et al.* The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6349–6357.
20. Chao, Y.; Xing, Y.; Chen, Y.; Xu, Y.; Lin, Z.; Li, Z.; Jeffrey, P.D.; Stock, J.B.; Shi, Y. Structure and mechanism of the PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator. *Mol. Cell* **2006**, *23*, 535–546.
21. Leulliot, N.; Vicentini, G.; Jordens, J.; Quevillon-Cheruel, S.; Schiltz, M.; Barford, D.; van Tilbeurgh, H.; Goris, J. Crystal structure of the PP2A phosphatase activator: Implications for its PP2A-specific PPIase activity. *Mol. Cell* **2006**, *23*, 413–424.
22. Magnusdottir, A.; Stenmark, P.; Flodin, S.; Nyman, T.; Hammarstrom, M.; Ehn, M.; Bakali, H.M.; Berglund, H.; Nordlund, P. The crystal structure of a human PP2A phosphatase activator reveals a novel fold and highly conserved cleft implicated in protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22434–22438.

23. Bhattacharyya, M.K.; Hong, Z.; Kongkasuriyachai, D.; Kumar, N. *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a *glc7* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 739–747.
24. Blisnick, T.; Vincensini, L.; Fall, G.; Braun-Breton, C. Protein phosphatase 1, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 591–601.
25. Dobson, S.; Kar, B.; Kumar, R.; Adams, B.; Barik, S. A novel tetratricopeptide repeat (TPR) containing PP5 serine/threonine protein phosphatase in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *BMC Microbiol.* **2001**, *1*, 31.
26. Dobson, S.; May, T.; Berriman, M.; del Vecchio, C.; Fairlamb, A.H.; Chakrabarti, D.; Barik, S. Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: Inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin-cyclosporin complex. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, *99*, 167–181.
27. Fernandez-Pol, S.; Slouka, Z.; Bhattacharjee, S.; Fedotova, Y.; Freed, S.; An, X.; Holder, A.A.; Campanella, E.; Low, P.S.; Mohandas, N.; *et al.* A bacterial phosphatase-like enzyme of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses tyrosine phosphatase activity and is implicated in the regulation of band 3 dynamics during parasite invasion. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 1179–1191.
28. Guttery, D.S.; Poulin, B.; Ferguson, D.J.; Szoor, B.; Wickstead, B.; Carroll, P.L.; Ramakrishnan, C.; Brady, D.; Patzewitz, E.M.; Straschil, U.; *et al.* A unique protein phosphatase with kelch-like domains (PPKL) in *Plasmodium* modulates ookinete differentiation, motility and invasion. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002948.
29. Kumar, R.; Adams, B.; Oldenburg, A.; Musiyenko, A.; Barik, S. 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.* **2002**, *1*, 5.
30. Kumar, R.; Musiyenko, A.; Barik, S. *Plasmodium falciparum* calcineurin and its association with heat shock protein 90: Mechanisms for the antimalarial activity of cyclosporin A and synergism with geldanamycin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, *141*, 29–37.
31. Kumar, R.; Musiyenko, A.; Oldenburg, A.; Adams, B.; Barik, S. Post-translational generation of constitutively active cores from larger phosphatases in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: Implications for proteomics. *BMC Mol. Biol.* **2004**, *5*, 6.
32. Li, J.L.; Baker, D.A. Protein phosphatase beta, a putative type-2A protein phosphatase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem./FEBS* **1997**, *249*, 98–106.
33. Li, J.L.; Baker, D.A. A putative protein serine/threonine phosphatase from *Plasmodium falciparum* contains a large N-terminal extension and five unique inserts in the catalytic domain. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *95*, 287–295.
34. Lindenthal, C.; Klinkert, M.Q. Identification and biochemical characterisation of a protein phosphatase 5 homologue from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *120*, 257–268.
35. Mamoun, C.B.; Goldberg, D.E. *Plasmodium* protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1beta and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity *in vitro*. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 973–981.

36. Mamoun, C.B.; Sullivan, D.J., Jr.; Banerjee, R.; Goldberg, D.E. Identification and characterization of an unusual double serine/threonine protein phosphatase 2C in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11241–11247.
37. Patzewitz, E.M.; Guttery, D.S.; Poulin, B.; Ramakrishnan, C.; Ferguson, D.J.; Wall, R.J.; Brady, D.; Holder, A.A.; Szoor, B.; Tewari, R. An ancient protein phosphatase, SHLP1, is critical to microneme development in *Plasmodium* ookinetes and parasite transmission. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 622–629.
38. Philip, N.; Vaikkinen, H.J.; Tetley, L.; Waters, A.P. A unique Kelch domain phosphatase in *Plasmodium* regulates ookinete morphology, motility and invasion. *PLoS One* **2012**, *7*, e44617.
39. Singh, S.; More, K.R.; Chitnis, C.E. Role of calcineurin and actin dynamics in regulated secretion of microneme proteins in *Plasmodium falciparum* merozoites during erythrocyte invasion. *Cell. Microbiol.* **2013**, doi:10.1111/cmi.12177.
40. Daher, W.; Browaeys, E.; Pierrot, C.; Jouin, H.; Dive, D.; Meurice, E.; Dissous, C.; Capron, M.; Tomavo, S.; Doerig, C.; *et al.* 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.* **2006**, *60*, 578–590.
41. Freville, A.; Cailliau-Maggio, K.; Pierrot, C.; Tellier, G.; Kalamou, H.; Lafitte, S.; Martoriati, A.; Pierce, R.J.; Bodart, J.F.; Khalife, J. *Plasmodium falciparum* encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1: Perspectives for novel anti-plasmodial therapy. *BMC Biol.* **2013**, *11*, 80.
42. Freville, A.; Landrieu, I.; Garcia-Gimeno, M.A.; Vicogne, J.; Montbarbon, M.; Bertin, B.; Verger, A.; Kalamou, H.; Sanz, P.; Werkmeister, E.; *et al.* *Plasmodium falciparum* inhibitor-3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1306–1321.
43. Dobson, S.; Kumar, R.; Bracchi-Ricard, V.; Freeman, S.; Al-Murrani, S.W.; Johnson, C.; Damuni, Z.; Chakrabarti, D.; Barik, S. Characterization of a unique aspartate-rich protein of the SET/TAF-family in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, which inhibits protein phosphatase 2A. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *126*, 239–250.
44. Aurrecoechea, C.; Brestelli, J.; Brunk, B.P.; Dommer, J.; Fischer, S.; Gajria, B.; Gao, X.; Gingle, A.; Grant, G.; Harb, O.S.; *et al.* PlasmoDB: A functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D539–D543.
45. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 2731–2739.
46. Pieper, U.; Webb, B.M.; Barkan, D.T.; Schneidman-Duhovny, D.; Schlessinger, A.; Braberg, H.; Yang, Z.; Meng, E.C.; Pettersen, E.F.; Huang, C.C.; *et al.* ModBase, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D465–D474.
47. Bowyer, P.W.; Simon, G.M.; Cravatt, B.F.; Bogyo, M. Global profiling of proteolysis during rupture of *Plasmodium falciparum* from the host erythrocyte. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, doi:10.1074/mcp.M110.001636.

48. Lopez-Barragan, M.J.; Lemieux, J.; Quinones, M.; Williamson, K.C.; Molina-Cruz, A.; Cui, K.; Barillas-Mury, C.; Zhao, K.; Su, X.Z. Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 587.
49. Treeck, M.; Sanders, J.L.; Elias, J.E.; Boothroyd, J.C. The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. *Cell Host Microbe* **2011**, *10*, 410–419.
50. Longin, S.; Jordens, J.; Martens, E.; Stevens, I.; Janssens, V.; Rondelez, E.; de Baere, I.; Derua, R.; Waelkens, E.; Goris, J.; *et al.* An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methylesterase and can be re-activated by the PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator. *Biochem. J.* **2004**, *380*, 111–119.
51. Kuhn, Y.; Sanchez, C.P.; Ayoub, D.; Saridaki, T.; van Dorsselaer, A.; Lanzer, M. Trafficking of the phosphoprotein PfCRT to the digestive vacuolar membrane in *Plasmodium falciparum*. *Traffic* **2010**, *11*, 236–249.
52. Lee, T.Y.; Lai, T.Y.; Lin, S.C.; Wu, C.W.; Ni, I.F.; Yang, Y.S.; Hung, L.Y.; Law, B.K.; Chiang, C.W. The B56gamma3 regulatory subunit of protein phosphatase 2A (PP2A) regulates S phase-specific nuclear accumulation of PP2A and the G1 to S transition. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21567–21580.
53. Van Hoof, C.; Martens, E.; Longin, S.; Jordens, J.; Stevens, I.; Janssens, V.; Goris, J. Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 93–102.
54. Kinoshita, N.; Ohkura, H.; Yanagida, M. Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* **1990**, *63*, 405–415.
55. Gotz, J.; Probst, A.; Ehler, E.; Hemmings, B.; Kues, W. Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12370–12375.
56. Yokoyama, D.; Saito-Ito, A.; Asao, N.; Tanabe, K.; Yamamoto, M.; Matsumura, T. Modulation of the growth of *Plasmodium falciparum* *in vitro* by protein serine/threonine phosphatase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *247*, 18–23.
57. Jeong, A.L.; Yang, Y. PP2A function toward mitotic kinases and substrates during the cell cycle. *BMB Rep.* **2013**, *46*, 289–294.
58. Jiang, Y. Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 440–449.
59. Krasinska, L.; Domingo-Sananes, M.R.; Kapuy, O.; Parisi, N.; Harker, B.; Moorhead, G.; Rossignol, M.; Novak, B.; Fisher, D. Protein phosphatase 2A controls the order and dynamics of cell-cycle transitions. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 437–450.
60. Lorca, T.; Bernis, C.; Vigneron, S.; Burgess, A.; Brioudes, E.; Labbe, J.C.; Castro, A. Constant regulation of both the MPF amplification loop and the Greatwall-PP2A pathway is required for metaphase II arrest and correct entry into the first embryonic cell cycle. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 2281–2291.
61. Ferrell, J.E., Jr. *Xenopus* oocyte maturation: New lessons from a good egg. *BioEssays* **1999**, *21*, 833–842.
62. Trager, W.; Jensen, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **1976**, *193*, 673–675.

63. Vernes, A.; Haynes, J.D.; Tapchaisri, P.; Williams, J.L.; Dutoit, E.; Diggs, C.L. *Plasmodium falciparum* strain-specific human antibody inhibits merozoite invasion of erythrocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1984**, *33*, 197–203.
64. Umlas, J.; Fallon, J.N. New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1971**, *20*, 527–529.
65. Sidhu, A.B.; Valderramos, S.G.; Fidock, D.A. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 913–926.
66. Vicogne, J.; Cailliau, K.; Tulasne, D.; Browaeys, E.; Yan, Y.T.; Fafeur, V.; Vilain, J.P.; Legrand, D.; Trolet, J.; Dissous, C. Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 37407–37414.
67. Azzi, L.; Meijer, L.; Ostvold, A.C.; Lew, J.; Wang, J.H. Purification of a 15-kDa cdk4- and cdk5-binding protein. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13279–13288.

Supplementary Information

Table S1. List of primers used throughout this study.

N° prim	Sequence	Orientation	Restriction site	Vector	Tagged gen	Use
PTPA						
p1	GGATCCGGGTGATGTAATAGCTTGAGTTA	F	BamHI	pETDuet 1	6-His	PfPTPA recombinant protein
p2	GTCGACTTAAAAGTCTATCAAATTTCCAAATAATATGTG	R	Sall	pETDuet 1	6-His	PfPTPA recombinant protein
p3	CTCGAGATGGGTGATGTAATAGCTTGAG	F	XhoI	pARL	GFP	PfPTPA-GFP episomal construct
p4	GGTACCAAAGTCTATCAAATTTCCAAATAATATGTGTTG	R	KpnI	pARL	GFP	PfPTPA-GFP episomal construct
p5	CTGCAGATGGGTGATGTAATAGCTTGAG	F	PstI	pCAM BSD		KO construct
p6	GGATCCCATTAATAATAGTATATACAC	R	BamHI	pCAM BSD		KO construct
p9	GAAAATAATATTAATGTGCTTCC	F				Genotype of transfected parasite
p10	GTAATTTATGGGATAGCGATTTTTTACTGTCTG	F				Detection of episomes
p11	CCAAGCGCAATTAACCCCTACTAAAG	R				Detection of episomes
p12	GATCTAGCATAATCTGGAACATCATATGGATAG	R				Genotype of transfected parasite
p13	GCACCTTTCATGCATCATCCAAATG	F		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA E272A
p14	CATTGGGATGATGCATGAAAAGGTGC	R		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA E272A
p15	GATATATCTGGAGCTGAAACATGGGAA	F		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA V283A
p16	TTCCCATGTTTCAGCTCCAGATATATC	R		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA V283A
p17	GAAAAAATATGTAATGCATTACTTAAATGTAT	F		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA G292A
p18	ATACATTTAAGTAATGCATTACATATTTTTTC	R		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA G292A
p19	TGGATTACTTAAAGCGTATCAAGCTGAAA	F		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA M296A
p20	TTTCAGCTTGATACGCTTTAAGTAATCCA	R		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA M296A
p21	TGAAATAATAC AAGCGCACAAATATTAC	F		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA K304A
p22	GTAATATTTGTGCGCTTGTATTATTCA	R		pETDuet 1	6-His	mutagenesis PfPTPA K304A
PP2A						
p23	GGATCCGGCAAAAAGGAGAAGAAAGAAAGTG	F	BamHI	pETDuet 1	6-His	PfPP2A recombinant protein
p24	GTCGACTTATAAGAAGTAGGGTATGGTGCC	R	Sall	pETDuet 1	6-His	PfPP2A recombinant protein
p25	CTCGAGATGGCAAAAAGGAGAAGAAAGAAAG	F	XhoI	pARL	GFP	PfPP2A-GFP episomal construct
p26	GGTACCTAAGAAGTAGGGTATGGTGCC	R	KpnI	pARL	GFP	PfPP2A-GFP episomal construct
p27	CTGCAGATGGCAAAAAGGAGAAGAAAGAAAG	F	PstI	pCAM BSD		KO construct
p28	GGATCCCGATAACAATAATTAGGAGCTG	R	BamHI	pCAM BSD		KO construct
p31	AAAATATTCGGCTTTTATATCATTGG	F				Genotype of transfected parasite

Table S2. List of proteins used in phylogenetic analysis. For *Plasmodium* proteins, accession numbers are from PlasmoDB Database.

Species	PTPA orthologs	Inhibitor 2 PP2A orthologs	Inhibitor 2 PP1 orthologs	Inhibitor 3 PP1 orthologs
	Accession number	Accession number	Accession number	Accession number
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEE82701.1	AAF27100.1	AED96182.1	NP_565720 INH3
<i>Caenorhabditis elegans</i>	CCD73872.1	NP_001021332.1	NP_498147.1	WBGene00015579
<i>Danio rerio</i>	NP_001003425.2	AAQ97849.1	NP_991231.1	ENSDARP0000005235
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF51115.1	AAF55155.1	NP_524013.1	FBpp0078819
<i>Homo sapiens</i>	CAA60163.1	CAG46847.1	NP_006232.1	ENSP00000407981
<i>Leishmania major</i>	XP_001680923.1	XP_001685161.1	XP_003722091.1	LmjF.07.0743
<i>Mus musculus</i>	AAK62028.1	NP_076360.1	NP_080076.1	ENSMUSP0000004720
<i>Oryza sativa</i>	BAD37240.1	ABR26120.1	NP_001055135.1	NP_001052397
<i>Plasmodium berghei</i>	PBANKA_101460	PBANKA_081990	PBANKA_121850	PBANKA_051550
<i>Plasmodium chabaudi</i>	PCHAS_101540	PCHAS_082020	PCHAS_121920	PCHAS_051560
<i>Plasmodium falciparum</i>	PF3D7_1430100	PF3D7_0919000	PFIT_0320000	PFIT_1031100
<i>Plasmodium knowlesi</i>	PKH_132020	PKH_071620	PKH_082100	PCYB_062600
<i>Plasmodium vivax</i>	PVX_085035	PVX_099365	PVX_095235	PVX_111140
<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	PYYM_1016100	PYYM_0822900	PY06380	PYYM_0516000
<i>Schistosoma mansoni</i>	XP_002579273.1	CCD59858.1	Smp_046160.1	Smp_097560
<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_001010763.2	XP_001022132.2	XP_001024018.2	XP_001014401.1
<i>Theileria parva</i>	EAN33933.1	XP_763467.1	XP_764857.1	XP_764385.1
<i>Toxoplasma gondii</i>	XP_002369121.1	XP_002368303.1	XP_002368145.1	TGME49_226825
<i>Trypanosoma brucei</i>	AEEEX79776.1	XP_827991.1	CBH10274.1	Tb927.8.1040
<i>Xenopus laevis (or tropicalis)</i>	NP_001089500.1	NP_001079909.1	NP_001091136.1	NP_001004815.1

Figure S1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of PfPTPA cDNA. Nucleotides are numbered to the right of the sequence and amino acids are numbered under the sequence.

```

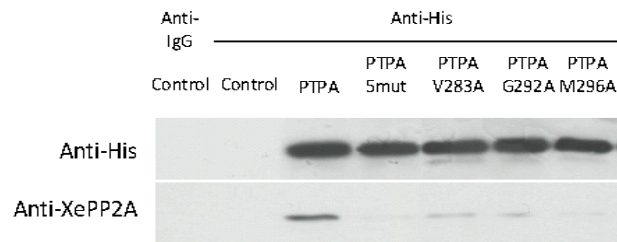
5' ATGGGTGATGTAATAAGCTTGAGTTATAAAATAATTAACGATGAAAGTATTATAAGATTACGAAAAGTTCTATATATAATGATATAAATTGAATTTATTA 100
   M G D V N S L S Y K I I N D E S I I R F T K S S I Y N D I I E F I
   1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
°
5' CGAATTTAAATAAATCAGTTGTCGGTGTGAAATGAAACCTTTAGAAGATTTTAAATTATGTAATGAAAATGATATGATTAATAATGACAATTTTTTATT 200
   T N L N K S V V G V E M K P L E D F K L C N E N D M I N N D N F L F
   34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67
°
5' CTTATCAAAAAATGTATATAATATTTTCAATTGATAAAAAATATGAACAAGTATTGATTCTTGTCCACCTATAAAATCAATCATCTCGATTGGTAAT 300
   L S K N V Y N I F Q L I K N M N K C I D S C P P I N Q S S R F G N
   68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
°
5' AGAGGATTTCAACATTTTGTGATGCATATTATAAAGAAGTTGATGAGTATTTACCTCATGCTTTATCAGAATCAACATACCTAATATATCTGAACATA 400
   R G F Q H F C D A Y Y K E V D E Y L P H A L S E S N I P N I S E H
   101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133
°
5' CTTATCAAAATATCTTATTATTTAAAGAATTCATTGGAAATAAAAAGAGAATAGATTATGGAACCTGGGCATGAATTAATTTTTTGCTTTTCCTCTTTTG 500
   T Y Q I S Y Y L K N S I G N K K R I D Y G T G H E L N F L L F L F C
   134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167
°
5' CCTAAATAAAATAAATTTCTTTATTCCTTCCGATTACAAGCACCTCGTCCTTGTTTTATATCGACAGTATTTAGAAGGAGTAAGAAGAGTGCAGATAATT 600
   L N K I N F F I P S D Y K H L V L V L Y R Q Y L E G V R R V Q I I
   168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200
°
5' TACACTGTGGAACCTGCAGGTAGTAGAGGGGCATGGGGATTGGATGATTTTCAATTTCTTGTTCCTTTTGGCGCAGCTCACTTTCTTACACAGGA 700
   Y T V E P A G S R G A W G L D D F Q F L V F L F G A A Q L S Y N R
   201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233
°
5' AAATAAAAACGGACGATATGAAAAAAGAATTGTTGGAATTGTGGCACCAGAAATTTTATATTTTGGATGCTCTTAAGTATATATCAATGATAAAACA 800
   K I K T D D I E K K E L L E L W A P K Y L Y F D A L K Y I S M I K H
   234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267
°
5' TGCACCTTTTCATGAATCATCCCAAATGTTGATGATATATCTGGAGTTGAAACATGGGAAAAAATATGTAATGGATTACTTAAAAATGTATCAAGCTGAA 900
   A P F H E S S Q M L Y D I S G V E T W E K I C N G L L K M Y Q A E
   268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300
°
5' ATAATACAAAAGCGACAAATATTACAACACATATATTTGGAAAATTTGATAGACTTTTAA
   I I Q K R Q I L Q H I L F G N L I D F
   301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320

```

Figure S3. Optimized sequence of PfPTPA 5mut.

5'	ATG GGC GAC GTG AAC TCC CTG AGC TAC AAA ATC ATC AAC GAC GAA TCA ATC ATC CGC TTT ACC AAA	66
1	M G D V N S L S Y K I I N D E S I I R F T K	
5'	TCG AGC ATC TAC AAC GAC ATT ATC GAA TTT ATT ACC AAC CTG AAT AAA AGC GTG GTT GGT GTC GAA	132
1	S S I Y N D I I E F I T N L N K S V V G V E	
5'	ATG AAA CCG CTG GAA GAT TTC AAG CTG TGC AAC GAA AAC GAT ATG ATC AAC AAC GAC AAC TTT CTG	198
1	M K A P L E D F K L C N E N D M I N N D N F L	
5'	TTC CTG TCA AAG AAC GTT TAC AAC ATC TTC CAG CTG ATC AAG AAC ATG AAC AAG TGC ATC GAT TCG	264
1	F L S K N V Y N I F Q L I K N M N K C I D S	
5'	TGT CCG CCG ATC AAC CAG AGC TCT CGT TTT GGC AAT CGC ATG GGT TTT CAA CAT TTC TGT GAT GCG	330
1	C P P I N Q S S R F G N R M G F Q H F C D A	
5'	TAT TAC AAA GAA GTG GAC GAA TAT CTG CCG CAT GCC CTG TCA GAA TCG AAC ATT CCG AAT ATC TCA	396
1	Y Y K E V D E Y L P H A L S E S N I P N I S	
5'	GAA CAC ACC TAC CAG ATT AGC TAC TAC CTG AAG AAC TCT ATC GGC AAC AAA AAG CGT ATC GAT TAT	462
1	E H T Y Q I S Y Y L K N S I G N K K R I D Y	
5'	GGC ACG GGT CAT GAA CTG AAT TTT CTG CTG TTT CTG TTC TGC CTG AAC AAA ATT AAC TTT TTC ATC	528
1	G T G H E L N F L L F L F C L N K I N F F I	
5'	CCG TCC GAC TAC AAG CAC CTG GTC CTG GTG CTG TAT CGT CAG TAC CTG GAA GGT GTT CGT CGC GTC	594
1	P S D Y K H L V L V L Y R Q Y L E G V R R V	
5'	CAA ATT ATC TAT ACC GTG GAA CCG GCA GGC AGC CGC GGT GCT TGG GGC CTG GAT GAC TTT CAG TTC	660
1	Q I I Y T V E P A G S R G A W G L D D F Q F	
5'	CTG GTT TTT CTG TTC GGC GCG GCC CAA CTG TCT TAC AAC CGC AAA ATT AAG ACG GAT GAC ATC GAA	726
1	L V F L F G A A Q L S Y N R K I K T D D I E	
5'	AAG AAA GAA CTG CTG GAA CTG TGG GCG CCG AAA TAT CTG TAC TTT GAT GCC CTG AAA TAT ATT AGT	792
1	K K E E L L E L W A P K Y L Y F D A L K Y I S	
5'	ATG ATC AAG CAT GCG CCG TTC CAC GCC AGT TCC CAG ATG CTG TAC GAC ATT TCC GGT GCA GAA ACG	858
1	M I K H A P F H A S S Q M L Y D I S G A E T	
5'	TGG GAA AAA ATC TGT AAT GCT CTG CTG AAG GCA TAT CAA GCT GAA ATT ATC CAA GCA CGC CAA ATT	924
1	W E K I C N A L L K A Y Q A E I I Q A R Q I	
5'	CTG CAG CAC ATC CTG TTC GGC AAC CTG ATT GAC TTC TGA	
1	L Q H I L F G N L I D F	

Figure S4. Binding of inactive mutated PfPTPA with XePP2A in oocytes. Co-immunoprecipitation experiment of the PfPTPA-XePP2A complexes was performed with anti- His antibodies (recognizing recombinant wild type and mutated PfPTPA) from microinjected *Xenopus* oocytes. Immunoprecipitates from *Xenopus* oocytes microinjected with water, WT or inactive mutated PfPTPA were eluted and separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblot analysis was performed with anti-His or anti-PP2A (Abcam) antibodies.



III. Interaction *in vivo* de PfPTPA et PfPP2A

Cette partie est consacrée aux données non publiées concernant l'étude de l'interaction *in vivo* de PfPTPA et PfPP2A. En effet, comme décrit précédemment, l'interaction des protéines PfPTPA et PfPP2A a été étudiée dans l'ovocyte de xénope (Vandomme, 2014) (Cf. B II 1) mais d'autres approches ont également été envisagées.

Nous avons tout d'abord utilisé le modèle de double hybride de levure. Pour cela l'ADNc codant pour PfPTPA a été cloné dans le vecteur pGAD-T7, puis cette construction a permis de transformer des levures AH109. Pourtant, comme pour PfI1^{PP2A}, la protéine n'était pas exprimée par la levure (Cf. A III 1 b i).

Par la suite, nous avons tenté de mettre en évidence l'interaction entre PfPTPA et PfPP2A chez le parasite par co-immunoprécipitation. Pour cela, nous avons préparé des extraits protéiques à partir de parasites exprimant les protéines fusionnées à la GFP (Cf. article). Cependant, lorsque ces extraits sont préparés en réalisant plusieurs cycles de congélation/décongélation (Cf Matériel et Méthodes), il s'avère que nos protéines d'intérêt ne sont pas solubles (Figure 37a). Une préparation réalisée à partir d'une culture de parasites très riche en schizontes (99%) a permis de détecter une très faible quantité de PfPTPA dans la fraction soluble (non présenté). Mais cette observation s'est révélée non reproductible. Nous avons donc essayé d'optimiser notre technique d'extraction en nous basant sur l'article de Hopp *et al.* (Hopp, 2012). Cette technique permet de solubiliser de façon séquentielle les protéines cytosoliques par une lyse en condition hypotonique, et les protéines liées aux membranes grâce à un traitement au carbonate. Les protéines membranaires restent insolubles. En utilisant cette méthode d'extraction, nous observons que les protéines PfPTPA et PfPP2A sont essentiellement présentes dans les fractions des protéines membranaires mais également faiblement détectées dans les fractions cytosoliques (Figure 37 b).

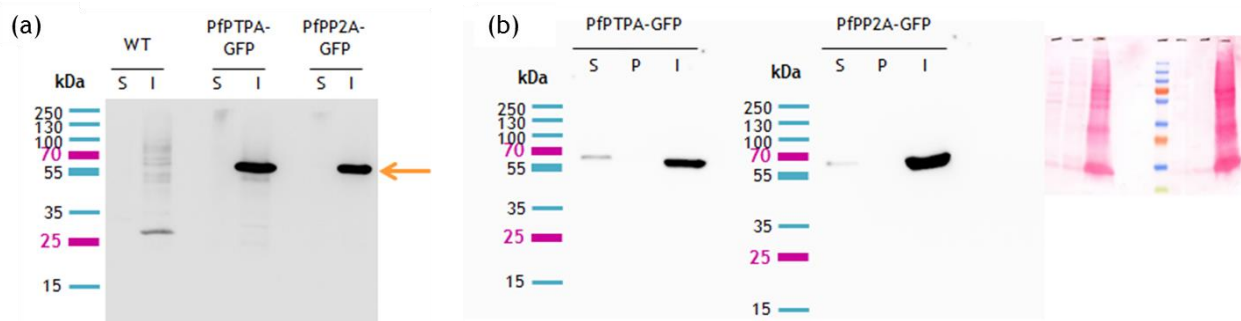


Figure 37 : Expression des protéines PfPTPA-GFP et PfPP2A-GFP chez le parasite et optimisation de l'extraction des protéines. (a) Extraction par congélation/décongélation. PfPTPA-GFP et PfPP2A-GFP sont présentes dans les fractions insolubles (I) et absentes des fractions solubles (S). (b) Solubilisation différentielle des protéines parasitaires. Les protéines sont révélées dans les fractions contenant les protéines cytosoliques solubles (S) et les protéines membranaires (I) mais pas dans la fraction des protéines liées aux membranes (P).

Les protéines étant partiellement cytosoliques, des expériences de co-immunoprécipitations ont été envisagées. Pour cela des anti-sérums contre PfPTPA et PfPP2A ont été élaborés. Ces sérums ont été obtenus suivant différents protocoles d'immunisation

Résultats

chez le rat ou la souris avec deux adjuvants différents. Ils ont ensuite été testés sur les protéines recombinantes immunisantes, sur des extraits de parasites totaux et sur des extraits de parasites exprimant la protéine fusionnée à la GFP (Figure 38). Bien que les anti-sérums reconnaissent les protéines recombinantes (Figure 38), ils ne se fixent sur aucune protéine à la taille attendue dans les extraits totaux de parasites sauvages et de parasites transfectés exprimant les protéines fusionnées à la GFP (Figure 38).

Ainsi, bien que les protéines soient solubles, les co-immunoprécipitations n'étaient pas envisageables chez le parasite sauvage.

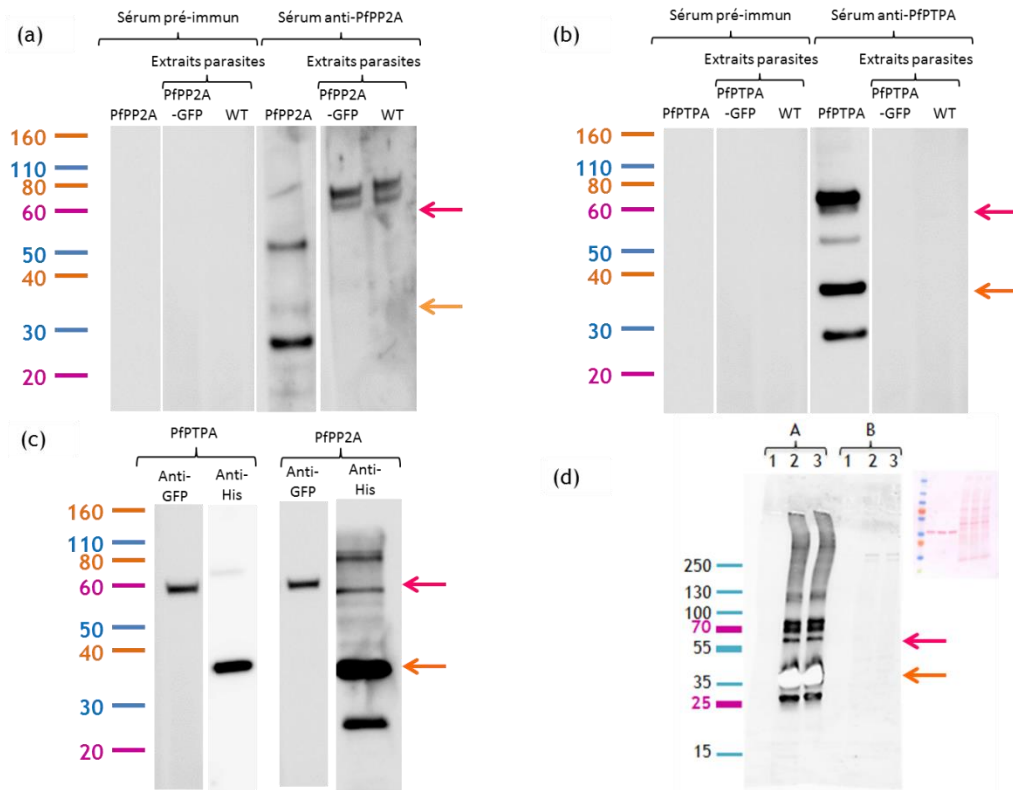


Figure 38 : Analyse en western-blot des sérums anti-PfPPTA et anti-PfPPP2A. Analyse des sérums anti-PfPPP2A (a) et anti-PfPPTA (b) produits chez le rat. Le sérum pré-immun (panel de gauche) ou anti-protéine (panel de droite) est incubé avec la protéine recombinante (première piste), des extraits parasitaires de parasites exprimant la protéine fusionnée à la GFP (deuxième piste) ou des extraits de parasites sauvages (troisième piste). (c) Les protéines fusionnées à la GFP exprimées par le parasite sont révélées par un anticorps anti-GFP dans les extraits de parasites exprimant lesdites protéines (piste anti-GFP), tandis que les protéines immunisantes révélées par un anti-histidines sont observables sur les pistes anti-His. (d) Analyse des sérums produits chez la souris en utilisant l'hydroxyde d'alun (2) ou l'adjuvant de Freund (3) comme adjuvant. Ces sérums sont mis en présence de la protéine recombinante PfPPTA (A) ou d'extraits parasitaires totaux issus de parasites exprimant la protéine PfPPTA fusionnée à la GFP (B). Un sérum pré-immun de souris est utilisé comme témoin (1). Les flèches orange représentent la taille des protéines WT tandis que les flèches roses marquent la taille attendue des protéines fusionnées à la GFP.

IV. Approches complémentaires pour l'étude du rôle de PfPTPA sur l'activité de PP2A

La suite de ce chapitre est consacrée aux données non publiées concernant l'étude du rôle de PfPTPA et de PfPP2A, notamment la poursuite de l'étude de l'effet de PfPTPA dans la régulation du cycle cellulaire chez le xénope, mais également l'utilisation d'un modèle d'interruption de gène inductible chez *P. berghei* afin d'approfondir le rôle des deux protéines dans le cycle érythrocytaire du parasite.

1. Rôle de PfPTPA sur l'activité sérine/thréonine phosphatase de PP2A

Nous avons pu voir que PfPTPA augmentait l'activité phosphatase de PP2A vis-à-vis du substrat tyrosine pNPP. Or, PP2A est une sérine/thréonine phosphatase. L'effet de PfPTPA sur l'activité de PP2A vis-à-vis d'un substrat phosphorylé sur une thréonine (K-R-pT-I-R-R) a donc été étudié. Nous observons que l'activité sérine/thréonine phosphatase varie modestement en fonction de la quantité de PfPTPA. Mais il n'y a pas de différence significative de l'activité de PP2A, sauf lorsque l'on ajoute 1000nM de PfPTPA (Figure 39). Cependant, le rapport PfPTPA/PP2A est alors de 100:1 et ne présente aucune relevance physiologique. La protéine PTPA de *P. falciparum* ne semble donc pas réguler l'activité sérine/thréonine phosphatase de la protéine PP2A humaine vis-à-vis du substrat (K-R-pT-I-R-R) *in vitro*.

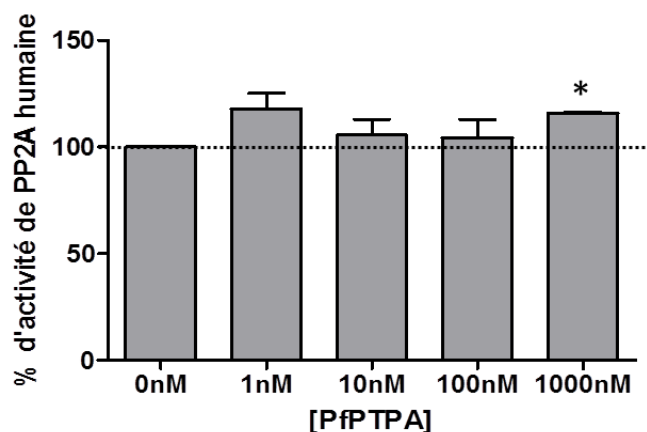


Figure 39 : Régulation de l'activité sérine/thréonine phosphatase de PP2A par PfPTPA. La libération de phosphate induite par l'activité sérine/thréonine phosphatase de 10nM de PP2A humaine est quantifiée par malachite green. Des doses croissantes de PfPTPA (1 à 1000nM) sont ajoutées et la quantité de phosphate libérée est mesurée. Les résultats sont présentés en % d'activité de PP2A \pm SEM (n=4). L'étoile représente la significativité à p=0.1% (test Mann et Withney).

2. Effet de PfPTPA sur l'activité ATPasique de PP2A

Dans la littérature, il est décrit que PTPA augmente l'activité ATPasique de PP2A (Chao, 2006). Nous avons donc voulu tester si la protéine PTPA du parasite pouvait augmenter l'activité ATPasique de la PP2A humaine. Nous avons utilisé pour cela un dosage des phosphates libérés *via* le malachite green. Dans ces expériences, l'hydrolyse de 200 μ M d'ATP

par 10nM de PP2A humaine avec ou sans 10 et 100nM de PfPTPA a été mesurée. Aucune hydrolyse n'a pu être détectée quelle que soit la concentration de PfPTPA ajoutée.

3. Études complémentaires de l'implication de PfPTPA dans la transition G2/M en ovocyte de xénope.

Afin de confirmer le rôle de PfPTPA sur la transition G2/M, de nouvelles expériences ont été faites en ovocytes de xénope. Dans ces expérimentations, la GVBD a été induite non pas par la progestérone, mais par des doses croissantes d'acide okadaïque (OA), un inhibiteur de phosphatases inhibant notamment PP2A et PP1. Nous observons que l'incubation avec une concentration de 0,01µM d'acide okadaïque est suffisante pour induire la GVBD (Figure 40). L'ajout de 10ng de PfPTPA ne permet pas de bloquer la GVBD induite par l'OA. Par contre, l'ajout de 40 et 100ng diminue de façon dose dépendante le taux de GVBD induite par 0,01 µM et 0,1µM d'OA. Il semble néanmoins que les quantités de PfPTPA micro-injectées ne soient pas suffisantes pour bloquer l'action de 1µM d'OA. Ainsi, plus la concentration d'OA augmente, plus il faut de PfPTPA pour empêcher la GVBD.

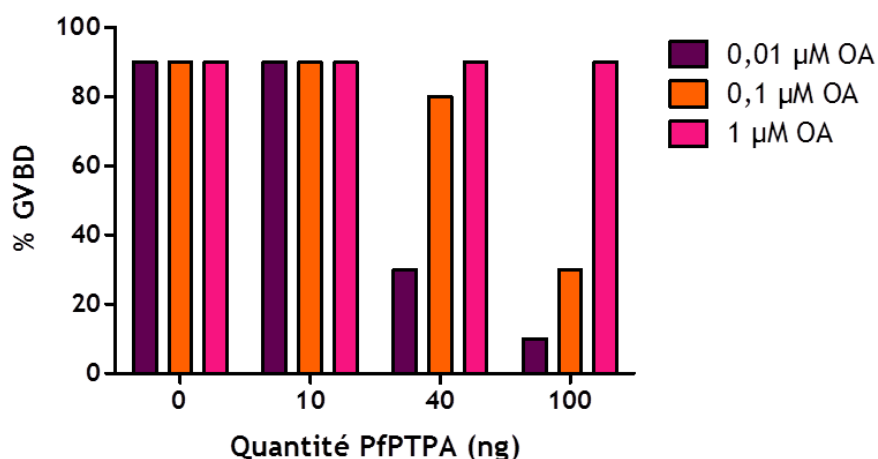


Figure 40 : Rôle de PfPTPA sur la transition G2/M induite par l'acide okadaïque. Les ovocytes sont micro-injectés avec 0 à 100 ng de PfPTPA recombinante, puis la GVBD est induite par ajout dans le milieu de culture de doses croissantes d'acide okadaïque (OA).

4. Étude du rôle de PfPTPA et PfPP2A chez le parasite

Les expériences de génétique inverse chez *P. falciparum* que nous avons publiées ont montré que les locus de PfPTPA et PfPP2A sont accessibles (Cf. résultats de l'article section 2.5). L'analyse des expériences d'interruption de gènes de PfPTPA nous ont laissé supposer une non-essentialité de ce gène. En effet, des PCR sur l'ADN génomique des parasites transfectés ont montré une intégration du construit dans leur génome (Cf. résultats de l'article section 2.5). En ce qui concerne PfPP2A, les premières PCR n'ont pas permis de voir une intégration dans leur génome. Pourtant, en modifiant les conditions de PCR et la quantité d'ADN matrice, une bande correspondant à une intégration du construit dans le génome a pu

être détectée (Cf. résultats de l'article section 2.5). Cependant, malgré plusieurs tentatives de clonage par dilution limite, aucun clone n'a pu être isolé. De plus, un cycle de levée/remise de la sélection par l'antibiotique blasticidine a montré que les parasites, ayant intégré la construction dans leur génome, ne survivaient pas. Il semble donc que les gènes soient essentiels mais pas à tous les stades parasitaires du cycle érythrocytaire. Des parasites intègrent le construit interrompant le gène, commencent à se développer, puis meurent, d'autres parasites prenant ensuite le relai. Ceci rend l'intégration détectable dans une culture initiale mais explique qu'aucun parasite ne survive après une levée/remise de pression de sélection. De ce fait, le rôle de ces deux protéines n'a donc pu être déterminé chez *P. falciparum*.

L'absence d'outil d'interruption de gène conditionnelle chez *P. falciparum*, nous a amenés à utiliser le modèle de *P. berghei*, espèce spécifique des rongeurs. En effet, dans ce modèle Pino *et al.* ont mis au point un système permettant, après double recombinaison homologue, la transcription du gène d'intérêt sous la dépendance de la transactivation d'un promoteur sensible à la tétracycline TetO7 (Figure 41a) (Pino, 2012).

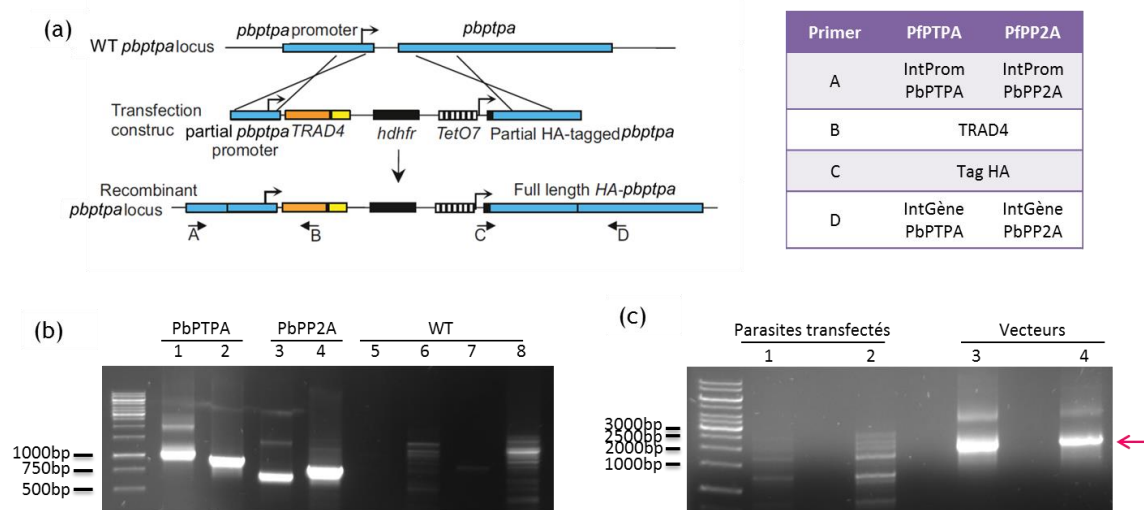


Figure 41 : Génération de parasites *P. berghei* dans une stratégie d'interruption de gène conditionnelle. (a) Représentation schématique de la double recombinaison homologue pour le gène *pbptpa*. La même construction a été réalisée pour *pbpp2a*. Le tableau présente les numéros des primers correspondants aux lettres sur le schéma pour les construits *pbptpa* et *pbpp2a*. (b) Génotypage par PCR des parasites sauvages (WT) ou transfectés (PbPTPA et PbPP2A). Les pistes 1 et 5 correspondent aux produits de PCR réalisées avec les amorces A et B de *pbptpa* tandis que les pistes 3 et 7 représentent les PCR réalisées avec les amorces A et B de *pbpp2a*. Les PCR réalisées avec les amorces C et D de *pbptpa* ont été déposées sur les pistes 2 et 6. Les PCR réalisées avec les amorces C et D de *pbpp2a* ont été déposées pistes 4 et 8. (c) Vérification de l'absence du vecteur utilisé pour la transfection dans les parasites transfectés. Pistes 3 et 4, les vecteurs contenant respectivement *pbptpa* et *pbpp2a* ont été amplifiés par PCR en utilisant les amorces B et C. La même PCR a été réalisée sur les parasites transfectés avec le vecteur contenant *pbptpa* (piste 1) ou *pbpp2a* (piste 2). La flèche rose symbolise la taille attendue.

Afin de mettre en place l'interruption conditionnelle de PbPTPA, nous avons cloné ses régions promotrice (1062 pb en amont de l'ATG) et codante (793 pb à partir de l'ATG) dans le vecteur mis au point par Pino *et al.* (fourni par le Dr Pino, université de Genève). De la même façon, les régions promotrice (1198 pb en amont de l'ATG) et codante (794 pb à partir de

Résultats

l'ATG) de PbPP2A ont été clonées. Le vecteur linéarisé a ensuite été transfecté par électroporation dans des schizontes purifiés de *P. berghei*. Puis, les schizontes ont été injectés par voie intraveineuse à des souris. Trente heures après l'injection, les parasites transfectés ayant intégré le vecteur sont sélectionnés par l'ajout de pyriméthamine dans l'eau de boisson des animaux. Aussi bien pour PbPTPA que pour PbPP2A, nous observons des parasites dans les frottis sanguins des animaux transfectés sept à huit jours après l'injection. Afin de vérifier que les parasites qui se développent ont intégré la construction dans leur génome, plusieurs vérifications par PCR sont faites. Tout d'abord, l'intégration dans le génome a été vérifiée et montre que les promoteurs et les gènes sont bien intégrés (Figure 41b). Ensuite, l'absence de vecteur non intégré a été étudiée. Pour cela, une PCR a été réalisée avec l'amorce s'hybridant avec la séquence transactivatrice TRAD4 et celle s'hybridant dans l'épitope HA. Seules les PCR réalisées sur les vecteurs circulaires peuvent amplifier un fragment, car dans le génome recombiné les amorces ont une orientation opposée (Figure 41a). On a ainsi pu vérifier l'absence de vecteur non intégré dans le génome (Figure 41c).

C. REGULATION DE LA PROTEINE PHOSPHATASE DE TYPE 1 (PP1) PAR PFPTPA.

La présence du motif RVxF dans la séquence de protéine PfPTPA, nous a incités à étudier si PfPTPA pouvait interagir avec PfPP1 et réguler son activité.

I. Étude de l'interaction PfPTPA/PP1

1. Interaction entre PfPTPA et PfPP1

L'interaction entre PfPTPA et PfPP1 a été étudiée *in vitro* par des tests ELISA. Deux expériences ont été mises en place. La première dans laquelle la protéine PfPTPA est adsorbée sur une plaque ELISA puis, des doses croissantes de PfPP1 biotinylée sont ajoutées (Figure 42a). Dans la seconde, à l'inverse, PfPP1 est adsorbée sur la plaque et c'est la concentration de PfPTPA biotinylée que l'on fait varier (Figure 42b). Ces expériences ont permis de montrer que PfPTPA et PfPP1 étaient capables d'interagir *in vitro* (Figure 42) et que l'interaction est aussi forte que celle observée entre PfPP1 et Pfl2^{PP1} (Figure 42a).

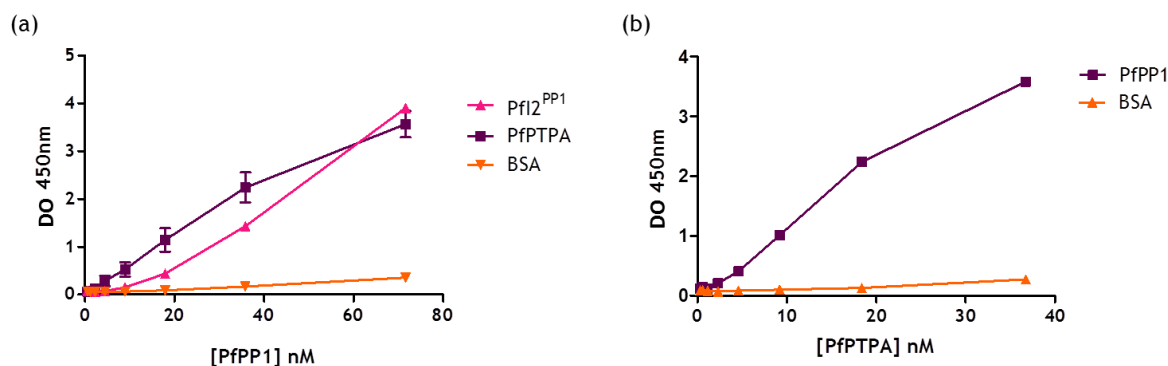


Figure 42 : Interaction entre PfPTPA et PfPP1 *in vitro*. (a) Les protéines PfPTPA, Pfl2^{PP1} et la BSA sont adsorbées sur une plaque ELISA à une concentration de 2µg/ml. Pfl2^{PP1} est notre témoin positif d'interaction tandis que la BSA sert de témoin négatif. Des doses croissantes de PfPP1 biotinylée sont ajoutées et les interactions sont lues par spectrophotométrie à 450nm. Cette figure est représentative de deux expériences indépendantes. (b) PfPP1 et la BSA qui sert de témoin négatif, sont adsorbées sur une plaque ELISA et des concentrations croissantes de PfPTPA biotinylée sont ajoutées. Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

2. Interaction entre PfPTPA et PP1

Les protéines parasites étant capables d'interagir, nous avons testé si PfPTPA pouvait également interagir avec une PP1 orthologue. Nous avons pour cela utilisé le modèle de xénope. Ce modèle nous permettait d'appréhender la cinétique de formation du complexe PfPTPA-XePP1 en comparaison de celle de la formation de complexe avec XePP2A. Ainsi, la protéine PfPTPA fusionnée à un épitope six histidines a été micro-injectée dans des ovocytes de xénope. Quinze minutes, deux heures ou dix-huit heures après, les complexes comprenant la protéine PfPTPA ont été immunoprécipités grâce à l'épitope histidine de PfPTPA. La

Résultats

présence des protéines XePP2A et XePP1 dans ces complexes a été étudiée après électrophorèse sur gel d'acrylamide par l'utilisation d'un anticorps anti-PP2A de xénope (XePP2A) ou un anticorps anti-PP1 de xénope (XePP1) (Figure 43). Quinze minutes après la micro-injection, nous observons que PfPTPA est immunoprécipitée avec XePP2A et XePP1. Deux heures après, seule XePP1 est immunoprécipitée avec PfPTPA et la XePP2A n'est presque plus détectable à dix-huit heures. Ainsi, PfPTPA est capable de former des complexes avec un orthologue de PfPP1, et la cinétique de formation des complexes entre PfPTPA avec PP2A et PP1 est différente. Les complexes PfPTPA/PP2A sont transitoires tandis que les complexes PfPTPA/PP1 sont visibles jusqu'à dix-huit heures après la micro-injection de PfPTPA.

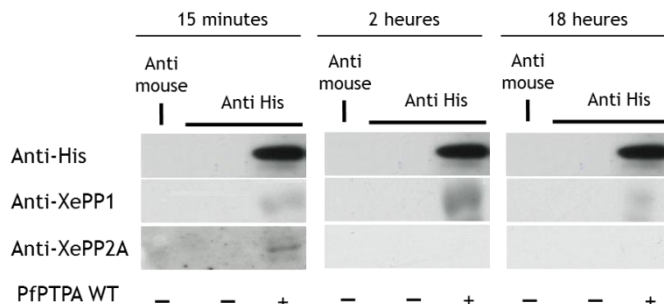


Figure 43 : Étude de la cinétique d'interaction de PfPTPA avec PP2A et PP1. Des ovocytes de xénope sont micro-injectés avec PfPTPA. Les complexes PfPTPA/PP2A et PfPTPA/PP1 sont isolés par immunoprécipitation par un anticorps anti-His quinze minutes (panel de gauche), deux heures (panel du centre) ou dix-huit heures après la micro-injection de PfPTPA (panel de droite). Les complexes sont ensuite révélés après migration sur gel d'électrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose par des anticorps anti-His, anti-XePP1 ou anti-XePP2A.

Ayant à notre disposition les protéines PfPTPA mutées sur les différents résidus impliqués dans l'interaction PfPTPA/PfPP2A, nous avons étudiés si les mutants étaient toujours capables de se complexer avec XePP1. Ainsi, des co-immunoprécipitations ont été réalisées après la micro-injection des différents mutants. De façon surprenante, aucun des mutants n'est capable de former des complexes avec XePP1 (Figure 44).



Figure 44 : Co-immunoprécipitation de PfPTPA avec la PP1 endogène. Les protéines PfPTPA WT ou mutées fusionnées à un épitope histidine sont microinjectées dans l'ovocyte de xénope. Les protéines sont immunoprécipitées quinze minutes après par un anticorps anti-histidine. La présence de XePP1 dans les complexes protéiques est vérifiée après électrophorèse par un anticorps anti-XePP1.

3. Implication du motif KINF (RVxF) dans la liaison de PfPTPA à PP1

Afin d'étudier l'implication du motif KINF (RVxF) dans l'interaction entre PfPTPA et PP1, des expériences de compétition de la fixation de PfPTPA sur PP1 par des peptides dérivés

du motif KINF ont été mises en place en ovocytes de xénope. En effet, l'utilisation de peptides dérivés des motifs RVxF de Pf12^{PP1} et Pf13^{PP1} a permis d'inhiber l'interaction entre ces protéines et PP1 (Freville, 2013). Deux peptides ont ainsi été synthétisés. L'un contenant la séquence du motif RVxF de PfPTPA élargit (NKINF) répétée en tandem que l'on a nommé peptide KINF, le second contenant la séquence mutée du motif KINF répétée en tandem (NKANANKANA) nommé peptide témoin. Les deux peptides contiennent également une séquence pénétrante nommée également DPT-SH1 qui sera décrite dans la suite de cette section. Les peptides KINF ou les peptides témoins sont pré-injectés dans des ovocytes de xénope avant la micro-injection de la protéine PfPTPA recombinante. La protéine PfPTPA est ensuite immunoprécipitée par un anticorps anti-His et les complexes protéiques sont révélés avec un anticorps anti-XePP1 ou anti-XePP2A. Lorsque le peptide KINF est pré-injecté, la protéine XePP1 n'est plus immunoprécipitée avec PfPTPA (Figure 45). Par contre, la protéine XePP1 est toujours immunoprécipitée avec PfPTPA quand ce sont les peptides témoins qui sont préinjectés (Figure 45). La pré-injection des deux peptides n'empêche pas la formation des complexes PfPTPA/PP2A (Figure 45). Ainsi, le peptide KINF empêche la formation des complexes PfPTPA/PP1 mais pas des complexes PfPTPA/PP2A. Ces expériences démontrent que l'interaction entre PfPTPA et PP1 se fait *via* le motif KINF.

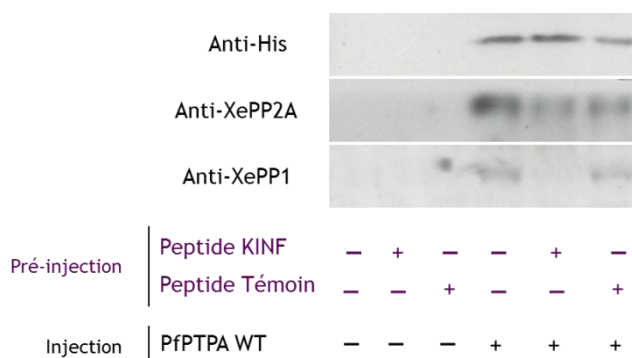


Figure 45 : Étude de l'implication du motif KINF dans l'interaction PfPTPA/PP1. Les peptides dérivés du motif KINF sont pré-injectés dans des ovocytes de xénope. La protéine PfPTPA recombinante fusionnée à un épitope histidine est ensuite injectée et des co-immunoprécipitations sont effectuées. Les protéines PfPTPA sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-His, puis les complexes avec les phosphatases endogènes sont identifiés grâce à des anticorps anti-XePP1 et anti-XePP2A.

II. Régulation de l'activité de PfPP1 par PfPTPA *in vitro*

Ayant montré que PfPTPA peut se lier à PfPP1, des tests d'activité *in vitro* utilisant le pNPP comme substrat ont été effectués. Cependant, l'ajout de doses croissantes de PfPTPA ne modifie pas l'activité de PfPP1 vis-à-vis du pNPP, démontrant que PfPTPA ne régule pas l'activité de phosphatase de PfPP1 *in vitro* vis-à-vis du substrat pNPP (Résultats non montrés).

III. Inhibition de l'interaction PfPTPA/PfPPP1 *in vivo* par des peptides synthétiques

Dans le but d'étudier le rôle *in vivo* de l'interaction PfPTPA/PfPPP1, une première expérience d'inhibition de l'interaction PfPTPA/PfPPP1 a été réalisée grâce à l'utilisation de peptides synthétiques. Ces peptides synthétiques sont composés d'une séquence pénétrante (ou DPT-SH1) « VKKKKIKREIKI » issue de la casein kinase 2 α (CK2 α) de *Theileria parva*, identifiée par Guernon *et al.*, et du motif RVxF de PfPTPA répété en tandem (NKINFNKINF) (peptide KINF) (Guernon, 2006). Un peptide contrôle contenant le DPT-SH1 et un motif KINF muté (NKANANKANA) a également été synthétisé (peptide témoin). Les protéines fusionnées à la séquence pénétrante sont capables de pénétrer dans les érythrocytes infectés par *P. falciparum* (Guernon, 2006). De plus, il a été montré que DPT-SH1 seul n'est pas cytotoxique ni pour les cellules HeLa ni pour le parasite (Guernon, 2006 ; Freville, 2013).

Le peptide KINF diminue de façon significative la croissance parasitaire de manière dose dépendante. En effet, la croissance des parasites en présence de 1,25 μ M du peptide KINF est proche de 100% tandis qu'en présence de 160 μ M de peptide, le taux de croissance des parasites est inférieur à 20% (Figure 46). Par contre, en présence de 160 μ M du peptide témoin dans le milieu, la croissance des parasites est supérieure à 75% (Figure 46). L'IC50 calculé pour le peptide KINF est de 43,12 μ M. Ainsi, l'inhibition de l'interaction dépendante du motif KINF par l'utilisation de ce peptide, notamment l'interaction PfPTPA/PfPPP1 diminue drastiquement la croissance parasitaire. Cependant, ces résultats restent à confirmer.

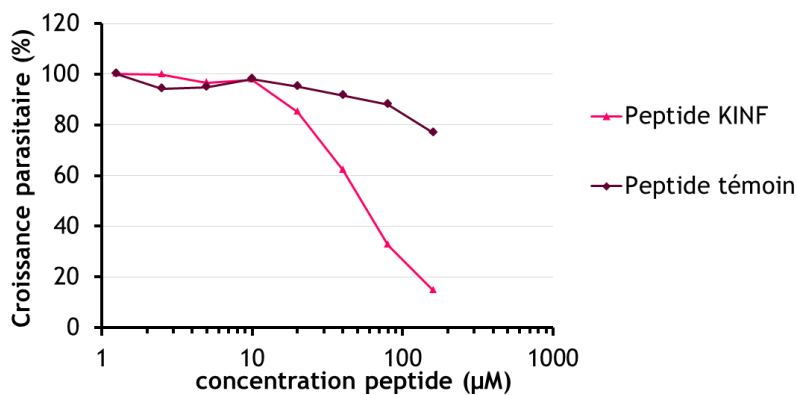


Figure 46 : Étude de l'inhibition de PfPTPA vis-à-vis de PfPPP1 *in vivo*. La croissance parasitaire est suivie après l'ajout des peptides KINF ou témoin dans le milieu de culture de parasite *P. falciparum* 3D7 sauvage. Les résultats sont présentés en % de la croissance parasitaire de parasites sauvages cultivés sans peptide.

Matériel et méthodes

Ce matériel et méthodes est complémentaire de la section expérimentale de l'article publié dans International Journal of Molecular Sciences (Cf. Résultats B II 1).

A. MATERIEL

I. Plasmides

L'origine des plasmides pETDuet-1, pCAM-BSD, pCAM-BSD-HA et pARL est décrite dans la section expérimentale de l'article. Les vecteurs pGAD-T7, pGBK-T7 et pGBK-T7-lam sont commercialisés par Clontech et le vecteur pCR2.1-TOPO est commercialisé par Invitrogen. Le vecteur utilisé pour les interruptions de gène conditionnelles nous a été fourni par le Dr Pino (Département de microbiologie et de médecine moléculaire, Université de Genève, Suisse). Ce vecteur est nommé vecteur berghei dans la suite de ce manuscrit.

II. Anticorps

Les anticorps anti-PP1 de xénope et anti-Gal4-DBD sont commercialisés par Santa-Cruz Biotechnology, les anticorps anti-HA et anti-GFP sont commercialisés par Roche. L'anticorps anti-HA couplé à la biotine et l'anticorps anti-PP2A sont, eux, commercialisés par Abcam. La streptavidine-HRP est commercialisée par Invitrogen.

III. Amorces

Les amorces utilisées au cours de la thèse qui n'ont pas été décrites dans l'article sont énumérées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Amorces utilisées au cours de cette étude.

Nom de l'amorce	Séquence	Orientation	Site de restriction	Vecteur	Epitope	Utilisation
PfPP2A-L F	GAATTCATGGCAAAGGAGAAGAAAGAAAG	F	EcoRI	pGBK-T7	c-myc, Gal4-DBD	Double hybride en levure
PfPP2A-L R	GGATCCTTATAAGAAGTAGGGTATGGTGGCC	R	BamHI	pGBK-T7	c-myc, Gal4-DBD	Double hybride en levure
Pf1 ^{PP2A} -L F	GAATTCATGGAAAAAGCTATTAGGGATCG	F	EcoRI	pGAD-T7	HA, Gal4-AD	Double hybride en levure
Pf1 ^{PP2A} -L R	GGATCCTCATTCAAGTTTGGTTTTTTTAGGTC	R	BamHI	pGAD-T7	HA, Gal4-AD	Double hybride en levure
Pf12 ^{PP2A} -L F	GAATTCATGAAGAGAGATCGTTTCAGAAACTC	F	EcoRI	pGAD-T7	HA, Gal4-AD	Double hybride en levure
Pf12 ^{PP2A} -L R	GGATCCTTAATCATCGTTATCATCATTATTTCC	R	BamHI	pGAD-T7	HA, Gal4-AD	Double hybride en levure
PfPTPA-L F	GGATCCTGGGTGATGTAATAGCTTGAGT	F	BamHI	pGAD-T7	HA, Gal4-AD	Double hybride en levure
PfPTPA-L R	CTCGAGTAAAAGTCTATCAAATTTCCAATAATATGTG	R	XhoI	pGAD-T7	HA, Gal4-AD	Double hybride en levure
Pf1 ^{PP2A} -P F	GGATCCATGGAAAAAGCTATTAGGGATCG	F	BamHI	pQE30	6-His	Production de protéine recombinante
Pf1 ^{PP2A} -P R	GTCGACTCATTCAAGTTTGGTTTTTTTAGGTC	R	Sall	pQE30	6-His	Production de protéine recombinante

Matériel et méthodes

PfI2 ^{PP2A} -P F	GGATCCGAAGAGAGATCGTTCAGAAAACT	F	BamHI	pETDuet-1	6-His	Production de protéine recombinante
PfI2 ^{PP2A} -P R	GTCGACTTATAAGCCTAAATAAATAAGATAATGGGT	R	Sall	pETDuet-1	6-His	Production de protéine recombinante
PbPP2A-P F	CAAAAAAAGCGCAGATCTCCACATGTTAGCTATATGAAAA TTAC	F	BglII	berghei		Interruption conditionnelle de gène chez <i>P. berghei</i>
PbPP2A-P R	CATTTTAAAGCTTCCGCGGTATATTATTTTGACTATTATAT AATCTTAAAG	R	SacII	berghei		Interruption conditionnelle de gène chez <i>P. berghei</i>
PbPTPA-P F	CAAAAAAAGCGCAGATCTGGAGTATGTGTGATTTAGTTA TTTG	F	BglII	berghei		Interruption conditionnelle de gène chez <i>P. berghei</i>
PbPTPA-P R	CATTTTAAAGCTTCCGCGGTTTCTTTATTTTAAATCT ATAAATATG	R	SacII	berghei		Interruption conditionnelle de gène chez <i>P. berghei</i>
PbPP2A-G F	CGTGCCCGATTATGCCGGCATGACTAGGGGAGACGAAAA AAAATG	F	NaeI	berghei		Interruption conditionnelle de gène chez <i>P. berghei</i>
PbPP2A-G R	CAAAATTTTAAACGCTAGCCAATAGTTTGGAGCTGACCAAA CAG	R	NheI	berghei		Interruption conditionnelle de gène chez <i>P. berghei</i>
PbPTPA-G F	CGTGCCCGATTATGCCGGCATGGAGATTCTAACTTAAG CTTC	F	NaeI	berghei		Interruption conditionnelle de gène chez <i>P. berghei</i>
PbPTPA-G R	CAAAATTTTAAACGCTAGCCTTTATTATATGAAAGTTGAGC AGC	R	NheI	berghei		Interruption conditionnelle de gène chez <i>P. berghei</i>
Tag HA	GACGTGCCCGATTACGCCGG	F				Génotypage <i>P. berghei</i> Intégration gène
IntGène PbPP2A	CCACCCAGCTCCTCTTGATTG	R				Génotypage <i>P. berghei</i> Intégration gène
IntGène PbPTPA	GGTGCCCATAAATCAACCAATTC	R				Génotypage <i>P. berghei</i> Intégration gène
TRAD4	CTTTGCTTTGTCCAGGCGCGAC	R				Génotypage <i>P. berghei</i> Intégration promoteur
IntProm PbPP2A	GTACCCCAAAGGCAGGAAAC	F				Génotypage <i>P. berghei</i> Intégration promoteur
IntProm PbPTPA	GGATAACCCATATATCGAAGTGG	F				Génotypage <i>P. berghei</i> Intégration promoteur

B. METHODES

I. Analyse de bioinformatique comparative et analyse des séquences

Les séquences protéiques des différentes sous-unités et protéines régulatrices de PP2A connues ont été alignées sur la base de données protéique de *Plasmodium falciparum* (<http://plasmodb.org/plasmo/>).

Tableau 10 : Numéro d'accèsion des différentes sous-unités et protéines régulatrices recherchées dans le génome de *P. falciparum*.

Sous-unité / protéine	Variant	N° Accession	Sous-unité / protéine	Variant	N° d'Accession
A	α	CAG29336	B''	PR48	NP_037371.2
	β	NP_002707		B'''	Striatine
B	α	NP_001171062.1	B'''	SG2NA	NP_001077362.1
	β	NP_858062.1		Zinedine	P58404.2
	γ	NP_870991.1	LCMT1		NP_057393.2
	δ	NP_060931.2	PME-1		Q9Y570.3
B'	α	NP_006234.1	α4		NP_001542.1
	β	NP_006235.1	I1 ^{PP2A}		NP_006296.1
	γ	NP_848702.1	I2 ^{PP2A}		AAQ79833.1
	δ	NP_006236.1	PTPA		CAA60163.1
	ε	NP_001269108.1	CIP2A		NP_065941.2
B''	PR72	NP_001177376.1	ENSA		NP_996925.1
	PR130	NP_002709.2	ARPP-19		AAI00016.1
	PR59	NP_060387.2	TIPRL		NP_690866.1

Les numéros d'accèsion des protéines humaines issues de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) sont listés dans le tableau ci-dessus (Tableau 10). Les alignements de séquence ont été faits par ClustalW en utilisant le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor. Les motifs LRR ont été identifiés en utilisant le serveur LRRFinder (<http://www.lrrfinder.com/>) puis affinés manuellement. Les motifs RVxF ont, eux, été identifiés grâce au programme 3of5 de EXPASY (<http://www.dkfz.de/mga2/3of5/3of5.html>).

II. Le double hybride en levure

Les séquences codantes de PfPP2A, Pfl1^{PP2A}, Pfl2^{PP2A} et PfPTPA ont été amplifiées par PCR en utilisant la Taq polymérase Advantage 2 (Clontech) et les amorces PfPP2A-L F, PfPP2A-L R, Pfl1^{PP2A}-L F, Pfl1^{PP2A}-L R, Pfl2^{PP2A}-L F et Pfl2^{PP2A}-L R (Tableau 9). Le produit de PCR a été sous-cloné dans un vecteur pCR2.1-TOPO et l'intégrité des séquences a été vérifiée par séquençage (Eurofins MGW Operon). Les séquences codantes de Pfl1^{PP2A}, Pfl2^{PP2A} ont ensuite été insérées entre les sites de restriction EcoRI et BamHI d'un vecteur pGAD-T7 tandis que la séquence codante de PfPTPA a été insérée entre les sites de restriction BamHI et XhoI de ce vecteur. La séquence codante de PfPP2A a, elle été insérée entre les sites de restriction EcoRI et BamHI d'un vecteur pGBK-T7. Des levures AH109 ont ensuite été transformées avec les constructions contenant les séquences des régulateurs et des levures Y187 ont été transformées avec la construction de PfPP2A. Les vecteurs vides pGAD-T7 et pGBK-T7 ainsi que le vecteur pGBK-T7 contenant la laminine (pGAD-T7-lam) sont utilisés comme témoins et sont insérés après transformation dans les levures AH109 (vecteur pGAD-T7) ou Y187 (pGBK-T7). La transformation a été faite selon les recommandations du fournisseur en utilisant l'acétate de lithium (Yeast Protocoles Handbook, Clontech). Afin de vérifier les interactions, les levures AH109 transformées avec les vecteurs pGAD-T7 vide ou contenant les régulateurs ont été mises en contact individuellement avec des levures Y187 transformées avec les vecteurs pGBK-T7 vide ou contenant soit la PfPP2A, soit la laminine (pGBK-T7-lam). Après la fusion des levures, les diploïdes sont sélectionnés sur un milieu dépourvu en leucine et en tryptophane et les diploïdes dans lesquels les protéines interagissent sont sélectionnés sur un milieu dépourvu en leucine, en tryptophane et en histidine (-LWH).

III. Test de croissance des levures en milieu liquide

Les levures haploïdes transformées avec les vecteurs pGAD-T7 vide ou contenant les séquences codantes des régulateurs sont mises en culture en milieu liquide dépourvu en leucine. Les levures haploïdes transformées avec les vecteurs pGBK-T7 vide ou contenant la séquence codante de PfPP2A sont mises en culture en milieu liquide dépourvu en tryptophane. Les levures sont ensuite placées à 30°C sous agitation et la densité optique à 600nm est lue régulièrement sur une durée de 72h.

IV. Test β -galactosidase sur filtre

Les levures diploïdes contenant Pfl2^{PP2A}-pGAD-T7 et PfPP2A-pGBK-T7 qui se développent sur milieu -LWH sont déposées sur un filtre imbibé de X-Gal afin d'identifier les levures dans lesquelles une interaction a effectivement eu lieu par apparition d'une coloration bleue selon le protocole du fournisseur (Yeast Protocoles Handbook, Colony-lift Filter Assay, Clontech).

V. Extraction des protéines de levures et Western-Blot

Des levures haploïdes contenant les vecteurs pGAD-T7 dans lesquels sont insérés les régulateurs ou le vecteur pGBK-T7 dans lequel est inséré PfPP2A sont mises en culture sur la nuit dans cinq millilitres de milieu dépourvu en leucine ou en tryptophane respectivement. La culture est ensuite vortexée puis diluée dans cinquante millilitres jusqu'à atteindre une densité optique à 600nm de 0,4 à 0,6. Les cultures ayant la densité optique appropriée sont ensuite rapidement mises sur glace puis centrifugées pendant cinq minutes à 1000g à une température de 4°C. Le culot est lavé avec de l'eau à 4°C, le culot sec est congelé par immersion du tube dans de l'azote liquide et conservé à -80°C. Les protéines sont ensuite extraites au TRIzol® Reagent suivant le protocole du fournisseur (Ambion par Life Technologies). Les protéines extraites sont ensuite séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines régulatrices insérées dans le vecteur pGAD-T7 sont révélées par un anticorps anti-HA (1/500) tandis que les protéines PfPP2A sont révélées par un anticorps anti-Gal4-DNA binding domain (1/500).

VI. Test d'interaction *in vitro*

Les protéines recombinantes Pfl1^{PP2A}, Pfl2^{PP2A}, PfPTPA, Pfl2^{PP1} et l'albumine sérique de bœuf commerciale (Sigma) sont adsorbées à une concentration de 2µg/ml sur une plaque ELISA (Nunc) pendant une nuit à 4°C. Après lavages au PBS 0,1% de Tween20, la plaque est saturée avec du PBS contenant de la gélatine durant une heure à température ambiante. Des doses croissantes de protéine PfPP1 recombinante biotinylée sont ensuite ajoutées après lavages et incubées deux heures à 37°C. Après une nouvelle étape de lavage, la streptavidine HRP (1/20 000) est ajoutée puis incubée vingt minutes à température ambiante et à l'obscurité. Puis, la plaque lavée est incubée avec une solution de TMB (Uptima) pendant vingt minutes à l'obscurité et à température ambiante. Enfin, la réaction est arrêtée par ajout de cent microlitres de HCl 2N. L'interaction est mesurée par lecture de la densité optique à 405nm.

VII. Test d'activité *in vitro* de PfPP1 vis-à-vis du substrat pNPP

Le kit Sigma Fast paraNitroPhénylPhosphate (pNPP) est utilisé afin de déterminer l'activité phosphatase de PfPP1 vis-à-vis du substrat pNPP selon les recommandations du fournisseur. La quantité optimale de 30nM de PfPP1 à utiliser a été déterminée au préalable parmi une gamme de concentration. Dans ce test, des doses croissantes de Pf12^{PP2A} ou de PfPTPA recombinante diluée dans un tampon Tris 10mM sont pré-incubées avec 30nM de PfPP1 recombinante durant trente minutes à 37°C dans une plaque ELISA. Le substrat pNPP dilué dans un tampon PMP/NaCl est alors ajouté et le tout est incubé une heure à 37°C. L'activité phosphatase est ensuite mesurée par lecture de la densité optique à 450nm.

VIII. Test d'activité sérine/thréonine phosphatase *in vitro*

L'activité phosphatase de la protéine PP2A humaine (Cayman) et sa régulation par PfPTPA vis-à-vis d'un substrat phosphorylé sur une thréonine est mesurée grâce au kit Ser/Thr Phosphatase Assay Kit 1 (K-R-pT-I-R-R) (Merck Millipore) selon le protocole du fournisseur. La quantité optimale de 10nM PfPP2A à utiliser a été déterminée parmi une gamme de concentration allant de 10 à 100 nM. Afin de tester l'effet de PfPTPA sur cette activité sérine/thréonine phosphatase, des doses croissantes de PfPTPA recombinante sont ajoutées à 10nM de PP2A humaine et incubées trente minutes à 37°C. Deux cent cinquante micromolaire de phospho-peptide sont ajoutés et le tout est incubé trente minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de malachite green puis incubée quinze minutes à température ambiante afin de laisser la réaction colorée se mettre en place. La quantité de phosphate libérée est mesurée par lecture de la densité optique à 620nm.

IX. Test d'activité ATPasique

L'activité ATPasique du complexe PfPTPA/PP2A humaine est mesurée par le dosage de la quantité de phosphate libérée par l'ATP en présence de PfPTPA seul, de PP2A humaine seule ou des deux protéines. L'ATP (Sigma) à une concentration de 200µM est incubée avec 10nM de PP2A humaine, 10 à 100nM de PfPTPA recombinante ou 10nM de PP2A humaine additionnée de 10 à 100nM de PfPTPA pour une durée de trente minutes. Puis la quantité de phosphate libérée est visualisée grâce au malachite green (Merck Millipore) et comparée à une gamme de phosphate libre par comparaison des densités optiques lues à 620nm.

X. Induction de la GVBD en ovocyte de xénope par l'acide okadaïque

Les ovocytes de xénopes sont micro-injectés avec 10, 40 ou 100ng de protéines PfPTPA recombinantes puis incubés dans un milieu contenant 0,01, 0,1 ou 1 μ M d'acide okadaïque. La GVBD est observée après dix-huit heures d'incubation.

XI. Extraction des protéines de parasites

1. Extraction par cycles de congélation/décongélation

Des schizontes purifiés sont lysés dans un tampon contenant 20mM de Tris, 150mM de NaCl, 0,5% de triton et des antiprotéases (Roche). Ils subissent ensuite huit cycles de congélation dans l'azote liquide, décongélation dans un bain-marie à 37°C. L'extrait est ensuite soniqué par des pulses de vingt secondes suivis de quinze secondes d'arrêt pour une durée effective de cinq minutes. Après centrifugation trente minutes à 14 000g, le surnageant contenant les extraits parasitaires est conservé à -80°C.

2. Solubilisation séquentielle des protéines

La solubilisation séquentielle est effectuée selon le protocole de Hopp *et al.* (Hopp, 2012). Les protéines solubles sont solubilisées dans cinq volumes de tampon hypotonique contenant 5mM de Tris-HCl pH8.0. Les parasites subissent ensuite huit cycles de congélation (azote liquide) /décongélation (bain-marie 37°C) puis sont centrifugés quinze minutes à 16 000g à une température de 4°C. Le surnageant contient les protéines solubles. Les protéines liées aux membranes qui sont dans le culot sont solubilisées par un traitement de dix minutes avec 0,5 volume de tampon contenant de la DNase (5mM Tris-HCl pH8.0, 10mM MgCl₂, DNase I et inhibiteur de protéase). Un volume de Na₂CO₃ 0,1M pH11 est ensuite ajouté puis incubé trente minutes sur glace. Le tout est ensuite centrifugé à 16 000g pendant trente minutes à 4°C. Les protéines liées aux membranes sont alors présentes dans le surnageant. Le reste des protéines présentes dans le culot sont resolubilisées dans quatre volumes de PBS 0,5% contenant 4% de SDS, 0,5% de Triton et des inhibiteurs de protéases.

XII. Production de sérum anti-PfPTPA et anti-PfPP2A

Les protocoles utilisant l'expérimentation animale ont été validés par le comité d'éthique en expérimentation animale (CEEA) du Nord-Pas de Calais.

1. Immunisation de rats Fisher F344

La protéine recombinante soluble PfPTPA et la protéine recombinante insoluble PfPP2A resolubilisée dans du tampon Tris 20mM, NaCl 150mM et 0,3% de SDS sont utilisées

pour immuniser des rats Fisher F344. Deux rats sont immunisés pour chaque protéine. Cinquante microgrammes de protéines diluées au demi dans de l'hydroxyde d'alun sont injectés par voie intrapéritonéale. Deux rappels sont ensuite effectués à J20 et J34 avec les mêmes quantités de protéines diluées selon le même protocole. Une présaignée le jour de la première injection est effectuée et nous sert de contrôle négatif. Ensuite, un premier prélèvement sanguin au niveau du sinus rétro-orbital est effectué à J48 et le sérum est titré par dosage ELISA vis-à-vis de la protéine recombinante. Si le titre est correct, un prélèvement en intra-cardiaque est effectué à J50 après sacrifice des animaux.

2. Immunisation de souris Balb/c

La protéine recombinante soluble PfPTPA est utilisée pour immuniser des souris Balb/c. Trois souris sont immunisées avec la protéine diluée au demi dans de l'hydroxyde d'alun, trois autres sont immunisées avec la protéine diluée en adjuvant de Freund. Le protocole en hydroxyde d'alun est le même que le protocole décrit ci-dessus. Le protocole pour l'adjuvant de Freund est le suivant : 50µg de protéines recombinantes diluées en adjuvant complet de Freund sont injectés par voie sous-cutanée à trois souris. Ensuite deux rappels sont effectués avec 50µg de protéines diluées en adjuvant incomplet de Freund et injectés par voie intra-péritonéale. Pour chaque protocole d'immunisation, une présaignée est effectuée à J0. Ensuite, un prélèvement sanguin est fait à J48, les sérums sont titrés et si le titre est correct, un dernier prélèvement sanguin en intra-cardiaque est effectué à J50 après sacrifice des animaux.

XIII. Tests des sérums d'immunisation en Western-blot

Les protéines recombinantes PfPTPA et PfPP2A, des extraits protéiques de parasites exprimant les protéines PfPTPA ou PfPP2A fusionnées à la GFP réalisés selon le protocole décrit au XI 1 ou des extraits protéiques de parasites sauvages sont déposés sur des gels d'acrylamide puis transférés sur membranes de nitrocellulose. Après saturation, les sérums d'immunisation (dilution : 1/50) sont ensuite incubés avec les membranes. Puis les protéines sont révélées par un anticorps anti-IgG (H+L) de souris (1/20 000) ou un anticorps anti-IgG (H+L) de rat marqués à la peroxidase (1/20 000).

XIV. Interruption conditionnelle de gène chez *Plasmodium berghei*

1. Préparation des plasmides

Les amorces sont dessinées à partir des données génomiques de *Plasmodium berghei* disponibles sur PlasmoDB afin d'amplifier par PCR les promoteurs et les gènes de PbPTPA et PbPP2A. Les gènes sont amplifiés par PCR sur l'ADN génomique de *P. berghei* avec la Taq polymérase Advantage 2 et les amorces PbPTPA-G F et R ou PbPP2A-G F et R.

Les produits de PCR sont ensuite insérés dans le vecteur berghei entre les sites de restrictions NaeI et NheI en utilisant le kit In-Fusion® HD Cloning (Clontech). Des bactéries compétentes Stellar™ (Clontech) sont transformées avec les vecteurs contenant le gène. L'intégrité des séquences a été vérifiée par séquençage. Les promoteurs sont ensuite amplifiés par PCR avec les amorces PbPTPA-P F et R ou PbPP2A-P F et R. Les produits de PCR sont ensuite insérés dans le vecteur berghei contenant le gène entre les sites de restriction BglII et SacII. L'intégrité des séquences est vérifiée par séquençage.

Les plasmides contenant le gène et le promoteur sont digérés par BglII et NheI afin d'être linéarisés pour permettre la double recombinaison homologe. Les plasmides linéarisés sont purifiés sur gel puis précipités à l'acétate de sodium et repris à une concentration finale de 1,5µg/µl.

2. Préparation des schizontes de *P. berghei*

Le sang d'un rat infecté par *P. berghei* ayant une parasitémie comprise entre 6 et 15% est prélevé en présence d'héparine au niveau du sinus rétro-orbitaire. Deux millilitres de sang sont mis en culture dans des flacons de 75cm² avec cinquante millilitres de milieu RPMI Hypoxantine Albumax pour une durée de seize heures à 37°C sous agitation à cinquante-quatre tours par minute. Cette étape permet la maturation des parasites en schizonte. La culture enrichie en schizontes est ensuite centrifugée dix minutes à 1 800 tours par minute à 4°C sans frein. Les schizontes sont alors séparés des érythrocytes et autres cellules sur un gradient de Nycodenz à 55%. Le gradient est ensuite centrifugé trente minutes à 2 300 tours par minute à 4°C sans frein. Les schizontes, situés dans un anneau à l'interface entre une phase inférieure contenant les cellules sanguines et les déchets cellulaires et une phase supérieure composée du milieu de culture, sont récupérés et lavés deux fois en PBS. Les schizontes purifiés sont utilisés immédiatement pour la transfection.

3. Transfection et injection aux animaux

Dans une cuvette d'électroporation, vingt microlitres d'ADN plasmidique linéarisé (10µg par souris) sont mis en contact avec cent microlitres de Nucleofector human T cell buffer (Lonza) et un tiers des schizontes purifiés. L'électroporation est effectuée grâce à un appareil à électroporation de type Amaxa® Nucleofector® avec le programme U33. Les schizontes électroporés sont ensuite repris afin d'obtenir un volume final de trois cent microlitres. Les schizontes sont ensuite injectés par voie intraveineuse à des souris mâles Balb/c à raison de cent microlitres par souris. Trente heures après l'injection, les parasites transfectés sont sélectionnés par ajout de pyriméthamine dans l'eau de boisson des animaux. En effet, le vecteur berghei comporte une cassette contenant la dihydrofolate reductase humaine résistante à la pyriméthamine qui, après recombinaison homologe, est insérée dans le génome. L'enzyme parasite étant sensible à la pyriméthamine, les parasites recombinants seront les seuls à se développer.

Les biberons contenant la pyriméthamine (70mg dilué dans dix millilitres de DMSO ajusté à un litre, pH 3.5-5) sont changés une fois par semaine. La parasitémie est suivie par frottis sanguin tous les deux ou trois jours.

4. Vérification de la transfection

Les parasites qui se développent dans les souris sous traitement à la pyriméthamine sont génotypés afin de vérifier l'intégration de notre construction dans le génome. Le génotypage est effectué par PCR avec les amorces Tag HA, IntGène PbPP2A, IntGène PbPTPA, TRAD4, IntProm PbPP2A, IntProm PbPTPA. Une analyse en western blot est réalisée afin de vérifier l'expression des protéines PbPTPA et PbPP2A fusionnées à un épitope héماغlutinine (HA). Pour cela, des extraits protéiques totaux de schizontes saponisés obtenus après mise en culture sur la nuit de sang de souris parasitées sont séparés sur gel d'acrylamide puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les protéines fusionnées HA sont révélées par un anticorps anti-HA couplé à la biotine (1/2500) et de la streptavidine HRP (1/100 000 diluée en PBS 3% BSA 0,1% Tween20).

XV. Elaboration de peptides dérivés du motif KINF

Des peptides dérivés du motif KINF sont élaborés en se basant sur l'article de Guernon *et al.* (Guernon, 2006). Ils sont composés soit de la séquence pénétrante ou DPT-SH1 « VKKKKIKREIKI » et du motif NKINF répété en tandem soit de la séquence pénétrante et du motif NKINF muté « NKANA » répété en tandem. Ces peptides ont été synthétisés par Genscript.

XVI. Micro-injection de peptides dérivés du motif KINF en ovocyte de xénope

Des ovocytes de xénope sont pré-injectés avec les peptides KINF ou témoins (100ng). Dix nanogrammes de PfPTPA recombinante sont micro-injectés une heure après, puis les extraits d'ovocytes sont préparés afin de réaliser des immunoprécipitations par un anticorps anti-His. Les complexes protéiques sont ensuite révélés après migration sur gel d'acrylamide et transferts sur membrane de nitrocellulose par des anticorps anti-XePP1 (1/15 000), anti-his (1/1 000) ou anti-XePP2A (1/15 000).

XVII. Test des peptides dérivés du motif KINF sur la croissance de *Plasmodium falciparum*

Les expériences sont effectuées en plaques 96 puits à une parasitémie initiale de 0,5% et une hématocrite de 1%. Les peptides sont ajoutés à différentes concentrations (concentrations finales de 5 à 160µM) dans 250µl de RPMI-AlbuMAX (0,5%) et incubés soixante-douze heures pour permettre à tous les stades d'effectuer au moins un cycle. Les cultures sont ensuite maintenues trente minutes à l'obscurité avec du SYBR Green I 1X

Matériel et méthodes

(Invitrogen) dilué dans un tampon contenant 20mM de Tris pH8.8 et 138mM de NaCl. Les érythrocytes sont fixés avec 1% de paraformaldéhyde puis conservés à 4°C à l'obscurité jusqu'à leur analyse par cytométrie en flux.

La croissance parasitaire est mesurée par cytométrie en flux sur un FACSCalibur (Becton-Dickinson). Les érythrocytes infectés ou non sont ciblés selon leurs signaux FSC (forward scatter) et SSC (side scatter). L'analyse de la fluorescence (fluorescence verte, filtre FL1) est réalisée en utilisant le logiciel CellQuest (FACScan ; BD Biosciences) sur un total de 100 000 événements acquis. La fluorescence est observée selon le protocole décrit par Izumiyama *et al.* sur un dot-plot à deux paramètres (FL1-SSC) (Izumiyama, 2009). La fluorescence des érythrocytes sains est ajustée pour apparaître entre 10^0 et 10^1 . Les résultats sont présentés en pourcentage de fluorescence des érythrocytes totaux. La concentration de peptide permettant l'inhibition de 50% de la croissance parasitaire (IC_{50}) est mesurée en déterminant la concentration correspondant à 50% de parasitémie observée dans les puits ne contenant pas de peptide. La valeur de l' IC_{50} est calculée en utilisant le logiciel ICEstimator 1.2 (www.antimalarial-icestimator.net) qui se base sur l'analyse de la régression non-linéaire des courbes dose-réponse logarithmiques.

Discussion et perspectives

L'étude de la régulation des phosphatases PP1 et PP2A chez le parasite *Apicomplexa P. falciparum* responsable du paludisme est l'axe de recherche majeur de notre laboratoire. Au cours de ces études, notre équipe a montré que les régulateurs de la phosphatase PfPP1 sont aussi importants que la phosphatase elle-même (Daher, 2006 ; Freville, 2012 ; Freville, 2013). En ce qui concerne l'activité et la régulation de PP2A chez le parasite, peu de choses sont connues. En effet, seule la sous-unité catalytique et l'inhibiteur 2 ont été identifiés. L'objectif de ce travail de thèse était donc d'étudier la régulation de PP2A chez *Plasmodium falciparum*, en identifiant les sous-unités et les protéines régulatrices de PfPP2A, puis en caractérisant moléculairement plus particulièrement trois protéines régulatrices putatives, PfI1^{PP2A}, PfI2^{PP2A} et PfPTPA. La protéine PfPTPA a ensuite été caractérisée fonctionnellement pour son rôle dans la régulation de PP2A. Enfin, une étude du rôle de PfPTPA dans la régulation de PfPP1 a été amorcée suite à l'identification d'une particularité spécifique de la protéine PTPA parasitaire. L'ensemble de ces travaux a permis de mieux comprendre la régulation de PfPP2A notamment par PTPA et de mettre en lumière un nouveau partenaire de la protéine PfPP1 dont le rôle reste à démontrer.

Dans un premier temps, nous discuterons l'identification des sous-unités régulatrices et des protéines régulatrices de PP2A chez le parasite *P. falciparum*. Puis, nous discuterons nos études faites sur les inhibiteurs 1 et 2 de PfPP2A. Nous commenterons ensuite le rôle régulateur de PfPTPA sur PP2A et enfin nous discuterons le rôle régulateur potentiel de PfPP1 de la protéine PfPTPA.

I. Identification des sous-unités régulatrices et des régulateurs de PfPP2A

1. PfPP2A : un nombre d'holoenzymes limité

La première étape de notre travail a consisté en la recherche *in silico* des séquences de *Plasmodium falciparum* homologues à la PP2A humaine et à ses régulateurs. La sous-unité catalytique de PfPP2A a été identifiée par Dobson *et al.* (Dobson, 1999). Le séquençage de la partie N-terminale de la protéine identifie la protéine PfPP2A comme la protéine sous le numéro d'accèsion de plasmDB PF3D7_0314400. De façon intéressante, l'alignement des séquences des protéines humaines appartenant à cette famille révèle l'existence de trois protéines présentant des taux d'homologies de séquence importants et appartenant toutes trois au groupe PP2A/PP4/PP6 : PF3D7_0314400 (PfPP2A), PF3D7_0925400 (PfPPB) et PF3D7_0927700. De l'alignement de ces trois protéines avec les phosphatases PP2A, PP4 et PP6 de l'homme, il ressort que PfPP2A présente 60% d'identité avec la PP6 contre 56% pour PP4 et seulement 54% avec la PP2A. Tandis que PF3D7_0927700 présente plus de 60% d'identité avec PP4 et que la partie C-terminale de PfPPB présente 54% d'identité avec PP2A. Cependant, seule PfPP2A possède le motif YFL, siège des modifications post-traductionnelles, en C-terminal. Les deux autres protéines possèdent soit un motif YML (PfPPB) soit un motif YFS (PF3D7_0927700). L'activité de PfPP2A a été caractérisée par Dobson *et al.* qui montrent

que cette protéine est insensible à la calmoduline mais sensible à l'acide okadaïque ($IC_{50}=0,2nM$), ce qui indique son appartenance à la famille PP2A/PP4/PP6 (Dobson, 1999). La sensibilité de cette protéine à l'inhibiteur 2 de PP2A présent chez *Plasmodium falciparum* (PfARP) confirme qu'il s'agit très certainement de l'orthologue de PP2A (Dobson, 2003). Nous avons choisi de poursuivre les études avec la protéine identifiée comme PfPP2Ac par Dobson *et al.* Mais une étude ultérieure des deux autres protéines serait intéressante.

L'analyse bio-informatique nous a permis d'identifier la sous-unité A qui est connue pour permettre la bonne conformation de la protéine PP2A chez les eucaryotes (Figure 47). Bien qu'annotée en tant que sous-unité A dans PlasmoDB, aucune étude n'a été réalisée afin de confirmer le rôle de cette protéine dans la conformation de la PP2A du parasite.

Nous avons également identifié un seul et unique représentant des sous-unités régulatrices de type B contrairement à l'homme qui en possède plus de 16 différentes (Figure 47). Ces sous-unités régulatrices sont impliquées dans la régulation de l'activité, de la localisation et de la spécificité de substrat de la protéine phosphatase de type 2A (Cegielska, 1994 ; Kamibayashi, 1994). La seule sous-unité de type B qui est présente chez *P. falciparum* est un orthologue de la sous-unité PR72 (B''). Sa séquence putative code pour 1006 acides aminés ce qui est plus proche de la taille de PR130, variant de PR72 composée de 1050 résidus, que de PR72 qui est, elle, composée de 529 résidus. De façon surprenante, cette sous-unité B'' parasitaire ne s'aligne qu'avec la partie C-terminale de PR130 qui est identique à PR72. Or, PR130 et PR72 sont issues du même gène et résultent d'un épissage alternatif. *Toxoplasma gondii*, un autre apicomplexe, possède également une protéine qui s'aligne dans sa partie C-terminale avec PR72 et PR130. Cependant, bien que les protéines des deux apicomplexes aient une taille similaire (1167 acides aminés pour la protéine de *Toxoplasma* et 1006 pour la protéine de *Plasmodium*), elles ne présentent d'homologie de séquence que dans leur partie C-terminale, c'est-à-dire la partie homologue à PR72. Il semblerait donc que cette sous-unité B'' parasitaire soit une chimère entre la protéine conservée PR72 en C-terminal et une protéine spécifique de *Plasmodium* ne présentant aucune homologie de séquence avec une protéine connue. De même, l'orthologue de cette sous-unité B'' chez *T. gondii* semble être une chimère entre la protéine PR72 et une autre protéine qui ne présente d'homologie de séquence ni avec son orthologue chez *P. falciparum*, ni aucune autre protéine connue. Néanmoins, il est possible qu'il s'agisse d'une mauvaise annotation du génome de *Plasmodium falciparum*. En effet, sa présence en spectrométrie de masse n'a pas été vérifiée. Par contre, chez *Toxoplasma gondii* les analyses par spectrométrie de masse ont permis d'identifier plusieurs peptides qui couvrent largement la protéine putative ce qui permet de penser que la protéine est exprimée. En dehors de ces considérations moléculaires, la présence de cette sous-unité particulière est également surprenante en raison de la localisation et de la fonction de cette sous-unité chez les eucaryotes. En effet, la sous-unité PR72 est uniquement exprimée dans le cœur et les cellules musculaires chez la souris et l'homme. Or, ces deux organes sont absents chez *P. falciparum*. De plus, elle joue un rôle dans les cellules neuronales dopaminoceptives dans le cerveau (Ahn, 2007), rôle qu'elle ne peut

jouer chez *Plasmodium*. Cette sous-unité permet également d'inhiber la voie de signalisation WNT. Pourtant, cette voie n'est pas décrite chez *Plasmodium*. Il est intéressant de noter également que *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* et *Eimeria tenella*, appartenant également au phylum des *Apicomplexa*, possèdent tous une sous-unité B56 (sous-unité B') qui est annotée comme telle dans leur génome et qui présente plus de 50% d'identité avec leur orthologue humain. L'alignement de ces séquences sur le génome de *Plasmodium* ne permet pas d'identifier un orthologue. Il semble donc que la régulation de PfPP2A emploie des protéines spécifiques à ce parasite ou du moins différentes de celles impliquées chez d'autres eucaryotes et même chez d'autres apicomplexes.

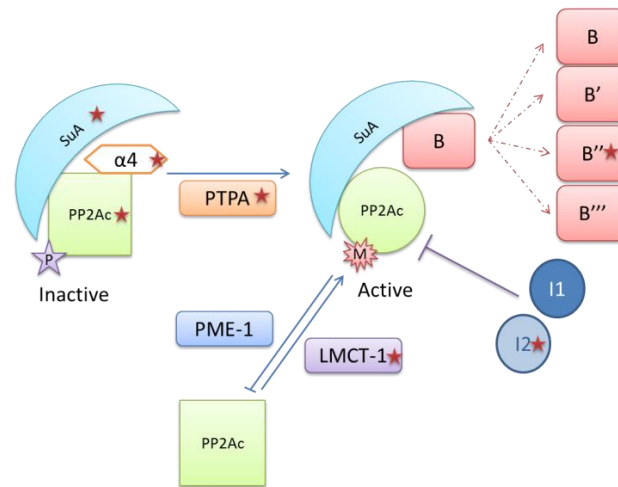


Figure 47 : Illustration de la régulation de PP2A. Les protéines qui ont été identifiées *in silico* chez *P. falciparum* sont illustrées par une étoile rouge.

L'identification d'une seule sous-unité A et d'une seule sous-unité de type B suggère que le nombre d'holoenzymes classiques est faible, voire même qu'une seule holoenzyme trimérique existe chez le parasite. Plusieurs suppositions expliquant cette structure peuvent être avancées. D'abord la faible complexité de l'organisme. En effet, *Plasmodium* est un organisme unicellulaire. Or, la levure qui est également unicellulaire, ne possède que deux sous-unités régulatrices : CDC55, orthologue des sous-unités B, et RTS1, orthologue des sous-unités B' (Zhao, 1997 ; Gentry, 2002). Une seconde hypothèse découle du rôle des sous-unités régulatrices de type B. En effet, celles-ci servent à réguler l'activité de PP2A, sa spécificité de substrat mais aussi sa localisation (pour revue (Janssens, 2001 ; Virshup, 2009 ; Slupe, 2011)). La localisation de la protéine PfPP2A est certainement plus simple à réguler dans un organisme unicellulaire et nécessiterait moins de partenaires. Il est possible que les autres partenaires de PP2A que nous avons identifiés, c'est-à-dire les inhibiteurs 1 et 2, Pfa4 et PfPTPA soient suffisants pour réguler l'activité de PP2A chez le parasite. Enfin, on ne peut exclure une régulation de la PP2A spécifique au parasite.

Il est possible en effet, qu'il n'y ait pas qu'un seul hétérotrimère qui puisse être formé. La PfPP2A purifiée à partir d'extraits parasitaires par Dobson *et al.* appartenait à

un trimère contenant trois polypeptides ayant des masses moléculaires de respectivement 35, 53 et 57 kDa (Dobson, 1999). La sous-unité catalytique identifiée par Dobson *et al.* a une masse moléculaire de 35,7kDa. Or, les sous-unités A et B que nous avons identifiées ont des masses moléculaires de respectivement 102 et 113kDa ce qui est loin des 53 et 57kDa des protéines présentes dans le trimère. La masse moléculaire de la sous-unité A de *P. falciparum* est supérieure à celle des sous-unités A d'autres organismes (environ 65 kDa). On peut envisager que les protéines aient été mal annotées dans le génome ou encore que les complexes précipités par Dobson *et al.* soient des complexes non classiques contenant d'autres protéines. Il serait intéressant d'étudier les sous-unités A et B identifiées dans la banque de données PlasmoDB et de déterminer leur(s) rôle(s) dans la régulation de PfPP2A, mais également d'étudier la composition des trimères présents *in vivo* dans le parasite.

2. Identification de protéines impliquées dans la régulation de l'activité de PP2A chez *Plasmodium*

En ce qui concerne les protéines régulatrices de PfPP2A, et de façon surprenante, bien qu'il existe un orthologue de LCMT1 dans le génome de *P. falciparum*, enzyme qui méthyle PP2A, aucun orthologue de la déméthylase PME-1 n'a été identifié dans notre étude (Figure 47). Or, chez *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* et *Eimeria tenella*, trois autres apicomplexes, il existe une PME-1. L'alignement de ces séquences sur la base de données PlasmoDB ne permet pas d'identifier un orthologue de cette protéine chez les différentes espèces de *Plasmodium* recensées dans cette base de données. Il semblerait donc que si PfPP2A est régulée par méthylation, les mécanismes impliqués soient, une fois encore, différents de ceux impliqués chez les autres eucaryotes mais également chez d'autres apicomplexes.

Notre analyse a permis d'identifier des orthologues des inhibiteurs 1 et 2, de la protéine $\alpha 4$ mais aussi de PTPA (Figure 47). Cependant, aucune protéine régulatrice impliquée dans la régulation du cycle cellulaire n'a été identifiée. L'absence de ces régulateurs impliqués dans le cycle cellulaire tel qu'ENSA, ARPP19 et TIPRL chez *P. falciparum* peut être expliquée par un cycle cellulaire différent avec une régulation spécifique aux apicomplexes. En effet, bien que *P. falciparum* soit un eucaryote, son cycle cellulaire est très différent de celui décrit dans l'introduction. Dans leur revue, Doerig *et al.* décrivent le cycle cellulaire de *Plasmodium* comme suit : une phase qui s'apparente à la phase G1 qui se déroule au stade anneau et en début de stade trophozoïte et des phases successives de synthèse d'ADN et de mitose observées tout au long des stades trophozoïtes et schizontes (Figure 48). Les mérozoïtes libérés seraient en phase G1 (Figure 48). La phase G2 semble absente. Les phases de mitoses correspondent à des endomitoses, c'est-à-dire des mitoses sans perte de l'enveloppe nucléaire, non suivies de cytokinèse. Les divisions des différents noyaux se font de façon asynchrone ce qui conduit à la formation de schizontes contenant 8 à 32 nuclei (Read, 1993). La dernière mitose est, elle, synchrone et coïncide avec l'assemblage des cellules filles par bourgeonnement (pour revue (Francia, 2014)). Il faut préciser que l'analyse du

transcriptome de *P. falciparum* au cours de la phase érythrocytaire de son cycle ne permet pas d'identifier de transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire du parasite. En effet, le phaseogramme du cycle érythrocytaire établi par Bozdech *et al.* montre une cascade d'expression continue sans limites claires ni transitions nettes (Bozdech, 2003) contrairement à ceux de l'homme ou de la levure qui identifient clairement les phases et les transitions (Spellman, 1998 ; Whitfield, 2002). Cependant, l'expression de gènes impliqués dans certains mécanismes tels que la machinerie de la réplication de l'ADN, ou la synthèse de nucléotides confirme la succession des phases établies ci-dessus. L'absence de transitions nettes dans le cycle cellulaire de *Plasmodium* est confirmée par l'absence de points de contrôle (pour revue (Doerig, 2000)), nécessaires et indispensables au bon déroulement du cycle cellulaire chez de nombreux eucaryotes (Hartwell, 1989). Pourtant, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, *Plasmodium* possède un certain nombre de cyclines et de CDKs fonctionnelles. Pourtant, bien que Doerig *et al.* montrent que la tyrosine 15 de la CDK1 humaine est conservée parmi les CDKs du parasite (Doerig, 2004), l'analyse du phosphoprotéome ne permet pas d'identifier cette tyrosine comme site de phosphorylation, suggérant une régulation de ces protéines par des enzymes spécifiques du parasite. Ceci pourrait expliquer l'absence dans le génome de *Plasmodium* d'un certain nombre de molécules impliquées dans le cycle cellulaire, notamment la régulation de la phosphorylation des CDKs, et régulées par PP2A chez les eucaryotes tels que WEE1, MYT1, CDC25 (pour revue (Doerig, 2004)). On peut également citer l'absence de CDC45, régulée par PP2A chez les eucaryotes, qui est impliquée dans le complexe pré-répliatif de l'ADN. Les particularités du cycle cellulaire de *Plasmodium* pourraient donc expliquer l'absence de certains régulateurs de PP2A.

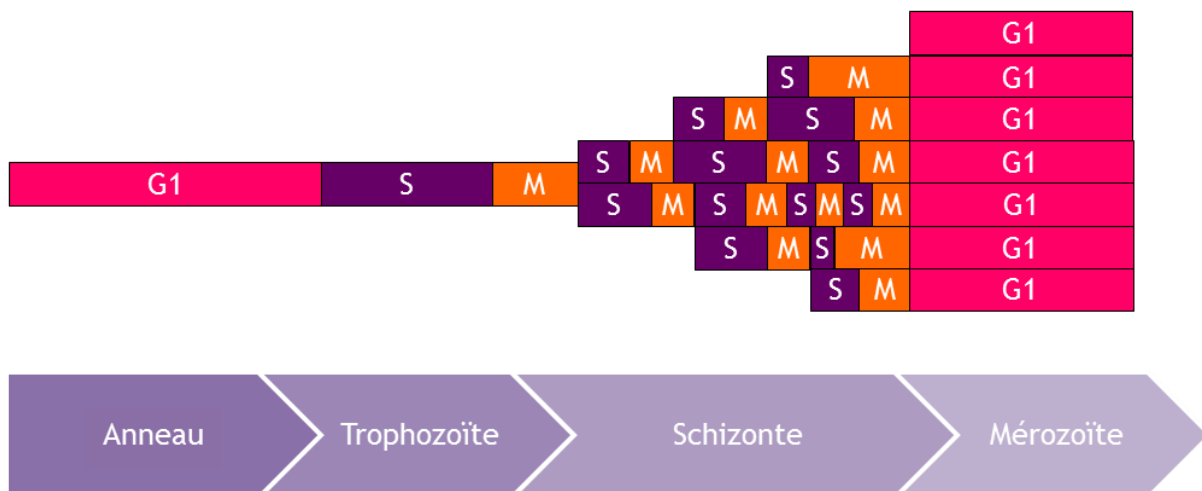


Figure 48 : Schématisation du cycle cellulaire lors de la phase érythrocytaire du cycle de *Plasmodium falciparum* selon Doerig *et al.* (Doerig, 2000). La succession des différentes phases identifiées chez les eucaryotes est mise en corrélation avec les différents stades parasitaires.

II. Études des inhibiteurs 1 et 2 de PfPP2A

1. L'inhibiteur 1 de PP2A en est-il vraiment un ?

Notre étude *in silico* nous a permis d'identifier un orthologue putatif de l'inhibiteur 1 de PP2A chez *Plasmodium falciparum* (Pfl1^{PP2A}). Cependant, les études que nous avons menées ne nous ont pas permis de vérifier que cette protéine est effectivement un orthologue de l'inhibiteur humain. En effet, la protéine I1^{PP2A} des mammifères inhibe l'activité de PP2A, mais est également capable de se lier et d'activer la PP1 (Li, 1995 ; Katayose, 2000). Le modèle de double hybride en levure utilisé lors de nos études préliminaires n'a pas permis de montrer une interaction de Pfl1^{PP2A} avec PfPP2A. D'autre part, nous avons montré que Pfl1^{PP2A} recombinante n'est pas capable d'interagir avec PfPP1 *in vitro*. Les études sur cette protéine n'ont pas été menées plus avant, car les résultats prometteurs obtenus en parallèle sur l'étude de PfPTPA nous ont incités à nous focaliser sur cette protéine. Il serait néanmoins intéressant de vérifier dans un autre modèle l'interaction entre Pfl1^{PP2A} et PfPP2A mais aussi avec PfPP1, notamment dans le modèle d'ovocyte de xénope que nous utilisons couramment dans le laboratoire ou *in vitro* en utilisant la PP2A humaine. Si Pfl1^{PP2A} interagit avec PfPP2A, il serait également intéressant de poursuivre les études sur le rôle de cette protéine dans l'activité de PfPP2A.

2. Pfl2^{PP2A} : interacteur de PfPP2A et PfPP1

En ce qui concerne l'orthologue d'I2^{PP2A}, nous avons montré une interaction de Pfl2^{PP2A} avec PfPP2A dans le modèle du double hybride en levure. Ainsi, le rôle inhibiteur de Pfl2^{PP2A} sur PfPP2A observé par Dobson *et al.* est certainement lié à l'interaction directe entre les deux protéines (Dobson, 2003). Par contre, bien que nous ayons montré une interaction entre Pfl2^{PP2A} et PfPP2A, nous n'avons pu confirmer les effets de cet inhibiteur *in vivo* dans un modèle hétérologue, l'ovocyte de xénope. Il aurait été intéressant de vérifier si cette absence d'effet est à mettre en lien avec une absence d'interaction entre Pfl2^{PP2A} et XePP2A. Il faut néanmoins préciser que l'étude en ovocyte n'est peut-être pas le meilleur outil pour vérifier l'inhibition de PP2A. En effet, Swain *et al.* montrent qu'en ovocyte de souris, le blocage de PP2A par des anticorps anti-PP2A ne permet pas de déclencher la GVBD (Swain, 2003). Néanmoins, cette étude n'est peut-être pas généralisable à tous les ovocytes car dans cette étude, ils montrent également que l'inhibition de PP1 par l'inhibiteur 2 de PP1 ne permet pas de déclencher la GVBD. Or, notre laboratoire a déjà prouvé que l'inhibition de PP1 en ovocyte de xénope par un sérum anti-PP1, l'inhibiteur 2 de *P. falciparum* ou encore PflRR1 induit la GVBD des ovocytes (Daher, 2006 ; Freville, 2013). L'inhibition de PP2A dans les ovocytes (xénope, souris ...) est généralement réalisée par l'acide okadaïque (Karaiskou, 1999 ; Lu, 2002 ; Mailhes, 2003 ; Wu, 2007 ; Toranzo, 2011), et aucun exemple d'activation de la GVBD par une protéine inhibitrice de PP2A n'a été décrit. L'effet de Pfl2^{PP2A} sur la régulation de l'activité de PP2A pourra être vérifié *in vitro* sur la protéine humaine.

Concernant le rôle potentiel de I2^{PP2A} sur PP1, nous avons montré que les deux protéines parasitaires interagissaient dans le modèle du double hybride en levure. Cette interaction pourra être vérifiée *in vitro* mais également *in vivo* en ovocyte de xénope par des expériences de co-immunoprécipitation. L'interaction observée entre Pfl2^{PP2A} et PfPP1, nous a amenés à étudier une potentielle régulation de PfPP1 par cet inhibiteur. Le test d'activité phosphatase pNPP est utilisé couramment dans le laboratoire pour étudier le rôle des régulateurs de PfPP1. Dans ce système, nous avons donc testé différentes concentrations de Pfl2^{PP2A} et observé la régulation de l'activité de PfPP1 vis-à-vis du substrat pNPP. Lors d'une étude préliminaire, nous observons que l'ajout de concentration de Pfl2^{PP2A} entre 1 et 500nM augmente l'activité de PfPP1 tandis que des concentrations supérieures inhibent son activité. Dobson *et al.* ont montré que l'ajout de 8 et 160 nM de Pfl2^{PP2A} ne modifiait pas l'activité de PfPP1 (Dobson, 2003). Mais il est important de noter que le substrat utilisé alors était l'histone marqué au ³²P et non le pNPP. Katayose *et al.* ont montré eux, que 0 à 30nM de I2^{PP2A} humaine ou bovine augmentait l'activité de PP1 jusqu'à 550% et que des concentrations plus élevées de I2^{PP2A} maintenait une activité de PP1 à 550% (Katayose, 2000). Cependant, la concentration maximale de I2^{PP2A} utilisée dans ce test est de 150nM et encore une fois le substrat n'était pas le pNPP mais la MBP (myelin basic protein) marquée au ³²P. De plus, il s'agit de protéine mammifère et non parasitaire. Enfin, nous pouvons nous demander si les concentrations de Pfl2^{PP2A} que nous avons utilisées peuvent être considérées car la relevance physiologique n'existe sûrement pas. Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle Pfl2^{PP2A} régule l'activité de PP1 comme ses orthologues mammifères, des études pourront être envisagées en utilisant un autre substrat notamment le K-R-pT-I-R-R. Le modèle de l'ovocyte de xénope pourra également être utilisé dans ce but. Nous pouvons d'ores et déjà affirmer que Pfl2^{PP2A} n'est pas un inhibiteur de PP1 dans le modèle des ovocytes de xénope. En effet, comme nous l'avons expliqué plus haut, l'inhibition de PP1 déclenche la GVBD. Or dans nos expériences, la GVBD n'a jamais été observée suite à la micro-injection de Pfl2^{PP2A}. Si les interactions sont confirmées, le rôle activateur de Pfl2^{PP2A} *in vivo* pourra être envisagé à la fois sur PP2A mais aussi sur PP1. En effet, la technique utilisée pour étudier l'effet activateur de PfPTPA est transposable dans ce cas. Ainsi, l'effet de Pfl2^{PP2A} sur la GVBD induite par la progestérone ou l'acide okadaïque pourra être étudié.

L'analyse de la séquence de Pfl2^{PP2A} a révélé la présence de trois motifs RVxF (KITF, KHVTF et RIKW) dont deux sont spécifiques au parasite (KHVTF et RIKW). L'implication de ces motifs dans l'interaction entre Pfl2^{PP2A} et PP1 n'a pas été étudiée. On pourra envisager de mesurer l'implication de ces motifs dans l'interaction mais aussi dans la régulation de son activité vis-à-vis de PP1 grâce à l'utilisation de protéines mutées dans les différents motifs RVxF. De plus, des peptides dérivés de ces motifs permettraient d'étudier l'implication de ces derniers dans l'interaction avec PP1, comme nous l'avons fait pour PfPTPA, et d'étudier le rôle de cette interaction *in vivo* chez le parasite.

Ainsi, nos études préliminaires sur ces deux inhibiteurs de PP2A ouvrent des perspectives d'études intéressantes sur la régulation de PP2A mais également sur la régulation de PP1 chez le parasite.

III. PfPTPA : un régulateur de PP2A

Les études sur PfPTPA ont été faites en parallèle aux études sur Pf11^{PP2A}, Pf12^{PP2A}. Les premiers résultats nous ont amenés à recentrer notre travail sur l'étude fonctionnelle de PfPTPA dans la régulation de PP2A chez le parasite.

1. PfPTPA : un interacteur de PP2A

Il nous a semblé primordial d'étudier dans un premier temps la localisation des deux partenaires chez le parasite. En effet, si nos études ultérieures montraient un effet de PfPTPA dans la régulation de PfPP2A *in vitro* ou dans certains modèles, rien ne nous indiquerait que cela soit relevant *in vivo*. L'exemple le plus frappant chez *P. falciparum* est l'identification de la protéine FKBP35 qui inhibe la calcineurine (ou PP2B) *in vitro*, mais qui n'est jamais co-localisée avec celle-ci tout au long du cycle érythrocytaire (Kumar, 2005). Ainsi, nous avons étudié la localisation de PfPTPA et PfPP2A *in vivo* chez le parasite en utilisant un vecteur qui permet l'expression des protéines parasitaires fusionnées à la GFP. Ces expériences nous ont permis de montrer que PfPTPA était nucléo-cytoplasmique tout au long du cycle érythrocytaire tandis que PfPP2A est nucléo-cytoplasmique au stade anneau et au stade schizonte mais exclusivement nucléaire au stade trophozoïte. Ainsi, les deux protéines sont présentes dans les mêmes compartiments cellulaires ce qui indique qu'elles peuvent potentiellement interagir *in vivo*. La localisation exclusivement nucléaire de PfPP2A au stade trophozoïte peut s'expliquer par le fait que le parasite est alors en phase de synthèse d'ADN. Or, PP2A est impliquée dans la réplication de l'ADN (Lin, 1998 ; Chou, 2002). La localisation de PfPTPA dans le cytoplasme au stade trophozoïte, en absence de PfPP2A peut indiquer que PfPP2A n'est pas la seule protéine avec laquelle elle interagit et qu'elle est peut-être impliquée dans d'autres voies de régulation. En effet, comme nous l'avons vu, PfPTPA est capable d'interagir avec PP1, mais nous y reviendrons plus longuement dans la suite de cette discussion. Nous pouvons également citer PP4 et PP6. En effet, PTPA est capable d'interagir avec ces deux protéines chez la levure (Mitchell, 2001 ; Van Hoof, 2005). Il a même été décrit que l'un des deux orthologues de PTPA chez la levure (YPA1) interagissait préférentiellement avec PP4 et PP6 plutôt qu'avec PP2A (Van Hoof, 2005). De plus, chez la levure l'orthologue YPA1 de PTPA est capable d'activer l'un des orthologues de PP2A (PPH21), PP4 (PPH3) et PP6 (SIT4) (Fellner, 2003 ; Van Hoof, 2005). Or, comme nous l'avons vu précédemment, nous avons identifié deux autres protéines appartenant potentiellement au groupe de phosphatases PP2A/PP4/PP6 dans le génome de *Plasmodium falciparum*. L'étude de l'interaction et de la régulation de l'activité de ces deux phosphatases par PfPTPA serait intéressante à mener.

Avant d'étudier une potentielle régulation de PfPP2A par PfPTPA, nous avons tout d'abord vérifié que les deux protéines étaient capables d'interagir. Diverses approches ont été utilisées. La première a été la détection du complexe *in vivo* chez le parasite. Pour ce faire nous avons tenté de produire des sérums anti-PfPTPA et anti-PfPP2A. Quel que soit le protocole utilisé, aucun de nos anti-sérums n'a permis reconnaître la protéine

parasitaire qu'elle soit sous forme native ou fusionnée à la GFP, bien qu'ils reconnaissent la protéine immunisante. L'identité de séquence (54,2% pour PfPP2A et 32,3% pour PfPTPA) n'est pas suffisante pour envisager que les souris et les rats immunisés ne puissent produire des anticorps contre ces deux protéines. La faible représentativité de la protéine dans le parasite pourrait être responsable du fait que la protéine native ne puisse être détectée. Il faudrait, pour pallier à cela, concentrer les protéines. Il serait en effet possible de concentrer PfPP2A en utilisant une colonne de microcystine-LR sur laquelle les protéines PfPP2A, entre autres, présentes dans un extrait protéique parasitaire se fixeraient. On peut également envisager d'extraire les protéines de culture de parasites synchronisés à différents stades. En effet, ces deux protéines sont majoritairement exprimées au stade trophozoïte âgé (Cf. Figure 2 de l'article). Or, les extraits parasitaires que nous avons testés contenaient plus de 90% de formes tardives. Nous pouvons envisager d'extraire les protéines de parasites au stade trophozoïte âgé. Cependant, un résultat est très surprenant. En effet, les anti-sérums ne sont pas capables de détecter des protéines PfPTPA ou PfPP2A dans des extraits protéiques de *Plasmodium falciparum* exprimant les protéines fusionnées à la GFP. Cette protéine est sous la dépendance d'un promoteur fort et est donc surexprimée tout au long du cycle érythrocytaire et la faible représentativité ne pourrait donc pas être mise en cause. Les anti-sérums que nous avons produits contiennent des anticorps polyclonaux anti-PfPTPA ou anti-PfPP2A. Même si certaines séquences ne sont pas accessibles à cause de la GFP, certains épitopes de la protéine devraient être reconnus. Quoi qu'il en soit, notre incapacité à produire des anticorps dirigés contre PfPTPA et PfPP2A ne nous permettait pas d'envisager d'étudier la formation des complexes *in vivo* par co-immunoprécipitation.

De ce fait, une seconde approche a été mise en place, le double hybride en levure que nous avons déjà utilisé pour les deux inhibiteurs de PP2A. Cependant, comme pour l'inhibiteur 1, ce modèle n'était pas adapté. Nous avons donc tenté d'étudier l'interaction de PfPTPA et PfPP2A *in vitro*. Pour ce faire, nous avons essayé de produire les deux protéines de façon recombinante. La protéine PfPTPA a donc été produite de façon recombinante et nous avons montré qu'elle était active. Par contre, nous n'avons pas pu produire la protéine PfPP2A de façon recombinante. En effet, la protéine recombinante n'était que rarement soluble et jamais active. De fait, il semblerait que l'expression de PP2A soit extrêmement régulée, empêchant la surexpression de la protéine (Baharians, 1998). Les essais d'expression de la PP2A de façon recombinante n'ont que rarement été couronnés de succès et les protéines produites se sont révélées inactives (Green, 1987 ; Chung, 1999). Des essais de production ont été réalisés dans un modèle de levure (*Pichia pastoris*). Ce modèle permet de produire une protéine PP2A active mais avec un très faible rendement (100µg par litre de culture) (Swiatek, 2000). Nous avons donc pallié à l'impossibilité de produire la protéine PfPP2A de façon recombinante en utilisant les ARNm de PfPP2A dans un modèle d'ovocyte de xénope. En effet, notre laboratoire avait déjà montré que l'ovocyte de xénope est capable de traduire des ARNm de *P. falciparum* (Daher, 2006). Nous avons ainsi pu montrer une interaction entre les deux protéines parasitaires mais ce modèle ne nous permet pas de dire si l'interaction est directe ou non. Dans le but de vérifier que l'interaction entre les

deux protéines PfPTPA et PP2A est directe, nous avons fait des tests d'interaction *in vitro* de type ELISA en utilisant la protéine PP2A humaine commercialisée (Cayman). L'utilisation de la protéine humaine était appuyée par le fait que la séquence de la protéine PP2A est conservée entre l'homme et le parasite (54% d'identité). De fait, la protéine PfPTPA est effectivement capable d'interagir directement avec l'orthologue humain de PfPP2A. Ceci montre que la protéine PTPA du parasite peut, comme ses orthologues humain et de la levure, interagir avec PP2A (Van Hoof, 2005 ; Guo, 2014).

L'interaction de PfPTPA avec la PP2A humaine nous a permis d'envisager que les résidus impliqués dans l'interaction puissent être les mêmes. De plus, cinq des six résidus connus pour être impliqués dans l'interaction entre PTPA et PP2A chez l'homme sont conservés chez le parasite corroborant notre hypothèse (Chao, 2006). Ainsi, divers mutants contenant une simple mutation sur l'un de ces acides aminés (E272A, V283A, G292A, M296A et K304) ont été produits ainsi qu'un mutant contenant les cinq mutations simultanément (5mut). Ces mutants ont permis de montrer, *in vivo* en ovocyte de xénope, l'implication des résidus V283, G292 et M296 dans l'interaction PfPTPA/PfPP2A. Au contraire, les résidus E272 et K304 ne semblent pas être impliqués dans cette interaction (Tableau 11). Ces données sont intéressantes et soulignent des différences entre l'homme et *Plasmodium*. En effet, chez l'homme, au contraire du parasite, le résidu E270 (qui correspond au résidu E272 de la séquence de *P. falciparum*) est, avec les résidus G290 et M294 (respectivement G292 et M296 chez le parasite), indispensable à l'interaction entre les deux protéines (Chao, 2006) (Tableau 11). Les protéines présentant une mutation au niveau du résidu V281 ou K302 présentent, elles, toujours une interaction résiduelle avec PP2A (Chao, 2006) (Tableau 11). Le résidu V283 (V281 chez l'homme) est donc plus impliqué chez le parasite que chez l'homme. Ceci peut s'expliquer par la plus grande accessibilité de ce résidu. En effet, la cristallographie de PP2A humaine montre que le résidu V281 est présent dans une petite poche (Cf. figure 1 de l'article). Or, la modélisation de la protéine parasitaire montre que ce résidu est exposé et forme une proéminence. Néanmoins, il ne s'agit que d'une modélisation. Cela est donc sujet à correction si la protéine est cristallisée plus tard. Cette différence d'accessibilité ne peut expliquer la différence d'implication du résidu E270. Mais l'absence du résidu V209 chez le parasite, qui est chez l'homme juxtaposé au résidu E270, pourrait impliquer une surface d'interaction différente entre la protéine humaine et la protéine parasitaire. Les résultats obtenus avec la protéine contenant les cinq mutations, semblent indiquer qu'aucun autre résidu n'est impliqué dans l'interaction avec PP2A. Cependant, l'introduction des cinq mutations simultanément a peut-être complètement modifié la structure de la protéine ce qui pourrait expliquer ces résultats.

Tableau 11 : Comparaison entre l'homme et *Plasmodium falciparum* de l'implication des résidus de PTPA dans l'interaction avec PP2A. Les positions des résidus sont notées dans l'ordre homme/*Plasmodium*. L'implication des résidus est symbolisée par des +/-, +++ symbolisant une forte implication, + une faible interaction et - une absence d'implication. La conservation du résidu entre l'homme et le parasite est commentée dans la colonne conservation.

Résidu	Conservation	Interaction	
		Homme	<i>Plasmodium</i>
V209	Non	+++	
E270/272	Oui	+++	-
V281/283	Oui	++	+++
G290/292	Oui	+++	+++
M294/296	Oui	+++	+++
K302/304	Oui	+	-

Il est important de noter ici qu'une nouvelle étude sur PTPA a été publiée en 2013, dans laquelle PTPA a été co-cristallisée avec PP2A et une molécule d'ATPγS (Guo, 2014). Dans cette étude, Guo *et al.* identifient des résidus impliqués dans l'interaction entre PTPA et PP2A sur les deux protéines, notamment, les résidus aspartate en position 213 et 214 (D213 et D214), la valine en position 209 (V209), le tryptophane en position 210 (W210) et la phénylalanine en position 100 (F100) (Figure 49).

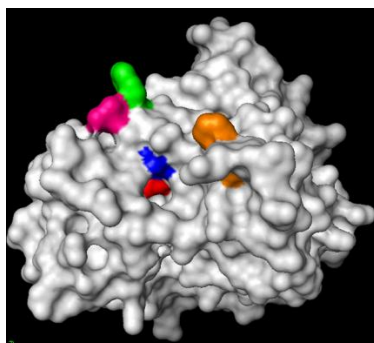


Figure 49 : Visualisation des résidus de PTPA humaine impliqués dans l'interaction avec PP2A d'après l'étude de Guo *et al.* (Guo, 2014). Les résidus identifiés par Guo *et al.* sont visualisés sur la structure de la PTPA humaine (2IXM). Le résidu F100 est coloré en orange, V209 en rouge, W210 en vert, D213 en rose et enfin D214 en bleu.

Ces auteurs estiment que les résidus identifiés par Chao *et al.* (Chao, 2006) sont localisés près mais pas à l'interface entre les deux protéines. Ils expliquent également que les effets sur la fixation et l'activité de PTPA des mutations en position V281 et M294 sont certainement liés à une modification de la conformation protéique. En effet, dans leur étude la mutation de la valine en position 281 par une alanine (V281A) n'altère pas l'interaction entre PTPA et PP2A tandis que la mutation en acide aspartique (V281D) empêche l'interaction des deux protéines. De même la mutation du résidu méthionine en position 294 en acide aspartique inhibe l'interaction, tandis que la mutation en lysine n'empêche pas l'interaction (Tableau 12).

Tableau 12 : Comparaison du rôle des mutations des résidus V281 et M294 sur l'interaction PTPA/PP2A. Les positions des résidus sont notées dans l'ordre homme/*Plasmodium*. L'interaction des mutants est symbolisée par des +/-, +++ symbolisant une forte interaction, + une interaction visible et - une absence d'interaction.

Résidu	Mutation	Interaction		
		Homme (Chao <i>et al.</i>)	Homme (Guo <i>et al.</i>)	<i>Plasmodium</i>
V281/283	A		+++	-
	D	+	-	
M294/296	D	-	-	-
	L		+++	

En dépit du fait qu'ils ne vérifient pas les autres résidus identifiés par Chao *et al.* leur étude est contradictoire avec la nôtre car les mutations en alanine des résidus valine en position 283 et méthionine en position 296 de la PTPA de *P. falciparum* diminuent voire abolissent l'interaction avec PP2A contrairement à ce qui est observé chez l'homme (Tableau 12). Néanmoins, il ne faut pas oublier que l'on parle de deux organismes différents. Il est également envisageable que les mutations que nous avons faites modifient la structure de la protéine et que les effets que nous avons observés soient causés par une modification de la structure de la protéine. La mutation des acides aminés en d'autres résidus que l'alanine pourrait nous permettre d'éclaircir ce point. De même, une étude plus approfondie et éclairée des structures protéiques pourrait nous renseigner si effectivement nos mutations modifient la structure de la protéine. En effet, les modélisations des protéines PfPTPA mutées qui ont été faites ne permettent pas d'observer de différence. Mais il ne s'agit que d'une modélisation et le modèle de référence étant toujours le même, on ne peut avoir aucune certitude. Afin d'évaluer si d'autres résidus sont impliqués, des études de mutagenèse sur les résidus identifiés par Guo *et al.* pourraient être envisagées.

2. Rôle de PfPTPA sur l'activité de PP2A

Après avoir vérifié que PfPTPA était capable d'interagir avec PfPP2A, nous avons étudié l'effet de PfPTPA dans la régulation de l'activité de PP2A *in vitro*. Nos expériences ont montré que PfPTPA augmente l'activité de la PP2A humaine vis-à-vis du substrat pNPP (Cf. article). Cependant, PfPTPA ne semble pas réguler l'activité de PP2A vis-à-vis d'un substrat contenant une thréonine phosphorylée. Ce résultat est intéressant et confirme les résultats publiés par Cayla *et al.* (Cayla, 1990). Le rôle de PTPA dans la régulation de PP2A est encore controversé. En effet, bien que la littérature soit unanime sur l'augmentation de l'activité tyrosine de PP2A en présence de PTPA *in vitro* (Cayla, 1990 ; Cayla, 1994 ; Van Hoof, 1994 ; Janssens, 1998 ; Van Hoof, 1998 ; Chao, 2006), il semblerait qu'*in vivo* chez la levure, la perte des deux gènes codant pour PTPA (*rrd1* et *rrd2*) augmente de façon importante l'activité tyrosine phosphatase (Fellner, 2003). De même, il semblerait que l'isoforme YPA2 ne soit pas capable d'induire l'activité tyrosine phosphatase de PP2A (Van Hoof, 1998). Le rôle de PTPA sur la régulation de l'activité sérine/thréonine phosphatase de PP2A est également très controversé. En effet, il a été décrit que PTPA a soit un effet inhibiteur vis-à-vis de l'activité sérine/thréonine

phosphatase de PP2A (Chao, 2006), soit un effet activateur (Fellner, 2003 ; Longin, 2004), soit encore un rôle neutre (Cayla, 1990). Nos résultats tendent à confirmer l'absence de régulation de l'activité sérine/thréonine phosphatase de PP2A par PTPA. Mais il ne faut pas oublier que nous travaillons avec deux protéines issues de deux organismes différents (PfPTPA et PP2A humaine) et que l'on ne peut exclure que PfPTPA puisse réguler l'activité sérine/thréonine phosphatase de PfPP2A. Nous pourrions envisager l'utilisation d'autres substrats comme la phosphorylase a ou l'histone H1 afin de confirmer l'absence d'effet régulateur de PfPTPA vis-à-vis d'un substrat sérine/thréonine phosphatase. De même, bien que nos résultats confirment l'effet activateur de PfPTPA vis-à-vis de l'activité tyrosine phosphatase de PP2A observé dans d'autres organismes, on ne peut être certain que PfPTPA augmente l'activité tyrosine phosphatase de PP2A chez le parasite.

De la même façon, l'absence d'activité ATPasique du complexe PP2A/PfPTPA peut être expliquée par le même raisonnement. En effet, il est fait état dans la littérature que PTPA augmente l'activité ATPasique de PP2A (Van Hoof, 1994 ; Chao, 2006 ; Guo, 2014). Or, nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une activité ATPasique. Nous ne pouvons pas être sûrs que les deux protéines parasitaires puissent ensemble présenter une activité ATPasique. Si ces résultats sont confirmés sur la protéine PP2A de *Plasmodium*, on pourra envisager un mécanisme de régulation de PP2A par PTPA spécifique du parasite. Dans les deux cas, la production d'une protéine PfPP2A recombinante active permettrait de répondre à de nombreuses questions.

Nos études sur les mutants PfPTPA montrent qu'à de faibles concentrations toutes les mutations empêchent l'activité de PfPTPA. A de plus fortes concentrations, la protéine contenant les cinq mutations reste incapable d'activer PP2A et montre donc une abolition complète de l'activité de PfPTPA, certainement liée à une perte totale d'interaction. Le mutant G292A montre lui aussi une perte totale d'activation de la PP2A humaine. L'interaction résiduelle qui existe entre PfPTPA et PfPP2A en ovocyte de xénope semble montrer que ce résidu est essentiel pour l'interaction mais aussi pour l'activité de la protéine. Au contraire, l'interaction résiduelle entre PfPP2A et les mutants PfPTPA V283A et M296A est suffisante pour permettre l'activation de PP2A même si celle-ci est faible. Le résidu E272 semble important pour l'activité de PfPTPA. En effet, nous avons vu précédemment que PfPTPA muté au niveau du résidu E272 était toujours capable d'interagir avec PfPP2A. Or, cette protéine ne permet qu'une faible activation de PP2A. Par contre, le résidu K304 est moins impliqué, ce qui confirme les données publiées par Chao *et al.* (Chao, 2006).

Ainsi, l'identification de résidus impliqués dans l'activité de PfPTPA, et notamment dans la régulation de PP2A, montre encore une fois certaines différences entre la protéine parasitaire et la protéine humaine. Certes, les mutations peuvent modifier la structure de la protéine entraînant une modification de l'interaction et donc une modulation de son activité. Cependant, on a pu observer qu'il y a avait des différences entre les résultats obtenus lors des études de l'interaction et ceux obtenus lors des études de l'activité. En effet, le résidu E272 qui, contrairement au résidu E270 chez l'homme, n'est que peu impliqué dans l'interaction semble jouer un rôle important dans l'activité de la protéine.

3. Rôle de PfPTPA et PfPP2A dans le cycle parasitaire

Afin d'étudier le rôle de PfPTPA et de PfPP2A chez le parasite, nous avons tenté d'interrompre ces deux gènes chez *P. falciparum*. Malheureusement, bien que l'on observe une intégration dans le génome, celle-ci semble transitoire et ne permet pas d'étudier le phénotype des parasites dont les gènes sont interrompus. Il semble donc que ces deux gènes soient essentiels à la survie du parasite et à la complétion de son cycle cellulaire. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment obtenus chez la souris et la levure. En effet, l'interruption des deux gènes codant pour PP2A chez la levure (*ppa1* et *ppa2*) est létale alors que la simple interruption (*ppa1* ou *ppa2*) est viable suggérant une redondance des deux gènes (Kinoshita, 1990). De même chez la souris, les embryons homozygotes PP2A α *-/-* ne sont pas viables (Gotz, 1998). De la même façon, la double délétion *rrd1/rrd2* chez la levure (gènes codant pour YPA1 et YPA2 respectivement, les deux isoformes de l'orthologue de PTPA chez *S. cerevisiae*) est létale dans des conditions standard de croissance (Rempola, 2000 ; Van Hoof, 2000), tandis que la simple délétion (*rrd1* ou *rrd2*) conduit à des phénotypes différents suggérant que les deux gènes ont des fonctions différentes (Rempola, 2000).

Si dans leur ensemble, nos observations tendent à montrer que chacun des gènes codant PP2A et PTPA est essentiel au parasite, il est à noter que nous avons détecté de façon transitoire des parasites ayant intégré les constructions permettant l'interruption des gènes. Ce résultat pourrait indiquer que l'essentialité est dépendante du stade parasitaire. On peut envisager que dans les parasites dont le gène *pfpp2a* est interrompu, les deux autres protéines de la famille de phosphatases PP2A/PP4/PP6 puissent prendre le relai ce qui expliquerait la survie de parasites ayant intégrés la construction. En effet, chez la levure *S. cerevisiae*, PPH3 (PP4) semble avoir une activité complémentaire de celle de PP2A (Ronne, 1991). Cependant, comme nous ne pouvons obtenir de clone viable, nous ne pouvons pas vérifier si l'une ou l'autre des phosphatases de ce groupe est surexprimée chez *P. falciparum* et prend le relai jusqu'à un certain stade. Les deux gènes semblant essentiels à partir d'un certain stade, nous avons donc voulu étudier plus précisément le rôle de ces protéines aux différents stades du parasite. Néanmoins, l'absence de système d'interruption conditionnelle de gène dans cet organisme ne nous permettait pas d'étudier le stade dans lequel ces protéines étaient essentielles. En effet, plusieurs outils permettant l'interruption de gène chez *P. falciparum* existent, notamment le vecteur pCAM que nous avons utilisé pour interrompre les gènes *pfpp2a* et *pfptpa* (Crabb, 2004). Ces outils ne permettent pas de connaître le rôle d'un gène si celui-ci est essentiel. Plusieurs technologies ont été mises au point pour étudier le rôle des gènes essentiels chez *P. falciparum* et ciblent différents niveaux de régulation. Le premier niveau de régulation concerne l'expression génique. Un système de régulation de l'expression génique par des régulateurs transcriptionnels régulés par la tétracycline a été mis en place chez *P. falciparum* par Meissner *et al.* (Meissner, 2005) (Figure 50). Ce système permet de réguler l'expression génique en utilisant l'anhydro-tétracycline qui inhibe le promoteur d'un transgène lorsqu'elle est ajoutée. Mais leur méthode, bien qu'elle permette de réprimer l'expression d'un transgène, ne permet pas de réprimer

l'expression d'un gène endogène. Le deuxième niveau de régulation cible les ARNm. Il est à noter que la régulation par ARN interférence ne semble pas applicable chez *Plasmodium* en raison de l'absence d'une machinerie complète (Baum, 2009). Cependant, il existerait une voie non canonique (Schwentke, 2012) qui permettrait d'expliquer le succès de certaines expériences (Kumar, 2002 ; Malhotra, 2002 ; McRobert, 2002 ; Gissot, 2004). Le dernier niveau de régulation cible la synthèse protéique. En effet, une méthode permettant de réguler le taux de protéines a été décrite chez *P. falciparum* (Armstrong, 2007). Un domaine de déstabilisation fusionné à la protéine FKBP, est ajouté sur le gène d'intérêt. La construction est ensuite intégrée dans le génome de *P. falciparum*. Dans ce système, la protéine est, en grande partie, rapidement dégradée en absence de Shld1, un analogue de la rapamycine (Figure 50). La protéine est stabilisée en présence de Shld1 (Figure 50). Par contre, ce système ne permet pas de dégrader la totalité de la protéine étudiée et l'activité résiduelle peut être un frein à l'étude du rôle de ces protéines (Armstrong, 2007). Malgré l'éventail de techniques pouvant permettre l'étude des gènes essentiels de *P. falciparum*, aucune n'est vraiment généralisable à l'étude de gènes différents.

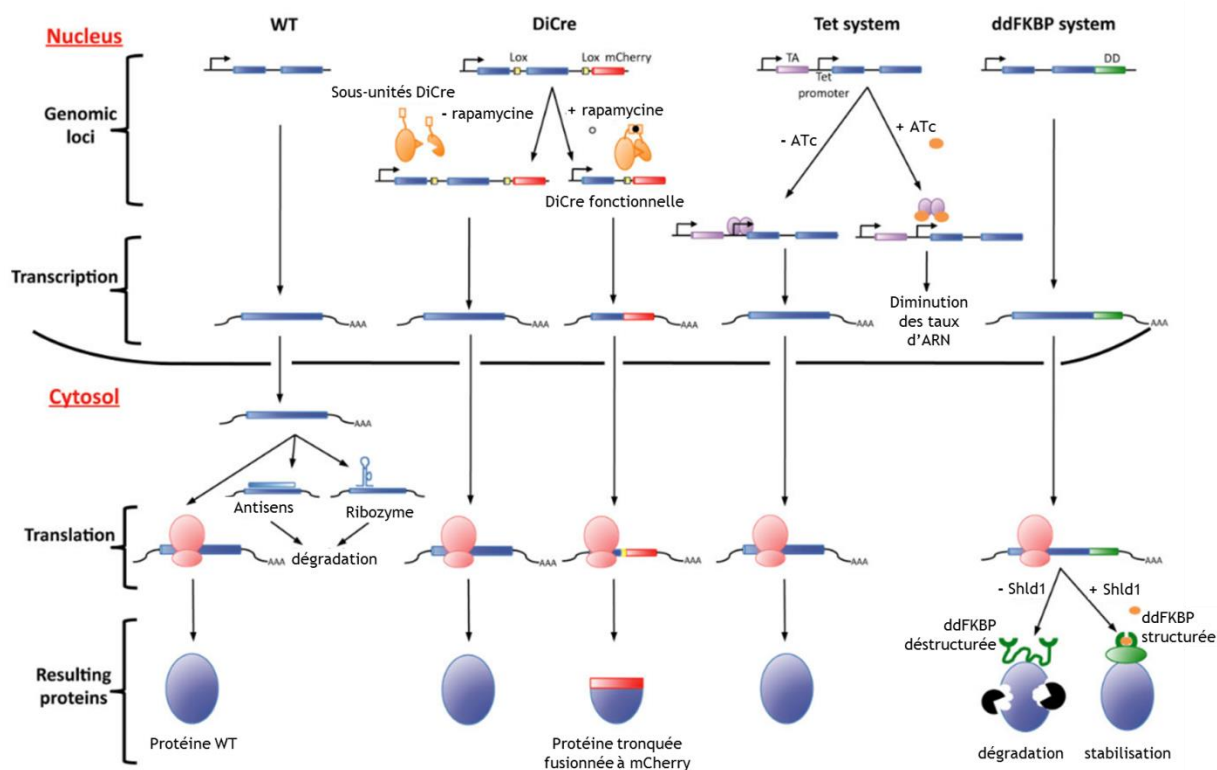


Figure 50 : Les différentes méthodes inductibles pour interrompre l'expression d'une protéine chez le parasite. Les différentes méthodes décrites dans le paragraphe ci-dessus sont schématisées dans cette figure tirée de (Pino, 2013).

Une nouvelle approche publiée par Pino *et al.* semble cependant solide et généralisable. Cette approche consiste en l'interruption conditionnelle de gène inductible par la tétracycline chez *Plasmodium berghei* (Pino, 2012) (Figure 50). Nous avons donc mis au point au laboratoire les transfections dans *P. berghei* et obtenu des parasites

transfectés avec les constructions permettant l'étude de PbPTPA et PbPP2A. Nos premiers résultats dans ce système montrent que les parasites ont bien intégré dans leur génome les modifications qui permettront d'éteindre ces gènes grâce à la tétracycline. Nous sommes actuellement en train de vérifier par western-blot que nos protéines sont bien exprimées dans le parasite. Ce système nous permettra d'étudier le rôle de chacune de ces protéines sur la survie du parasite, notamment en mesurant la parasitémie chez les animaux, mais également le rôle spécifique à chaque stade parasitaire de la phase érythrocytaire, grâce à la culture *in vitro*. Enfin, nous pourrions étudier le rôle de ces protéines dans l'invasion des érythrocytes *in vitro*, ainsi que dans le cycle parasitaire chez le moustique.

Pendant que nous mettions en place ce système dans le laboratoire, Collins *et al.* ont publié un système homologue chez *P. falciparum* (Collins, 2013a). Ces auteurs utilisent le système Cre/Lox. Le principe est simple, lorsqu'il y a recombinaison homologue, le gène d'intérêt est alors suivi de la région 3'UTR du gène *pbdhfr* puis du gène de la *dhfr* humaine (*hdhfr*). Ces deux insertions sont flanquées par des sites LoxP. La cassette DiCre est également présente en aval de ces séquences (Figure 51). La région 3'UTR d'un gène régule la terminaison correcte de la transcription de l'ARNm et la polyadénylation de l'ARNm, important pour sa stabilité et son trafic dans la cellule. Plusieurs équipes ont montré qu'il était possible de remplacer la région 3'UTR d'un gène par une autre sans modifier l'expression génique (Yeoh, 2007 ; Combe, 2009 ; Giovannini, 2011) et l'ablation de cette région peut conduire à l'inhibition complète de l'expression du gène. En présence de rapamycine, la recombinase DiCre est hétérodimérisée et permet l'excision des séquences génomiques présentes entre les deux sites LoxP. Dans le système de Collins *et al.*, la région 3'UTR et le gène de résistance au WR99210 (*hdhfr*) sont excisés (Figure 51). Le but est qu'en l'absence de site de polyadénylation, l'ARNm soit dégradé et que le gène ne soit pas traduit en protéine. Malheureusement, bien que l'excision ait bien eu lieu, il existe un site de polyadénylation dans la cassette DiCre qui après excision se retrouve juxtaposé au gène d'intérêt. De ce fait, aucune diminution de l'expression de la protéine n'est décelable. Par contre, bien que le système ne soit pas fonctionnel, les auteurs ont ouvert la voie pour un système d'interruption conditionnelle de gène chez *P. falciparum*. En effet, ils ont montré que le mécanisme d'excision en présence de rapamycine présente une efficacité de près de 100%. Ainsi, on peut envisager à plus ou moins court terme d'utiliser cette technologie pour interrompre un gène comme le propose Pino *et al.* notamment en insérant un site LoxP dans un intron et un second site à la fin du gène (Pino, 2013).

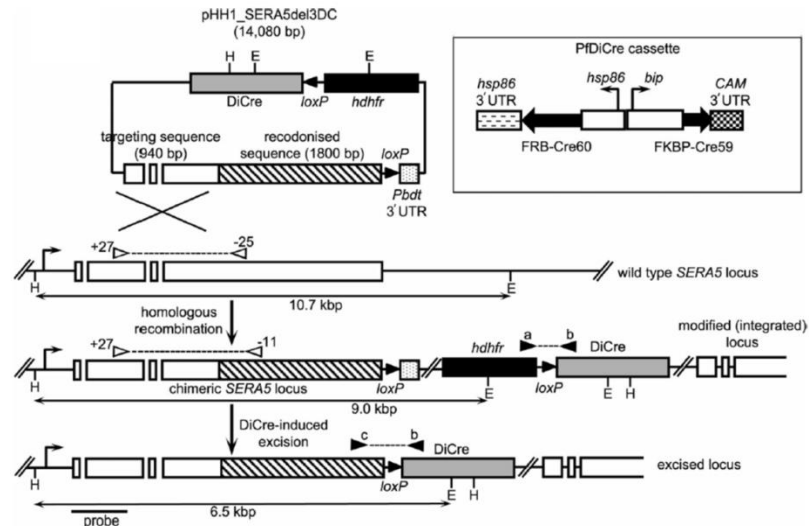


Figure 51 : Système de délétion de gène par une activité recombinase inducible chez *P. falciparum*. Le vecteur utilisé contient une cassette DiCre, détaillée dans l'encart en haut à droite, la séquence d'intérêt est insérée dans le vecteur, de même que la région 3'UTR du gène *pbdhfr* et le gène *hdhfr* nécessaire pour la sélection des parasites recombinés. Ces deux gènes sont flanqués de sites *LoxP* qui permettront l'excision. Le schéma mentionne une partie recodonsée du gène d'intérêt cependant, cela n'est pas nécessaire pour l'interruption conditionnelle du gène. D'après (Collins, 2013a).

4. Rôle de PfPTPA dans le cycle cellulaire

L'implication apparente de PfPTPA dans la régulation du cycle de *Plasmodium*, nous a poussé à étudier les effets de cette protéine dans la régulation du cycle cellulaire et notamment au niveau de la transition G2/M. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Dans ce modèle, l'ovocyte de xénope est bloqué en prophase I de méiose (phase G2) sous l'action d'un certain nombre de molécules dont PP2A (Cf. Introduction). PP2A est effectivement la protéine phosphatase majeure responsable de la déphosphorylation d'un grand nombre de substrats des CDK induisant l'inactivation du MPF (Mitotic Promoting Factor) et donc inhibant la transition G2/M (Ferrigno, 1993) (Cf. Introduction). Dans ce contexte, l'inhibition de PP2A déclenche la transition G2/M suivie de la maturation jusqu'à la métaphase II et l'expulsion du premier globule polaire (GVBD) observable par l'apparition d'une tache blanche au pôle animal de l'ovocyte. En effet, il a été montré dans ce modèle que l'inhibition des phosphatases PP1 et PP2A par l'ajout d'acide okadaïque, une toxine naturelle qui inhibe spécifiquement ces deux phosphatases, induit la maturation de l'ovocyte (Goris, 1989). Par contre, l'injection d'une sous-unité activatrice de PP2A dans l'ovocyte de xénope prévient la GVBD induite par la progestérone (Iwashita, 1997). Lors de nos expériences, nous avons montré que l'injection de PfPTPA ne déclenche pas la GVBD. Ces résultats confirment que PfPTPA n'est pas un inhibiteur de PP2A. Cependant, on peut émettre les mêmes réserves que celles précédemment exposées pour PfI2^{PP2A} dans le paragraphe II 2 de cette discussion, c'est-à-dire que l'ovocyte de xénope comme modèle d'étude de l'inhibition de PP2A n'est peut-être pas la meilleure option. Nous avons également montré que PfPTPA était capable d'inhiber la GVBD induite par la progestérone ou par l'acide okadaïque. Ces résultats

montrent un effet inhibiteur de la transition G2/M par PfPTPA dans l'ovocyte de xénope. L'effet de PfPTPA sur cette transition semble impliquer PP2A, hypothèse soutenue par l'interaction observée entre PfPTPA et XePP2A. Pour comprendre cela, il est intéressant de préciser que PP2A est plus sensible à l'acide okadaïque que PP1. En effet, alors qu'une concentration de 0.1nM d'acide okadaïque inhibe 50% de l'activité de PP2A ($IC_{50} = 0.1nM$), il en faut cent cinquante à cinq cents fois plus pour diminuer de moitié l'activité de PP1 ($IC_{50} = 15-50nM$). Ainsi, lorsque l'on ajoute 0,01 μ M d'acide okadaïque dans le milieu de culture des ovocytes, l'activité de PP2A sera totalement inhibée alors que celle de PP1 ne sera que peu voire pas modifiée. Dans ce cas-là, on observe que l'ajout de 40ng de PfPTPA prévient la GVBD induite par l'acide okadaïque. On peut émettre l'hypothèse que l'activation de PP2A par PfPTPA empêcherait l'action de l'acide okadaïque. Lorsque l'on ajoute une plus grande concentration d'acide okadaïque (0,1 μ M), dose à laquelle l'activité de PP2A est totalement inhibée et à laquelle celle de PP1 est partiellement inhibée, il faut 100ng de PfPTPA pour empêcher la GVBD induite par l'acide okadaïque. PfPTPA n'est pas capable d'empêcher la GVBD induite par 1 μ M d'acide okadaïque, dose à laquelle on observe l'inhibition complète des activités de PP2A et PP1. Il semble donc que l'activité de PfPTPA soit restreinte à PP2A. En effet, si PfPTPA activait PP1, PfPTPA serait capable d'empêcher la GVBD induite par des doses d'acide okadaïque inhibant PP2A et PP1. Or, ce n'est pas le cas ici. Il semble donc que PfPTPA active PP2A ce qui empêche la maturation de l'ovocyte. Ceci peut également expliquer que PfPTPA empêche la GVBD induite par la progestérone. En effet, la progestérone induit la GVBD (Ferrell, 1999). Il semble que la progestérone régule l'interaction entre PP2A et Greatwall et donc la transition G2/M et le maintien en phase M (Yamamoto, 2011). L'activation de PP2A par PfPTPA empêcherait l'action de la progestérone et préviendrait la GVBD induite par celle-ci. On ne peut pas imaginer que ce soit l'interaction de PfPTPA avec PP2A qui empêche l'action de l'acide okadaïque ou de la progestérone. En effet, l'interaction de PfPTPA avec PP2A est rapide et transitoire. Ainsi, lorsque l'on incube les ovocytes avec la progestérone une heure après la micro-injection de PfPTPA, nous ne détectons plus de complexe PfPTPA/PP2A. C'est donc l'activation de PP2A par PfPTPA qui prévient la GVBD. On ne peut exclure que la fixation de PfPTPA/PP2A permette l'interaction avec une sous-unité de PP2A ou une autre protéine activatrice qui permettrait d'activer la protéine PP2A plus longtemps.

Nous avons donc montré au cours de ce travail que PfPTPA interagissait avec PP2A et régulait son activité. Nous avons également identifié des résidus de PfPTPA impliqués dans l'interaction et l'activité de cette protéine vis-à-vis de PP2A. D'autres approches pourront être mises en place afin de confirmer l'implication de ces résidus mais également d'approfondir nos connaissances sur le rôle de PfPTPA dans la régulation de PP2A.

IV. PfPTPA : un régulateur de PfPP1 ?

L'analyse de la séquence de PfPTPA nous a permis d'identifier un motif RVxF qui est absent de la séquence humaine. La présence de ce motif spécifiquement chez *P. falciparum*, nous a permis d'entrevoir un rôle inédit de PTPA dans la régulation de PP1.

1. PfPTPA est un interacteur de PfPP1

La présence du motif RVxF nous a incités à vérifier que la protéine PfPTPA pouvait interagir avec PP1. De fait, la protéine PfPTPA est capable d'interagir avec PfPP1 *in vitro* mais également avec XePP1 *in vivo* (Cf. Résultats C I). Les études en ovocytes de xénope ont permis de montrer que les cinétiques des interactions PfPTPA/PP2A et PfPTPA/PP1 sont différentes. En effet, l'interaction de PfPTPA avec PP2A est rapide mais transitoire, puisqu'un complexe contenant les deux protéines est détectable quinze minutes après l'injection, mais n'est plus détectable une heure et quarante-cinq minutes plus tard. Les complexes contenant PfPTPA et PP1 sont également rapidement mis en place, mais ils sont beaucoup plus stables et sont encore détectables bien que faiblement, dix-huit heures après la micro-injection de PfPTPA. Ces cinétiques différentes nous permettent d'envisager que la régulation de ces deux phosphatases par PfPTPA induit des phénomènes différents dans la cellule avec certainement une régulation dans le temps différente.

2. Le motif KINF est impliqué dans l'interaction PfPTPA/PP1

Nous avons voulu vérifier que l'interaction de PfPTPA avec PP1 impliquait le motif RVxF. Effectivement, l'interaction PfPTPA/PP1 est médiée par le motif RVxF (KINF) présent dans la séquence de la protéine PfPTPA comme plus de quatre-vingt-dix pourcents des régulateurs de PP1 (Bollen, 2010). En effet, la pré-injection de peptides dérivés du motif KINF abolit l'interaction entre PP1 et PfPTPA en ovocyte de xénope. Cependant, il semble que d'autres résidus soient impliqués. En effet, de façon surprenante, les protéines PfPTPA mutées au niveau des résidus impliqués dans l'interaction avec PP2A ne sont pas capables d'interagir avec XePP1 (Cf. Résultats C I b). La mutation d'un seul résidu est suffisante pour abolir complètement cette interaction contrairement à l'interaction PfPTPA/PfPP2A qui n'est totalement abolie que pour la protéine PfPTPA contenant les cinq mutations. Il faudrait néanmoins confirmer cette interaction par une autre approche, notamment des tests d'interaction *in vitro*. Il est intéressant de noter que le motif RVxF est situé sur une autre face de la protéine que les résidus mutés (Figure 52). Il est possible que les mutations entraînent un changement de la structure de la protéine réduisant, par exemple, l'accès au motif KINF. Mais notre outil de modélisation ne nous permet pas de vérifier cette hypothèse. On peut également envisager qu'une autre protéine soit impliquée dans le complexe PfPTPA/PP1 en le stabilisant. Ainsi, les mutations que l'on a faites empêcheraient l'interaction PfPTPA/X, ce qui abolirait la formation du complexe stable PfPTPA/X/PP1, malgré l'interaction entre PfPTPA et PP1 *via* le motif KINF. Une autre hypothèse est qu'un autre motif serait impliqué dans l'interaction entre les deux protéines.

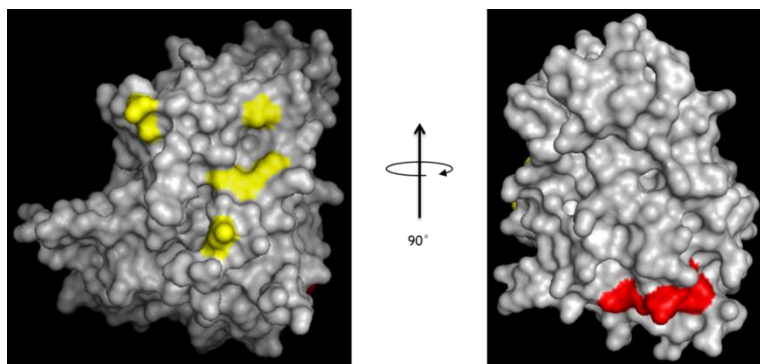


Figure 52 : Modélisation de la structure de PfPTPA. En jaune sont représentés les résidus impliqués dans l'interaction de PfPTPA et PfPP2A tandis qu'en rouge est surligné le motif RVxF (Modélisation prédite par ModWebserver et visualisée par le logiciel Pymol).

La formation de complexe entre PfPTPA et PP1 pourrait être spécifique à la protéine PTPA parasitaire. Cependant, l'interaction entre PTPA et PP1 n'a jamais été vraiment étudiée dans d'autres organismes. Il est vrai que notre étude a été motivée par la présence d'un site RVxF dans la séquence de PfPTPA, motif absent d'un grand nombre d'organismes. En effet, l'analyse des séquences protéiques de PTPA de plusieurs organismes modèles (*Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Leishmania major*, *Mus musculus*, *Oryza sativa*, *Schistosoma mansoni*, *Tetrahymena thermophila*, *Theileria parva*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma brucei*, *Xenopus laevis*, *Saccharomyces cerevisiae*) ne nous a permis d'identifier des motifs RVxF que dans les protéines PTPA de *Tetrahymena thermophila*, *Schistosoma mansoni* et dans les deux orthologues de PTPA de *Saccharomyces cerevisiae* (YPA1 et YPA2). La présence de ce motif ne peut être expliquée par l'évolution. En effet, dans l'embranchement des apicomplexes, le motif RVxF dans PTPA est présent dans d'autres espèces de *Plasmodium* comme *P. berghei*, *P. knowlesi*, ou *P. vivax*, mais pas dans *T. gondii*, *N. caninum* ou *E. tenella*. Parmi les alvéolés que nous avons analysés, seuls les *Plasmodiums* et *Tetrahymena thermophila* possèdent ce motif. De plus, les organismes dans lesquels ce motif a été identifié appartiennent à des règnes différents (Animalia, Fungi, Chromalveolata). Il semblerait donc que ce soit des événements ponctuels dans certains organismes à travers les différents règnes. La présence de ce motif dans ces protéines permet d'envisager une interaction avec PP1. Or, une étude a été faite dans la levure, indépendamment de l'identification d'un motif RVxF dans la séquence de YPA, et n'a pas permis de montrer une interaction de PTPA (YPA1 et YPA2) avec PP1 (GLC7) par immunoprécipitation (Fellner, 2003). Il serait intéressant de confirmer ces résultats et d'étudier si les PTPA de *S. mansoni* et *T. thermophila* interagissent avec PP1.

3. PfPTPA serait un régulateur de PfPP1 *in vivo*.

Bien que PfPTPA soit capable d'interagir avec PP1, les expériences *in vitro* que nous avons effectuées ne montrent pas d'effet de PfPTPA sur la régulation de l'activité de PfPP1 vis-à-vis du substrat pNPP. Des études utilisant d'autres substrats pourront être

prises en place. En effet, il est possible que PfPTPA modifie la spécificité de substrat de PfPPP1, ou régule l'activité de PP1 vis-à-vis d'un substrat particulier. On peut également émettre l'hypothèse que PfPTPA régulerait l'activité de PfPPP1 au sein d'un complexe protéique particulier et que, bien qu'une interaction directe ait pu être mise en évidence *in vitro*, la formation du complexe soit indispensable pour que PfPTPA puisse réguler PP1. On ne peut pas écarter non plus que PfPTPA n'ait pas de rôle de régulateur de PP1, mais plutôt un rôle de protéine chaperonne, qui permettrait la localisation ou la stabilité de l'enzyme. Dans leur étude, Treeck *et al.* n'identifient pas PfPTPA comme une phosphoprotéine, bien qu'ils aient détecté plusieurs peptides appartenant à PfPTPA (Treeck, 2011). Cette observation indique que PfPTPA ne serait pas un substrat de PP1.

Les études que nous avons réalisées en ovocyte de xénope, nous permettent d'éliminer le rôle de régulateur de PP1 (Cf. III 4). Pourtant, nos résultats concernant les cinétiques de formation des complexes PfPTPA/PP2A et PfPTPA/PP1 nous permettent d'envisager que PfPTPA est un compétiteur pour les régulateurs et/ou les substrats de PP1.

Nous avons voulu éclaircir le rôle de PfPTPA dans la régulation de PfPPP1 *in vivo* chez le parasite. Pour cela, nous avons tenté de bloquer l'interaction entre les deux protéines dans le parasite grâce à des peptides synthétiques dérivés du motif KINF. L'utilisation de ces peptides montre une inhibition de la croissance parasitaire. Cependant, il faut préciser que le motif « NKINF » répété en tandem dans notre peptide synthétique n'est pas spécifique de PfPTPA contrairement aux peptides utilisés pour inhiber l'interaction PfPPP1 avec PfI2 et PfI3 ((Freville, 2013) et (Freville, en préparation)). En effet, quinze protéines identifiées chez *Plasmodium* comportent ce motif, de même que seize protéines putatives inconnues. Parmi, les protéines identifiées chez le parasite, on peut nommer PfEMP1, une protéine membranaire de l'érythrocyte codée par le parasite, responsable de la très grande variation antigénique qui permet au parasite d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ou encore RON3, une protéine des rhoptries. Mais aucune de ces protéines n'est connue pour interagir avec PP1. Néanmoins, deux d'entre elles, les protéines RAP et RON3 interagissent respectivement avec les kinases FIKK1 et CLK3 et on peut imaginer que si RAP et RON3 sont des substrats de ces kinases, elles pourront potentiellement être déphosphorylées par PfPPP1. Or, le motif RVxF est impliqué dans l'interaction avec des régulateurs mais aussi quelques substrats comme eIF2B (Wakula, 2006). De plus, deux protéines LRR (LRR5 et LRR9) contiennent ce motif NKINF. Or, certaines protéines LRR sont capables d'interagir avec PfPPP1 notamment la PfLRR1 (Daher, 2006). L'utilisation de peptides avec un motif RVxF flanqué de part et d'autre de deux ou trois acides aminés augmenterait la spécificité du peptide à l'interaction PfPTPA/PfPPP1.

Ce travail de thèse a donc permis d'identifier chez *Plasmodium falciparum* un certain nombre de protéines potentiellement impliquées dans la régulation de PP2A, notamment les inhibiteurs 1 et 2 de PP2A et PfPTPA. Notre étude sur la protéine phosphotyrosyl phosphatase activator de *P. falciparum*, nous a permis de montrer son rôle

Discussion et perspectives

dans la régulation de PP2A mais également de PP1. Ce rôle dans la régulation de PP1 est unique en son genre et permet d'envisager de cibler spécifiquement cette régulation pour inhiber la croissance parasitaire.

Bibliographie

A

- Abdi A, Eschenlauer S, Reininger L, Doerig C: SAM domain-dependent activity of PFTKL3, an essential tyrosine kinase-like kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2010, **67**(19):3355-3369.
- Abdi AI, Carvalho TG, Wilkes JM, Doerig C: A secreted *Plasmodium falciparum* kinase reveals a signature motif for classification of tyrosine kinase-like kinases. *Microbiology* 2013, **159**(Pt 12):2533-2547.
- Adachi Y, Pavlakis GN, Copeland TD: Identification of in vivo phosphorylation sites of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation breakpoint in acute undifferentiated leukemia. *FEBS letters* 1994, **340**(3):231-235.
- Adams DG, Coffee RL, Jr., Zhang H, Pelech S, Strack S *et al*: Positive regulation of Raf1-MEK1/2-ERK1/2 signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A holoenzymes. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(52):42644-42654.
- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR *et al*: The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology* 2005, **52**(5):399-451.
- Adl SM, Leander BS, Simpson AG, Archibald JM, Anderson OR *et al*: Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic biology* 2007, **56**(4):684-689.
- Adler HT, Nallaseth FS, Walter G, Tkachuk DC: HRX leukemic fusion proteins form a heterocomplex with the leukemia-associated protein SET and protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(45):28407-28414.
- Agarwal S, Kern S, Halbert J, Przyborski JM, Baumeister S *et al*: Two nucleus-localized CDK-like kinases with crucial roles for malaria parasite erythrocytic replication are involved in phosphorylation of splicing factor. *Journal of cellular biochemistry* 2011, **112**(5):1295-1310.
- Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP *et al*: First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England journal of medicine* 2011, **365**(20):1863-1875.
- Ahn JH, Sung JY, McAvoy T, Nishi A, Janssens V *et al*: The B¹/PR72 subunit mediates Ca²⁺-dependent dephosphorylation of DARPP-32 by protein phosphatase 2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(23):9876-9881.
- Al-Murrani SW, Woodgett JR, Damuni Z: Expression of I2PP2A, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c-Jun and AP-1 activity. *The Biochemical journal* 1999, **341** (Pt 2):293-298.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I *et al*: Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 2004a, **117**(6):699-711.
- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E *et al*: Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 2004b, **364**(9443):1411-1420.

- Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH: Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annual review of microbiology* 2009, **63**:195-221.
- Amino R, Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O *et al*: Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nature protocols* 2007, **2**(7):1705-1712.
- Anamika, Srinivasan N, Krupa A: A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins* 2005, **58**(1):180-189.
- Andreeva AV, Kutuzov MA: Protozoan protein tyrosine phosphatases. *Int J Parasitol* 2008, **38**(11):1279-1295.
- Antoniw JF, Cohen P: Separation of two phosphorylase kinase phosphatases from rabbit skeletal muscle. *European journal of biochemistry / FEBS* 1976, **68**(1):45-54.
- Aponte JJ, Aide P, Renom M, Mandomando I, Bassat Q *et al*: 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* 2007, **370**(9598):1543-1551.
- Arino J, Woon CW, Brautigan DL, Miller TB, Jr., Johnson GL: Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunit isotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**(12):4252-4256.
- Armstrong CM, Goldberg DE: An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. *Nature methods* 2007, **4**(12):1007-1009.
- Ascenzi A: Malaria diseases and parasites. *Parassitologia* 1999, **41**(1-3):33-38.

B

- Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevert U: Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS pathogens* 2007, **3**(11):e171.
- Baharians Z, Schonthal AH: Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(30):19019-19024.
- Baird JK: Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Annals of tropical medicine and parasitology* 1998, **92**(4):367-390.
- Baird JK: Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clinical microbiology reviews* 2009, **22**(3):508-534.
- Bajsa J, Duke SO, Tekwani BL: *Plasmodium falciparum* serine/threonine phosphoprotein phosphatases (PPP): from housekeeper to the 'holy grail'. *Current drug targets* 2008, **9**(11):997-1012.
- Baker DA: Malaria gametocytogenesis. *Molecular and biochemical parasitology* 2010, **172**(2):57-65.
- Balu B, Campbell C, Sedillo J, Maher S, Singh N *et al*: Atypical mitogen-activated protein kinase phosphatase implicated in regulating transition from pre-S-Phase asexual intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic cell* 2013, **12**(9):1171-1178.

- Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH: A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology today* 2000, **16**(10):427-433.
- Bansal A, Singh S, More KR, Hans D, Nangalia K *et al*: Characterization of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1 (PfCDPK1) and its role in microneme secretion during erythrocyte invasion. *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(3):1590-1602.
- Barton GJ, Cohen PT, Barford D: Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *European journal of biochemistry / FEBS* 1994, **220**(1):225-237.
- Baruch DI: Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology* 1999, **12**(4):747-761.
- Baum J, Papenfuss AT, Mair GR, Janse CJ, Vlachou D *et al*: Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites. *Nucleic acids research* 2009, **37**(11):3788-3798.
- Beier JC: Malaria control in the highlands of Burundi: an important success story. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2008, **79**(1):1-2.
- Bejon P, Lusingu J, Olotu A, Leach A, Lievens M *et al*: Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *The New England journal of medicine* 2008, **359**(24):2521-2532.
- Bejon P, White MT, Olotu A, Bojang K, Lusingu JP *et al*: Efficacy of RTS,S malaria vaccines: individual-participant pooled analysis of phase 2 data. *The Lancet infectious diseases* 2013, **13**(4):319-327.
- Bhasin N, Cunha SR, Mudannayake M, Gigena MS, Rogers TB *et al*: Molecular basis for PP2A regulatory subunit B56alpha targeting in cardiomyocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2007, **293**(1):H109-119.
- Bhattacharyya MK, Hong Z, Kongkasuriyachai D, Kumar N: *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal for parasitology* 2002, **32**(6):739-747.
- Bialojan C, Takai A: Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *The Biochemical journal* 1988, **256**(1):283-290.
- Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B *et al*: Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 2004, **117**(4):503-514.
- Birago C, Pace T, Barca S, Picci L, Ponzi M: A chromatin-associated protein is encoded in a genomic region highly conserved in the *Plasmodium* genus. *Molecular and biochemical parasitology* 1996, **80**(2):193-202.
- Blisnick T, Vincensini L, Fall G, Braun-Breton C: Protein phosphatase 1, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. *Cellular microbiology* 2006, **8**(4):591-601.

- Boivin MJ, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R *et al*: Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics* 2007, **119**(2):e360-366.
- Bojang K, Milligan P, Pinder M, Doherty T, Leach A *et al*: 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. *Human vaccines* 2009, **5**(4):242-247.
- Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A *et al*: Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet* 2001, **358**(9297):1927-1934.
- Bojang KA: RTS,S/AS02A for malaria. *Expert review of vaccines* 2006, **5**(5):611-615.
- Bollen M, Peti W, Ragusa MJ, Beullens M: The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends in biochemical sciences* 2010, **35**(8):450-458.
- Bondesson M, Ohman K, Manervik M, Fan S, Akusjarvi G: Adenovirus E4 open reading frame 4 protein autoregulates E4 transcription by inhibiting E1A transactivation of the E4 promoter. *Journal of virology* 1996, **70**(6):3844-3851.
- Booher RN, Deshaies RJ, Kirschner MW: Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *The EMBO journal* 1993, **12**(9):3417-3426.
- Bosch J, Paige MH, Vaidya AB, Bergman LW, Hol WG: Crystal structure of GAP50, the anchor of the invasion machinery in the inner membrane complex of *Plasmodium falciparum*. *Journal of structural biology* 2012, **178**(1):61-73.
- Bosch M, Cayla X, Van Hoof C, Hemmings BA, Ozon R *et al*: The PR55 and PR65 subunits of protein phosphatase 2A from *Xenopus laevis*. molecular cloning and developmental regulation of expression. *European journal of biochemistry / FEBS* 1995, **230**(3):1037-1045.
- Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart MP, Ortet P, Barakat M *et al*: Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell host & microbe* 2013, **13**(4):489-500.
- Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J *et al*: The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS biology* 2003, **1**(1):E5.
- Bracchi-Ricard V, Barik S, Delvecchio C, Doerig C, Chakrabarti R *et al*: PfkPK6, a novel cyclin-dependent kinase/mitogen-activated protein kinase-related protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *The Biochemical journal* 2000, **347** Pt 1:255-263.
- Bracchi V, Langsley G, Thelu J, Eling W, Ambroise-Thomas P: PfkKIN, an SNF1 type protein kinase of *Plasmodium falciparum* predominantly expressed in gametocytes. *Molecular and biochemical parasitology* 1996, **76**(1-2):299-303.
- Bruce MC, Alano P, Duthie S, Carter R: Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* 1990, **100** Pt 2:191-200.

- Brunet J, Pfaff AW, Abidi A, Unoki M, Nakamura Y *et al*: *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cellular microbiology* 2008, 10(4):908-920.
- Butler T, Paul J, Europe-Finner N, Smith R, Chan EC: Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility. *American journal of physiology Cell physiology* 2013, 304(6):C485-504.

C

- Cameron A, Reece SE, Drew DR, Haydon DT, Yates AJ: Plasticity in transmission strategies of the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*: environmental and genetic effects. *Evolutionary applications* 2013, 6(2):365-376.
- Carlson SG, Eng E, Kim EG, Perlman EJ, Copeland TD *et al*: Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1998, 9(10):1873-1880.
- Carvalho TG, Doerig C, Reininger L: Nima- and Aurora-related kinases of malaria parasites. *Biochimica et biophysica acta* 2013, 1834(7):1336-1345.
- Caulfield LE, Richard SA, Black RE: Undernutrition as an underlying cause of malaria morbidity and mortality in children less than five years old. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2004, 71(2 Suppl):55-63.
- Cayla X, Goris J, Hermann J, Hendrix P, Ozon R *et al*: Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activator from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry* 1990, 29(3):658-667.
- Cayla X, Ballmer-Hofer K, Merlevede W, Goris J: Phosphatase 2A associated with polyomavirus small-T or middle-T antigen is an okadaic acid-sensitive tyrosyl phosphatase. *European journal of biochemistry / FEBS* 1993, 214(1):281-286.
- Cayla X, Van Hoof C, Bosch M, Waelkens E, Vandekerckhove J *et al*: Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* 1994, 269(22):15668-15675.
- Cayla X, Garcia A, Baumgartner M, Ozon R, Langsley G: A *Theileria parva* type 1 protein phosphatase activity. *Molecular and biochemical parasitology* 2000, 110(1):161-166.
- Cegielska A, Shaffer S, Derua R, Goris J, Virshup DM: Different oligomeric forms of protein phosphatase 2A activate and inhibit simian virus 40 DNA replication. *Molecular and cellular biology* 1994, 14(7):4616-4623.
- Ceulemans H, Vulsteke V, De Maeyer M, Tatchell K, Stalmans W *et al*: Binding of the concave surface of the Sds22 superhelix to the alpha 4/alpha 5/alpha 6-triangle of protein phosphatase-1. *The Journal of biological chemistry* 2002, 277(49):47331-47337.
- Chambon JP, Touati SA, Berneau S, Cladiere D, Hebras C *et al*: The PP2A inhibitor I2PP2A is essential for sister chromatid segregation in oocyte meiosis II. *Current biology : CB* 2013, 23(6):485-490.
- Chandra BR, Olivieri A, Silvestrini F, Alano P, Sharma A: Biochemical characterization of the two nucleosome assembly proteins from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 2005, 142(2):237-247.

- Chao Y, Xing Y, Chen Y, Xu Y, Lin Z *et al*: Structure and mechanism of the phosphotyrosyl phosphatase activator. *Molecular cell* 2006, **23**(4):535-546.
- Chen J, Martin BL, Brautigan DL: Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science* 1992, **257**(5074):1261-1264.
- Chen MS, Silverstein AM, Pratt WB, Chinkers M: The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**(50):32315-32320.
- Chen S, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K: I1PP2A affects tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(16):10513-10521.
- Chen Y, Jirage D, Caridha D, Kathcart AK, Cortes EA *et al*: Identification of an effector protein and gain-of-function mutants that activate Pfmrk, a malarial cyclin-dependent protein kinase. *Molecular and biochemical parasitology* 2006, **149**(1):48-57.
- Chen Y, Xu Y, Bao Q, Xing Y, Li Z *et al*: Structural and biochemical insights into the regulation of protein phosphatase 2A by small t antigen of SV40. *Nature structural & molecular biology* 2007, **14**(6):527-534.
- Chou DM, Petersen P, Walter JC, Walter G: Protein phosphatase 2A regulates binding of Cdc45 to the prereplication complex. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(43):40520-40527.
- Chung DW, Ponts N, Cervantes S, Le Roch KG: Post-translational modifications in *Plasmodium*: more than you think! *Molecular and biochemical parasitology* 2009, **168**(2):123-134.
- Chung H, Brautigan DL: Protein phosphatase 2A suppresses MAP kinase signalling and ectopic protein expression. *Cellular signalling* 1999, **11**(8):575-580.
- Ciesla J, Fraczyk T, Rode W: Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta biochimica Polonica* 2011, **58**(2):137-148.
- Clements AC, Barnett AG, Cheng ZW, Snow RW, Zhou HN: Space-time variation of malaria incidence in Yunnan province, China. *Malaria journal* 2009, **8**:180.
- Cohen JM, Dlamini S, Novotny JM, Kandula D, Kunene S *et al*: Rapid case-based mapping of seasonal malaria transmission risk for strategic elimination planning in Swaziland. *Malaria journal* 2013, **12**(1):61.
- Cohen P: The role of calmodulin, troponin, and cyclic AMP in the regulation of glycogen metabolism in mammalian skeletal muscle. *Advances in cyclic nucleotide research* 1981, **14**:345-359.
- Collins CR, Das S, Wong EH, Andenmatten N, Stallmach R *et al*: Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Molecular microbiology* 2013a, **88**(4):687-701.
- Collins CR, Hackett F, Strath M, Penzo M, Withers-Martinez C *et al*: Malaria parasite cGMP-dependent protein kinase regulates blood stage merozoite secretory organelle discharge and egress. *PLoS pathogens* 2013b, **9**(5):e1003344.
- Combe A, Giovannini D, Carvalho TG, Spath S, Boisson B *et al*: Clonal conditional mutagenesis in malaria parasites. *Cell host & microbe* 2009, **5**(4):386-396.

- Cori CF: Enzymatic reactions in carbohydrate metabolism. *Harvey lectures* 1945, 41:253-272.
- Cowman AF, Berry D, Baum J: The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *The Journal of cell biology* 2012, 198(6):961-971.
- Crabb BS, Rug M, Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T *et al*: Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods in molecular biology* 2004, 270:263-276.
- Csortos C, Zolnierowicz S, Bako E, Durbin SD, DePaoli-Roach AA: High complexity in the expression of the B' subunit of protein phosphatase 2A0. Evidence for the existence of at least seven novel isoforms. *The Journal of biological chemistry* 1996, 271(5):2578-2588.
- Cui F, Raymond M, Qiao CL: Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. *Pest management science* 2006, 62(11):1013-1022.

D

- Dabire KR, Diabate A, Djogbenou L, Ouari A, N'Guessan R *et al*: Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malaria journal* 2008, 7:188.
- Dacks JB, Walker G, Field MC: Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitology international* 2008, 57(2):97-104.
- Daher W, Browaeys E, Pierrot C, Jouin H, Dive D *et al*: 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*. *Molecular microbiology* 2006, 60(3):578-590.
- Daher W, Oria G, Fauquenoy S, Cailliau K, Browaeys E *et al*: A *Toxoplasma gondii* leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity. *Eukaryotic cell* 2007a, 6(9):1606-1617.
- Daher W, Pierce R, Khalife J: Census, molecular characterization and developmental expression of Leucine-Rich-Repeat proteins in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 2007b, 155(2):161-166.
- Damuni Z, Xiong H, Li M: Autophosphorylation-activated protein kinase inactivates the protein tyrosine phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *FEBS letters* 1994, 352(3):311-314.
- Das A, Gale M, Jr., Carter V, Parsons M: The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces defects in cytokinesis and organellar genome segregation in *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science* 1994, 107 (Pt 12):3477-3483.
- De Baere I, Derua R, Janssens V, Van Hoof C, Waelkens E *et al*: Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry* 1999, 38(50):16539-16547.
- DeGrande ST, Little SC, Nixon DJ, Wright P, Snyder J *et al*: Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart. *The Journal of biological chemistry* 2013, 288(2):1032-1046.

- Deng W, Baker DA: A novel cyclic GMP-dependent protein kinase is expressed in the ring stage of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Molecular microbiology* 2002, 44(5):1141-1151.
- Deng X, Ito T, Carr B, Mumby M, May WS, Jr.: Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(51):34157-34163.
- Depaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, Csontos C, Durbin SD *et al*: Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Advances in enzyme regulation* 1994, 34:199-224.
- Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE *et al*: A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105(31):10762-10767.
- Dey R, Majumder N, Bhattacharjee S, Majumdar SB, Banerjee R *et al*: *Leishmania donovani*-induced ceramide as the key mediator of Akt dephosphorylation in murine macrophages: role of protein kinase C ζ and phosphatase. *Infection and immunity* 2007, 75(5):2136-2142.
- Di Como CJ, Arndt KT: Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & development* 1996, 10(15):1904-1916.
- Dluzewski AR, Garcia CR: Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* by kinase inhibitors. *Experientia* 1996, 52(6):621-623.
- Dobson S, May T, Berriman M, Del Vecchio C, Fairlamb AH *et al*: Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin-cyclosporin complex. *Molecular and biochemical parasitology* 1999, 99(2):167-181.
- Dobson S, Bracchi V, Chakrabarti D, Barik S: Characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase (PfPPJ) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 2001a, 115(1):29-39.
- Dobson S, Kar B, Kumar R, Adams B, Barik S: A novel tetratricopeptide repeat (TPR) containing PP5 serine/threonine protein phosphatase in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *BMC microbiology* 2001b, 1:31.
- Dobson S, Kumar R, Bracchi-Ricard V, Freeman S, Al-Murrani SW *et al*: Characterization of a unique aspartate-rich protein of the SET/TAF-family in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, which inhibits protein phosphatase 2A. *Molecular and biochemical parasitology* 2003, 126(2):239-250.
- Doerig C, Chakrabarti D, Kappes B, Matthews K: The cell cycle in protozoan parasites. *Progress in cell cycle research* 2000, 4:163-183.
- Doerig C, Billker O, Pratt D, Endicott J: Protein kinases as targets for antimalarial intervention: Kinomics, structure-based design, transmission-blockade, and targeting host cell enzymes. *Biochimica et biophysica acta* 2005, 1754(1-2):132-150.
- Doerig CC, D: Cell Cycle Control in *Plasmodium falciparum* : A Genomics Perspective In: *Malaria Parasites: Genomes and Molecular Biology*. Edited by A.P. Waters

- and C.J. Janse Leiden University Medical Centre L, The Netherlands Caister Academic Press; 2004.
- Doerig CM, Parzy D, Langsley G, Horrocks P, Carter R *et al*:** A MAP kinase homologue from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Gene* 1996, **177**(1-2):1-6.
- Dohoney KM, Guillerm C, Whiteford C, Elbi C, Lambert PF *et al*:** Phosphorylation of p53 at serine 37 is important for transcriptional activity and regulation in response to DNA damage. *Oncogene* 2004, **23**(1):49-57.
- Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ:** Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitology today* 2000, **16**(6):228-232.
- Dorin-Semblat D, Quashie N, Halbert J, Sicard A, Doerig C *et al*:** Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by reverse genetics. *Molecular microbiology* 2007, **65**(5):1170-1180.
- Dorin-Semblat D, Schmitt S, Semblat JP, Sicard A, Reininger L *et al*:** *Plasmodium falciparum* NIMA-related kinase Pfnek-1: sex specificity and assessment of essentiality for the erythrocytic asexual cycle. *Microbiology* 2011, **157**(Pt 10):2785-2794.
- Dorin D, Alano P, Boccaccio I, Ciceron L, Doerig C *et al*:** An atypical mitogen-activated protein kinase (MAPK) homologue expressed in gametocytes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Identification of a MAPK signature. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(42):29912-29920.
- Dorin D, Le Roch K, Sallicandro P, Alano P, Parzy D *et al*:** Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* Biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. *European journal of biochemistry / FEBS* 2001, **268**(9):2600-2608.
- Dorin D, Semblat JP, Pouillet P, Alano P, Goldring JP *et al*:** PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology* 2005, **55**(1):184-196.
- Dorsey G, Kanya MR, Singh A, Rosenthal PJ:** Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* pfcrt and pfmdr-1 genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *The Journal of infectious diseases* 2001, **183**(9):1417-1420.
- Duraisingh MT, Roper C, Walliker D, Warhurst DC:** Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the pfmdr1 gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology* 2000, **36**(4):955-961.
- Dvorin JD, Martyn DC, Patel SD, Grimley JS, Collins CR *et al*:** A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science* 2010, **328**(5980):910-912.

E

- Eastman RT, Fidock DA:** Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nature reviews Microbiology* 2009, **7**(12):864-874.

- Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P et al:** Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *The EMBO journal* 1997, **16**(8):1876-1887.
- Eichhorn PJ, Creighton MP, Wilhelmsen K, van Dam H, Bernardis R:** A RNA interference screen identifies the protein phosphatase 2A subunit PR55gamma as a stress-sensitive inhibitor of c-SRC. *PLoS genetics* 2007, **3**(12):e218.
- Eichhorn PJ, Creighton MP, Bernardis R:** Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1795**(1):1-15.
- Evans DR, Stark MJ:** Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* type 2A protein phosphatase catalytic subunit reveal roles in cell wall integrity, actin cytoskeleton organization and mitosis. *Genetics* 1997, **145**(2):227-241.

E

- Farber PM, Graeser R, Franklin RM, Kappes B:** Molecular cloning and characterization of a second calcium-dependent protein kinase of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 1997, **87**(2):211-216.
- Favre B, Zolnierowicz S, Turowski P, Hemmings BA:** The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(23):16311-16317.
- Fellner T, Lackner DH, Hombauer H, Piribauer P, Mudrak I et al:** A novel and essential mechanism determining specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo. *Genes & development* 2003, **17**(17):2138-2150.
- Fernandez-Pol S, Slouka Z, Bhattacharjee S, Fedotova Y, Freed S et al:** A bacterial phosphatase-like enzyme of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses tyrosine phosphatase activity and is implicated in the regulation of band 3 dynamics during parasite invasion. *Eukaryotic cell* 2013, **12**(9):1179-1191.
- Ferrell JE, Jr.:** *Xenopus* oocyte maturation: new lessons from a good egg. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1999, **21**(10):833-842.
- Ferrigno P, Langan TA, Cohen P:** Protein phosphatase 2A1 is the major enzyme in vertebrate cell extracts that dephosphorylates several physiological substrates for cyclin-dependent protein kinases. *Molecular biology of the cell* 1993, **4**(7):669-677.
- Fichera ME, Roos DS:** A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 1997, **390**(6658):407-409.
- Foley M, Tilley L:** Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *International journal for parasitology* 1997, **27**(2):231-240.
- Fornerod M, Boer J, van Baal S, Jaegle M, von Lindern M et al:** Relocation of the carboxyterminal part of CAN from the nuclear envelope to the nucleus as a result of leukemia-specific chromosome rearrangements. *Oncogene* 1995, **10**(9):1739-1748.
- Francia ME, Striepen B:** Cell division in apicomplexan parasites. *Nature reviews Microbiology* 2014, **12**(2):125-136.

- Freville A, Landrieu I, Garcia-Gimeno MA, Vicogne J, Montbarbon M *et al*: *Plasmodium falciparum* inhibitor-3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival. *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(2):1306-1321.
- Freville A, Cailliau-Maggio K, Pierrot C, Tellier G, Kalamou H *et al*: *Plasmodium falciparum* encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1: perspectives for novel anti-plasmodial therapy. *BMC biology* 2013, **11**:80.

G

- Galadari S, Kishikawa K, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA: Purification and characterization of ceramide-activated protein phosphatases. *Biochemistry* 1998, **37**(32):11232-11238.
- Geerlings TH, Faber AW, Bister MD, Vos JC, Raue HA: Rio2p, an evolutionarily conserved, low abundant protein kinase essential for processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(25):22537-22545.
- Gentry MS, Hallberg RL: Localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A subunits throughout mitotic cell cycle. *Molecular biology of the cell* 2002, **13**(10):3477-3492.
- Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Smith DL, Battle KE *et al*: A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS neglected tropical diseases* 2012, **6**(9):e1814.
- Gharbi-Ayachi A, Labbe JC, Burgess A, Vigneron S, Strub JM *et al*: The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *Science* 2010, **330**(6011):1673-1677.
- Giovannini D, Spath S, Lacroix C, Perazzi A, Bargieri D *et al*: Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by apicomplexa. *Cell host & microbe* 2011, **10**(6):591-602.
- Gissot M, Refour P, Briquet S, Boschet C, Coupe S *et al*: Transcriptome of 3D7 and its gametocyte-less derivative F12 *Plasmodium falciparum* clones during erythrocytic development using a gene-specific microarray assigned to gene regulation, cell cycle and transcription factors. *Gene* 2004, **341**:267-277.
- Gonzalez J, Cornejo A, Santos MR, Cordero EM, Gutierrez B *et al*: A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical journal* 2003, **374**(Pt 3):647-656.
- Goris J, Hermann J, Hendrix P, Ozon R, Merlevede W: Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS letters* 1989, **245**(1-2):91-94.
- Gotz J, Probst A, Ehler E, Hemmings B, Kues W: Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(21):12370-12375.
- Graeser R, Kury P, Franklin RM, Kappes B: Characterization of a mitogen-activated protein (MAP) kinase from *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology* 1997, **23**(1):151-159.

- Green DD, Yang SI, Mumby MC:** Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, **84**(14):4880-4884.
- Green JL, Rees-Channer RR, Howell SA, Martin SR, Knuepfer E et al:** The motor complex of *Plasmodium falciparum*: phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(45):30980-30989.
- Griffith KS, Lewis LS, Mali S, Parise ME:** Treatment of malaria in the United States: a systematic review. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2007, **297**(20):2264-2277.
- Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA, Barford D:** The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* 1999, **96**(1):99-110.
- Guergnon J, Dessauge F, Dominguez V, Viallet J, Bonnefoy S et al:** Use of penetrating peptides interacting with PP1/PP2A proteins as a general approach for a drug phosphatase technology. *Molecular pharmacology* 2006, **69**(4):1115-1124.
- Guergnon J, Godet AN, Galioot A, Falanga PB, Colle JH et al:** PP2A targeting by viral proteins: a widespread biological strategy from DNA/RNA tumor viruses to HIV-1. *Biochimica et biophysica acta* 2011, **1812**(11):1498-1507.
- Guo F, Stanevich V, Wlodarchak N, Sengupta R, Jiang L et al:** Structural basis of PP2A activation by PTPA, an ATP-dependent activation chaperone. *Cell research* 2014, **24**(2):190-203.
- Guo H, Damuni Z:** Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993a, **90**(6):2500-2504.
- Guo H, Reddy SA, Damuni Z:** Purification and characterization of an autophosphorylation-activated protein serine threonine kinase that phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* 1993b, **268**(15):11193-11198.
- Guttery DS, Poulin B, Ferguson DJ, Szoor B, Wickstead B et al:** A unique protein phosphatase with kelch-like domains (PPKL) in *Plasmodium* modulates ookinete differentiation, motility and invasion. *PLoS pathogens* 2012, **8**(9):e1002948.

H

- Harmala-Brasken AS, Mikhailov A, Soderstrom TS, Meinander A, Holmstrom TH et al:** Type-2A protein phosphatase activity is required to maintain death receptor responsiveness. *Oncogene* 2003, **22**(48):7677-7686.
- Hartwell LH, Weinert TA:** Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989, **246**(4930):629-634.
- He CY, Shaw MK, Pletcher CH, Striepen B, Tilney LG et al:** A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *The EMBO journal* 2001, **20**(3):330-339.
- Healy AM, Zolnierowicz S, Stapleton AE, Goebel M, DePaoli-Roach AA et al:** CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis:

- identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Molecular and cellular biology* 1991, **11**(11):5767-5780.
- Hemmings BA, Adams-Pearson C, Maurer F, Muller P, Goris J *et al*: alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry* 1990, **29**(13):3166-3173.
- Hendrix P, Mayer-Jackel RE, Cron P, Goris J, Hofsteenge J *et al*: Structure and expression of a 72-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry* 1993a, **268**(20):15267-15276.
- Hendrix P, Turowski P, Mayer-Jaekel RE, Goris J, Hofsteenge J *et al*: Analysis of subunit isoforms in protein phosphatase 2A holoenzymes from rabbit and *Xenopus*. *The Journal of biological chemistry* 1993b, **268**(10):7330-7337.
- Heriche JK, Lebrin F, Rabilloud T, Leroy D, Chambaz EM *et al*: Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha. *Science* 1997, **276**(5314):952-955.
- Hopp CS, Flueck C, Solyakov L, Tobin A, Baker DA: Spatiotemporal and functional characterisation of the *Plasmodium falciparum* cGMP-dependent protein kinase. *PloS one* 2012, **7**(11):e48206.
- Huelsken J, Behrens J: The Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* 2002, **115**(Pt 21):3977-3978.
- Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, Goswami T, Rad R *et al*: A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 2010, **143**(7):1174-1189.

!

- Ibrahim MA, Griko NB, Bulla LA, Jr.: The Cry4B toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* kills Permethrin-resistant *Anopheles gambiae*, the principal vector of malaria. *Experimental biology and medicine* 2013a, **238**(4):350-359.
- Ibrahim MA, Griko NB, Bulla LA, Jr.: Cytotoxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin is mediated by the cadherin receptor BT-R(3) of *Anopheles gambiae*. *Experimental biology and medicine* 2013b, **238**(7):755-764.
- Idro R, Jenkins NE, Newton CR: Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet neurology* 2005, **4**(12):827-840.
- Imwong M, Pukrittayakamee S, Renia L, Letourneur F, Charlier JP *et al*: Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium vivax*: evidence for sequential selection by drug pressure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003, **47**(5):1514-1521.
- Ingebritsen TS, Foulkes JG, Cohen P: The broad specificity protein phosphatase from mammalian liver. Separation of the Mr 35 000 catalytic subunit into two distinct enzymes. *FEBS letters* 1980, **119**(1):9-15.
- Ishino T, Orito Y, Chinzei Y, Yuda M: A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. *Molecular microbiology* 2006, **59**(4):1175-1184.

- Iwanaga T, Sugi T, Kobayashi K, Takemae H, Gong H *et al*: Characterization of *Plasmodium falciparum* cdc2-related kinase and the effects of a CDK inhibitor on the parasites in erythrocytic schizogony. *Parasitology international* 2013, **62**(5):423-430.
- Iwashita J, Shima H, Nagao M, Sagata N: cDNA cloning of a novel B subunit of *Xenopus* protein phosphatase 2A and its biological activity in oocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 1997, **232**(1):218-222.
- Izumiya S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H: *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Experimental parasitology* 2009, **121**(2):144-150.

J

- Jacinto E, Guo B, Arndt KT, Schmelzle T, Hall MN: TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Molecular cell* 2001, **8**(5):1017-1026.
- Janssens V, Van Hoof C, Merlevede W, Goris J: PTPA regulating PP2A as a dual specificity phosphatase. *Methods in molecular biology* 1998, **93**:103-115.
- Janssens V, van Hoof C, Martens E, de Baere I, Merlevede W *et al*: Identification and characterization of alternative splice products encoded by the human phosphotyrosyl phosphatase activator gene. *European journal of biochemistry / FEBS* 2000, **267**(14):4406-4413.
- Janssens V, Goris J: Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *The Biochemical journal* 2001, **353**(Pt 3):417-439.
- Janssens V, Goris J, Van Hoof C: PP2A: the expected tumor suppressor. *Current opinion in genetics & development* 2005, **15**(1):34-41.
- John CC, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R *et al*: Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics* 2008, **122**(1):e92-99.
- Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C *et al*: Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 1999, **285**(5433):1573-1576.
- Jordens J, Janssens V, Longin S, Stevens I, Martens E *et al*: The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(10):6349-6357.
- Juanes MA, Khoueiry R, Kupka T, Castro A, Mudrak I *et al*: Budding yeast greatwall and endosulfines control activity and spatial regulation of PP2A(Cdc55) for timely mitotic progression. *PLoS genetics* 2013, **9**(7):e1003575.
- Junttila MR, Puustinen P, Niemela M, Ahola R, Arnold H *et al*: CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* 2007, **130**(1):51-62.

K

- Kamibayashi C, Estes R, Lickteig RL, Yang SI, Craft C *et al*: Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits. *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(31):20139-20148.
- Kanopka A, Muhlemann O, Petersen-Mahrt S, Estmer C, Ohrmalm C *et al*: Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature* 1998, **393**(6681):185-187.
- Kantele A, Jokiranta TS: Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011, **52**(11):1356-1362.
- Kar S, Ukil A, Sharma G, Das PK: MAPK-directed phosphatases preferentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in experimental visceral leishmaniasis: involvement of distinct protein kinase C isoforms. *Journal of leukocyte biology* 2010, **88**(1):9-20.
- Karaiskou A, Jesus C, Brassac T, Ozon R: Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *Journal of cell science* 1999, **112** (Pt 21):3747-3756.
- Katayose Y, Li M, Al-Murrani SW, Shenolikar S, Damuni Z: Protein phosphatase 2A inhibitors, I(1)(PP2A) and I(2)(PP2A), associate with and modify the substrate specificity of protein phosphatase 1. *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(13):9209-9214.
- Kato K, Sudo A, Kobayashi K, Tohya Y, Akashi H: Characterization of *Plasmodium falciparum* protein kinase 2. *Molecular and biochemical parasitology* 2008a, **162**(1):87-95.
- Kato N, Sakata T, Breton G, Le Roch KG, Nagle A *et al*: Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. *Nature chemical biology* 2008b, **4**(6):347-356.
- Khalife J, Freville A, Vandomme A, Pierrot C: Hommel M, Kremsner PG Phosphatases. In: *Encyclopedia of Malaria*. Edited by Hommel M, Kremsner PG: Springer; In press.
- Khew-Goodall Y, Hemmings BA: Tissue-specific expression of mRNAs encoding alpha- and beta-catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS letters* 1988, **238**(2):265-268.
- Kinoshita N, Ohkura H, Yanagida M: Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* 1990, **63**(2):405-415.
- Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T *et al*: Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 2006, **441**(7089):46-52.
- Kleinberger T, Shenk T: Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription. *Journal of virology* 1993, **67**(12):7556-7560.
- Kong M, Ditsworth D, Lindsten T, Thompson CB: Alpha4 is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Molecular cell* 2009, **36**(1):51-60.

- Kono Y, Maeda K, Kuwahara K, Yamamoto H, Miyamoto E *et al*: MCM3-binding GANP DNA-primase is associated with a novel phosphatase component G5PR. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2002, 7(8):821-834.
- Krebs EG, Fischer EH: The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta* 1956, 20(1):150-157.
- Kremmer E, Ohst K, Kiefer J, Brewis N, Walter G: Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Molecular and cellular biology* 1997, 17(3):1692-1701.
- Krishna S, Woodrow CJ, Staines HM, Haynes RK, Mercereau-Puijalon O: Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. *Trends in molecular medicine* 2006, 12(5):200-205.
- Kumar R, Adams B, Oldenburg A, Musiyenko A, Barik S: Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malaria journal* 2002, 1:5.
- Kumar R, Musiyenko A, Cioffi E, Oldenburg A, Adams B *et al*: A zinc-binding dual-specificity YVH1 phosphatase in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, and its interaction with the nuclear protein, pescadillo. *Molecular and biochemical parasitology* 2004a, 133(2):297-310.
- Kumar R, Musiyenko A, Oldenburg A, Adams B, Barik S: Post-translational generation of constitutively active cores from larger phosphatases in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for proteomics. *BMC molecular biology* 2004b, 5:6.
- Kumar R, Adams B, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S: The FK506-binding protein of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is a FK506-sensitive chaperone with FK506-independent calcineurin-inhibitory activity. *Molecular and biochemical parasitology* 2005, 141(2):163-173.
- Kun JF, Hibbs AR, Saul A, McColl DJ, Coppel RL *et al*: A putative *Plasmodium falciparum* exported serine/threonine protein kinase. *Molecular and biochemical parasitology* 1997, 85(1):41-51.
- Kuo YC, Huang KY, Yang CH, Yang YS, Lee WY *et al*: Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *The Journal of biological chemistry* 2008, 283(4):1882-1892.
- Kutuzov MA, Andreeva AV: Protein Ser/Thr phosphatases of parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 2008, 161(2):81-90.



- Lauwaet T, Davids BJ, Torres-Escobar A, Birkeland SR, Cipriano MJ *et al*: Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Molecular and biochemical parasitology* 2007, 152(1):80-89.
- Laveran CL: Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme; 1881.
- Laveran CL: 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). *Reviews of infectious diseases* 1982, 4(4):908-911.
- Le Roch K, Sestier C, Dorin D, Waters N, Kappes B *et al*: Activation of a *Plasmodium falciparum* cdc2-related kinase by heterologous p25 and cyclin H. Functional characterization of a *P. falciparum* cyclin homologue. *The Journal of biological chemistry* 2000, 275(12):8952-8958.
- Lee J, Stock J: Protein phosphatase 2A catalytic subunit is methyl-esterified at its carboxyl terminus by a novel methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 1993, 268(26):19192-19195.
- Lee J, Chen Y, Tolstykh T, Stock J: A specific protein carboxyl methyltransferase that demethylates phosphoprotein phosphatase 2A in bovine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93(12):6043-6047.
- Lee TY, Lai TY, Lin SC, Wu CW, Ni IF *et al*: The B56gamma3 regulatory subunit of protein phosphatase 2A (PP2A) regulates S phase-specific nuclear accumulation of PP2A and the G1 to S transition. *The Journal of biological chemistry* 2010, 285(28):21567-21580.
- Letourneux C, Rocher G, Porteu F: B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *The EMBO journal* 2006, 25(4):727-738.
- Leulliot N, Vicentini G, Jordens J, Quevillon-Cheruel S, Schiltz M *et al*: Crystal structure of the PP2A phosphatase activator: implications for its PP2A-specific PPlase activity. *Molecular cell* 2006, 23(3):413-424.
- Li HH, Cai X, Shouse GP, Piluso LG, Liu X: A specific PP2A regulatory subunit, B56gamma, mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *The EMBO journal* 2007, 26(2):402-411.
- Li JL, Baker DA: Protein phosphatase beta, a putative type-2A protein phosphatase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *European journal of biochemistry / FEBS* 1997, 249(1):98-106.
- Li JL, Baker DA: A putative protein serine/threonine phosphatase from *Plasmodium falciparum* contains a large N-terminal extension and five unique inserts in the catalytic domain. *Molecular and biochemical parasitology* 1998, 95(2):287-295.
- Li JL, Baker DA, Cox LS: Sexual stage-specific expression of a third calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *Biochimica et biophysica acta* 2000, 1491(1-3):341-349.
- Li M, Guo H, Damuni Z: Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry* 1995, 34(6):1988-1996.
- Li M, Makkinje A, Damuni Z: Molecular identification of I1PP2A, a novel potent heat-stable inhibitor protein of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* 1996, 35(22):6998-7002.
- Li X, Scuderi A, Letsou A, Virshup DM: B56-associated protein phosphatase 2A is required for survival and protects from apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology* 2002, 22(11):3674-3684.

- Li Z, Tu X, Wang CC: Okadaic acid overcomes the blocked cell cycle caused by depleting Cdc2-related kinases in *Trypanosoma brucei*. *Experimental cell research* 2006, **312**(18):3504-3516.
- Lin FC, Arndt KT: The role of *Saccharomyces cerevisiae* type 2A phosphatase in the actin cytoskeleton and in entry into mitosis. *The EMBO journal* 1995, **14**(12):2745-2759.
- Lin XH, Walter J, Scheidtmann K, Ohst K, Newport J *et al*: Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(25):14693-14698.
- Lindenthal C, Klinkert MQ: Identification and biochemical characterisation of a protein phosphatase 5 homologue from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 2002, **120**(2):257-268.
- Longin S, Jordens J, Martens E, Stevens I, Janssens V *et al*: An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methylesterase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator. *The Biochemical journal* 2004, **380**(Pt 1):111-119.
- Longin S, Zwaenepoel K, Louis JV, Dilworth S, Goris J *et al*: Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic subunit. *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(37):26971-26980.
- Low H, Lye YM, Sim TS: Pfnk3 functions as an atypical MAPKK in *Plasmodium falciparum*. *Biochemical and biophysical research communications* 2007, **361**(2):439-444.
- Low H, Chua CS, Sim TS: *Plasmodium falciparum* possesses a unique dual-specificity serine/threonine and tyrosine kinase, Pfnk3. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2012, **69**(9):1523-1535.
- Lu Q, Dunn RL, Angeles R, Smith GD: Regulation of spindle formation by active mitogen-activated protein kinase and protein phosphatase 2A during mouse oocyte meiosis. *Biology of reproduction* 2002, **66**(1):29-37.
- Lye YM, Chan M, Sim TS: Pfnk3: an atypical activator of a MAP kinase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS letters* 2006, **580**(26):6083-6092.

M

- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA: Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS letters* 1990, **264**(2):187-192.
- Magnusdottir A, Stenmark P, Flodin S, Nyman T, Hammarstrom M *et al*: The crystal structure of a human PP2A phosphatase activator reveals a novel fold and highly conserved cleft implicated in protein-protein interactions. *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(32):22434-22438.
- Mailhes JB, Hilliard C, Fuseler JW, London SN: Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, induces premature separation of sister chromatids during meiosis I and aneuploidy in mouse oocytes in vitro. *Chromosome research : an*

- international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 2003, **11**(6):619-631.
- Malhotra P, Dasaradhi PV, Kumar A, Mohammed A, Agrawal N et al:** Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology* 2002, **45**(5):1245-1254.
- Mamoun CB, Sullivan DJ, Jr., Banerjee R, Goldberg DE:** Identification and characterization of an unusual double serine/threonine protein phosphatase 2C in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(18):11241-11247.
- Mamoun CB, Goldberg DE:** *Plasmodium* protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1beta and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity in vitro. *Molecular microbiology* 2001, **39**(4):973-981.
- Marcellus RC, Chan H, Paquette D, Thirlwell S, Boivin D et al:** Induction of p53-independent apoptosis by the adenovirus E4orf4 protein requires binding to the Balpha subunit of protein phosphatase 2A. *Journal of virology* 2000, **74**(17):7869-7877.
- Marchiafava EC, A:** Weitere Untersuchungen über die Malariainfection » in Fortschritte der Medicin. In. Edited by München, vol. 3; 1885: p. 787-806.
- Margolis SS, Perry JA, Forester CM, Nutt LK, Guo Y et al:** Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis. *Cell* 2006, **127**(4):759-773.
- Martins YC, Daniel-Ribeiro CT:** A new hypothesis on the manifestation of cerebral malaria: the secret is in the liver. *Medical hypotheses* 2013, **81**(5):777-783.
- Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ:** A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular phylogenetics and evolution* 2008, **47**(1):261-273.
- Mayer RE, Hendrix P, Cron P, Matthies R, Stone SR et al:** Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform. *Biochemistry* 1991, **30**(15):3589-3597.
- McConnell JL, Gomez RJ, McCorvey LR, Law BK, Wadzinski BE:** Identification of a PP2A-interacting protein that functions as a negative regulator of phosphatase activity in the ATM/ATR signaling pathway. *Oncogene* 2007, **26**(41):6021-6030.
- McCright B, Virshup DM:** Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(44):26123-26128.
- McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM:** The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**(36):22081-22089.
- McLennan AG, Cartwright JL, Gasmi L:** The human NUDT family of nucleotide hydrolases. Enzymes of diverse substrate specificity. *Advances in experimental medicine and biology* 2000, **486**:115-118.
- McRobert L, McConkey GA:** RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 2002, **119**(2):273-278.

- McRobert L, Taylor CJ, Deng W, Fivelman QL, Cummings RM *et al*: Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. *PLoS biology* 2008, **6**(6):e139.
- Meissner M, Krejany E, Gilson PR, de Koning-Ward TF, Soldati D *et al*: Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(8):2980-2985.
- Merckx A, Le Roch K, Nivez MP, Dorin D, Alano P *et al*: Identification and initial characterization of three novel cyclin-related proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(41):39839-39850.
- Migueli DL, Smetana JH, Nunes HF, Kobarg J, Zanchin NI: Identification and characterization of an alternatively spliced isoform of the human protein phosphatase 2A α catalytic subunit. *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(7):4853-4862.
- Miller RL, Ikram S, Armelagos GJ, Walker R, Harer WB *et al*: Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1994, **88**(1):31-32.
- Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA: Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends in biochemical sciences* 1999, **24**(5):186-191.
- Mishra SK, Mohanty S, Satpathy SK, Mohapatra DN: Cerebral malaria in adults -- a description of 526 cases admitted to Ispat General Hospital in Rourkela, India. *Annals of tropical medicine and parasitology* 2007, **101**(3):187-193.
- Mitchell DA, Sprague GF, Jr.: The phosphotyrosyl phosphatase activator, Ncs1p (Rrd1p), functions with Cla4p to regulate the G(2)/M transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 2001, **21**(2):488-500.
- Mitsuhashi S, Matsuura N, Ubukata M, Oikawa H, Shima H *et al*: Tautomycetin is a novel and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase type 1, PP1. *Biochemical and biophysical research communications* 2001, **287**(2):328-331.
- Mittal PK: Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. *Journal of vector borne diseases* 2003, **40**(1-2):20-32.
- Miura T, Miki T: GSK-3 β , a therapeutic target for cardiomyocyte protection. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2009, **73**(7):1184-1192.
- Mochida S, Maslen SL, Skehel M, Hunt T: Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science* 2010, **330**(6011):1670-1673.
- Molestina RE, El-Guendy N, Sinai AP: Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. *Cellular microbiology* 2008, **10**(5):1153-1165.
- Moon RW, Taylor CJ, Bex C, Schepers R, Goulding D *et al*: A cyclic GMP signalling module that regulates gliding motility in a malaria parasite. *PLoS pathogens* 2009, **5**(9):e1000599.

- Moreno CS, Park S, Nelson K, Ashby D, Hubalek F *et al*: WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(8):5257-5263.
- Moreno FJ, Diaz-Nido J, Jimenez JS, Avila J: Distribution of CK2, its substrate MAP1B and phosphatases in neuronal cells. *Molecular and cellular biochemistry* 1999, **191**(1-2):201-205.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U *et al*: Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* 2001, **291**(5501):141-144.
- Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG: Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Molecular biology of the cell* 1995, **6**(1):119-134.
- Muller IB, Knockel J, Eschbach ML, Bergmann B, Walter RD *et al*: Secretion of an acid phosphatase provides a possible mechanism to acquire host nutrients by *Plasmodium falciparum*. *Cellular microbiology* 2010, **12**(5):677-691.
- Murphy SC, Breman JG: Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2001, **64**(1-2 Suppl):57-67.

N

- Nagaraj VA, Arumugam R, Gopalakrishnan B, Jyothsna YS, Rangarajan PN *et al*: Unique properties of *Plasmodium falciparum* porphobilinogen deaminase. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(1):437-444.
- Nagaraj VA, Arumugam R, Chandra NR, Prasad D, Rangarajan PN *et al*: Localisation of *Plasmodium falciparum* uroporphyrinogen III decarboxylase of the heme-biosynthetic pathway in the apicoplast and characterisation of its catalytic properties. *International journal for parasitology* 2009a, **39**(5):559-568.
- Nagaraj VA, Prasad D, Rangarajan PN, Padmanaban G: Mitochondrial localization of functional ferrochelatase from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 2009b, **168**(1):109-112.
- Nagaraj VA, Arumugam R, Prasad D, Rangarajan PN, Padmanaban G: Protoporphyrinogen IX oxidase from *Plasmodium falciparum* is anaerobic and is localized to the mitochondrion. *Molecular and biochemical parasitology* 2010a, **174**(1):44-52.
- Nagaraj VA, Prasad D, Arumugam R, Rangarajan PN, Padmanaban G: Characterization of coproporphyrinogen III oxidase in *Plasmodium falciparum* cytosol. *Parasitology international* 2010b, **59**(2):121-127.
- Nakashima A, Tanimura-Ito K, Oshiro N, Eguchi S, Miyamoto T *et al*: A positive role of mammalian Tip41-like protein, TIPRL, in the amino-acid dependent mTORC1-signaling pathway through interaction with PP2A. *FEBS letters* 2013, **587**(18):2924-2929.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF: The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 1994, **371**(6495):297-300.

- Neviani P, Santhanam R, Trotta R, Notari M, Blaser BW *et al*:** The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer cell* 2005, **8**(5):355-368.
- Nevill CG, Some ES, Mung'ala VO, Mutemi W, New L *et al*:** Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 1996, **1**(2):139-146.
- Nunbhakdi-Craig V, Craig L, Machleidt T, Sontag E:** Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells. *Journal of virology* 2003, **77**(5):2807-2818.
- Nunes MC, Goldring JP, Doerig C, Scherf A:** A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. *Molecular microbiology* 2007, **63**(2):391-403.
- Nunes MC, Okada M, Scheidig-Benatar C, Cooke BM, Scherf A:** *Plasmodium falciparum* FIKK kinase members target distinct components of the erythrocyte membrane. *PLoS one* 2010, **5**(7):e11747.

O

- Ogris E, Du X, Nelson KC, Mak EK, Yu XX *et al*:** A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(20):14382-14391.
- Ohkura H, Yanagida M:** *S. pombe* gene *sds22+* essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1. *Cell* 1991, **64**(1):149-157.
- Okamoto K, Li H, Jensen MR, Zhang T, Taya Y *et al*:** Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. *Molecular cell* 2002, **9**(4):761-771.
- ole-MoiYoi OK, Brown WC, Iams KP, Nayar A, Tsukamoto T *et al*:** Evidence for the induction of casein kinase II in bovine lymphocytes transformed by the intracellular protozoan parasite *Theileria parva*. *The EMBO journal* 1993, **12**(4):1621-1631.
- Onwuamaegbu ME, Henein M, Coats AJ:** Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice. *Postgraduate medical journal* 2004, **80**(949):642-649.
- Ortega-Gutierrez S, Leung D, Ficarro S, Peters EC, Cravatt BF:** Targeted disruption of the PME-1 gene causes loss of demethylated PP2A and perinatal lethality in mice. *PLoS one* 2008, **3**(7):e2486.

P

- Pace T, Birago C, Janse CJ, Picci L, Ponzi M:** Developmental regulation of a *Plasmodium* gene involves the generation of stage-specific 5' untranslated sequences. *Molecular and biochemical parasitology* 1998, **97**(1-2):45-53.

- Pace T, Olivieri A, Sanchez M, Albanesi V, Picci L *et al*: Set regulation in asexual and sexual *Plasmodium* parasites reveals a novel mechanism of stage-specific expression. *Molecular microbiology* 2006, **60**(4):870-882.
- Pallas DC, Shahrik LK, Martin BL, Jaspers S, Miller TB *et al*: Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 1990, **60**(1):167-176.
- Papasozomenos SC, Binder LI: Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell motility and the cytoskeleton* 1987, **8**(3):210-226.
- Parija SC, Praharaj I: Drug resistance in malaria. *Indian journal of medical microbiology* 2011, **29**(3):243-248.
- Patzewitz EM, Guttery DS, Poulin B, Ramakrishnan C, Ferguson DJ *et al*: An ancient protein phosphatase, SHLP1, is critical to microneme development in *Plasmodium* ookinetes and parasite transmission. *Cell reports* 2013, **3**(3):622-629.
- Pendyala PR, Ayong L, Eatrises J, Schreiber M, Pham C *et al*: Characterization of a PRL protein tyrosine phosphatase from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 2008, **158**(1):1-10.
- Perez M, Avila J: The expression of casein kinase 2alpha' and phosphatase 2A activity. *Biochimica et biophysica acta* 1999, **1449**(2):150-156.
- Peti W, Nairn AC, Page R: Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *The FEBS journal* 2013, **280**(2):596-611.
- Philip N, Haystead TA: Characterization of a UBC13 kinase in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(19):7845-7850.
- Philip N, Vaikkinen HJ, Tetley L, Waters AP: A unique Kelch domain phosphatase in *Plasmodium* regulates ookinete morphology, motility and invasion. *PloS one* 2012, **7**(9):e44617.
- Pino P, Sebastian S, Kim EA, Bush E, Brochet M *et al*: A tetracycline-repressible transactivator system to study essential genes in malaria parasites. *Cell host & microbe* 2012, **12**(6):824-834.
- Pino P: From technology to biology: a malaria genetic toolbox for the functional dissection of essential genes. *Molecular microbiology* 2013, **88**(4):650-654.
- Polhemus ME, Remich SA, Ogutu BR, Waitumbi JN, Otieno L *et al*: Evaluation of RTS,S/AS02A and RTS,S/AS01B in adults in a high malaria transmission area. *PloS one* 2009, **4**(7):e6465.
- Pradel G, Frevert U: Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 2001, **33**(5):1154-1165.
- Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M *et al*: The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999, **43**(12):2943-2949.
- Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM: The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature reviews Microbiology* 2006, **4**(11):849-856.

R

- Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ *et al*: Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature reviews Microbiology* 2004, **2**(3):203-216.
- Rangarajan R, Bei AK, Jethwaney D, Maldonado P, Dorin D *et al*: A mitogen-activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO reports* 2005, **6**(5):464-469.
- Ranjan R, Ahmed A, Gourinath S, Sharma P: Dissection of mechanisms involved in the regulation of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 4. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(22):15267-15276.
- Read M, Sherwin T, Holloway SP, Gull K, Hyde JE: Microtubular organization visualized by immunofluorescence microscopy during erythrocytic schizogony in *Plasmodium falciparum* and investigation of post-translational modifications of parasite tubulin. *Parasitology* 1993, **106** (Pt 3):223-232.
- Reininger L, Wilkes JM, Bourgade H, Miranda-Saavedra D, Doerig C: An essential Aurora-related kinase transiently associates with spindle pole bodies during *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizogony. *Molecular microbiology* 2011, **79**(1):205-221.
- Reininger L, Garcia M, Tomlins A, Muller S, Doerig C: The *Plasmodium falciparum*, Nima-related kinase Pfnek-4: a marker for asexual parasites committed to sexual differentiation. *Malaria journal* 2012, **11**:250.
- Rempola B, Kaniak A, Migdalski A, Rytka J, Slonimski PP *et al*: Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics : MGG* 2000, **262**(6):1081-1092.
- Richie TL, Haberberger RL: RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England journal of medicine* 2012, **366**(8):765.
- Riedel CG, Katis VL, Katou Y, Mori S, Itoh T *et al*: Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 2006, **441**(7089):53-61.
- Riedmann EM: Human Vaccines & Immunotherapeutics: News. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2013, **9**(12).
- Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P *et al*: Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malaria journal* 2009, **8**:10.
- Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW: Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *The Lancet infectious diseases* 2007, **7**(2):105-117.
- Ronne H, Carlberg M, Hu GZ, Nehlin JO: Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Molecular and cellular biology* 1991, **11**(10):4876-4884.
- Ross R: On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood. *British medical journal* 1897, **2**(1929):1786-1788.
- Rossio V, Yoshida S: Spatial regulation of Cdc55-PP2A by Zds1/Zds2 controls mitotic entry and mitotic exit in budding yeast. *The Journal of cell biology* 2011, **193**(3):445-454.

- Rts Sctp, Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, Abossolo BP et al:** A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *The New England journal of medicine* 2012, **367**(24):2284-2295.
- Rundell K:** Complete interaction of cellular 56,000- and 32,000-Mr proteins with simian virus 40 small-t antigen in productively infected cells. *Journal of virology* 1987, **61**(4):1240-1243.
- Russell LC, Whitt SR, Chen MS, Chinkers M:** Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(29):20060-20063.
- Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS:** Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(29):20296-20300.
- Ruvolo PP, Clark W, Mumby M, Gao F, May WS:** A functional role for the B56 alpha-subunit of protein phosphatase 2A in ceramide-mediated regulation of Bcl2 phosphorylation status and function. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(25):22847-22852.

S

- Sablina AA, Hahn WC:** SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation. *Cancer metastasis reviews* 2008, **27**(2):137-146.
- Sacarlal J, Aponte JJ, Aide P, Mandomando I, Bassat Q et al:** Safety of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children during a Phase IIb trial. *Vaccine* 2008, **26**(2):174-184.
- Sacarlal J, Aide P, Aponte JJ, Renom M, Leach A et al:** Long-term safety and efficacy of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children. *The Journal of infectious diseases* 2009, **200**(3):329-336.
- Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Miyamoto E, Kishimoto T et al:** *In situ* dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons. *FEBS letters* 1995, **376**(3):238-242.
- Santoro MF, Annand RR, Robertson MM, Peng YW, Brady MJ et al:** Regulation of protein phosphatase 2A activity by caspase-3 during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(21):13119-13128.
- Schiebel K, Meder J, Rump A, Rosenthal A, Winkelmann M et al:** Elevated DNA sequence diversity in the genomic region of the phosphatase PPP2R3L gene in the human pseudoautosomal region. *Cytogenetics and cell genetics* 2000, **91**(1-4):224-230.
- Schneider AG, Mercereau-Puijalon O:** A new Apicomplexa-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. *BMC genomics* 2005, **6**:30.
- Schonthal A, Feramisco JR:** Inhibition of histone H1 kinase expression, retinoblastoma protein phosphorylation, and cell proliferation by the phosphatase inhibitor okadaic acid. *Oncogene* 1993, **8**(2):433-441.
- Schwentke A, Krepstakies M, Mueller AK, Hammerschmidt-Kamper C, Motaal BA et al:** *In vitro* and *in vivo* silencing of plasmodial dhs and elf-5a genes in a putative, non-canonical RNAi-related pathway. *BMC microbiology* 2012, **12**:107.

- Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R *et al*: Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* 1999, **283**(5410):2089-2091.
- Sents W, Ivanova E, Lambrecht C, Haesen D, Janssens V: The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS J* 2012.
- Seo SB, McNamara P, Heo S, Turner A, Lane WS *et al*: Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* 2001, **104**(1):119-130.
- Shimizu S, Ugi S, Maegawa H, Egawa K, Nishio Y *et al*: Protein-tyrosine phosphatase 1B as new activator for hepatic lipogenesis via sterol regulatory element-binding protein-1 gene expression. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(44):43095-43101.
- Shiu SH, Li WH: Origins, lineage-specific expansions, and multiple losses of tyrosine kinases in eukaryotes. *Molecular biology and evolution* 2004, **21**(5):828-840.
- Shtrichman R, Sharf R, Barr H, Dobner T, Kleinberger T: Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(18):10080-10085.
- Sigal YJ, McDermott MI, Morris AJ: Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J* 2005, **387**(Pt 2):281-293.
- Silverstein AM, Barrow CA, Davis AJ, Mumby MC: Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(7):4221-4226.
- Silvestrini F, Alano P, Williams JL: Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 2000, **121** Pt 5:465-471.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS *et al*: A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 2004, **363**(9414):1017-1024.
- Singh M, Mukherjee P, Narayanasamy K, Arora R, Sen SD *et al*: Proteome analysis of *Plasmodium falciparum* extracellular secretory antigens at asexual blood stages reveals a cohort of proteins with possible roles in immune modulation and signaling. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2009, **8**(9):2102-2118.
- Singh S, More KR, Chitnis CE: Role of calcineurin and actin dynamics in regulated secretion of microneme proteins in *Plasmodium falciparum* merozoites during erythrocyte invasion. *Cellular microbiology* 2013.
- Slater AF: Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacology & therapeutics* 1993, **57**(2-3):203-235.
- Slupe AM, Merrill RA, Strack S: Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme research* 2011, **2011**:398751.
- Smetana JH, Zanchin NI: Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, alpha4 and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL). *The FEBS journal* 2007, **274**(22):5891-5904.

- Sneddon AA, Cohen PT, Stark MJ: *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *The EMBO journal* 1990, **9**(13):4339-4346.
- Solano-Parada J, Gonzalez-Gonzalez G, Torro LM, dos Santos MF, Espino AM *et al*: Effectiveness of intranasal vaccination against *Angiostrongylus costaricensis* using a serine/threonine phosphatase 2 A synthetic peptide and recombinant antigens. *Vaccine* 2010, **28**(32):5185-5196.
- Solyakov L, Halbert J, Alam MM, Semblat JP, Dorin-Semblat D *et al*: Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature communications* 2011, **2**:565.
- Sontag E, Sontag JM, Garcia A: Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C zeta signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF-kappaB activation. *The EMBO journal* 1997, **16**(18):5662-5671.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C *et al*: Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(36):25490-25498.
- Sontag E, Hladik C, Montgomery L, Luangpirom A, Mudrak I *et al*: Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2004a, **63**(10):1080-1091.
- Sontag E, Luangpirom A, Hladik C, Mudrak I, Ogris E *et al*: Altered expression levels of the protein phosphatase 2A B α C enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2004b, **63**(4):287-301.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Sontag JM, Diaz-Arrastia R, Ogris E *et al*: Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau and amyloid precursor protein regulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007, **27**(11):2751-2759.
- Sontag JM, Nunbhakdi-Craig V, Montgomery L, Arning E, Bottiglieri T *et al*: Folate deficiency induces in vitro and mouse brain region-specific downregulation of leucine carboxyl methyltransferase-1 and protein phosphatase 2A B α subunit expression that correlate with enhanced tau phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008, **28**(45):11477-11487.
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K *et al*: Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Molecular biology of the cell* 1998, **9**(12):3273-3297.
- Srinivasan P, Beatty WL, Diouf A, Herrera R, Ambroggio X *et al*: Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(32):13275-13280.
- Stevens I, Janssens V, Martens E, Dilworth S, Goris J *et al*: Identification and characterization of B α -subunits of protein phosphatase 2 A in *Xenopus laevis*

- oocytes and adult tissues. *European journal of biochemistry / FEBS* 2003, **270**(2):376-387.
- Stone SR, Hofsteenge J, Hemmings BA: Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* 1987, **26**(23):7215-7220.
- Strack S, Zaucha JA, Ebner FF, Colbran RJ, Wadzinski BE: Brain protein phosphatase 2A: developmental regulation and distinct cellular and subcellular localization by B subunits. *The Journal of comparative neurology* 1998, **392**(4):515-527.
- Strack S, Cribbs JT, Gomez L: Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(46):47732-47739.
- Swain JE, Wang X, Saunders TL, Dunn R, Smith GD: Specific inhibition of mouse oocyte nuclear protein phosphatase-1 stimulates germinal vesicle breakdown. *Molecular reproduction and development* 2003, **65**(1):96-103.
- Swiatek W, Sugajska E, Lankiewicz L, Hemmings BA, Zolnierowicz S: Biochemical characterization of recombinant subunits of type 2A protein phosphatase overexpressed in *Pichia pastoris*. *European journal of biochemistry / FEBS* 2000, **267**(16):5209-5216.
- Swingle M, Ni L, Honkanen RE: Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods in molecular biology* 2007, **365**:23-38.
- Syin C, Parzy D, Traincard F, Boccaccio I, Joshi MB *et al*: The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* 2001, **268**(18):4842-4849.

I

- Talevich E, Mirza A, Kannan N: Structural and evolutionary divergence of eukaryotic protein kinases in *Apicomplexa*. *BMC evolutionary biology* 2011, **11**:321.
- Tan CS, Bader GD: Phosphorylation sites of higher stoichiometry are more conserved. *Nature methods* 2012, **9**(4):317; author reply 318.
- Tang Z, Shu H, Qi W, Mahmood NA, Mumby MC *et al*: PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Developmental cell* 2006, **10**(5):575-585.
- Tanimukai H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K: Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 2005, **166**(6):1761-1771.
- Taylor HM, McRobert L, Grainger M, Sicard A, Dluzewski AR *et al*: The malaria parasite cyclic GMP-dependent protein kinase plays a central role in blood-stage schizogony. *Eukaryotic cell* 2010, **9**(1):37-45.
- Tehrani MA, Mumby MC, Kamibayashi C: Identification of a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit highly expressed in muscle. *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**(9):5164-5170.
- Theodosiou A, Ashworth A: Differential effects of stress stimuli on a JNK-inactivating phosphatase. *Oncogene* 2002, **21**(15):2387-2397.

- Toranzo GS, Bonilla F, Buhler MC, Buhler MI:** Participation of MAPK, PKA and PP2A in the regulation of MPF activity in *Bufo arenarum* oocytes. *Zygote* 2011, **19**(2):181-189.
- Trager W:** What triggers the gametocyte pathway in *Plasmodium falciparum*? *Trends in parasitology* 2005, **21**(6):262-264.
- Treeck M, Sanders JL, Elias JE, Boothroyd JC:** The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. *Cell host & microbe* 2011, **10**(4):410-419.
- Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A:** Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* 2011, **332**(6025):91-94.
- Turowski P, Fernandez A, Favre B, Lamb NJ, Hemmings BA:** Differential methylation and altered conformation of cytoplasmic and nuclear forms of protein phosphatase 2A during cell cycle progression. *The Journal of cell biology* 1995, **129**(2):397-410.

U

- Usui H, Inoue R, Tanabe O, Nishito Y, Shimizu M et al:** Activation of protein phosphatase 2A by cAMP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of the 74-kDa B" (delta) regulatory subunit in vitro and identification of the phosphorylation sites. *FEBS letters* 1998, **430**(3):312-316.

V

- Vaesen M, Barnikol-Watanabe S, Gotz H, Awni LA, Cole T et al:** Purification and characterization of two putative HLA class II associated proteins: PHAPI and PHAPII. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1994, **375**(2):113-126.
- Vaid A, Sharma P:** 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. *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(37):27126-27133.
- Vaid A, Thomas DC, Sharma P:** Role of Ca²⁺/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(9):5589-5597.
- Van Hoof C, Cayla X, Bosch M, Merlevede W, Goris J:** The phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A. A novel purification method, immunological and enzymic characterization. *European journal of biochemistry / FEBS* 1994, **226**(3):899-907.
- Van Hoof C, Janssens V, Dinisliotu A, Merlevede W, Goris J:** Functional analysis of conserved domains in the phosphotyrosyl phosphatase activator. Molecular cloning of the homologues from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 1998, **37**(37):12899-12908.
- Van Hoof C, Janssens V, De Baere I, de Winde JH, Winderickx J et al:** The *Saccharomyces cerevisiae* homologue YPA1 of the mammalian phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A controls progression through

- the G1 phase of the yeast cell cycle. *Journal of molecular biology* 2000, **302**(1):103-120.
- Van Hoof C, Martens E, Longin S, Jordens J, Stevens I *et al*: Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *The Biochemical journal* 2005, **386**(Pt 1):93-102.
- Vandomme A, Freville A, Cailliau K, Kalamou H, Bodart JF *et al*: PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator of *Plasmodium falciparum*: Identification of Its Residues Involved in Binding to and Activation of PP2A. *International journal of molecular sciences* 2014, **15**(2):2431-2453.
- Varadkar P, Despres D, Kraman M, Lozier J, Phadke A *et al*: The protein phosphatase 2A B56gamma regulatory subunit is required for heart development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2014.
- Vasudevan NT, Mohan ML, Gupta MK, Hussain AK, Naga Prasad SV: Inhibition of protein phosphatase 2A activity by PI3Kgamma regulates beta-adrenergic receptor function. *Molecular cell* 2011, **41**(6):636-648.
- Virshup DM, Shenolikar S: From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Molecular cell* 2009, **33**(5):537-545.
- Voorhoeve PM, Hijmans EM, Bernards R: Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. *Oncogene* 1999, **18**(2):515-524.

W

- Wakula P, Beullens M, van Eynde A, Ceulemans H, Stalmans W *et al*: The translation initiation factor eIF2beta is an interactor of protein phosphatase-1. *The Biochemical journal* 2006, **400**(2):377-383.
- Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E *et al*: Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(21):12352-12357.
- Wang SS, Esplin ED, Li JL, Huang L, Gazdar A *et al*: Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science* 1998, **282**(5387):284-287.
- Wang X, Blanchard J, Kohlbrenner E, Clement N, Linden RM *et al*: The carboxy-terminal fragment of inhibitor-2 of protein phosphatase-2A induces Alzheimer disease pathology and cognitive impairment. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010, **24**(11):4420-4432.
- Wang Y, Lei Y, Fang L, Mu Y, Wu J *et al*: Roles of phosphatase 2A in nociceptive signal processing. *Molecular pain* 2013, **9**:46.
- Ward GE, Fujioka H, Aikawa M, Miller LH: Staurosporine inhibits invasion of erythrocytes by malarial merozoites. *Experimental parasitology* 1994, **79**(3):480-487.
- Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C: Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC genomics* 2004, **5**:79.

- Wei H, Ashby DG, Moreno CS, Ogris E, Yeong FM *et al*: Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the B-type subunits Cdc55p and Rts1p. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(2):1570-1577.
- White NJ, Turner GD, Day NP, Dondorp AM: Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *The Journal of infectious diseases* 2013, **208**(2):192-198.
- Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA *et al*: Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Molecular biology of the cell* 2002, **13**(6):1977-2000.
- Wilkes JM, Doerig C: The protein-phosphatome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC genomics* 2008, **9**:412.
- Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR: Epidemiology of drug-resistant malaria. *The Lancet infectious diseases* 2002, **2**(4):209-218.
- Woodrow CJ, Planche T, Krishna S: Artesunate versus quinine for severe *falciparum* malaria. *Lancet* 2006, **367**(9505):110-111; author reply 111-112.
- Wu J, Tolstykh T, Lee J, Boyd K, Stock JB *et al*: Carboxyl methylation of the phosphoprotein phosphatase 2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits *in vivo*. *The EMBO journal* 2000, **19**(21):5672-5681.
- Wu Q, Guo Y, Yamada A, Perry JA, Wang MZ *et al*: A role for Cdc2- and PP2A-mediated regulation of Emi2 in the maintenance of CSF arrest. *Current biology : CB* 2007, **17**(3):213-224.
- Wurtz N, Pastorino B, Almeras L, Briolant S, Villard C *et al*: Expression and biochemical characterization of the *Plasmodium falciparum* protein kinase A catalytic subunit. *Parasitology research* 2009, **104**(6):1299-1305.
- Wurzenberger C, Gerlich DW: Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nature reviews Molecular cell biology* 2011, **12**(8):469-482.

X

- Xie H, Clarke S: Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain. *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(3):1981-1984.
- Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey PD, Chao Y *et al*: Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell* 2006, **127**(2):341-353.
- Xiong Y, Jing XP, Zhou XW, Wang XL, Yang Y *et al*: Zinc induces protein phosphatase 2A inactivation and tau hyperphosphorylation through Src dependent PP2A (tyrosine 307) phosphorylation. *Neurobiology of aging* 2013, **34**(3):745-756.
- Xu Y, Chen Y, Zhang P, Jeffrey PD, Shi Y: Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation. *Molecular cell* 2008, **31**(6):873-885.
- Xu Z, Williams BR: The B56alpha regulatory subunit of protein phosphatase 2A is a target for regulation by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Molecular and cellular biology* 2000, **20**(14):5285-5299.

Y

- Yamamoto TM, Blake-Hodek K, Williams BC, Lewellyn AL, Goldberg ML *et al*: Regulation of Greatwall kinase during *Xenopus* oocyte maturation. *Molecular biology of the cell* 2011, **22**(13):2157-2164.
- Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P: *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular microbiology* 2007, **9**(5):1215-1222.
- Yan Y, Mumby MC: Distinct roles for PP1 and PP2A in phosphorylation of the retinoblastoma protein. PP2a regulates the activities of G(1) cyclin-dependent kinases. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(45):31917-31924.
- Yan Z, Fedorov SA, Mumby MC, Williams RS: PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Molecular and cellular biology* 2000, **20**(3):1021-1029.
- Yang H, Jiang W, Gentry M, Hallberg RL: Loss of a protein phosphatase 2A regulatory subunit (Cdc55p) elicits improper regulation of Swe1p degradation. *Molecular and cellular biology* 2000, **20**(21):8143-8156.
- Yeoh S, O'Donnell RA, Koussis K, Dluzewski AR, Ansell KH *et al*: Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* 2007, **131**(6):1072-1083.
- Yi K, Wang X, Emmett MR, Marshall AG, Stewart M *et al*: Dephosphorylation of major sperm protein (MSP) fiber protein 3 by protein phosphatase 2A during cell body retraction in the MSP-based amoeboid motility of *Ascaris* sperm. *Molecular biology of the cell* 2009, **20**(14):3200-3208.
- Yokoyama D, Saito-Ito A, Asao N, Tanabe K, Yamamoto M *et al*: Modulation of the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro by protein serine/threonine phosphatase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* 1998, **247**(1):18-23.
- You J, Bird RC: Selective induction of cell cycle regulatory genes cdk1 (p34cdc2), cyclins A/B, and the tumor suppressor gene Rb in transformed cells by okadaic acid. *Journal of cellular physiology* 1995, **164**(2):424-433.

Z

- Zhao Y, Kappes B, Yang J, Franklin RM: Molecular cloning, stage-specific expression and cellular distribution of a putative protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *European journal of biochemistry / FEBS* 1992, **207**(1):305-313.
- Zhao Y, Boguslawski G, Zitomer RS, DePaoli-Roach AA: *Saccharomyces cerevisiae* homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(13):8256-8262.
- Zhou XW, Gustafsson JA, Tanila H, Bjorkdahl C, Liu R *et al*: Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A. *Neurobiology of disease* 2008, **31**(3):386-394.
- Ziskind B: [Malaria: a plague of ancient Egypt]. *La Revue du praticien* 2009, **59**(4):586-589.

Zolnierowicz S, Csontos C, Bondor J, Verin A, Mumby MC *et al*: Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain. *Biochemistry* 1994, **33**(39):11858-11867.

Annexes

ANNEXE 1

Khalife J, Freville A, Vandomme A, Pierrot C : Phosphatases. In: *Encyclopedia of Malaria*. Edited by Hommel M, Kremsner PG: Springer; In press.

PHOSPHATASES

Jamal Khalife, Aline Fréville, Audrey Vandomme, Christine Pierrot

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

email addresses : jamal.khalife@pasteur-lille.fr, aline.freville@pasteur-lille.fr,
audrey.vandomme@pasteur-lille.fr, christine.pierrot@pasteur-lille.fr

Definition

Phosphatases are enzymes which catalyze the cleavage of monophosphate ester bonds from the phosphorylated form of different kinds of substrates. Their activity in dephosphorylating substrates is opposite to those of kinases, which are responsible for phosphorylation processes. Protein phosphorylation is the most common and the best studied post-translational modification. It has been estimated that about 30% of all proteins can be regulated by phosphorylation. The reversible phosphorylation of proteins represents a ubiquitous regulatory mechanism for diverse pathways and systems in eukaryotic cells.

1. Introduction

Two decades ago, phosphorylation signalling pathway, known to be controlled by kinases, has been suggested to be involved in *Plasmodium* parasite development/growth. In these first reports, the use of inhibitors for kinases on cultured parasites showed an arrest of their development and a drastic inhibition of their capacity to invade red blood cells (Ward, 1994 ; Dluzewski, 1996). More recently, an important number of studies was dedicated to characterize the kinases of *Plasmodium* and to search for specific potent inhibitors as effective chemotherapeutic agents. The genome wide sequencing of *P. falciparum*, together with the 'omics' era, have allowed a major breakthrough and a quantum leap not only to identify the kinome of this parasite (85 kinases) but also to show that about 30 kinases are essential for the completion of the parasite lifecycle (Solyakov, 2011).

It is well known that phosphorylation event is a reversible post-translational modification where phosphatases reverse the action of kinases. Thus, the phosphorylation state of a substrate, at a given

time, is the picture of a global result of the opposing activities of the relevant kinases and phosphatases. In *Pf*, the physiological importance of phosphatases during the parasite lifecycle has been supported by the fact that natural toxins inhibiting phosphatases activities block parasite growth *in vitro* (Yokoyama, 1998). Although, recent increasing efforts have been made to provide better understanding on the molecular role of phosphatases in several organisms, little is known about the phosphatases of *P. falciparum*. In general, most of eukaryotic phosphatases fall into three major families on the basis of their catalytic domains as follows: (1) the Protein Serine/Threonine Phosphatases or PSP family; (2) the Protein Tyrosine Phosphatases or PTP and (3) the Protein Histidine Phosphatases or PHP (Figure 1). The PSP include the PhosphoProtein phosphatases (PPPs) (PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 and PP7), the Metal-dependent protein phosphatases (PPMs, PP2C) and the FCP/SCP aspartate-based phosphatases, and are able to dephosphorylate serine (Ser) and threonine (Thr) residues. The PTPs are mainly but not exclusively able to dephosphorylate the tyrosine (Tyr) residue and include the highest number of phosphatases: a total of 108 PTP have been identified in human, among which eighteen have been classified in Dual Specificity phosphatases (DSP) as they are able to dephosphorylate all three phospho-amino acids (Ser, Thr and Tyr). Regarding the third family, the PHP, it is the most recently described one with a capacity to regulate the signaling pathway related not only to histidine but also to tyrosine dephosphorylation. Beside these main families, there are two additional ones which dephosphorylate non-protein substrates: the Lipid Phosphatases or LP and the Nucleotide hydrolases that are involved in dephosphorylating lipids and phosphonucleosides respectively (McLennan, 2000 ; Sigal, 2005).

In this review, our attention will be focused on the phosphatases that are putatively and experimentally characterized as well as the regulators of two major phosphatases (PP1 and PP2A) in *P. falciparum*.

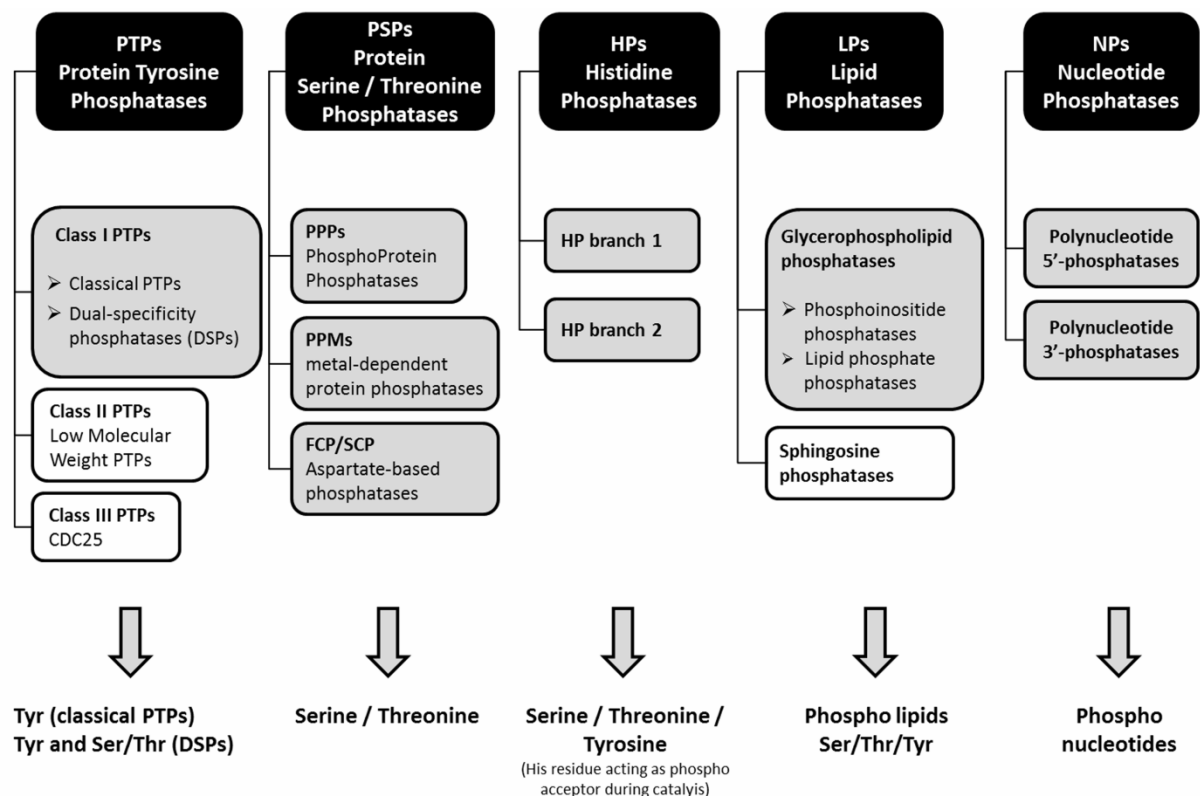


Figure 1. Classification of phosphatases. In grey boxes are the subfamilies represented in the genome of *P. falciparum*

2. Exploration of putative phosphatases in *Plasmodium falciparum* genome

Several authors have previously established a state of the art of both putative and characterized *P. falciparum* phosphatases by exploring the genome of the parasite and manual search in the literature (Andreeva, 2008 ; Bajsa, 2008 ; Kutuzov, 2008 ; Wilkes, 2008). However, in order to update the picture with recent data, we reexamined *P. falciparum* genome. For this purpose, a search was performed in *P. falciparum* database (PlasmoDB, <http://plasmodb.org>) for members of the five phosphatase families described above (Figure 1) using the general term ‘phosphatase’ and more specific terms as ‘nudix’, ‘inositol’ and ‘nucleotidase’. All the hits obtained were then subjected to Interpro (IPR) domain analysis (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) in order to exclude proteins that did not match with potential phosphatase activity. This analysis, combined with BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) allowed to list 69 putative phosphatases in the genome of *P. falciparum* 3D7, among which 55 could be classified into the five phosphatase families described above according to their IPR domains and alignment with human homologs (Table I).

Table I. Census and classification of putative *P. falciparum* 3D7 phosphatases

Phosphatase families and subfamilies (<i>IPR domain</i>)		
PlasmoDB Gene ID	Previous identification	Product description (PlasmoDB)
Protein Serine/Threonine Phosphatases (PSPs)		
PhosphoProtein Phosphatases (PPPs) (<i>IPR004843, IPR024654</i>)		
PF3D7_0107800	MAL1P2.06, PFA0390w	DNA repair exonuclease Mre11, putative
PF3D7_0314400	MAL3P5.5, PFC0595c	serine/threonine protein phosphatase, putative
PF3D7_0802800	PF08_0129	serine/threonine protein phosphatase, putative
PF3D7_0912400	PF10605c	conserved Plasmodium protein, unknown function
PF3D7_0918000	PF10880c	glideosome-associated protein 50, secreted acid phosphatase (GAP50)
PF3D7_0925400	PF11245c	protein phosphatase-beta
PF3D7_0927700	PF11360c	serine/threonine protein phosphatase, putative
PF3D7_1018200	PF10_0177a	serine/threonine protein phosphatase, putative
PF3D7_1206000	2277.t00061, MAL12P1.60, PFL0300c	protein phosphatase, putative
PF3D7_1340600	PF13_0222	RNA lariat debranching enzyme, putative (DBR1)
PF3D7_1355500	MAL13P1.274, PF13_0294	serine/threonine protein phosphatase (PP5)
PF3D7_1403900	PF14_0036	phosphatase, putative
PF3D7_1406700	PF14_0064	phosphatase, putative
PF3D7_1414400	PF14_0142	serine/threonine protein phosphatase (PP1)
PF3D7_1423300	PF14_0224	serine/threonine protein phosphatase (PP7)
PF3D7_1464600	PF14_0614	phosphatase, putative
PF3D7_1466100	PF14_0630	protein serine/threonine phosphatase
PF3D7_1469200	PF14_0660	protein phosphatase, putative
Metal-dependent protein phosphatases (PPMs) (<i>IPR001932</i>)		
PF3D7_0410300	MAL4P2.37, PFD0505c, PFD0510c	protein phosphatase, putative
PF3D7_0520100	MAL5P1.202, PFE1010w	protein phosphatase, putative
PF3D7_0810300	MAL8P1.109	protein phosphatase, putative
PF3D7_0810500	MAL8P1.108	protein phosphatase, putative
PF3D7_1009600	1398.t00340, PF10_0093	protein phosphatase, putative
PF3D7_1135100	PF11_0362	protein phosphatase, putative
PF3D7_1138500	PF11_0396	protein phosphatase 2c
PF3D7_1208900	2277.t00090, MAL12P1.89, PFL0445w	conserved Plasmodium protein, unknown function
PF3D7_1249300	2277.t00473, MAL12P1.471, PFL2365w	protein phosphatase, putative
PF3D7_1309200	MAL13P1.44	protein phosphatase 2c-like protein, putative
PF3D7_1455000	PF14_0523	protein phosphatase, putative
FCP/SCP Aspartate-based phosphatases (<i>IPR004274</i>)		
PF3D7_0515900	MAL5P1.159, PFE0795c	protein phosphatase, putative
PF3D7_0726900	PF07_0110	protein phosphatase, putative
PF3D7_1012700	PF10_0124	protein phosphatase, putative
PF3D7_1355700	MAL13P1.275	protein phosphatase, putative
Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs)		
CDC25		
Low Molecular Weight PTPs		
Dual-specificity phosphatases (DSPs) (<i>IPR000387</i>)		
PF3D7_0309000	MAL3P3.11, PFC0380w	dual specificity phosphatase (YVH1)
PF3D7_1113100	PF11_0139	protein tyrosine phosphatase (PRL)
PF3D7_1127000	PF11_0281	protein phosphatase, putative
PF3D7_1455100	PF14_0524, PF14_0525	protein phosphatase, putative
Histidine Phosphatases (HPs)		
HP branch 1 (<i>IPR013078</i>)		
PF3D7_0310300	MAL3P4.27, PFC0430w	phosphoglycerate mutase, putative
PF3D7_0413500	MAL4P1.127, PFD0660w	phosphoglucomutase-2 (PGM2)
PF3D7_1120100	PF11_0208	phosphoglycerate mutase, putative (PGM1)
HP branch 2 (<i>IPR000560</i>)		
PF3D7_1430300	PF14_0282	acid phosphatase, putative

Phosphatase families and subfamilies (<i>IPR domain</i>)		
PlasmoDB Gene ID	Previous identification	Product description (PlasmoDB)
Lipid Phosphatases		
Glycerophospholipid phosphatases		
Phosphoinositide phosphatases (<i>IPR002013, IPR000300</i>)		
PF3D7_0705500	PF07_0024	inositol-phosphate phosphatase, putative
PF3D7_0802500	MAL8P1.151	inositol phosphatase, putative
PF3D7_1354200	PF13_0285	inositol-polyphosphate 5-phosphatase, putative
PF3D7_1111600	PF11_0122	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein, putative
Lipid phosphate phosphatases (<i>IPR016118, IPR026058</i>)		
PF3D7_0805600	MAL8P1.202	apicoplast phosphatidic acid phosphatase, putative
PF3D7_0303200	MAL3P1.12, PFC0150w	HAD superfamily protein, putative
Sphingosine phosphatases		
Nucleotide Phosphatases		
NUDX domain (<i>IPR00086</i>)		
PF3D7_0520600	MAL5P1.207, PFE1035c	BIS(5'-nucleosyl)-tetrakisphosphate (diadenosine tetraphosphatase), putative
PF3D7_1308900	PF13_0048	mRNA-decapping enzyme 2, putative (DCP2)
PF3D7_1349100	MAL13P1.248	nucleoside diphosphate hydrolase, putative
GDA1/CD39 domain (<i>IPR000407</i>)		
PF3D7_1322000	MAL13P1.121	adenosine-diphosphatase, putative
PF3D7_1431800	PF14_0297	apyrase, putative
PNK3 phosphatase (<i>IPR013954</i>)		
PF3D7_0817400	MAL8P1.74	conserved Plasmodium protein, unknown function
PF3D7_1363200	PF13_0334	bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase (PNKP)
IMP-specific nucleotidase (<i>IPR009453</i>)		
PF3D7_1206100	2277.t00062, MAL12P1.61, PFL0305c	IMP-specific 5'-nucleotidase, putative, haloacid dehalogenase hydrolase, putative
Others		
PTPLA (<i>IPR007482</i>)		
PF3D7_1331600	MAL13P1.168	protein tyrosine phosphatase, putative
RHOD (<i>IPR001763</i>)		
PF3D7_1206400	2277.t00065, MAL12P1.64, PFL0320w	rhodanese like protein, putative
PF3D7_1305500	PF13_0027	protein phosphatase, putative
Unclassified haloacid dehalogenase (HAD) (<i>IPR023214</i>)		
PF3D7_0715000	PF07_0059	4-nitrophenylphosphatase (PNPase)
PF3D7_1118400	PF11_0190	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative
PF3D7_1226100	2277.t00252, MAL12P1.252, PFL1260w	hydrolase/phosphatase, putative
Unclassified Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase (EEP) (<i>IPR005135</i>)		
PF3D7_0107200	MAL1P1.64, PFA0350w, PFA0355w,	carbon catabolite repressor protein 4, putative
PF3D7_0305600	MAL3P2.19, PFC0250c	AP endonuclease (DNA-[apurinic or apyrimidinic site] lyase), putative
PF3D7_0319200	MAL3P6.29, PFC0850c	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein, putative
PF3D7_1238600	2277.t00374, MAL12P1.372, PFL1870c	sphingomyelin phosphodiesterase, putative
PF3D7_1363500	PF13_0336	DNase I-like protein, putative
PF3D7_1430600	PF14_0285	exodeoxyribonuclease III, putative
mRNA capping phosphatase SU (<i>IPR004206</i>)		
PF3D7_0322100	MAL3P7.26, PFC0980c	RNA triphosphatase (Prt1)
HP PAP-like (no IPR domain)		
PF3D7_0208400	PF02_0080, PFB0380c	conserved Plasmodium protein, unknown function

Protein Serine/Threonine Phosphatases (PSPs)

The most populated phosphatase family in *P. falciparum* genome is the Protein Serine/Threonine Phosphatase (PSP) family with 33 putative phosphatases, among which are 18 PPPs, 11 PPMs (PP2C) and 4 FCP/SCP aspartate-based phosphatases. This family is also the most described as 10 PPPs and 1 PP2C have been experimentally characterized. These include PP1, PP2A, PP2B, PP2C, PP5, PP7, PPKL, GAP50, PP β , SHLP1 and SHLP2 (see below). Among the 8 non-characterized putative PPPs are three phosphatases that may have nucleotide phosphatase activity since they show homologies with Mre11 (DNA repair exonuclease), Dbr1 (RNA lariat debranching enzyme that plays a role in pre-mRNA splicing) and PhoD (Alkaline phosphatase D, 5' nucleotide phosphodiesterase). The putative *Plasmodium* PSPs also include three members of the PP2/PP4/PP6 family exhibiting high degree of identity between each other. While two of them have been described and characterized as PfPP2A and PfPP β (see below), the third one showing closer clustering with PP4 remains to be characterized. The analysis of RNA-Seq data (plasmoDB) shows that these three PP2A-like phosphatases may be differentially regulated during the erythrocytic stages of the parasite, since PP2A transcripts are highly detected in young trophozoites while transcripts of the non-characterized PP2A-like phosphatases are predominantly detected in late trophozoites and schizonts. PfPP β is expressed exclusively at the sexual stages of the parasite (see below). The presence in *Plasmodium* genome of 11 PP2C-like phosphatases, of which only one has been characterized, represents a high proportion of the putative parasite phosphatases when compared to human, and is more akin to plants where PP2cs play major roles in stress responses. The RNA-Seq and transcriptome data in PlasmoDB database show that all these putative PP2cs are differentially expressed in sexual and asexual stages suggesting that they may play different roles at different parasite stages. The 4 members of the FCP/SCP aspartate-based phosphatases belong to the large family of Haloacid dehalogenases, are all NIF-like phosphatases, and contain the DxTxT/V motif. Two of them align preferentially with CTD1/FCP1 (RNA pol C-terminal domain phosphatase) and the two others with SCP1 (Small C-terminal domain phosphatase).

Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs)

Of the classical phosphatase families, the Protein Tyrosine Phosphatase (PTP) is the second one represented with only 4 putative members. Of notice, no putative homologs to CDC25 and LMW PTPs have been found. LMW PTPs, known to be involved in cell growth inhibition, seem to be absent in apicomplexan (Andreeva, 2008). In their classification of human PTPs, Alonso *et al.* included Asp-based PTPs subfamily of Tyr/Ser phosphatases composed of 4 Eya genes (Alonso, 2004a). No homologous of these phosphatases have been found in *Plasmodium*. Among the four putative PfPTPs, three belong to the DSP subfamily and two have been experimentally characterized (PfYVH1 and PfPRL, see below).

Overall, PTPs are under-represented in the *P. falciparum* genome when compared to human where more than 100 PTPs have been listed. This observation may be related to the fact that no classical tyrosine kinases have been described in *Plasmodium*. However, the PTP family may include more members since among the phosphatases grouped in 'others' are one PTPL (protein tyrosine phosphatase-like), two RHOD (Rhodanese domains-containing proteins) and one mRNA capping SU (subunit). The PTPL proteins

constitute a small family structurally related to PTPs. However, the substitution of the essential R residue in the CX₅R catalytic site renders these proteins catalytically inactive. Rhodanese domains are found in many proteins including phosphatases such as CDC25 or dual-specificity MAPK phosphatases. However, catalytically inactive rhodanese modules that may have regulatory roles have also been described. In *P. falciparum*, among the two RHOD, one has been experimentally characterized as an atypical MAPK phosphatase (see below). Another putative phosphatase that may have Tyr phosphatase activity is mRNA capping β -subunit (SU). mRNA capping enzyme is a bifunctional enzyme with RNA 5'-triphosphate (β -SU, PTP activity) and guanylyl transferase activity (α -SU). Interestingly two *P. falciparum* genes are found to align with α and β mRNA capping SUs respectively.

Histidine Phosphatases (HPs)

The Histidine Phosphatase (HP) family is also represented in *P. falciparum* genome with three putative phosphatases belonging to branch 1 and one belonging to branch 2 (Fig. 1). Among these are homologs to phosphoglycerate mutases (PGM1 and PGM2). PGMs share several structural features with histidine acid phosphatases including a catalytic domain which contains a histidine residue acting as a phospho acceptor during catalysis. PGMs are enzymes that, beside their mutase activity (phospho transferase), may function as histidine phosphatase acting upon a variety of substrates. The *P. falciparum* homolog of PGM2 has been experimentally characterized and shows prominent phosphatase activity in contrast to weak mutase activity (see below). Whether the *P. falciparum* homolog of PGM1 functions also as a phosphatase has to be checked.

It is to note that *P. falciparum* genome may include at least one more HP (classified in Table I in 'others'). Despite the absence of Interpro domain characteristic for HP superfamily, this protein presents a very short HP domain in its N-terminal sequence and shares features of histidine acid phosphatase and phosphoglycerate mutase.

Lipid and Nucleotide Phosphatases

In addition to the three classical phosphatase families (PSP, PTP, HP) lipid and nucleotide phosphatases are listed, despite the fact that some members are known to have clearly Tyr or His phosphatase activity. Lipid phosphatases may be divided in two subgroups, glycerophospholipid phosphatases and sphingosine phosphatases according to their role in dephosphorylating glycerophospholipids and phosphosphingolipids. While genes encoding sphingosine phosphatases seem to be absent in the genome of *P. falciparum*, 6 putative members of the other subgroup are found. Among these, four are putative phosphoinositide phosphatases exhibiting SAC domains for two of them, inositol polyphosphate-related phosphatase domain for one and both of these domains in tandem for the fourth. The presence of these two domains in the latter suggests that it may belong to the synaptojanin sub-family of lipid phosphatases. Interestingly, three out of four of these proteins are predicted to have transmembrane (TM) domains (<http://phobius.sbc.su.se/>) which is in accordance with the membrane distribution of phosphoinositides. The two others putative glycerophospholipid phosphatases align with phosphatidate phosphatases. One of

them contains a LIPIN domain and no TM domain while the second one, homologous with PAP2, contains 7 putative TM domains (<http://phobius.sbc.su.se/>). None of all these putative lipid phosphatases have been experimentally characterized.

Nucleotide phosphatases are a heterogeneous group of enzymes that may have polynucleotide 5'- or 3'-phosphatase activity. The search of putative nucleotide phosphatases in *P. falciparum* allowed to list 8 putative enzymes exhibiting different domains (Table I). One of them, a polynucleotide 5'-kinase 3'-phosphatase has been studied and shown to have preferential phosphatase activity (see below). However this list of nucleotide phosphatases may not be exhaustive since query of PlasmoDB with 'nucleoside' yielded 36 more putative enzymes exhibiting characteristic domains such as ATPase or GTPase domains. None of these putative nucleotide phosphatases have been experimentally characterized.

Overall, even if the list of putative *Plasmodium* phosphatases may be incomplete, the *in silico* analysis allowed to classify 55 putative enzymes. However, in order to explore the role of these putative phosphatases, it is crucial to characterize both their activity *in vitro* and their function in the parasite.

3. Confirmed Phosphatases in *P. falciparum*

For clarity, all the references for this section have been included in Table II.

Biochemical characterization of *Plasmodium* phosphatases

As evaluated by their ability to dephosphorylate p-nitrophenyl phosphate (pNPP) in presence of divalent metal cation and/or to be inhibited by specific compounds such as okadaic acid or microcystin, seven PfPSPs have been characterized: PP1, PP2A, PP β , PP5, PP7, PP2B and PP2c. The characterization and regulation of PfPP1 and PfPP2A are described in the next paragraph. The C-terminal end of PP β shows 47% identity and 75% homology with PfPP2A. However PfPP β has an N-terminal extension of 151 amino acids (a.a.) which doesn't present any conserved domain. Even if the role of this phosphatase in the parasite is not known, a northern blot analysis indicates that its expression is maximal in gametocytes while PP2A has been purified from the erythrocytic stages of *P. falciparum*.

The PP5 identified in *P. falciparum* has all the known structural and biochemical features of PP5 phosphatases. It notably contains in its N-terminal end three Tetratricopeptide repeats (TPR), known to be involved in protein-protein interaction and to exert autoinhibitory role on PP5 activity. Accordingly, a mutant of PfPP5 deleted of its TPR domain exhibits higher activity than the full length protein. Moreover, as for mammalian PP5s, PfPP5 interacts with HSP90 and is located in the nucleus of the parasite, suggesting an involvement in the regulation of nuclear proteins.

PfPP7 was initially described in the literature as PfPPJ. However PfPPJ seems to be a processed form of PfPP7, truncated of a region containing two EF-hand motifs. Phosphatase activity of PfPPJ is not enhanced by Ca²⁺ while PP7 is clearly activated by Ca²⁺. This is in accordance with the role of EF-hand motifs of PP7 phosphatases in Ca²⁺-dependent regulation of activity.

PfPP2B, a calcineurin-like protein has been purified from parasites extracts and characterized. As for mammalian calcineurins, phosphatase activity of PfPP2B is dependent of calmodulin and inhibited by FK506 (a calcineurin-specific inhibitor) and Cyclosporin A, and is resistant to okadaic acid. Interestingly, mutations in PP2B (leading to an inactive form) and calcineurin B (B subunit of calcineurin) have been detected in *Plasmodium* parasites resistant to Cyclosporin A, suggesting a role of these proteins and PP2B phosphatase activity in the anti-malarial activity of Cyclosporin A. Recently, the use of calcineurin inhibitors showed that PfPP2B is involved in dephosphorylation and depolymerization of apical actin, which is critical for microneme secretion and thus invasion of host cells.

The only *Plasmodium* PP2C described in the literature is an unusual PP2C composed of two halves, each showing Mg^{2+} or Mn^{2+} -dependent phosphatase activity. The dimerization of PfPP2C, leading to four catalytic units, is however required for its optimal activity. EF1 β , an elongation factor involved in protein translation, has been identified as a substrate of PfPP2C, suggesting that this phosphatase may play an important regulatory function.

Beside these seven *Plasmodium* phosphatases, three unusual PSPs have been reported in the literature. These include PfPPKL, previously named PP α , which is closely related to plants and contains tandem Kelch-like repeats in a long N-terminal extension. The restricted expression of PfPPKL to gametocytes suggests a role in sexual stages. The two other unusual PSPs belong to *Shewanella*-like protein phosphatases (SHLP) family, found only in bacteria, protists and plants. Despite the presence of a metallo-phosphatase domain, SHLPs have tyrosine-phosphatase activity, and this is clearly the case for PfSHLP2 whose activity is inhibited by Tyr-phosphatase specific inhibitors. PfSHLP2 has been shown to be released in the infected erythrocyte and to play a role in dephosphorylating Band 3, an erythrocyte membrane protein involved in adhesion of the parasite to the host erythrocyte during the invasion process.

While searching for *Plasmodium* phosphatases involved in acquisition of host nutrients, Muller *et al.* described PfGAP50 (Glideosome-associated protein 50), a secreted acid phosphatase. PfGAP50 contains an N-terminal domain which has to be cleaved off for maturation, a C-terminal transmembrane domain involved in correct localization into the inner membrane complex (a pellicle structure present on the invading merozoite, critical for merozoite motility and viability), and a soluble domain belonging to the family of metallo-dependent phosphatases. Analysis of biochemical properties of recombinant soluble domain of PfGAP50 showed that this phosphatase was able to dephosphorylate a wide range of substrates including nucleotides, phosphorylated sugars as well as inositol 1,4,5-triphosphate and pNPP (Muller, 2010). However this observation is controversial since the recent structure of PfGAP50 does not seem to be compatible neither with phosphatase activity nor with pNPP binding (Bosch, 2012).

Two *Plasmodium* PTPs have been reported in the literature. PfYVH1 is a DSP highly active both on P-Tyr and P-Ser residues. As described for YVH1 phosphatases, PfYVH1 is a zinc-finger protein and the binding of Zn atoms to its C-terminal domain is necessary for optimal phosphatase activity. The localization of PfYVH1 in the nucleus of trophozoites, together with its interaction with a *P. falciparum* homolog of yeast Pescadillo, suggest that this PfDSP may play a role in cell cycle progression at the trophozoite stage. PfPRL, also named PfEP, is a Tyr-phosphatase which contains a prenylation site in its C-terminal domain, and can be farnesylated *in vitro*. Interestingly, PfPRL seems to be exported beyond

the infected erythrocyte membrane and is able to dephosphorylate parasite-specific proteins in extracellular supernatants.

A phosphoglycerate mutase PfPGM2 has been characterized in *P. falciparum*. This enzyme is active on pNPP and inactive on phosphonucleotides. Moreover, PfPGM2 is able to dephosphorylate all P-Ser, P-Thr and P-Tyr residues but is the most active against P-Thr. It has preference for acidic pH, which is a characteristic for Histidine phosphatases. Unlike other PGMs, PfPGM2 has a prominent phosphatase activity in contrast to weak mutase activity.

The only Nucleotide phosphatase described in *Plasmodium* is a bi-functional polynucleotide kinase/phosphatase (PNKP). PNKPs are enzymes that can phosphorylate the 5-OH end and dephosphorylate the 3-phosphate end of DNA. Several differences in the 5'-kinase domain of PfPNKP may explain why this enzyme does not have 5'-kinase activity. Moreover, in light of its inability to dephosphorylate double-stranded substrates that mimic single-strand breaks, it has been proposed that PfPNKP action in DNA repairing may be restricted to overhanging termini of double-strand breaks.

Table II. *Plasmodium* phosphatases experimentally characterized

name PlasmoDB Gene ID	references	Phosphatase activity in vitro	Role in the parasite
Protein Serine/Threonine Phosphatases (PSPs)			
PP1 PF3D7_1414400	Kumar, 2002 Battacharya, 2002 Blisnick, 2006	active on pNPP inhibited by Calyculin A, Okadaic Acid	RNAi: inhibition of parasite cellular progression Use of PP1 inhibitor (CalyculinA) on late schizonts: role of PP1 in the release of infectious merozoites
PP2A PF3D7_0314400	Dobson, 1999 Yokoyama, 1998	active on pNPP: requirement of Mn ²⁺ inhibited by Okadaic Acid	use of Okadaic Acid: suggests crucial role of PP2A in parasite cell cycle
PPβ PF3D7_0925400	Li, 1997		stage specific expression: suggests role in sexual stages
PP2B (CalcineurinA) PF3D7_0802800	Dobson, 1999 Kumar, 2004b, 2005 Singh, 2013	active on pNPP: requirement of calmodulin; activated by Ca ²⁺ inhibited by calmodulin antagonist, CyclosporinA, FK506 resistant to Okadaic Acid	use of PP2B inhibitors: role of PP2B in invasion processus of erythrocytes
PP5 PF3D7_1355500	Dobson, 2001 Lindenthal, 2002	active on pNPP (activated with oleic acid) and MBP inhibited by Okadaic acid autoinhibitory role of Tetratricopeptide repeat	
PPJ / PP7 PF3D7_1423300	Dobson, 2001 Kumar, 2004b	active on pNPP, 32P-phosphorylase a and phosphohistone: requirement of Mn ²⁺ , no effect of Ca ²⁺ or calmodulin no activity on Pospo-Tyr peptide PP7: activated by Ca ²⁺ , prefers phosphohistone as substrate resistant to Okadaic Acid and microCystin	
PPα / PPKL PF3D7_1466100	Li 1998 Guttery 2012 Philip 2012	active on 3-O-MFP	KO in Pb: differentiation into ookinetes impaired (female specific); PPKL is essential for gliding motility of ookinetes and for mosquito invasion
SHLP1 / Shelph1 PF3D7_1469200	Patzewitz, 2013	active on 3-O-MFP resistant to microCystin and Okadaic Acid	KO in Pb: role in ookinete formation transition to oocysts and parasite transmission (female specific)
SHLP2/Shelph2 PF3D7_1206000	Fernandez-Pol, 2013	active on pNPP: requirement of Mn ²⁺ Tyr-Phosphatase activity inhibited by sodium orthovanadate resistant to microCystin and CalyculinA	release in erythrocyte and role on Band3: suggests a role in invasion
GAP50 PF3D7_0918000	Müller, 2010 Yeoman, 2011 Bosch, 2012	active on ATP>TPP>G6P-F6P>pNPP activity max at pH6, not metal ion-dependent However: Structure of soluble domain not compatible with phosphatase activity and binding to pNPP	no possibility to obtain parasites deleted from the PIGAP50 phosphatase domain: essentiality of the acid phosphatase domain
PP2C PF3D7_1138500	Mamoun, 1998 Mamoun, 2001	full length and each PP2c half: active on P-casein: activated with Mg ²⁺ or Mn ²⁺ max activity with full length (dimerization necessary for full activity) minimally inhibited by Okadaic Acid	no possibility to obtain PP2c KO parasites: essentiality in asexual stages
Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs)			
YVH1 PF3D7_0309000	Kumar, 2004a	weakly active on pNPP, highly active on Phospho-Tyr and -Ser mutated protein (C>S): inactive inhibited by vanadate resistant to fluoride, pyrophosphate, Okadaic Acid, microCystin	
PRL / P/IEP PF3D7_1113100	Pendyala, 2008 Singh, 2009	active on O-MFP and phosphorylated MBP inhibited by sodium orthovanadate resistant to a cocktail composed of bromotetramisole+canthadrin+microCystin	
Histidine Phosphatases, Nucleotide phosphatases and others			
PGM2 PF3D7_0413500	Hills, 2011	active on pNPP and Phospho a.a. (Thre>Tyr>Ser) Phosphatase activity > Mutase activity	no possibility to obtain PGM2 KO parasites: essentiality in asexual stages
PNKP PF3D7_1363200	Siribal, 2011	active on single /double-stranded DNA with phosphate groupe at 3'-termini highly active with Mn ²⁺ , Ca ²⁺ or Mg ²⁺ no 5'-kinase activity inhibited by sodium vanadate	
MAPKP1 PF3D7_1305500	Balu, 2013		KO in Pf: attenuated growth rate (complementation with full length copy of MAPKP: rescue of the phenotype)
pNPP: p-Nitrophenyl Phosphate O-MFP: O-methylfluorescein phosphate MBP: Myelin Basic Protein		RNAi: RNA interference KO: Knock Out Pb: <i>Plasmodium berghei</i> ; Pf: <i>Plasmodium falciparum</i>	

Role of *Plasmodium* phosphatases in the parasite

In order to determine the function of a protein in *Plasmodium*, parasitologists can rely on the localization of the protein, its stage specific expression or on the behavior of the parasites when treated with specific inhibitors (when available). Another approach widely used for other parasites such as *Trypanosoma* is abrogation of expression by synthetic interfering RNA or RNA interference (RNAi). This approach has been used for PfPPP1 for which phenotypic studies using RNAi confirmed its essential role in the parasite. However, this observation is controversial, since the application of RNAi-based down regulation of *Plasmodium* genes may be not applicable due to the absence of a complete RNAi machinery.

At present, the best way to measure the involvement of one specific protein is to generate parasites deleted from the corresponding gene either in *P. falciparum* or in *P. berghei*. Four studies allowed the functional characterization of PPKL, SHLP1 and a MAP-kinase phosphatase-1 (MAPKP1). While having no effect on asexual blood stage development, the deletion of endogenous PbPPKL gene yielded abnormal *P. berghei* ookinete development and differentiation. The distribution of micronemes in mutant parasites was modified, leading to a failure in parasite motility and capacity to invade the mosquito epithelium. SHLP1 has been shown to play also diverse functions in ookinete biology and parasite transmission: the deletion of SHLP1 gene resulted in impaired development of ookinetes and formation of micronemes, and to a complete ablation of oocyst formation.

Concerning MAPKP1, a *P. falciparum* mutant with a PiggyBac insertion disrupting this gene, resulted in a significantly slower growth rate of blood stages with delayed entry into the S/M phase of the cell cycle. The complementation of mutant parasites with the full-length copy of MAPKP1 gene rescued the phenotype thus confirming that the attenuated phenotype was due to the disruption of the MAPKP1 gene. However, surprisingly, analysis of the phenotype of *P. berghei* parasites deleted for the Pb homolog of this MAPK phosphatase revealed that the multiplication/growth rate was not different from wild type parasites (<http://www.pberghei.eu/index.php?rmgm=829>). Moreover, the *P. berghei* mutant produced normal oocyst numbers and the prepatent period in mice was similar to that of wild type parasites after intravenous injection of sporozoites.

In the literature, two phosphatases, PGM2 and PP2C, have been described to have crucial role for the parasite due to the inability to generate Knock Out (KO) parasites. Interestingly, attempts to generate *P. berghei* deleted for another PP2C-like (not listed in Tables I and II, not reported previously) were also unsuccessful (<http://www.pberghei.eu/index.php?rmgm=827>). These observations suggest that both of these PP2C are essential during blood stage development/multiplication of the parasite, and that despite the presence of a total of 12 PP2C-like putative phosphatases, they may not have redundant functions.

Moreover, even if the phosphatase activity of PfGAP50 is controversial, Yeoman *et al.* reported their inability to generate transfectants deleted from the phosphatase domain of this enzyme, suggesting that this domain may play an important enzymatic activity or structural role.

While the inability to generate KO parasites can only suggest an essential role of the corresponding protein, the recent availability of a system that tightly controls gene expression in *P. berghei* will allow the functional characterization of essential proteins (Pino, 2012).

4. Regulators of PP1 and PP2A in *P. falciparum*

On the basis of many studies, prevailing views on the catalytic subunits of several phosphatases, (including, but not limited to, PP1 and PP2A) responsible of the dephosphorylation activity, are that they do not exist free in the cell and are associated to a number of different regulators or targeting proteins. These partners are assumed to control the catalytic phosphatase activity per se, to determine its substrate specificity and/or to define its localization.

PfPP1 Regulators

The *Plasmodium falciparum* phosphatase type 1 (or PfPP1) activity predominates among phosphatase activity in this apicomplexan parasite (Yokoyama, 1998 ; Bhattacharyya, 2002). Gene knockdown experiments indicate an essential role in the parasite asexual development as interference studies reveal it's implication in the growth of the blood stage parasite (Kumar, 2002). This confirmed an earlier observation showing that the use of okadaic acid, a natural phosphatases toxin, inhibits parasite growth mainly by interfering with PP1-like activity (Yokoyama, 1998 ; Bhattacharyya, 2002). Functional study performed in *Saccharomyces cerevisiae* evidence that PfPP1 is able to rescue the *glc7-* (PP1-) mutant characterized by a low glycogen phenotype (Bhattacharyya, 2002) and revealed a *glc7*/PfPP1 functional orthology. Moreover, PfPP1 is localized in both nucleus and cytoplasmic compartments (Daher, 2006) and seems to be implicated in the release of infectious merozoites (Blisnick, 2006).

Despite PfPP1 importance in *P. falciparum* development, very little is known about its regulation. Recent studies carried out in various eukaryotic organisms reveal the existence of PP1 interacting sub-units as key mechanism of PP1 regulation. Most of these regulators inhibit PP1 activity and interact with the phosphatase through an amino acid sequence present in the regulator and designated as the 'RVxF' motif.

In order to identify PfPP1 regulators, an examination of the *P. falciparum* genome was carried out. Unexpectedly, this analysis did not lead to the identification of orthologs of some well-known and described PP1 regulators such as the Inhibitor 1, GADD34 or PNUTS. This surprising observation suggests specificity in *P. falciparum* phosphatase 1 regulation. However, this work led to the identification of three potential PfPP1 binding proteins: PfLRR1, Pf inhibitor 2 (PfI2^{PP1}) and Pf inhibitor 3 (PfI3^{PP1}) (Daher, 2006 ; Freville, 2012 ; Freville, 2013).

The first of them, PfLRR1 is a *P. falciparum* homologs to the yeast *sds22⁺*. *Sds22⁺* was described in *Schizosaccharomyces pombe* as a cell division regulator, essential to the progression from metaphase to anaphase by enhancing PP1 activity (Ohkura, 1991). PfLRR1 belongs to the Leucine Rich Repeat family as it contains several LRR domains known to be involved in protein-protein interaction. In *P. falciparum* extracts, PfLRR1 is present in a complex with PfPP1. Moreover, PfLRR1 seems to be involved in cell cycle regulation as functional studies using *Xenopus* oocytes revealed its ability to inhibit PP1 activity and to trigger the G2/M transition (Daher, 2006). An essential role in parasite survival is suggested by the

inability to obtain PfLRR1 knock-out parasite (J. Khalife, unpublished results) and by the fact that an overexpression of its ortholog in *Toxoplasma gondii* can damage parasite growth (Daher, 2007a).

The second and third potential PP1 interactors, Pfi2^{PP1} and Pfi3^{PP1}, are similar to the mammalian inhibitors 2 and 3, known as PP1 essential regulators. In *P. falciparum*, reverse genetics studies revealed that Pfi2^{PP1} and Pfi3^{PP1} are as essential as PfPP1 itself for blood-stage parasite growth and/or survival as attempts to obtain knock out parasites were unsuccessful. Localization studies indicated a main expression in the nucleus at all blood-stage parasites (Figure 2A) (Freville, 2012 ; Freville, 2013) suggesting a potential regulatory role on the activity of nuclear PfPP1 (Daher, 2006). *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that both proteins are able to interact with PfPP1 and to regulate its activity. *In vitro* study and functional study using the *Xenopus* model evidenced that Pfi2^{PP1} is able to inhibit PP1 phosphatase activity and to override the G2/M checkpoint (Freville, 2013). Moreover, Pfi2^{PP1} “RVxF” motif seems to be involved in PfPP1 regulatory activity. In regards to Pfi3^{PP1}, *in vitro* assays demonstrated that the protein interacts with PfPP1 mainly through the “RVxF” motif. Unexpectedly, the use of yeast model showed a lack of functional orthology as Pfi3^{PP1} was unable to rescue I3 (YPi 1) deficient yeast. Further *in vitro* functional assays revealed that Pfi3^{PP1}, unlike yeast I3, increased PfPP1 activity which may explain Pfi3 inability to complement I3 deficient yeast.

All together, these findings suggest that the regulation of the *Plasmodium falciparum* phosphatase 1 must be tightly coordinated in the nucleus compartment. PfLRR1, Pfi2 and Pfi3 may play critical roles in *P. falciparum* development through negative and/or positive modulation of PfPP1 phosphatase activity (Figure 2B).

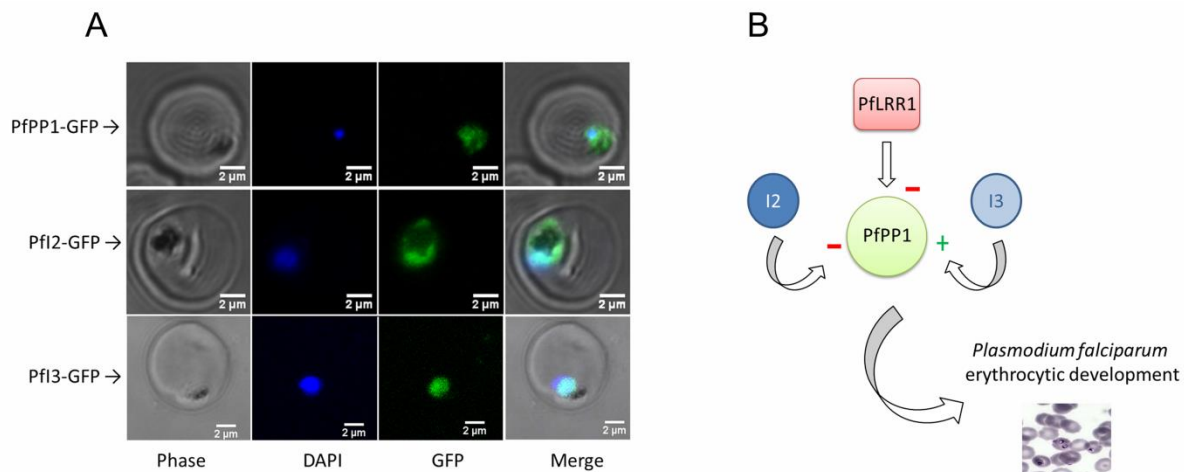


Figure 2. Characterization of PfPP1 regulators. A, Localization of Pfi2 and Pfi3 during erythrocytic cycle of *P. falciparum*. Pfi3-GFP photo was originally published in The Journal of Biological Chemistry. Freville, *et al.* 2012, 287:1306-21. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology. B, schematic representation of the role of PfLRR1, Pfi2 and Pfi3 on PfPP1. PfLRR1 and Pfi2 are inhibitors of PfPP1 while Pfi3 is an activator. The resulting tightly controlled activity of PP1 may contribute to *P. falciparum* erythrocytic development.

PP2A regulators

PP2A is a major serine/threonine phosphatase involved in some biological processes like signaling pathway, mitosis, meiosis or apoptosis. During the mitosis, PP2A blocks the G2/M transition by inactivating the MPF until DNA replication is complete. This inhibition is lifted by the kinase Greatwall which inhibits PP2A. Moreover, PP2A is known to allow the cohesion between the sister chromatid (reversed by the Polo-Like Kinase 1) and to induce the restructuring of the nuclear envelope and of the Golgi apparatus during the mitosis exit. Structurally, PP2A is a holoenzyme composed of a catalytic subunit named PP2Ac, a scaffold subunit (A subunit) and some regulatory subunits (B family subunit). Each subunit presents two or more isoforms. PP2A is biologically present in dimeric (A+C) or trimeric form (A+B+C) (Kremmer, 1997). However, the $\alpha 4$ protein can complex with the catalytic subunit of PP2A without any other subunit for its stabilization (Kong, 2009). The regulation of PP2A is complex and present three levels of regulation (Figure 3). First, the catalytic subunit itself can be regulated by post-translational modifications. Indeed, PP2Ac may be inhibited by phosphorylation on the tyrosine in position 307 (Y307). Moreover, the methylation of the C-terminal tail of PP2A (L309) by the Leucine carboxyl methyltransferase 1 (LCMT 1) activates PP2Ac whereas its de-methylation by the PP2A methyl esterase 1 (PME 1) inhibits PP2A. Then, the B regulatory subunits determine substrate specificity, subcellular localization and catalytic activity of PP2A. For example the B56 α (B') subunit targets PP2A in cardiomyocyte (Bhasin, 2007). In addition to these regulatory subunits, some independent proteins regulate PP2A activities. Among these are the inhibitor 1 and the inhibitor 2 (I1^{PP2A} and I2^{PP2A}) which inhibit PP2A, and the $\alpha 4$ protein and the PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator (PTPA) which activate PP2A. Recent studies showed that $\alpha 4$ protein and PTPA are necessary to allow the active conformation of PP2A catalytic subunit (for review: (Sents, 2012)).

In *P. falciparum* a homolog of PP2A named PfPP2A has been purified from parasites extracts and characterized (Dobson, 1999). This protein seems to be essential for the parasite since the treatment of live parasite with the natural phosphatase toxins okadaic acid, inhibits parasite growth (Yokoyama, 1998).

Concerning PP2A regulators, only one inhibitor has been characterized in *Plasmodium*, I2^{PP2A} named ARP in *P. falciparum* (PfARP) or B7 in *P. berghei*. Like its human counterpart, PfI2^{PP2A} inhibits specifically PP2A activity in Pf. This inhibition induces the hyper-phosphorylation of c-Jun in HeLa cells and the activation of transcription factor AP1 and NF κ B (Dobson, 2003). PfARP is believed to be the main inhibitor of PfPP2A as its immunodepletion decreases the PP2A-inhibitory activity by 90% (Dobson, 2003). This protein is essential for the *P. berghei* since attempts to disrupt PbI2^{PP2A} gene were unsuccessful (<http://www.pberghei.eu/index.php?rmgm=246>). In *P. berghei*, PbI2^{PP2A} protein is encoded by two different transcripts, one of 1.4kb specific for asexual stages and the second one of 1.8kb specific for sexual stages of the parasite. The transcription of PbI2^{PP2A} is active at ring stage, and still present in mature trophozoites but is absent in schizonts (Pace, 1998). In addition to its role in inhibiting PP2A activity, PbI2^{PP2A} may play a role in nucleosome assembly as it exhibits a significant similarity with yeast and human nucleosome assembly proteins and is localized in the nucleus (Birago, 1996).

While only I2^{PP2A} has been experimentally characterized, examination of *P. falciparum* genome revealed the presence of different putative regulatory subunits and regulators of PfPP2A. First, a homolog of the A subunit is annotated and referenced in PlasmoDB. Concerning the LCMT1 and PME1 enzymes, involved

in methylation/demethylation of PP2A, the presence in Pf genome of a putative LCMT1 together with the absence of PME1 raises the question about the role of this post-translational modification in the activation process of PP2A in the parasite. Among the B regulatory subunits described in eukaryotes, the only putative member in Pf is a homolog of B^{''}. The C-terminal end of this putative PfB^{''} subunit aligns with the human PR72 B^{''} regulatory subunit and the PR130, a spliced variant of PR72. In human, PR72 is present in heart and skeletal muscle, whereas the PR130 is detected in almost all tissues analyzed. Of note, none of the tissues/organs analyzed are present in *Plasmodium*, suggesting a different role of the putative PfB^{''}. Finally, putative homologs of the known regulators $\alpha 4$, PTPA and I1^{PP2A} are also present in *Plasmodium* genome. The role of PfPTPA on PP2A activity is currently under investigation in our laboratory.

Overall, very few homologs of known regulators of PP2A are found in *P. falciparum*, even at the *in silico* level. This observation may indicate either a low number of substrates of PP2A in the parasite implicating a less complex regulation of PP2A activity, or that the regulation of the enzyme may be undertaken by other specific proteins.

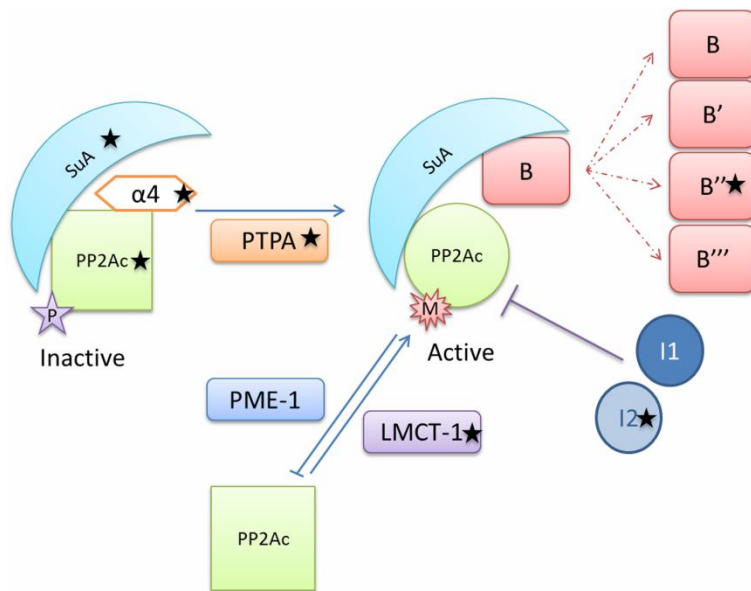


Figure 3. PP2A and its regulation. Schematic representation of PP2A and its regulation. All different subunits and regulatory proteins involved in PP2A activation are illustrated. Proteins which are present in *Plasmodium falciparum* according to *in silico* studies are indicated by black stars.

Concluding Remarks: Phosphatase holoenzymes as drug targets

Based on the latest data and observations on the essentiality of phosphatases function, it should be emphasized that these enzymes could be as suitable targets as kinases. This is further supported by the fact that a change in the phosphorylation state of a protein at any given time is the result of a balance between kinases and phosphatase activities.

Most of the natural toxins are potent inhibitors of PP1 and PP2A with a low specificity. In the case of pathogens, targeting the catalytic subunit of these phosphatases itself would not be strongly recommended given the high identity with those of humans. However, an alternative approach could be more specific by targeting the regulators of these enzymes. In this context, a recent study showed that the selective inhibition of GADD34, a human regulator of PP1, by guanabenz (an α_2 -adrenergic receptor agonist) was able to restore proteostasis and to protect stressed cells (Tsaytler, 2011). As to *P. falciparum*, it is expected that it would express specific regulators of phosphatases that could be selectively blocked by small inhibitor molecules. In this regard, we have already reported the feasibility of such approach implicating conserved regulators of PP1. Indeed peptides derived from PfI2^{PP1} or PfI3^{PP1} and competing with RVxF binding sites in PP1 exhibit anti-plasmodial activity against blood stage parasites *in vitro* (Freville, 2013).

This supports that interfering with the interaction of phosphatases-regulators could be a novel means to control malaria.

Cross references

Kinases and Phosphoproteome

Cell cycle regulation in *Plasmodium*

Phospholipid metabolism

References

- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004 Jun 11;117(6):699-711.
- Andreeva AV, Kutuzov MA. Protozoan protein tyrosine phosphatases. *Int J Parasitol*. 2008 Sep;38(11):1279-95.
- Bajsa J, Duke SO, Tekwani BL. *Plasmodium falciparum* serine/threonine phosphoprotein phosphatases (PPP): from housekeeper to the 'holy grail'. *Curr Drug Targets*. 2008 Nov;9(11):997-1012.
- Balu B, Campbell C, Sedillo J, Maher S, Singh N, Thomas P, et al. Atypical mitogen-activated protein kinase phosphatase implicated in regulating transition from pre-S-Phase asexual intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell*. 2013 Sep;12(9):1171-8.
- Bhasin N, Cunha SR, Mudannayake M, Gigena MS, Rogers TB, Mohler PJ. Molecular basis for PP2A regulatory subunit B56alpha targeting in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jul;293(1):H109-19.
- Bhattacharyya MK, Hong Z, Kongkasuriyachai D, Kumar N. *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a *glc7* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Parasitol*. 2002 Jun;32(6):739-47.
- Birago C, Pace T, Barca S, Picci L, Ponzi M. A chromatin-associated protein is encoded in a genomic region highly conserved in the *Plasmodium* genus. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Oct 1;80(2):193-202.

- Blisnick T, Vincensini L, Fall G, Braun-Breton C. Protein phosphatase 1, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. *Cell Microbiol.* 2006 Apr;8(4):591-601.
- Bosch J, Paige MH, Vaidya AB, Bergman LW, Hol WG. Crystal structure of GAP50, the anchor of the invasion machinery in the inner membrane complex of *Plasmodium falciparum*. *J Struct Biol.* 2012 Apr;178(1):61-73.
- Daher W, Browaeys E, Pierrot C, Jouin H, Dive D, Meurice E, et al. 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.* 2006 May;60(3):578-90.
- Daher W, Oria G, Fauquenoy S, Cailliau K, Browaeys E, Tomavo S, et al. A *Toxoplasma gondii* leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity. *Eukaryot Cell.* 2007 Sep;6(9):1606-17.
- Dluzewski AR, Garcia CR. Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* by kinase inhibitors. *Experientia.* 1996 Jun 15;52(6):621-3.
- Dobson S, Kar B, Kumar R, Adams B, Barik S. A novel tetratricopeptide repeat (TPR) containing PP5 serine/threonine protein phosphatase in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *BMC Microbiol.* 2001;1:31.
- Dobson S, Kumar R, Bracchi-Ricard V, Freeman S, Al-Murrani SW, Johnson C, et al. Characterization of a unique aspartate-rich protein of the SET/TAF-family in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, which inhibits protein phosphatase 2A. *Mol Biochem Parasitol.* 2003 Feb;126(2):239-50.
- Dobson S, May T, Berriman M, Del Vecchio C, Fairlamb AH, Chakrabarti D, et al. Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin-cyclosporin complex. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Apr 30;99(2):167-81.
- Fernandez-Pol S, Slouka Z, Bhattacharjee S, Fedotova Y, Freed S, An X, et al. A bacterial phosphatase-like enzyme of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses tyrosine phosphatase activity and is implicated in the regulation of band 3 dynamics during parasite invasion. *Eukaryot Cell.* 2013 Sep;12(9):1179-91.
- Freville A, Cailliau-Maggio K, Pierrot C, Tellier G, Kalamou H, Lafitte S, et al. *Plasmodium falciparum* encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1: perspectives for novel anti-plasmodial therapy. *BMC Biol.* 2013;11:80.
- Freville A, Landrieu I, Garcia-Gimeno MA, Vicogne J, Montbarbon M, Bertin B, et al. *Plasmodium falciparum* inhibitor-3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival. *J Biol Chem.* 2012 Jan 6;287(2):1306-21.
- Guttery DS, Poulin B, Ferguson DJ, Szoor B, Wickstead B, Carroll PL, et al. A unique protein phosphatase with kelch-like domains (PPKL) in *Plasmodium* modulates ookinete differentiation, motility and invasion. *PLoS Pathog.* 2012 Sep;8(9):e1002948.
- Hills T, Srivastava A, Ayi K, Wernimont AK, Kain K, Waters AP, et al. Characterization of a new phosphatase from *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol.* 2011 Oct;179(2):69-79.
- Kong M, Ditsworth D, Lindsten T, Thompson CB. Alpha4 is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Mol Cell.* 2009 Oct 9;36(1):51-60.

- Kremmer E, Ohst K, Kiefer J, Brewis N, Walter G. Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol Cell Biol*. 1997 Mar;17(3):1692-701.
- Kumar R, Adams B, Oldenburg A, Musiyenko A, Barik S. 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*. 2002 Apr 26;1:5.
- Kumar R, Musiyenko A, Barik S. *Plasmodium falciparum* calcineurin and its association with heat shock protein 90: mechanisms for the antimalarial activity of cyclosporin A and synergism with geldanamycin. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 May;141(1):29-37.
- Kumar R, Musiyenko A, Cioffi E, Oldenburg A, Adams B, Bitko V, et al. A zinc-binding dual-specificity YVH1 phosphatase in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, and its interaction with the nuclear protein, pescadillo. *Mol Biochem Parasitol*. 2004a Feb;133(2):297-310.
- Kumar R, Musiyenko A, Oldenburg A, Adams B, Barik S. Post-translational generation of constitutively active cores from larger phosphatases in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for proteomics. *BMC Mol Biol*. 2004b Jul 1;5:6.
- Kutuzov MA, Andreeva AV. Protein Ser/Thr phosphatases of parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Oct;161(2):81-90.
- Li JL, Baker DA. Protein phosphatase beta, a putative type-2A protein phosphatase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem*. 1997 Oct 1;249(1):98-106.
- Li JL, Baker DA. A putative protein serine/threonine phosphatase from *Plasmodium falciparum* contains a large N-terminal extension and five unique inserts in the catalytic domain. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Sep 15;95(2):287-95.
- Lindenthal C, Klinkert MQ. Identification and biochemical characterisation of a protein phosphatase 5 homologue from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002 Apr 9;120(2):257-68.
- Mamoun CB, Goldberg DE. *Plasmodium* protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1beta and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity *in vitro*. *Mol Microbiol*. 2001 Feb;39(4):973-81.
- Mamoun CB, Sullivan DJ, Jr., Banerjee R, Goldberg DE. Identification and characterization of an unusual double serine/threonine protein phosphatase 2C in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 1998 May 1;273(18):11241-7.
- McLennan AG, Cartwright JL, Gasmi L. The human NUDT family of nucleotide hydrolases. Enzymes of diverse substrate specificity. *Adv Exp Med Biol*. 2000;486:115-8.
- Muller IB, Knockel J, Eschbach ML, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. Secretion of an acid phosphatase provides a possible mechanism to acquire host nutrients by *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol*. 2010 May 1;12(5):677-91.
- Ohkura H, Yanagida M. *S. pombe* gene sds22+ essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1. *Cell*. 1991;64(1):149-57.
- Pace T, Birago C, Janse CJ, Picci L, Ponzi M. Developmental regulation of a *Plasmodium* gene involves the generation of stage-specific 5' untranslated sequences. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Nov 30;97(1-2):45-53.

- Patzewitz EM, Guttery DS, Poulin B, Ramakrishnan C, Ferguson DJ, Wall RJ, et al. An ancient protein phosphatase, SHLP1, is critical to microneme development in *Plasmodium* ookinetes and parasite transmission. *Cell Rep*. 2013 Mar 28;3(3):622-9.
- Pendyala PR, Ayong L, Eatrides J, Schreiber M, Pham C, Chakrabarti R, et al. Characterization of a PRL protein tyrosine phosphatase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Mar;158(1):1-10.
- Philip N, Vaikkinen HJ, Tetley L, Waters AP. A unique Kelch domain phosphatase in *Plasmodium* regulates ookinete morphology, motility and invasion. *PLoS One*. 2012;7(9):e44617.
- Pino P, Sebastian S, Kim EA, Bush E, Brochet M, Volkmann K, et al. A tetracycline-repressible transactivator system to study essential genes in malaria parasites. *Cell Host Microbe*. 2012 Dec 13;12(6):824-34.
- Sents W, Ivanova E, Lambrecht C, Haesen D, Janssens V. The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS J*. 2012 Mar 24.
- Sigal YJ, McDermott MI, Morris AJ. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J*. 2005 Apr 15;387(Pt 2):281-93.
- Singh M, Mukherjee P, Narayanasamy K, Arora R, Sen SD, Gupta S, et al. Proteome analysis of *Plasmodium falciparum* extracellular secretory antigens at asexual blood stages reveals a cohort of proteins with possible roles in immune modulation and signaling. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Sep;8(9):2102-18.
- Singh S, More KR, Chitnis CE. Role of calcineurin and actin dynamics in regulated secretion of microneme proteins in *Plasmodium falciparum* merozoites during erythrocyte invasion. *Cell Microbiol*. 2013 Aug 5.
- Siribal S, Weinfeld M, Karimi-Busheri F, Mark Glover JN, Bernstein NK, Aceytuno D, et al. Molecular characterization of *Plasmodium falciparum* putative polynucleotide kinase/phosphatase. *Mol Biochem Parasitol*. 2011 Nov;180(1):1-7.
- Solyakov L, Halbert J, Alam MM, Semblat JP, Dorin-Semblat D, Reininger L, et al. Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun*. 2011;2:565.
- Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science*. 2011 Apr 1;332(6025):91-4.
- Ward GE, Fujioka H, Aikawa M, Miller LH. Staurosporine inhibits invasion of erythrocytes by malarial merozoites. *Exp Parasitol*. 1994 Nov;79(3):480-7.
- Wilkes JM, Doerig C. The protein-phosphatome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*. 2008;9:412.
- Yeoman JA, Hanssen E, Maier AG, Klonis N, Maco B, Baum J, et al. Tracking Glideosome-associated protein 50 reveals the development and organization of the inner membrane complex of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell*. 2011 Apr;10(4):556-64.
- Yokoyama D, Saito-Ito A, Asao N, Tanabe K, Yamamoto M, Matsumura T. Modulation of the growth of *Plasmodium falciparum* *in vitro* by protein serine/threonine phosphatase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jun 9;247(1):18-23.

ANNEXE 2

Curriculum Vitae Audrey VANDOMME

Audrey VANDOMME

Tel : +33 (0)6 75 41 24 31

Mail : audrey.vandomme86@laposte.net

Research Fields

Infectious Diseases, Parasitology, Malaria, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium falciparum* development, Phosphatases, Phosphatases regulatory activity, Protein-protein interaction

Scholastics

- 2014 **Last year of preparation of Doctorat of Philosophy (Parasitology)** from University of Lille Nord de France, Center of Infection and Immunology of Lille (CIIL), CNRS-UMR8204 Inserm unit U1019, team 2, Institut Pasteur of Lille, Lille, France. Supervisor: Dr Christine Pierrot.
- 2010 **Master of Sciences (Honors) (Microbiology and Genetic)** from University of Lille Nord de France, Center of Infection and Immunology of Lille (CIIL), CNRS-UMR8204 Inserm unit U1019, team 2, Institut Pasteur of Lille, Lille, France.
Supervisor: Dr Jamal Khalife and Dr Christine Pierrot.
- 2008 **Bachelor of Sciences (Honors) (Cell Biology and Physiology)** from University of Lille Nord de France (Lille 1).

Research projects

Ph.D Research

Project: *Functional characterization of the PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator (PTPA) in Protein Phosphatase 2A and Protein Phosphatase 1 regulation.*

Duration: 3 years 1/2 (2010-2014)

M.Sc Research

Project: *Role of CD24+ cells in susceptibility/resistance of rats in Plasmodium berghei infection.*

Duration: 1 year (2009-2010)

Technical skills

Molecular Biology

DNA and RNA extraction, PCR, RT-PCR, qPCR, PCR-based site directed mutagenesis, Molecular cloning.

Proteins:

Expression of recombinant proteins using several bacterial systems and expression vectors (pQE-30 (*E.coli* M15), pETDUET (*E.Coli* BL21), pGEX (*E.Coli* JM109), proteins purification (using nickel-NTA resin column, ion exchange column or glutathione agarose beads/ Biolabs biologic chromatography), protein analysis (Western-blot, Immunoprecipitation).

Proteins Interaction studies:

Yeast two hybrid Assay, Pull Down Assay, Co-Immunoprecipitation

P. falciparum manipulations:

Plasmodium falciparum culture, Synchronization (sorbitol treatment), Extraction (saponin treatment), Purification of infected red blood cell (percoll-sorbitol density gradient procedures), Transfection of *P.falciparum* by electroporation, Genetic manipulations (Knock-in (pCAM-BSD), Knock-out (pCAM-BSD-2HA), Episomal expression of *P.falciparum* proteins (pARL2)

P. berghei manipulations:

Plasmodium berghei culture, Animals infection, Purification of schizont by Nycodenz gradient, Transfection of *P. berghei* by electroporation, Genetic manipulation: conditional knock-out

Cellular biology:

Cell culture (Raw 264.7 cells, [Drosophila Schneider 2 \(S2\) Cells](#)), Cytokine dosage, Cell population isolation, Flow cytometry

Computing: Expertise in software applications: Word, Excel, Power-point, EndNote, DNASTar, BioEdit, PyMol, GraphPad.

Seminars, Conferences and Presentations

Poster Presentations

- April 8-11, 2013 “Functional studies of the Protein Phosphatase 2A (PP2A) regulation by PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator (PTPA) in Plasmodium falciparum” at the Annual Spring Meeting of the British Society for Parasitology, University of Bristol, Bristol, UK.
- September 11, 2012 “Functional studies of the Protein Phosphatase 2A (PP2A) regulation by PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator (PTPA) in Plasmodium falciparum” at the annual symposium of graduate and post graduate students of the University of Lille Nord de France (Journée André Verbert), Lille, FRANCE.

Research Publications

- Vandomme Audrey, Freville Aline, Cailliau Katia, Kalamou Hadidjatou, Bodart Jean-François, Khalife Jamal and Pierrot Christine. 2014. *PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator of Plasmodium falciparum: Identification of its residues involved in binding to and activation of PP2A*. Int J Mol Sci. 2014
- Pierrot Christine, Acroute dit Vampouille Aurore, Vandomme Audrey, Lafitte Sophia, Pierce Raymond, Hot David and Khalife Jamal. 2011. *Gene profiling analysis reveals the contribution of CD24 and P2Y6R to the susceptibility of young rats to Plasmodium berghei infection*. Cell Microbiol. 2011, May 13; (5):752-63.
- Khalife Jamal, Freville Aline, Vandomme Audrey, and Pierrot Christine (in press) *Phosphatases*. in Encyclopedia of Malaria (Hommel, M., and Kremsner, P. G. eds.), Springer
- Fréville Aline, Tellier Géraldine, Vandomme Audrey, Vicogne Jérôme, Cantrelle François-Xavier, Martoriati Alain, Caillau-Maggio Katia, Pierrot Christine, Bodart Jean-François, Khalife Jamal and Landrieu Isabelle. *Identification of a Plasmodium falciparum inhibitor 2 motif involved in binding and regulation activity of the protein phosphatase type 1*. (Submitted in FEBS J)

Languages

French (Mother tongue)

English

Personal dossier

Nationality French
Date of birth 8th September, 1986
Address rue Paul HAZARD
59280 ARMENTIERES, FRANCE
Sex Female
Email audrey.vandomme86@laposte.net

References

1. Dr Christine Pierrot, Chargé de recherche Pasteur, CILL, Inserm1019-CNRS UMR8204, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille. 1, Rue du prof. Calmette. 59019- Lille Cedex. France. Tel : +33(0)320877968. E-mail : christine.pierrot@pasteur-lille.fr
2. Dr Jamal Khalife, Directeur de Recherche CNRS, CILL, Inserm1019-CNRS UMR8204, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille. 1, Rue du prof. Calmette. 59019- Lille Cedex. France. Tel : 0033(0)320877968. E-mail : jamal.khalife@pasteur-lille.fr

