

Caractérisation de transporteurs membranaires de *Plasmodium falciparum* en tant que potentiel cibles thérapeutiques

Résumé en Français

Le paludisme

Le paludisme est une maladie infectieuse à transmission vectorielle causée par un parasite du genre *Plasmodium*. Il est couramment transmis par une piqûre d'un moustique anophèle femelle infecté, qui introduit des parasites dans le sang d'un hôte humain. Le paludisme est une maladie potentiellement mortelle, et la moitié de la population mondiale est à risque de contracter le paludisme (World Health Organization, 2013a)

Le paludisme est endémique à partir de 99 pays d'Europe centrale et d'Amérique du Sud, l'Afrique sub-saharienne et en Asie du Sud-est (Heppner, 2013; World Health Organization, 2013b) (**Error! Reference source not found.**). Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) en 2012, il était estimé à 627 000 décès liés au paludisme, d'environ 207 millions de personnes infectées (World Health Organization, 2013b).

Le paludisme est souvent associé à la pauvreté, mais il est également cause de pauvreté, et est un important frein au développement économique. Bien que cette maladie soit endémique des régions tropicales, elle peut infecter des voyageurs en provenance des pays développés, ce qui affecte les gens dans le monde entier, au-delà des frontières.

La pauvreté, les questions politiques, la migration de la population, une mauvaise alimentation et de haute contrefaçon de médicaments antipaludiques (jusqu'à 40% des médicaments contre le paludisme à base d'artésunate sont contrefaits en Asie (Parry, 2005)), l'accès hétérogène aux installations de santé de qualité, culturelle et religieuse croît, tous ces éléments sont des facteurs importants qui contribuent à la charge de la maladie et de la difficulté de l'éradication du paludisme, en particulier en Afrique (Heppner, 2013).

Le paludisme touche plus durement les jeunes enfants et les femmes dans leur première grossesse. Provoquant des dommages cognitifs à long terme chez les enfants atteints par le paludisme cérébral et le paludisme de la mère pendant la grossesse, affecte toute la vie de l'enfant à naître. La prévention du paludisme placentaire chez premières femmes de la grossesse empêcherait l'une des grandes causes du paludisme liés mort et la naissance d'enfants à faible poids de l'Afrique sub-saharienne.

Plasmodium est un grand genre de parasites unicellulaires eucaryotes, aussi appelé protozoaires. Cinq espèces de *Plasmodium* peut infecter les humains: *P. falciparum* est l'espèce la plus fréquente qui infectent les humains et est responsable de la forme la plus grave de paludisme ; *P. vivax* et *P. ovale* peuvent donner origine a des formes dormantes dans le foie (hypnozoïtes) et la maladie peut rechuter plusieurs mois ou même des années après l'infection, devenant chronique ; *P. malariae* et *P. knowlesi* sont moins fréquentent.

Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum* implique deux hôtes: un vecteur de moustique femelle Anophèles genre et un humain (Figure 2). Plus de 30 espèces de moustiques anophèles sont connus pour transmettre le paludisme humain. Le cycle de vie passe par plusieurs stades : A) Infection et cycle hépatiques humain; B) cycle érythrocytaire ; C) cycle sexué dans le moustique.

Symptômes

Les stades hépatiques de réplication *Plasmodium* sont asymptomatiques. Le paludisme se manifeste au cours du cycle érythrocytaire du parasite. Les symptômes sont les suivants: fatigue généralisée, une perte d'appétit, des étourdissements, des maux de tête intenses, troubles digestifs (maux d'estomac), des nausées, des vomissements, des douleurs articulaires, des douleurs abdominales, de la diarrhée, des douleurs musculaires diffuses. Les signes cliniques sont caractérisés par: l'anémie, les fièvres cycliques violents avec des frissons intermittents (toutes les 48h, 72h pour les infections à *P. malariae*, transpiration excessive, des convulsions, hémoglobinurie (sang dans les urines), ictère, hypoglycémie, une splénomégalie et une hépatomégalie (rate et du foie, respectivement). Plusieurs de ces symptômes ne sont pas spécifiques et souvent un diagnostic erroné devient un problème majeur dans le traitement du paludisme.

La forme grave de paludisme apparaît 6 - 14 jours après l'infection et est presque exclusivement due à une infection à *P. falciparum* (Trampuz et al, 2003.). Cette forme de la maladie peut entraîner le coma et la mort. Les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables. Il commence par des maux de tête graves et une ischémie cérébrale alors lieu. Chez les enfants, le paludisme cérébral est caractérisé par une posture anormale de la moelle épinière dans une position (position d'opisthotonos) cambrant en arrière. Le paludisme grave peut progresser très rapidement, en quelques jours, voire quelques heures (Trampuz et al., 2003). Un diagnostic rapide et fiable est extrêmement important d'éviter ces cas.

Dans de nombreuses régions d'endémie un simple test de laboratoire n'est pas possible. La périodicité des fièvres est souvent utilisée comme diagnostic, bien que cette méthode ne soit pas infaillible. Dans les régions endémiques ont été antipaludiques sont largement utilisés soit en prophylaxie ou le traitement du paludisme, l'évolution des symptômes n'est pas la même que celle décrite ci-dessus, souvent les périodes de fièvre violents rythmiques sont absents. Le paludisme est souvent mal diagnostiqué surtout chez les enfants, ce qui conduit à un traitement non adapté.

La méthode de diagnostic la plus efficace et la moins chère est encore l'observation au microscope d'un frottis sanguin ou une goutte de sang épais. Il existe aussi des Test de Diagnostic Rapide (TDR) qui sont conçus pour être simple à utiliser, avec peu de formation nécessaire du personnel de soins de santé et aucune infrastructure particulière nécessaire (voir encadré 1).

Prévention et traitements

Les mesures de prévention du paludisme sont le moyen le plus précieux pour contrôler la propagation de la maladie. Ces mesures ont entraîné une baisse drastique de nouveaux cas de paludisme depuis le début du 20ème siècle, quand il était présent en Europe du Sud et les Etats-Unis (Figure 3).

Avec les nouvelles mesures de prévention mises en œuvre par l'OMS, la mortalité du paludisme a été considérablement diminuée dans le monde de 42% depuis 2000, les objectifs de prévention de l'OMS sont les suivants: i) la couverture de 100% de la population avec des filets imprégnés d'insecticide de longue durée (ITN) , ii) la pulvérisation à effet rémanent (IRS) (voir encadré 2), iii) la protection des personnes par les insectifuges et les vêtements d'insectifuge, iv) la prophylaxie du paludisme pour les voyageurs, v) et la recherche de vaccins, ainsi que le contrôle régulier de la population et fournir des traitements aux personnes infectées.

Les vaccins sont le moyen le plus rentable de contrôler et de prévenir une maladie. Jusqu'à présent, un vaccin n'a jamais été produit contre un parasite. Il est particulièrement difficile de produire un vaccin contre le paludisme parce que ce parasite présente: i) des antigènes de surface variables; ii) de la variabilité génétique et un cycle de vie complexe (plusieurs étages et multi-antigène); iii) un taux de réplication élevé; et l'évolution rapide d'une stratégie d'échappement au système immunitaire par le parasite (Takala et Plowe, 2009; Takala et al, 2009; Weedall et Conway, 2010).

Le vaccin recombinant le plus récent RTS, S / AS01 est le candidat le plus avancé qui a terminé la phase III d'essais cliniques en 2011, le vaccin devrait être disponible prochainement et sera utilisé en plus des mesures de prévention, de diagnostic et de traitement traditionnels. L'efficacité estimée pour les enfants de 5 à 17 mois d'âge est de 55% de réduction des épisodes de paludisme au cours des 12 premiers mois, et 47% d'efficacité contre le paludisme sévère. 18 mois après la vaccination diminue l'efficacité de 46% et 35,5%, respectivement. Pour les enfants âgés de 6 - 14 semaines, le vaccin est moins efficace, la réduction des cas de seulement 25% (Agnandji et al, 2011, 2012; Régules et al, 2011; Riley et Stewart, 2013; World Health Organization, 2013c). Bien que l'efficacité et la durée de la protection est limitée, il est aujourd'hui le meilleur candidat. Le RTS, S / AS01 (nom commercial: Mosquirix) sera disponible pour les pays africains sans but lucratif car il fait partie du projet d'éradication du paludisme. Il sera disponible en 2015, en ce qui concerne l'approbation des gouvernements africains. Un candidat de deuxième génération qui présenterait une prévention des épisodes cliniques de paludisme à 80% serait envisagé pour 2025 (Heppner, 2013;. Heppner et al, 2005; Riley et Stewart, 2013; Vannice et al, 2012). www.malariavaccine.org.

Le traitement des personnes malades continues à être fait grâce à des molécules antipaludiques. Les médicaments disponibles à l'heure actuelle peuvent être divisés en trois grandes catégories: quinoléines et dérivés (inhibiteurs de hémozoïne), combinaisons d'antifoliques, l'artémisinine et ses dérivés (lactones sesquiterpéniques) (Grimberg et Mehlotra, 2011) (tableau 3, figure 6). Peu de ces médicaments possèdent une cible identifiée et pour la plus part des parasites résistants ont déjà été décrits (Figure 7).

L'artémisinine

L'artémisinine appartient à une classe unique de médicaments antipaludiques. Se sont des lactones sesquiterpéniques de trioxanes, et l'activité antipaludique est dû à la présence d'un pont endoperoxyde (Figure 11 A) (White, 2008b). L'artémisinine (ou Qinghaosu) a été découvert par Youyou Tu et son équipe au titre du projet 523 du gouvernement chinois créé pour aider les Nord-Vietnamiens lutte contre le paludisme pendant la guerre contre les États-Unis. De la médecine traditionnelle chinoise un candidat se distingue: la plante chinoise Qing Hao ou armoise annuelle

(*Artemisia annua*, Figure 11 B), qui a été utilisé pendant des siècles pour guérir plusieurs maladies telles que les fièvres élevées (Cui et Su, 2009; Hsu, 2006a , 2006b; Klayman, 1985). Depuis 2001, l'OMS recommande l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) comme traitement de première ligne contre le paludisme.

L'artémisinine présente une faible biodisponibilité limiter son efficacité, qui est soluble ni dans l'eau ni dans l'huile et ne peut donc être administrée par voie orale (Kamchonwongpaisan et Meshnick, 1996), donc plusieurs dérivés semi-synthétiques ont été créés (Figure 6). Les dérivés semi-synthétiques les plus répandues de l'artémisinine sont: l'artésunate, artéméther, β -artéether, et dihydroartémisinine. Dihydroartémisinine est le métabolite bioactif de tous les dérivés de l'artémisinine et le dérivé le plus puissant. La deoxyartémisinine est un dérivé biologiquement inactif dans laquelle le pont endoperoxyde a été remplacé par un oxygène.

Le mécanisme d'action de ces médicaments est très controversée et reste incertaine, mais plusieurs hypothèses ont été formulées (Grimberg et Mehlotra, 2011). La connaissance de la cible de l'artémisinine est très importante pour être en mesure de prévoir et de contrer les résistances émergentes. De nombreux mécanismes potentiels ont été suggérés qui ont donné le nom de "balle magique" à l'artémisinine (Ding et al., 2011) (Figure 12) :

- Génération de radicaux libres
- Interférence avec la voie de désintoxication de l'hème
- Alkylation de protéines
- Interférence avec la chaîne de transport d'électrons des mitochondries
- interférence avec le système immunitaire
- Inhibition de l'angiogenèse
- inhibition de la calcium ATPase sarco / endoplasmique (PfATP6)

Recherche de nouveaux antipaludiques

Le paludisme a menacé l'humanité depuis des milliers d'années. Même si les initiatives de prévention ont beaucoup diminué le nombre de cas de paludisme, il est toujours essentiel de développer des traitements pour les personnes infectées (en particulier les enfants et les femmes enceintes) et, avec l'émergence de résistance à l'artémisinine, nouveaux antipaludiques sont nécessaires d'urgence (Wells et le sondage , 2010). La plupart des antipaludiques puissants que nous utilisons de nos jours n'ont pas été élaboré avec une cible spécifique de médicament, mais à la place ont été trouvés à partir de produits naturels qui ont présenté une activité antipaludique (quinine et l'artémisinine), ou des dérivés semi-synthétiques (chloroquine et artésunate), ou même active contre d'autres agents pathogènes (antifolates et tétracycline).

Principalement deux approches globales ont été définies pour la recherche antipaludique:

- Le criblage de molécules issues de chimiothèques soit sur une voie phénotypique, c'est à dire par détermination de l'effet de composés directement sur des cultures *in vitro* de *Plasmodium* (approche sur cellules entières) (tableau 4);

- La recherche de molécules inhibitrices qui agissent sur l'activité biochimique d'une cible thérapeutique identifiée qui peut être une enzyme ou une voie essentielle, idéalement spécifique au parasite (approche sur cible) (Chatterjee et Yeung, 2012) (tableau 4);

Depuis 1996, aucun nouvel antipaludique n'a été introduit dans la pratique clinique. Cependant, récemment, de trois nouveaux médicaments ont été découverts et sont actuellement en phase II d'essais cliniques (Charman et al., 2011). L'un d'eux, le peroxyde entièrement synthétique, issu d'une série d'ozonides appelle trioxolane OZ439 (Buckner et al., 2012). Cette molécule est active sur les parasites au nanomolaire et ont une longue demi-vie, sont bien toléré et peuvent être administré par une unique dose orale (Charman et al, 2011;.. Mäser et al, 2012). L'autre molécule a été identifiée avec l'approche sur cellules entières à partir d'une bibliothèque de produits naturels et de composés synthétiques et est nommé NITD609, ou spiroindolones. Elle est active à la gamme nanomolaire, peut être administré par voie orale, et ne présente ni cardiotoxicité ni génotoxicité. L'ATPase de type-P PfATP4 a été décrite comme cible basées sur des études d'induction de résistances par ce composé, bien que le mécanisme d'action exact reste inconnu (Chatterjee et Yeung, 2012; Rottmann et al, 2010;. Spillman et al, 2013.; Mäser et al., 2012). AN3661 est un autre candidat à antipaludiques puissants développés par Ancor Pharmaceuticals qui est actif à la gamme nanomolaire (tableau 6) (Buckner et al., 2012).

Transporteurs Membranaires de Plasmodium en tant que potentielles cibles antipaludiques

L'érythrocyte infecté par *Plasmodium* est composé d'une multitude de membranes et de compartiments cellulaires. Le parasite exprime plusieurs protéines transmembranaires qui jouent des rôles clés dans le mouvement et en solutés entre le parasite et la membrane des érythrocytes, et ces protéines sont aussi impliquées dans les mécanismes de résistance. Ces membranes sont: la membrane des érythrocytes du plasma infecté; membrane du parasite du plasma; Le noyau du parasite; réticulum endoplasmique du parasite; L'appareil de Golgi du parasite; la membrane vacuolaire parasitophore; la grande vacuole digestive acide et les petites acidocalcisomes; la double membrane mitochondriale du parasite; la vacuole digestive; et enfin l'apicoplaste limitée par quatre membranes (Figure 14). Comme le parasite n'est pas en contact direct avec le cytosol de l'érythrocyte, la seule façon de s'assurer ion essentiel et l'absorption des nutriments, ainsi que l'évacuation des déchets métaboliques, est par le contrôle de la localisation de pompes. Les ATPases de type P sont indispensables pour ce rôle et le génome de *P. falciparum* code pour 13 de ces prédites ATPases (Martin et al., 2009).

Après l'invasion du globule rouge par le parasite passé, une augmentation de la perméabilité des érythrocytes a lieu par l'expression de canaux et de pompes par la cellules hôte et le parasite, pour permettre l'entrée de nutriments essentiels de parasites, la régulation de l'homéostasie ionique, et la médiation efflux des déchets métaboliques (par exemple, l'acide lactique) (Becker et Kirk, 2004;. Grellier et al, 2012;. Martin et al, 2009;. Staines et al, 2010), créant ainsi de «nouvelles voies de perméabilité» (les centrales nucléaires). Certains transporteurs sont déjà connus pour jouer un rôle important dans la résistance aux antipaludiques ou la sensibilité aux médicaments. A ce jour, 100 séquences de putatifs transporteurs ont été annotées dans le génome de *P. falciparum* (Martin et al.,

2005). Cette collection a été nommée Plasmodium "permeome" (Figure 15) (Martin et al, 2005, 2009;. Staines et al, 2010.). Les transporteurs sont largement étudiés comme cibles potentielles de médicaments. La localisation cellulaire de certains de ces transporteurs est connue, mais les protéines membranaires sont difficiles à localiser (figure 15).

Pour leur implication dans des rôles physiologiques importants et dans plusieurs maladies (voir l'exemple des pompes SERCA), des protéines membranaires Plasmodium ont été étudiées comme potentielles cibles thérapeutiques.

Généralités sur les ATPases membranaires

Les ATPases membranaires sont une classe de protéines transmembranaires responsables pour le transport d'affinité des ions inorganiques et solutés organiques, l'énergie nécessaire étant fournie par hydrolyse de l'ATP. Il existe trois catégories fonctionnelles des ATPases ioniques: i) ATPases de type F-, de type V-ATPase et ATPases de type p; et un transporteur non ionique: transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) (Møller et al, 2010; Pedersen, 2007; Shechter et Rossignol, 1997).

Les ATPases de type P sont des protéines membranaires qui, au cours de leur cycle d'activité forme une protéine phosphorylée intermédiaire (Møller et al, 2010;. Shechter et Rossignol, 1997). Dans cette catégorie sont inclus les: Na^+ / K^+ ATPase, H^+ ATPases, H^+ / K^+ ATPase, ATPases responsables pour le transport des dits métaux "lourds", Ca^{2+} ATPases.

Généralités sur les calcium ATPases

Le calcium est le messager secondaire le plus important et polyvalent. Le calcium ne traduit pas directement le signal, mais il est transmis par des protéines qui se lient aux ions Ca^{2+} et ensuite déclenchent la voie de signalisation. Les cellules utilisent son énergie de liaison pour la transduction du signal et également de déclencher des changements de conformation de protéines et de modifier des champs électrostatiques locaux (Clapham, 2007). Le calcium est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que la neurotransmission, l'immunité, la signalisation cellulaire, la fécondation, l'apoptose, la transcription du gène, la contraction musculaire, la sortie, l'invasion des cellules, le développement intracellulaire, la motilité, la sécrétion, et la production de combustibles à plusieurs voies métaboliques. Les organismes sont toujours avidement tentent de prendre en calcium du cytosol car il précipite des groupes phosphate et en présence de sa haute concentration devient très toxique. Comme le calcium est si important dans les processus cellulaires, la concentration de cet ion est crucial et doit être étroitement régulée (Brini et Carafoli, 2009; Carafoli, 2002, 2005). Trois grandes classes de pompes à calcium ont été décrites chez les animaux supérieurs et sont situés dans le: réticulum sarco-endoplasmique et dans le prolongement de l'enveloppe nucléaire (SERCA), le réseau de Golgi (SPCA) et la membrane plasmique (PMCA) (voir Figure 17).

Le calcium a été montré pour être essentiel à plusieurs stades de développement de *Plasmodium*, mais sa régulation est mal comprise. Après l'invasion, une augmentation importante de la concentration de Ca^{2+} se produit (Luo et al, 2005;. Plattner et al, 2012.) et le blocage de l'influx de calcium inhibe la croissance des parasites (Krogstad et al., 1991). La vacuole digestive et le réticulum

endoplasmique (RE) sont des réserves internes de Ca^{2+} . L'homéostasie du calcium est assurée par (Plattner et al, 2012.): SERCA; les transporteurs ATPase de la membrane plasmique liées (PTM); trois ATPases situées dans le réticulum endoplasmique de Golgi; et un échangeur unique + Ca^{2+} + / H (PfCAX) (Nagamune et Sibley, 2006).

Pompes SERCA

SERCA est un transporteur chargé de retirer le calcium du cytosol et le stocker dans le réticulum sarcoplasmique, ce qui permet la détente rapide du muscle après la contraction. SERCA est spécifiquement inhibée par la thapsigargine, un sesquiterpène lactone; par l'acide cyclopiazonique (CPA); et par le 2,5-di-tert-butylhydroquinone (BHQ). Le transport de calcium est obtenu par un cycle étroitement régulé qui entraîne la transformation de l'énergie chimique d'un intermédiaire phosphorylée dans un transport actif des cations (Møller et al., 2010) (figure 18). SERCA1a du réticulum sarcoplasmique de lapin (SR), a été largement étudiée en raison de la facilité de préparation directement du muscle squelettique de lapin. La structure 3D cristallographique de cette protéine a été le premier P-ATPase résolu (Nomura et Toyoshima, 2002; Toyoshima et al, 2000.). En 2005, l'expression de lapin SERCA1a dans la levure et sa purification a conduit à la cristallisation de cette protéine (Figure 19) (Jidenko et al., 2005). La SERCA est structurellement divisée en quatre domaines importants, un domaine membranaires et trois domaines cytosoliques qui sont: le (N) domaine de liaison des nucléotides, le domaine de phosphorylation (P), et le domaine actionneur (A) (Figure 18 et Figure 19). Le domaine membranaire (M) est constitué de 10 domaines transmembranaires (M1-M10), incorporés dans la bicouche lipidique.

Les pompes SERCA ont été décrites pour être impliquées dans plusieurs maladies. Deux maladies génétiques humaines liées à des mutations dans les pompes SERCA ont été définies: la maladie de Brody (condition musculaire récessive rare caractérisée par une altération de la détente musculaire, des crampes et la raideur exercice suivant) et la maladie de Darier (maladie autosomique dominante rare de la peau défini par une perte d'adhérence entre les cellules épidermiques et une kératinisation anormale, papules kératosiques dans les zones séborrhéique et de flexion de la peau). Aussi, une diminution de l'expression ou des mutations dans les gènes SERCA conduisent à des maladies cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque et des cardiomyopathies (Kranias et Bers, 2007). Des mutations dans SERCA sont également impliqués dans le diabète de type II (Varadi et al, 1999.) Et le cancer (Monteith et al., 2007). Dans le cancer, d'autres mécanismes pourraient être impliqués tels que le dysfonctionnement de SERCA qui mène à l'homéostasie du calcium déréglementé déclenchement prolifération cellulaire anormale (Brini et Carafoli, 2009;. Monteith et al, 2007).

La thapsigargine a été proposé comme traitement pour le cancer de la prostate, administré comme un pro médicament inactif qui serait activé dans certaines cellules cancéreuses. En fait, les cellules cancéreuses de la prostate sont connus pour la production d'une protéase de sérine-thréonine qui est utilisé pour activer cette pro drogue (Denmeade et al., 2012). La curcumine, un inhibiteur de la SERCA à faible toxicité, est également fait en phase II des essais cliniques comme traitement pour le cancer (Anand et al, 2008;. Dhillon et al, 2008.).

PfATP6

PfATP6 est la seule SERCA de *Plasmodium falciparum* décrite (Kimura et al., 1993). Elle est localisée sur le réticulum endoplasmique de la parasite qui est responsable du transport des ions Ca^{2+} à partir du cytosol vers le réticulum endoplasmique. PfATP6 protéine a une masse moléculaire de 139,4 kDa, avec 10 domaines transmembranaires putatifs et les domaines catalytiques cytosoliques caractéristiques d'une protéine de SERCA. Il (Figure 21) (Arnou et al, 2011;. Cardi et al, 2010a.). Les principales différences entre PfATP6 et tous les autres SERCAs sont principalement localisées dans le domaine N, tournée vers le côté cytoplasmique du réticulum endoplasmique (Dahlström et al, 2008;. Jambou et al, 2010;. Tanabe et al, 2004.) (Figure 21). Ce domaine a 200 résidus supplémentaires que SERCA1a et une quantité anormale de motifs poly-asparagine, par rapport à d'autres eucaryotes, et celles-ci sont prédits pour former des structures non globulaires (Aravind et al, 2003;.. Arnou et al, 2011) (Figure 21), leur rôle exact étant toujours inconnu. PfATP6 est inhibée par les inhibiteurs classiques de SERCA tels que la thapsigargin, le CPA et le BHQ. CPA a la meilleure affinité pour PfATP6 $\sim 0,4 \mu\text{M}$, puis vient BHQ avec $\sim 65 \mu\text{M}$, et enfin thapsigargin avec plus de $150 \mu\text{M}$ (valeurs IC_{50}) (Arnou et al., 2011).

Depuis 2003, PfATP6 a gagné un grand intérêt de la communauté scientifique quand il a été proposé être la cible directe de l'antipaludique le plus puissant: l'artémisinine (Eckstein-Ludwig et al, 2003). Cette proposition a été basée sur les similitudes structurelles entre la thapsigargin et l'artémisinine. La thapsigargin est également une lactone sesquiterpénique mais cependant elle ne possède pas de liaison peroxyde, responsable de l'activité de l'artémisinine (Figure 22). En exprimant PfATP6 dans des oocytes de *Xenopus laevis*, et en procédant à des mesure d'activités ATPasique, les auteurs ont reportés que PfATP6 était inhibé par l'artémisinine (Eckstein-Ludwig et al., 2003) (Figure 23 et 24). Plus tard, la mutation L263E a été affirmée comme étant responsable de rendre PfATP6 insensible à l'artémisinine, donc L263 serait le seule acide aminés responsable pour l'inhibition de PfATP6 par l'artémisinine (Uhlemann et al., 2005) (Figure 26). La position correspondante dans la SERCA1a de mammifère (E255) quant mutée serait-elle responsable de rendre cette protéine (naturellement insensible) sensible à l'artémisinine (Uhlemann et al., 2005). Quelques années plus tard, l'expression de PfATP6 et de SERCA1a_E255L dans la levure a montré que aucune de ces protéines étaient sensibles à l'artémisinine, et donc PfATP6 ne serait pas la cible directe de cet antipaludiques (Cardi et al., 2010) (Figure 27 et 28).

PfATP6 a été largement séquencé dans les zones ou de la résistance à l'artémisinine a été décrite (Huang et al, 2012 ; Adhin et al, 2012 ; Kamugisha et al, 2012 ; Miao et al, 2013 ; Tanabe et al, 2011, Menemedengue et al, 2011, Phompradit et al, 2011 ; Tahar et al, 2009 ; Chavchich et al, 2010 ; Kwansa-Bentum et al, 2011 ; Imwong et al, 2010 ; Ferreira et al, 2007 ; Noedl et al, 2008 ; Afonso et al 2006 ; Cui er al, 2012 ; Cojean et al, 2006 ; Price et al, 2004 ; Dondorp et al, 2009 ; Zhang et al 2008) et seulement quelques études ont trouvée un liens avec des mutations dans PFATP6 et la résistance à l'artémisinine (Pillai et al, 2012 ; Shahinas et al, 2010 ; Jambou et al, 2005 ; Bacon et al, 2009 ; Legrand et al, 2008 ; Fernández-Martinez et al, 2013), mais aucune n'a trouvé la mutation L263E qui avait été décrite comme étant le seule acide aminés responsable pour l'inhibition de PfATP6 par l'artémisinine (Uhlemann et al, 2005). Finalement PfATP6 a été décrit comme étant un gène extrêmement polymorphe étant difficile de corrélés des mutations dans sa séquence avec la résistance à l'artémisinine (Jambou et al, 2010 ; Tanabe et al, 2011).

PfATP4

PfATP4 a été décrite la première fois comme étant une calcium ATPase localisée sur la membrane plasmique de *P. falciparum*, mais très éloignées des putatifs isoformes de mammifères (Dyer et al, 1996). Après expression dans des ovocytes *X. laevis*, des mesures d'activité ATPasique ont montré que cette activité était dépendante du calcium (Krishna et al, 2001). Cependant, en 2013 il a été démontré qu'il s'agissait en effet d'une sodium ATPase (Spillman et al, 2013). PfATP4 commence à séduire la communauté scientifique parce que cette protéine a été décrite comme étant la cible d'une classe de molécules actuellement en phase IIA d'essais clinique qui pourrait bientôt devenir le prochain puissant antipaludique – les spiroindolones (Rottmann et al, 2010).

PfAdT

Le rôle physiologique des transporteurs d'ADP/ATP (AAC) est d'échanger l'ADP du cytosol avec l'ATP de la mitochondrie. L'AAC bovine a été largement étudiée en raison de son abondance dans les mitochondries cardiaques, étant un transporteur facile à isoler pour des études fonctionnelles et structurales (Pebay-Peyroula et al, 2003;. Ravaud et al, 2012.). La structure cristallographique de l'AAC bovine (Pebay-Peyroula et al., 2003) et, plus récemment, de l'AAC de levure (Ruprecht et al., 2014) sont connus, mais le transporteur humain est encore inconnu. Ces protéines sont spécifiquement inhibées par deux classes de poisons naturels: la atractyloside (ATR) et le carboxyatractyloside (CATR); et l'acide bongkréique (BA) et l'acide isobongkréic (Isoba) (Vignais et Lunardi, 1985;. Vignais et al, 1976).

Un unique résidu d'acide aminé hautement conservé a été décrit pour être responsable pour l'échange de l'ADP et de l'ATP-dépendant du pH -la lysine 22 de l'AAC bovine (K23 dans l'AAC humaine) (Ravaud et al., 2012). Des mutations en K22 ont été montrées responsable pour la suppression de l'activité de l'AAC (Nelson et al, 1993;. Pebay-Peyroula et al, 2003;. Ravaud et al, 2012.). La position correspondante dans le transporteur de *P. falciparum* (PfAdT) est K24 (Figure 31).

L'adénylate translocase mitochondrial de *P. falciparum* (PfAdT) est une protéine transmembranaire de 301 résidus et 33,7 kDa, localisée dans la membrane interne de la mitochondrie (Hatin et Jaureguiberry, 1995). PfAdT est constitué de 6 domaines transmembranaires, et N - et C - régions terminales sont localisées dans la région cytosolique (Brandolin et al, 1989; Hatanaka et al, 1999; Majima et al, 1994; Trézéguet et al, 2000). Il a une forte homologie de 50,3% avec la levure et 61,2% avec les humains (Hatin et Jaureguiberry, 1995). Le résidu Lys24 est très conservé dans les séquences de *Plasmodium* et se situe dans les segments transmembranaires (Hatin et Jaureguiberry, 1995).

PfAdT a déjà été décrit comme étant l'un des transporteurs les plus prometteur comme potentiel ciblant de nouveaux antipaludiques (Staines et al, 2010). PfAdT a été exprimée en souche C43 (DE3) d'*Escherichia coli* qui a également permis la mise en place d'un système de criblage d'inhibiteurs (Razakantoanina et al, 2008.). *E. coli* ne possède pas d'ADP / ATP mitochondrial transporteur, ce qui rend cette cellule un système idéal pour étudier le transport ATP sur sa membrane externe (Haferkamp et al., 2002). En outre, ce transporteur est directement accessible à des inhibiteurs potentiels testés, à la différence de *Plasmodium* où les composés devront traverser plusieurs membranes avant d'atteindre la mitochondrie (Narayanareddy, 1991). L'acide bongkréique inhibe le

transport de l'ATP radiomarqué ($IC_{50} < 1 \text{ M}$), mais le même ne se vérifie pas avec l'atractyloside (Razakantoanina et al., 2008).

Le projet

L'objectif de cette thèse est d'étudier des transporteurs membranaires de *Plasmodium falciparum* en tant que potentiels cibles d'antipaludiques. Dans une première approche nous avons cherché à donner une continuité au travail engagé par Delphine Cardi au cours de sa thèse concernant PfATP6, la SERCA de *P. falciparum*. En parallèle, nous avons tenté de lancer l'étude d'une autre ATPase de type P: PfATP4. Enfin nous avons aussi l'intention de commencer l'étude du transporteur mitochondrial ADP/ATP de *P. falciparum* (PfAdT).

PfATP6 a déjà été exprimée dans la levure et purifiée par Delphine Cardi (Cardi et al., 2010a). Ce projet antérieur a permis la caractérisation fonctionnelle et biochimique de cette Ca^{2+} ATPase. Au cours de ce projet de thèse nous avons cherché à aller plus loin:

1. Dans un premier temps nous voulut optimiser le protocole précédent pour la purification à grande échelle des PfATP6, compatible avec les procédures de dépistage de composés.
2. Nous avons prévu d'établir une collaboration solide entre les trois partenaires spécialisés pour entreprendre une recherche de nouveaux inhibiteurs de PfATP6 et d'évaluer leur activité antiplasmodium.
3. Nous voulions aussi déterminer sur quel stade du cycle érythrocytaire chacun des meilleurs composés issus de la sélection précédente agissait. Pour cela il fallait d'abord déterminer les stades du cycle de *P. falciparum* dans lequel PfATP6 s'exprime. Dans ce but, nous avons choisi d'effectuer de l'immunofluorescence avec un anticorps spécifique PfATP6.
4. En parallèle, nous avons tenté d'exprimer PfATP6, SERCA1a et le mutant SERCA1a-E255L dans un autre système: sur des membranes d'ovocytes de *Xenopus laevis*, comme décrit précédemment par Krishna et ses collaborateurs (Krishna et al, 2001 Eckstein-Ludwig et al 2003). Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr Hanne Poulsen, le Dr Michael Jakob Clausen, le Dr Jesper Møller et le Dr Poul Nissen. Nous avons prévu de reproduire les expériences décrites dans Eckstein-Ludwig et al 2003, et Uhlemann et al 2005, et de vérifier si PfATP6 et le mutant SERCA1a-E255L (décrit comme l'artémisinine sensible) ont été inhibés par l'artémisinine, un point très controversé de vue que ces auteurs n'ont jamais cessé de défendre pendant des années.

PfATP4 à aussi captiver notre intérêt, car il a été décrit comme une Ca^{2+} ATPase situé sur la membrane plasmique (Krishna et al, 2001, Dyer et al 1996), qui était aussi la cible des spiroindolones, l'un des antipaludiques les plus prometteurs à venir (Rottmann et al 2010). Comme réalisé avec PfATP6, nous avons tenté d'introduire *pfatp4* gène dans le vecteur d'expression de levure qui permettrait une purification de ce transporteur. Malheureusement, après plus d'un an de tentatives infructueuses constantes, nous avons décidé de concentrer nos efforts dans d'autres projets. En 2013, PfATP4 a finalement été décrit comme étant un Na^+ / H^+ ATPase (Spillman et al 2013).

A ce stade, nous avons décidé d'introduire un nouveau transporteur dans ce projet. En collaboration avec le Pr. Isabelle Florent, qui a déjà participé à la mise en place du protocole de criblage d'inhibiteurs pour PfAdT (Razakantoanina et al 2008), et la combinaison de l'expertise de notre laboratoire et le laboratoire du Pr. E. Pebay-Peyroula et le Dr S. Ravaud, pour l'expression et la purification de l'être humain transporteur ADP/ATP (HAAC), nous avons décidé d'étudier PfAdT comme une potentiel cible antipaludique. Nous avons l'intention d'étudier le type sauvage de PfAdT mais aussi un mutant prédit inactif K24I (Ravaud et al., 2012)

1. Nous avons introduit *pfadt_wt* et *pfadt_k24i* dans le vecteur d'expression de levure et procédé à l'expression de cette protéine dans la levure, pour un futur projet de cristallisation.
2. Nous avons également introduit *pfadt_wt* et *pfadt_k24i* dans un vecteur pET20b et exprimé ces protéines dans la souche *E. coli* C43 (DE3) (Miroux et Walker, 1996), pour un projet d'étude fonctionnel et recherche d'inhibiteurs.

Resultats

Pour produire les protéines de la membrane nous utilisons une levure (*Saccharomyces cerevisiae*) comme système d'expression hétérologue. Pour ce faire, le gène de la protéine à exprimer, dans ce cas, un gène *pfatp6* codon optimisé pour la levure, est inséré dans le vecteur d'expression de levure pYeDP60 (Pompon et al., 1996), sous le contrôle d'un promoteur inductible par le galactose et fusionné à un domaine BAD (Figure 39). Les levures qui ont positivement été transformée avec la construction de ce vecteur sont identifiées par une culture en milieu minimum. Le clone choisi est alors mis en culture en milieu riche et l'expression de PfATP6 est déclenchée par l'addition de galactose. Pendant la phase d'expression, PfATP6-BAD est biotinylé de façon endogène (Figure 40, Figure 41). L'expression de PfATP6 peut être détecté soit par un anticorps spécifique; ou par une sonde avidine-peroxydase qui reconnaît spécifiquement les protéines biotinylées (Figure 40).

Après l'expression, nous rompons les membranes des levures et nous procédons à la séparation des fractions membrane. L'extrait brut (CE) correspond à la levure cassé après broyage dans la Pulverisette. A ce stade, nous avons toutes les fractions de la membrane qui sera ensuite séparés par centrifugation différentielle (voir Figure 40). Après une première centrifugation à faible vitesse de la CE, le culot (P1) est éliminé et le surnageant (S1) est centrifugé à une vitesse intermédiaire afin d'obtenir un culot de membranes P2 et un surnageant S2. L'analyse de ces fractions membranaires nous indique la quantité de PfATP6 qui est soit mal repliées ou adressé à un autre compartiment de la membrane que le réticulum endoplasmique, et est donc perdue dans les membranes P2. Ces fractions membranaires P2 contiennent habituellement une grande quantité de PfATP6 (voir Figure 40).

Les membranes P3 sont obtenues après centrifugation à grande vitesse du surnageant (S2), à partir de la centrifugation intermédiaire qui origine les membranes P2. Ces membranes sont enrichies avec des microsomes et contiennent la plus grande fraction de PfATP6 bien replié qui est adressée à son compartiment natif (réticulum endoplasmique) (voir figure 40).

La solubilisation des membranes est effectuée avec un détergent doux; pour les membranes exprimant PfATP6 nous avons utilisé du dodecyl maltoside (DDM) (Figure 41). Les protéines biotinyllées sont ensuite isolées par liaison spécifique à une résine streptavidine - Sepharose. La purification est faite par séparation du domaine BAD de PfATP6 par clivage avec une protéase (la thrombine a été utilisé premièrement pour PfATP6). PfATP6 est ensuite éluée, recueilli et concentré sur une colonne Centricon par filtre d'exclusion de taille (figure 41).

La production à grande échelle de PfATP6 nous a permis de dépister de nouveaux inhibiteurs spécifiques en collaboration avec Pcovery Société (Copenhague, Danemark). Avant le début de ce projet, la mise en place d'une procédure pour exprimer une forme recombinante de PfATP6 dans la levure et sa purification par chromatographie d'affinité (Cardi et al, 2010a, 2010b). Pour la première fois, il était possible de purifier une forme active de PfATP6 qui pourraient être biochimiquement caractérisée et inhibé par les inhibiteurs de SERCA spécifiques (Arnou et al, 2011;.. Cardi et al, 2010a). PfATP6, en raison de son importance biologique en tant que transporteur de SERCA et les tentatives infructueuses de knock-out de ce gène de *Plasmodium falciparum* (Pulcini et al., 2013), a été considérée comme une bonne potentielle cible thérapeutique (Arnou et al., 2011).

Une collaboration entre trois partenaires de différents domaines d'expertise a été établie. Un premier partenaire (nous) en mesure d'exprimer hétérologue dans la levure et purifier une forme active de PfATP6; un second partenaire qui possédait une bibliothèque chimique d'inhibiteurs d'ATPases de type P et en mesure de tester un grand nombre de composés sur PfATP6 purifié (Pcovery, Danemark); et un troisième partenaire qui pourrait culture *in vitro* des stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*, en vue de tester les meilleurs composés, ainsi que de vérifier leur toxicité sur des cellules de mammifères (Isabelle Florent, MNHN, France).

Nous avons modifié et mis en place un protocole optimisé pour la surexpression et la purification de PfATP6 compatible avec la préparation de grandes quantités de protéines pour des fins de criblage. L'introduction d'un dispositif pour faciliter la rupture de la levure après expression, la planétaire (Fritsh), a permis une préparation plus efficace, plus homogène, avec une considérable réduction du temps et de l'effort effort. Cette étape est essentielle pour un bon rendement de la préparation de membrane. Au cours de la solubilisation et de la purification de PfATP6 par chromatographie d'affinité sur une résine streptavidine-Sepharose, plusieurs modifications au protocole précédent ont été introduites (par exemple: le lavage de la fraction de membrane légère, la composition de certains tampons, le mode de liaison de la fraction solubilisée à la résine, et le mode d'éluion et de la concentration des protéines purifiées).

Nous avons vérifié l'activité de l'PfATP6 purifié par ce nouveau protocole en testant les inhibiteurs classiques de la SERCA (thapsigargine, BHQ et CPA). Nous avons vérifié que le CPA était l'inhibiteur le plus efficace de PfATP6, comme décrit précédemment (Arnou et al., 2011).

Avec la mise en place de ce protocole, la société Pcovery a identifié de nouveaux inhibiteurs de PfATP6. Les meilleures molécules candidates ont ensuite été testées sur des cultures *in vitro* de globules rouges de *P. falciparum* et pour leur cytotoxicité. Pour cela, comme nous avons premièrement testé les inhibiteurs classiques SERCA pour évaluer si une corrélation était observable entre l'inhibition enzymatique de PfATP6 et les résultats de l'activité antiplasmodique. Aucune corrélation n'a été observée. Certains de ces résultats ont été publiés dans FEBS Journal en 2013 (David-Bosne et al., 2013). Les meilleures molécules issues de cette étude sont les composés 17, 18

et 19, cependant pour entrer dans les critères de Médecine for Malaria Venture pour les nouveaux potentiel antipaludiques, ceux-ci doivent être améliorés par des chimistes.

Après cette publication, l'occasion d'une nouvelle collaboration s'est présentée, un groupe italien a construit des antipaludiques à base de clotrimazole et 4-quinoléines (Gemma et al., 2009 et 2012). Ceux ont été décrits comme étant des inhibiteurs de la SERCA1a de mammifère (Bartolommei et al., 2011). Cependant nous n'avons trouvé aucun inhibiteur de PfATP6 parmi ces molécules. Mais nous avons pu établir un protocole de mesure de l'activité ATPase, compatible avec le screening d'inhibiteurs sur PfATP6.

Dans un souci de réduction des coûts engendrés par la purification, nous avons aussi changé la protéase utilisée pour éluer. Nous avons inséré un site de clivage à la TEV (protéase qui peut être produite dans *E. coli* de façon économique). L'expression de la construction avec le site de clivage TEV est identique à celle de la construction avec le site thrombine (Figure 48). Cependant durant la purification nous avons rencontré des problèmes, vu que la protéase reste accrochée à la protéine (Figure 49). Des essais de changement du site du côté C-terminale de la protéine sont en cours (vu que le site de clivage par la TEV est asymétrique), ainsi que des essais de diminution des quantités de TEV utilisés.

Nous avons aussi exprimé PfATP6 et SERCA1a de lapin dans des oocytes de *Xenopus laevis*. Ceci a été fait dans le but de vérifier la véracité d'un travail publié précédemment (Eckstein-Ludwig et al, 2003) qui affirmait que PfATP6 était la cible directe de l'un des antipaludiques le plus puissant utilisé – l'artémisinine. Le même groupe avait décrit qu'un seul résidu d'acide aminés (L263) était responsable pour l'inhibition de PfATP6 par l'artémisinine et de la même façon, le résidu correspondant dans SERCA1a (E255) quand muté rendait cette protéine sensible à l'artémisinine (Uhlemann et al, 2005). Nous avons pu démontrer que ni SERCA1a sauvage ni le mutant E255L étaient inhibés par l'artémisinine (mais l'était par la thapsigargine, inhibiteur classique des SERCAs). De plus, nous avons exprimé PfATP6 dans ces oocytes mais cette protéine n'était pas active dans le milieu membranaire. Ainsi nous avons démontré que ces publications avaient de sérieuses erreurs.

Parallèlement nous avons initié l'étude d'une protéine membranaire mitochondriale – PfAdT. Il s'agit d'un transporteur d'adénylates responsable d'échanger l'ADP du cytosol avec l'ATP du lumen de la mitochondrie. Notre laboratoire a une expérience établie pour l'étude du transporteur orthologue d'humains (hAAC) avec le laboratoire d'Eva Pebay-Peyroula et Stéphanie Ravaud. Nous avons exprimé PfAdT dans la levure pour de futurs essais de purification en vue d'études structurales. Pour établir un test fonctionnel de transport d'ATP radioactif, nous avons aussi exprimé PfAdT dans *E. coli*, comme précédemment décrit (Razakantoanina et al, 2008). Comme *E. coli* ne dispose pas de membrane interne ce transporteur serait adressé à la membrane externe et un transport direct d'ATP peut être mesuré. Ceci permettra dans le futur la recherche de nouveaux inhibiteurs et des études fonctionnelles plus approfondies sur ce transporteur qui a été décrit comme étant une des potentielle cibles d'antipaludique la plus prometteuse (Staines et al, 2010).

Conclusions

Cette thèse a permis une étude de deux transporteurs membranaires de *Plasmodium falciparum* en tant que potentielles cibles thérapeutiques. Nous avons pu établir un protocole pour l'expression et la purification de PfATP6 à grande échelle, ainsi qu'un test de criblage d'inhibiteurs sur les protéines

purifié. Le développement d'une collaboration nous a permis de tester ces molécules sur *P. falciparum in vitro* et pour leur cytotoxicité (David-Bosne et al, 2013). Nous avons aussi démarré un projet sur PfAdT qui permettra dans le futur d'établir un test de criblage de molécules et la recherche d'inhibiteurs. Ce projet pluridisciplinaire nous permettra ainsi de contribuer à la recherche de nouveaux antipaludiques.