



**HAL**  
open science

# Etudes moléculaires et fonctionnelles de deux régulateurs de la protéine phosphatase de type 1 chez *Plasmodium falciparum* : I2 et eIF2 $\beta$

Géraldine Tellier

► **To cite this version:**

Géraldine Tellier. Etudes moléculaires et fonctionnelles de deux régulateurs de la protéine phosphatase de type 1 chez *Plasmodium falciparum* : I2 et eIF2 $\beta$ . Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S039 . tel-01423879

**HAL Id: tel-01423879**

**<https://theses.hal.science/tel-01423879>**

Submitted on 1 Jan 2017

**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 des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

N° d'ordre

**THESE**

Pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II**

Discipline : Biologie moléculaire et structurale, biochimie

Spécialité parasitologie et mycologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Géraldine TELLIER**

Le 30 septembre 2015

**Etudes moléculaires et fonctionnelles de deux régulateurs  
de la protéine phosphatase de type 1 chez *Plasmodium  
falciparum* : I2 et eIF2 $\beta$**

Devant le jury composé de :

Professeur **El Moukhtar ALIOUAT**

Professeur **Isabelle FLORENT**

Docteur **Luc REININGER**

Docteur **Katia CAILLIAU**

Docteur **Mathieu GISSOT**

Docteur **Jamal KHALIFE**

Président

Rapporteur

Rapporteur

Membre invité

Membre invité

Directeur de thèse







## Remerciements

Je remercie le Dr. Camille Locht de m'avoir permis de faire mon master et mon doctorat au sein du CIIL.

Je remercie le Dr. Raymond Pierce de m'avoir accueillie durant ces quatre années au sein de l'équipe 2 du CIIL.

Je remercie le Dr. Isabelle Florent et le Dr. Luc Reininger d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également le Dr. Katia Cailliau et le Dr. Mathieu Gissot d'avoir fait parti de mon comité de suivi de thèse, d'avoir suivi ce travail, pour les discussions et les questions posées au cours de ces rencontres.

Je remercie également le Pr. El Moukhtar Aliouat d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de le présider.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr. Jamal Khalife de m'avoir permis de travailler avec lui et au sein de son équipe durant quatre ans. De m'avoir transmis ses connaissances, ses méthodes et d'avoir partagé avec moi les doutes, les questions sur ce travail que nous avons accompli. Un grand merci !!

Je tiens également à remercier nos collaborateurs le Dr. Isabelle Landrieux, le Dr. Katia Cailliau, le Dr. Alain Martoriati et le Pr. Jean-François Bodart pour leur aide sur les différentes expériences que nous avons réalisées ensemble afin de mener à bien les projets.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe 2 : Christine, Colette, Caro, Alejandro, Anne, Manu, Jacques, sans oublier ceux et celles qui sont partis Mathieu, Nico, Aline et Hadi pour leur aide, leur soutien et leurs connaissances.

Je tiens particulièrement à remercier Sophia, pour m'avoir appris à m'occuper des parasites, ce qui n'a pas été facile au début car nous découvrons ensemble la culture. De m'avoir permis de découvrir l'animalerie ainsi que les méthodes pour prendre soin de nos petites souris. Je te remercie Sophia pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ces années. Tu es vraiment une personne que j'apprécie et que j'adore. J'ai bien aimé nos fous rires, cela va me manquer.

Et enfin, je tiens à dire un énorme merci à mes collègues, devenus mes amis au fil des mois : Marion, Astrid, Thomas (et oui tu ne peux pas y échapper !!), Stéphanie, Julien, Lucile, Laëtitia, Adeline et sans oublier Audrey, qui m'a permis de m'intégrer au sein de cette équipe à mon arrivée. Merci à tous pour ces moments partagés au sein du laboratoire ainsi

que durant nos folles sorties. Merci de m'avoir aidée, soutenue durant ce travail. On a bien rigolé ensemble, notamment le midi avec les petites boutades de Stéphanie. Tout cela va vraiment me manquer. Un grand merci plus particulièrement à Marion et Astrid, avec qui j'ai tout partagé, professionnellement et personnellement. Je vous dis bon courage les filles car l'année prochaine c'est votre tour !!!!

Je tiens à remercier mes amis Laura, Camille, Julien, Mathieu, Céline, Loïc et tous les autres pour vous être intéressés à mon projet, pour m'avoir soutenue dans les bons et les mauvais moments, pour m'avoir aidée, encouragée durant toutes ces années et plus particulièrement celle-ci.

Et enfin, le plus dur pour la fin, comment dire merci à ma famille, ma mère et mon père, qui m'ont soutenu, encouragé durant toutes ces années, qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont toujours dit : « tu vas y arriver ma fille, ne t'inquiète pas » : juste en vous disant merci et je vous aime. Sans vous je ne serai pas là, à présenter mon projet. Merci à vous deux.

Un grand merci en particulier à Vanessa, ma sœur adorée, ma jumelle, ma moitié, qui savait quand tout se passait bien ou pas sans même que je lui dise, qui était là à chaque moment important que j'ai passé durant ma vie. Sans toi ma sœurette, je ne serai pas là aujourd'hui. Tu m'as tellement aidée à préparer mes oraux, mes écrits en m'écoutant, me lisant que tu dois connaître presque aussi bien que moi mes résultats. Je tiens à te dire un grand merci et tu connais la suite....pas besoin de l'écrire pour que tu le saches !!!

Et le meilleur pour la fin, merci à Maxime, mon chéri pour m'avoir aidée, soutenue, encouragée durant ces trois années de thèse. Un grand merci pour m'avoir remontée le moral quand je ne l'avais plus et surtout pour m'avoir supportée durant cette année, qui a été riche en émotion. Merci pour tout !!!





## Résumé

La malaria est la 1<sup>ère</sup> parasitose mondiale du fait de son taux de morbidité et de mortalité. Elle est responsable de 198 millions de cas dont 584 000 décès en 2013 (OMS). La forme la plus sévère est due à l'apicomplexe *Plasmodium falciparum*. Etant donné l'absence d'un vaccin efficace et l'augmentation des résistances aux traitements, il est crucial d'approfondir nos connaissances sur la biologie de *P. falciparum* afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Le cycle de vie complexe, avec deux hôtes, nécessite une régulation précise et dynamique de l'expression des gènes et des modifications post-traductionnelles. Dans ce contexte, il a été montré que les kinases et les phosphatases, impliquées dans les processus de phosphorylation et de déphosphorylation respectivement, jouent un rôle crucial pour la survie du parasite.

Chez les eucaryotes, les phosphatases sont impliquées dans la croissance cellulaire, la différenciation et la division. Parmi elles, PP1, une des principales sérine/thréonine phosphatases, est composée d'une sous-unité catalytique (PP1c) et d'une sous-unité régulatrice. Ces régulateurs sont essentiels et confèrent à PP1 une localisation, une spécificité et une régulation de son activité. La majorité des régulateurs interagissent avec PP1c via différents motifs tel que le motif RVxF.

Chez *P. falciparum*, PP1c (PfPP1c) est exprimée et semble être essentielle au niveau du cycle érythrocytaire, en particulier dans la libération des mérozoïtes infectieux. Pour mieux comprendre la fonction de PfPP1c, nous étudions les régulateurs de PP1 chez le parasite. Nos études précédentes nous ont permis de caractériser 3 régulateurs aux niveaux moléculaire et fonctionnel. Dans ce contexte, nous avons montré que PfLRR1 et PfI2 inhibent l'activité de PP1 alors que PfI3 l'active. Des études de génétique inverse suggèrent que ces régulateurs sont aussi essentiels que la PP1c elle-même. Récemment, nous avons identifié dans le génome de *P. falciparum* le facteur d'initiation de la traduction de type 2, sous-unité  $\beta$  (eIF2 $\beta$ ) qui pourrait être un partenaire/régulateur potentiel de PfPP1.

Dans la 1<sup>ère</sup> partie de cette étude, l'objectif principal a été d'étudier la présence de motifs additionnels de fixation à PfPP1c dans PfI2 et leur impact sur sa fonction. En utilisant la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), un troisième motif d'interaction FxxR/KxR/K a été identifié. Ce motif a été montré comme agissant de concert avec le motif canonique RVxF. En effet, la mutation des deux motifs abolit complètement l'interaction avec PfPP1. De plus, en utilisant le modèle d'ovocytes de Xénope, nous avons mis en évidence que ces motifs sont nécessaires à PfI2 pour réguler l'activité de PP1. Finalement, l'utilisation d'un peptide dérivé du motif d'interaction FxxR/KxR/K de PfI2 a montré une accumulation dans les érythrocytes infectés et un effet anti-plasmodial a été observé.

Dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette étude, nous avons étudié eIF2 $\beta$ , un autre régulateur potentiel de PfPP1. Par des expériences de GST pull-down, nous avons montré l'interaction entre PfeIF2 $\beta$ /PfPP1 et deux motifs d'interaction ont été identifiés : RVxF et FxxR/KxR/K. De plus, en utilisant le modèle d'ovocytes de Xénope, nous avons démontré que PfeIF2 $\beta$  est impliquée dans la transition G2/M, suggérant un rôle inhibiteur sur l'activité de PP1. La mutation d'un des deux motifs n'empêche pas la formation du complexe alors que la mutation des deux abolit l'interaction avec PP1. Afin de déterminer la fonction de PfeIF2 $\beta$  *in vivo* chez *Plasmodium*, des expériences de génétique inverse ont été réalisées. Nous avons montré l'accessibilité au locus de PfeIF2 $\beta$  par Knock-In et des expériences d'interruption du gène eIF2 $\beta$  chez *P. falciparum* et *berghei* (espèce spécifique aux rongeurs) sont actuellement en cours afin de déterminer l'essentialité de cette protéine dans le développement du parasite.

## **Abstract**

Malaria is still the most severe infectious disease in the world because of its high rate of morbidity and mortality. Malaria is responsible for 198 million cases among which 584 000 deaths in 2013 (WHO). The most deadly parasite is the Apicomplexa *Plasmodium falciparum*. Given the lack of efficient vaccine with long-lasting protection and the increase of resistance against current treatments it is crucial to further deepen our understanding the biology of *P. falciparum* to find new means of control. The complex life cycle within two hosts necessitates a highly accurate and dynamic regulation of gene expression and of post translational modifications. In this context, it has been shown that kinases and phosphatases, involved in phosphorylation/dephosphorylation processes respectively, play a key role in parasite survival.

In eukaryotes, phosphatases have been shown to be involved in cell growth, differentiation and division. Among them, Protein phosphatase type 1 (PP1) has been reported as one of the major serine/threonine phosphatase proteins involved in diverse cellular functions. PP1 is composed of a single catalytic subunit (PP1c) with a capacity to interact with a high number of regulatory subunits. These regulators are essential as they are key players in different roles of PP1c, including its trafficking, activity and specificity. Most of regulators interact with PP1c via several binding motifs including the RVXF motif.

In *P. falciparum*, PP1c (PfPP1c) is expressed and seems to be essential for blood stage parasite, in particular merozoite liberation. To better understand the function of PfPP1c, we investigated the regulators of protein phosphatase type I in this parasite. Our earlier studies have characterized three regulators at the molecular and functional levels. In this context, we have shown that PfLRR1 and PfI2 inhibit PP1 activity while PfI3 activates it. Reverse genetic studies suggested that these regulators are as essential as the PP1c itself. Recently, we found in *P. falciparum* genome the eukaryotic translation initiation factor 2 subunit  $\beta$  (eIF2 $\beta$ ) which could be a potential partner/regulator of PfPP1.

In the first part of this study, the main objective was to further explore in PfI2 the presence of additional motifs of binding to PfPP1c and their impacts on its function. Using NMR spectroscopy, a third motif was identified: FxxR/KxR/K. This motif has been found to act together with the canonical motif RVxF. Indeed, mutations in both motifs abolished completely the interaction with PfPP1. In addition, using *Xenopus* oocytes model, we showed that both motifs were necessary for PfI2 to regulate the activity of PP1. Finally the use of a peptide spanning the FxxR/KxR/K motif of PfI2 regulator showed an accumulation in infected erythrocytes and an antiplasmodial effect was observed.

In the second part, we investigated eIF2 $\beta$  as a potential regulator of PfPP1. By GST pull-down assays, we have shown the interaction between PfeIF2 $\beta$ /PfPP1 and two binding motifs were identified : RVxF and FxxR/KxR/K motifs. Moreover, using *Xenopus* oocytes model, we demonstrated that PfeIF2 $\beta$  is involved in G2/M transition, suggesting an inhibitor function of PP1 activity. Mutation of one of two motifs did not prevent the interaction while mutation of both abolished this binding. To gain more insights on the function of PfeIF2 $\beta$  in *Plasmodium*, reverse genetic experiments were carried out. We have shown the accessibility of PfeIF2 $\beta$  locus by Knock-in and we are performing Knock-out experiments on *P. falciparum* and *berghei* (specific species of the rodents) to determine the essentiality of this protein for parasite development.





# Table des matières

## Introduction..... 19

### Partie A : Le paludisme d’hier à aujourd’hui, d’aujourd’hui à demain ..... 21

I.	Un historique du paludisme .....	21
A.	Les premières apparitions de la malaria .....	21
B.	Les dates importantes sur la malaria .....	21
C.	La malaria de nos jours .....	23
II.	L’agent responsable du paludisme .....	23
A.	Phylogénie de <i>Plasmodium</i> .....	23
B.	Les espèces infectant l’homme .....	24
C.	Le parasite <i>Plasmodium falciparum</i> .....	25
1.	Généralités.....	25
2.	Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	26
a.	Chez l’anophèle : le cycle sexué .....	26
b.	Chez l’Homme : le cycle asexué.....	28
i.	Phase hépatique.....	28
ii.	Phase érythrocytaire .....	28
iii.	La gamétocytogénèse.....	29
III.	La lutte contre le paludisme .....	29
A.	La « pathologie » du paludisme .....	29
1.	Accès palustre simple .....	30
2.	Accès palustre grave ou neuropaludisme.....	30
3.	Le paludisme de la femme enceinte .....	31
4.	Le paludisme chronique.....	31
B.	La « guerre » contre le paludisme.....	32
1.	Impact socio-économique .....	32
2.	Le diagnostic et la prévention.....	32
a.	Le diagnostic .....	32
b.	La prévention .....	33
i.	A titre collectif .....	33
ii.	A titre individuel .....	33
3.	Les traitements et les résistances.....	34
4.	La vaccination .....	36
a.	RTS,S/AS02.....	37
b.	RTS,S/AS01.....	37
5.	Les recommandations aux voyageurs dans les zones endémiques.....	38
6.	Les nouvelles approches pour lutter contre le paludisme.....	39

### Partie B : La Phosphorylation et la Déphosphorylation chez *Plasmodium falciparum* ..... 40

I.	Les kinases chez <i>Plasmodium falciparum</i> .....	41
A.	Les différentes familles des kinases .....	41
B.	Les kinases « essentielles » pour le parasite.....	43
II.	Les phosphatases chez <i>Plasmodium falciparum</i> .....	46
A.	Les différentes familles de phosphatases .....	46
B.	Les phosphatases « essentielles » pour le parasite .....	48

### Partie C : la Protéine Phosphatase de type 1 (PP1) ..... 50

I.	La protéine phosphatase de type 1 .....	50
A.	Chez les eucaryotes.....	50

1.	Généralités sur PP1.....	50
a.	Présentation de PP1 .....	50
b.	La structure de PP1.....	51
i.	La sous-unité catalytique de PP1 : PP1c.....	52
ii.	La conformation invariante de PP1 .....	52
iii.	Inhibition par des toxines naturelles de la PP1 .....	53
c.	Les différentes fonctions de PP1 .....	53
i.	Le cycle cellulaire.....	53
ii.	La synthèse protéique .....	54
B.	Chez <i>Plasmodium falciparum</i> .....	54
1.	Séquence .....	54
2.	Fonction.....	55
II.	Les régulateurs de PP1c.....	55
A.	Chez les eucaryotes.....	55
1.	Généralités sur les régulateurs.....	55
2.	Les propriétés du « code de fixation » à PP1.....	56
3.	Les différents motifs d'interaction à PP1.....	56
a.	Le motif RVxF.....	56
b.	Le motif FxxR/KxR/K .....	57
c.	Les autres motifs.....	57
4.	Les différentes sous-unités régulatrices .....	58
a.	Les différentes sous-unités substrats .....	59
b.	Les sous-unités impliquées dans la localisation.....	60
c.	Les sous-unités appartenant à la famille des inhibiteurs .....	60
i.	Présentation générale .....	60
ii.	Les différents inhibiteurs.....	61
B.	Chez <i>Plasmodium falciparum</i> .....	63
1.	PfLRR1.....	63
2.	PfI3.....	64
3.	PfI2.....	65

## **Cadre et Objectifs..... 69**

## **Résultats..... 75**

I.	Etude du motif d'interaction FKEKRK de PfI2 chez <i>Plasmodium falciparum</i> .....	77
II.	Le rôle du facteur eIF2 $\beta$ dans le réseau de régulation de PP1 chez <i>Plasmodium falciparum</i> ...	103
A.	Analyse <i>in silico</i> de PfefF2 $\beta$ .....	103
1.	Annotation de la séquence de PfefF2 $\beta$ .....	103
2.	Etude phylogénétique .....	104
3.	Etude des structures secondaire et tertiaire .....	105
B.	PfefF2 $\beta$ et ses partenaires de la traduction .....	107
C.	Etude de l'interaction entre PfefF2 $\beta$ et PfPPP1 .....	108
1.	Interaction avec PfPPP1.....	108
2.	Expression d'eIF2 $\beta$ par <i>Plasmodium falciparum</i> et interaction avec PP1.....	110
3.	Implication des motifs dans la formation du complexe PfefF2 $\beta$ /PfPPP1 .....	112
D.	Rôle de PfefF2 $\beta$ dans la régulation de l'activité phosphatase de PP1.....	113
1.	Etude de la fonction de PfefF2 $\beta$ sur PfPPP1 .....	114
2.	Détermination du rôle de PfefF2 $\beta$ au niveau de la transition G2/M de l'ovocyte de Xénope.....	115

E.	Etude du rôle du facteur eIF2 $\beta$ chez <i>Plasmodium</i> .....	117
F.	Tentative d'inhibition de la formation du complexe eIF2 $\beta$ /PP1 chez <i>Plasmodium falciparum</i> par des peptides synthétiques .....	122

## **Matériels et Méthodes ..... 127**

I.	Matériels.....	129
A.	Plasmides .....	129
B.	Anticorps .....	129
C.	Culture de parasites <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 .....	129
D.	Amorces .....	129
II.	Méthodes.....	132
A.	Etude <i>in silico</i> des séquences .....	132
B.	Analyse phylogénétique.....	132
C.	Etude de la structure secondaire .....	134
D.	Expression des protéines recombinantes et purification.....	135
1.	Réalisation des constructions .....	135
2.	Production des protéines recombinantes tagguées 6Histidines .....	136
a.	Protéine PfelF2 $\beta$ .....	136
b.	Protéines PfPP1 .....	136
3.	Production des protéines recombinantes tagguées GST.....	137
E.	Obtention d'un sérum anti-PfelF2 $\beta$ .....	137
1.	Immunisation de souris .....	137
2.	Tests des sérums d'immunisation par Western-blot.....	137
F.	Détection de PfelF2 $\beta$ natif chez <i>Plasmodium</i> .....	138
G.	Test d'interaction entre PfPP1 et PfelF2 $\beta$ .....	138
1.	Par GST pull-down .....	138
2.	Par immunoprécipitation.....	138
H.	Test d'activité <i>in vitro</i> .....	138
1.	Test pNPP.....	138
2.	Test d'activité sérine/thréonine phosphatase.....	139
I.	Extraction de l'ADN et des protéines de parasites.....	139
1.	Préparation de l'ADN .....	139
2.	Préparation des extraits parasitaires solubles.....	139
J.	Induction de la GVBD en ovocytes de Xénope .....	140
1.	Préparation de l'ARNm de PfelF2 $\beta$ .....	140
2.	Induction de la GVBD.....	140
3.	Co-Immunoprécipitation (Co-IP).....	140
K.	Génétique inverse chez <i>P. falciparum</i> .....	141
1.	Préparation des plasmides .....	141
2.	Préparation des parasites et transfection .....	141
3.	Vérification de la transfection .....	142
L.	Interruption conditionnelle de gène chez <i>P. berghei</i> .....	142
1.	Préparation des plasmides .....	142
2.	Préparation des schizontes.....	143
3.	Transfection et injection aux animaux .....	143
4.	Vérification de la transfection .....	143
M.	Elaboration de peptides dérivés des motifs d'interaction .....	144
N.	Test des peptides dérivés des motifs d'interaction sur la croissance de <i>P. falciparum</i> .....	144

## **Discussion ..... 149**

I.	L'inhibiteur 2 de <i>P. falciparum</i> .....	152
A.	Rôle des motifs d'interaction dans la formation du complexe Pfl2/PfPP1 .....	152
B.	Importance des motifs d'interaction dans la fonction régulatrice de Pfl2 .....	153
C.	Importance du complexe Pfl2/PfPP1 dans le développement du parasite .....	154
D.	Identification de nouveaux partenaires de Pfl2 .....	155
II.	Le facteur eIF2 $\beta$ chez <i>P. falciparum</i> .....	156
A.	L'analyse structurale du facteur eIF2 $\beta$ .....	156
B.	eIF2 $\beta$ et ses partenaires de traduction .....	157
1.	Le complexe eIF2 .....	159
2.	Le facteur eIF5 .....	159
C.	eIF2 $\beta$ : un régulateur et/ou un substrat de PP1.....	161
1.	eIF2 $\beta$ : un interacteur de PP1 ? .....	161
2.	eIF2 $\beta$ : un inhibiteur de PP1 ?.....	161
3.	eIF2 $\beta$ : un substrat de PP1 ? .....	162
4.	Le rôle d'eIF2 $\beta$ dans le cycle de vie du parasite .....	165
D.	Identifier de nouveaux partenaires de PfeIF2 $\beta$ .....	166

**Annexes ..... 171**

Annexe 1 : Tableau récapitulatif de l'interactome de PP1.....	173
Annexe 2 : <i>Plasmodium falciparum</i> encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1: perspectives for novel anti-plasmodialtherapy .....	186

**Bibliographie..... 209**





# Introduction



## Partie A : Le paludisme d’hier à aujourd’hui, d’aujourd’hui à demain

### I. Un historique du paludisme

#### A. Les premières apparitions de la malaria

Le terme « malaria » vient de l’italien *mal’aria* et signifie mauvais air. Le terme « paludisme » est, quant à lui, d’origine latine *paludis* signifiant marais et est apparu en 1857. Le mot paludisme sera associé à la maladie en 1867 par le professeur A. Verneuil et sera ensuite repris par Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922) (Vaucel et Féron 1968).

Le paludisme ou malaria est une maladie qui remonte au « temps des momies » (Miller et al. 1994). En effet, dans le papyrus d’Ebers (1570 av. JC), des symptômes tels que la fièvre, la splénomégalie, ainsi que des traitements contre la fièvre ont été décrits (Ebers GM and Stern L, 1875). De plus, une étude récente, réalisée par Hawass et son équipe, a montré que Toutankhamon était atteint de cette maladie (Hawass et al. 2010). Au fil des siècles, la malaria a tué de nombreuses personnalités telles qu’Alexandre le Grand en 323 av. JC, Dante en 1321. Elle a également touché le Roi Soleil qui fut guéri par l’absorption d’infusions à base de plantes et de quinquina. Par la suite, Laveran a démontré que la prise de quinine, extrait de l’écorce de quinquina, permettait l’élimination du parasite (Laveran 1982).

#### B. Les dates importantes sur la malaria

Longtemps, le paludisme fut identifié comme la fièvre des marais. Grâce aux avancées scientifiques, de nombreuses découvertes ont été faites (**Figure 1**).

## Introduction

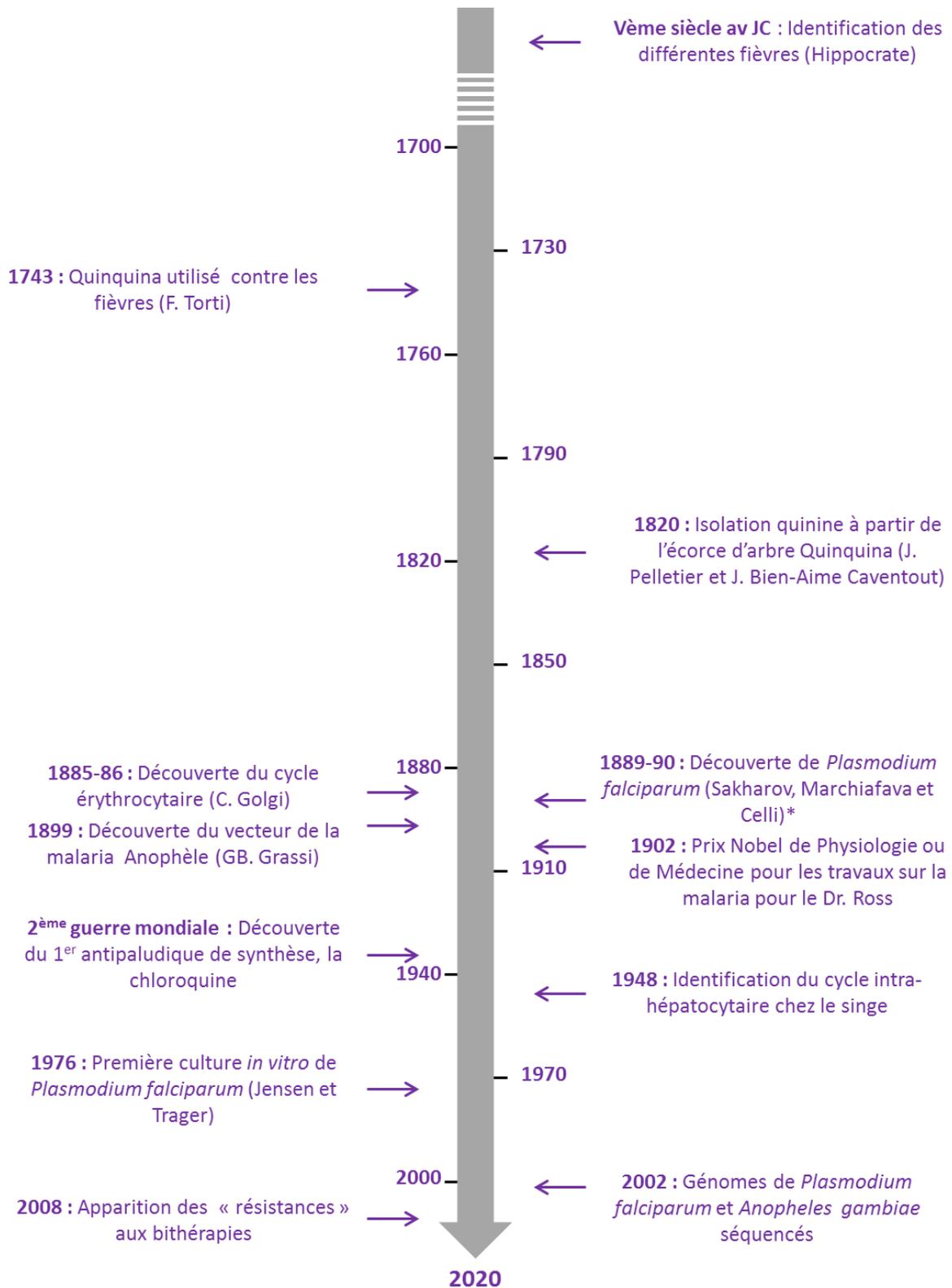
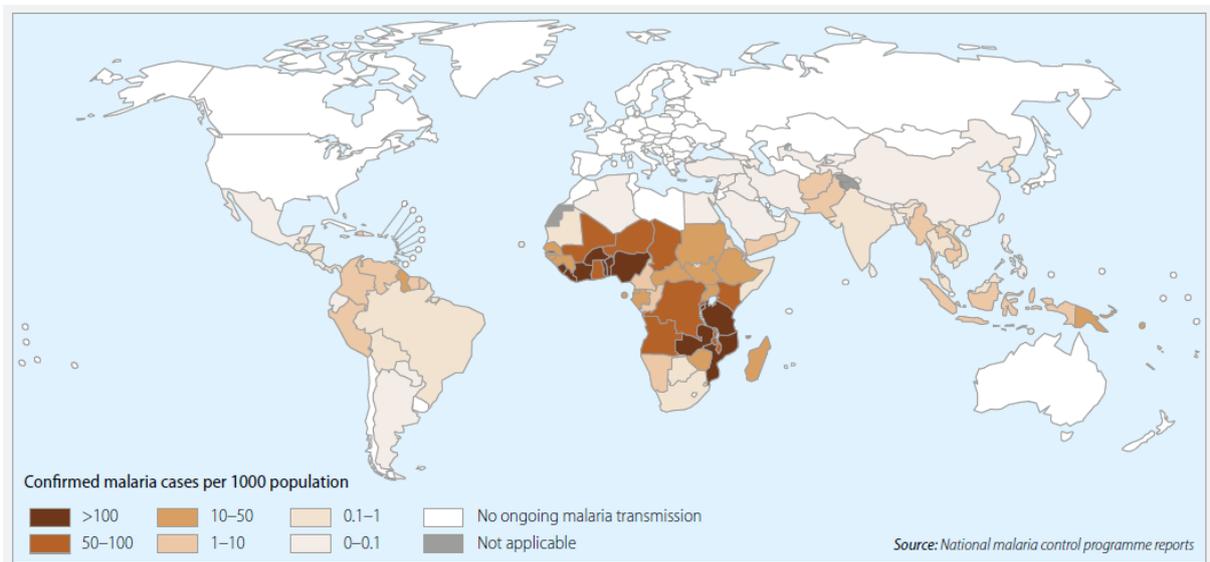


Figure 1 : Les dates importantes dans la compréhension du paludisme. (\* Articles correspondants (Ascenzi 1999; Marchiafava, 1885)

## C. La malaria de nos jours

Le paludisme est la première parasitose au monde. Cependant, le dernier rapport de l'OMS annonce une diminution des cas palustres à travers le monde ces dix dernières années. En effet, en 2004, il y avait 450 millions de cas dont 1,5 millions de morts contre 198 millions de cas dont 584 000 décès en 2013 (World Health Organization 2013) (**Figure 2**). Selon ces données, la malaria est endémique dans environ 100 pays, avec 3.2 milliards de personnes pouvant être touchées. Elle est présente en Asie, Amérique équatoriale et principalement en Afrique sub-saharienne avec 90% des cas mortels, dont 78% sont des enfants de moins de 5 ans (World Health Organization 2013, 2014, [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/wmr-2014-points-essentiels.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-points-essentiels.pdf) et [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013/wmr13\\_resume\\_poi-nts\\_essentiels.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr13_resume_poi-nts_essentiels.pdf?ua=1)).



**Figure 2 : Représentation géographique des zones touchées par la malaria en 2014** (image extraite (World Health Organization 2014).

## II. L'agent responsable du paludisme

### A. Phylogénie de *Plasmodium*

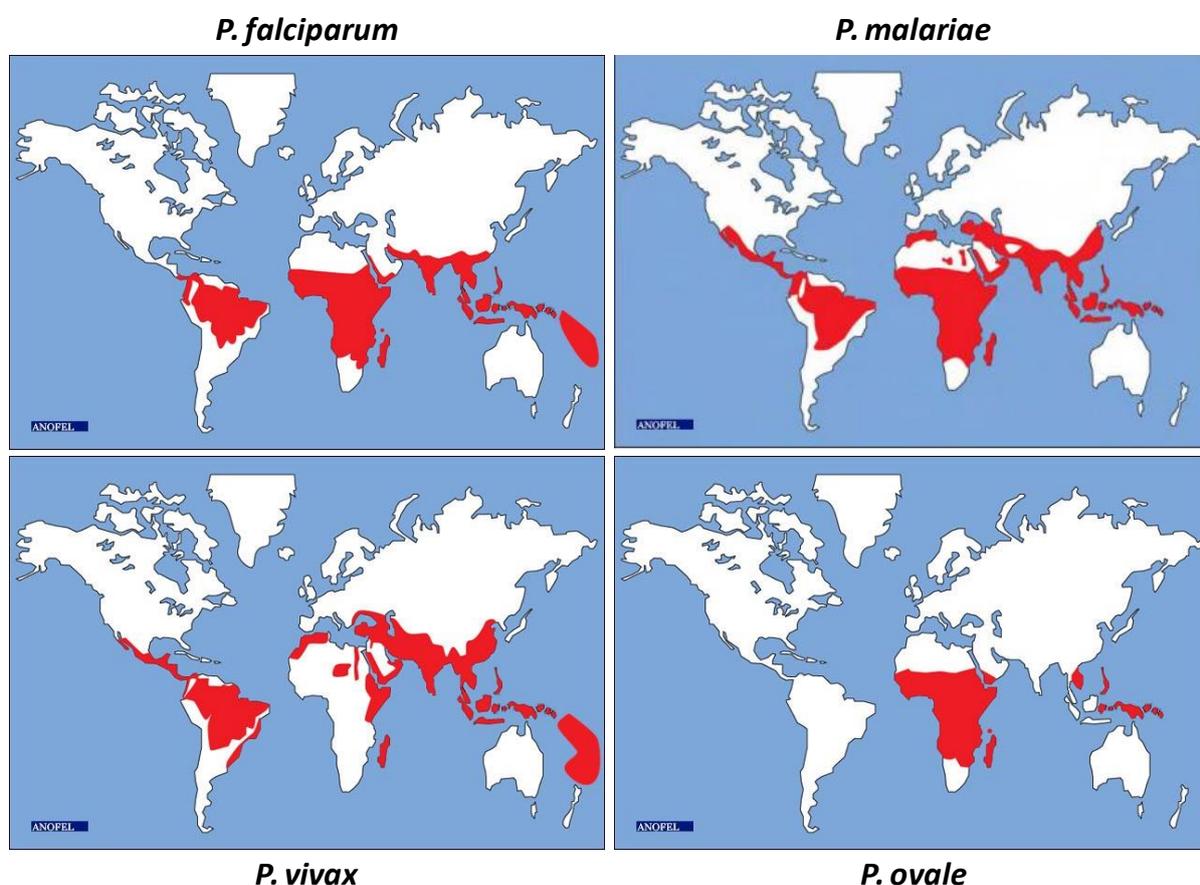
L'agent responsable du paludisme est le protozoaire *Plasmodium*. C'est un organisme eucaryote unicellulaire appartenant à la famille des Plasmodiidae, à l'embranchement des Apicomplexa, à la division des Alveolata (Adl et al. 2005; Adl et al. 2007; Adl et al. 2012; Dacks et al. 2008). Environ 200 espèces différentes de *Plasmodium* sont répertoriées et divisées en deux taxons principaux : celui des mammifères et celui des oiseaux et lézards (Martinsen, Perkins, and Schall 2008). La transmission du paludisme se fait par la piqûre d'un moustique appartenant à la famille des Culicidés, l'anophèle. L'émergence des *Plasmodium*

## Introduction

chez les mammifères est liée au fait que l'anophèle soit devenue l'agent vecteur (Martinsen, Perkins, and Schall 2008).

### B. Les espèces infectant l'homme

Parmi toutes les espèces de *Plasmodium*, seulement cinq sont inféodées à l'Homme : *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. knowlesi*. *P. falciparum* est la forme la plus répandue et la plus mortelle, notamment en Afrique (Gething et al. 2011; Snow, Korenromp, and Gouws 2004). Cependant, *P. vivax* est aussi largement répandu et est responsable de formes sévères (Gething et al. 2012) (**Figure 3**).



**Figure 3 : Répartition géographique des différentes espèces de *Plasmodium* inféodées à l'Homme en 2011.**  
(Site ANOFEL: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/4.html>)

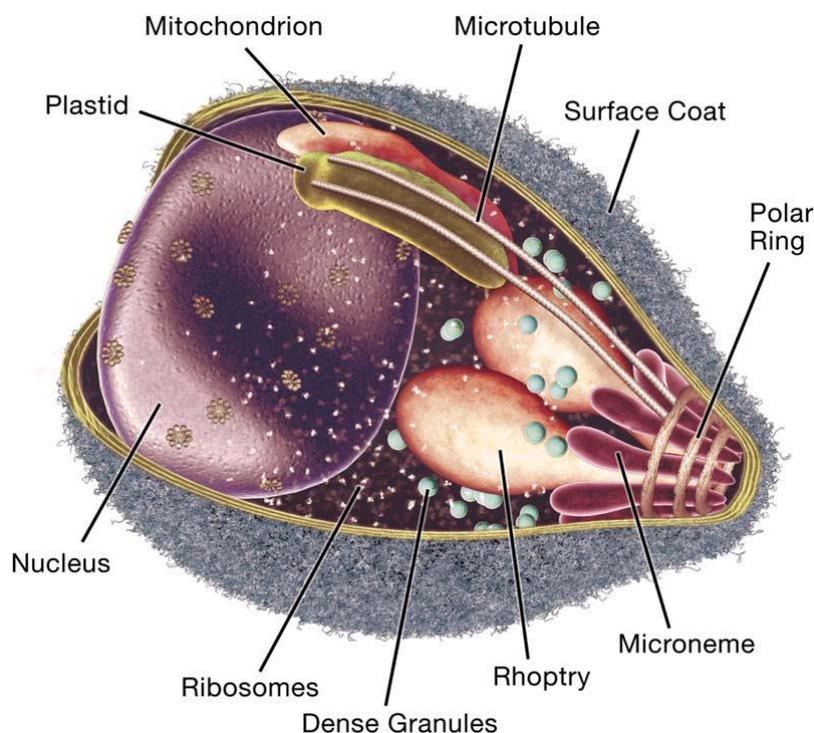
Depuis quelques années, il a été montré, que *P. knowlesi*, espèce inféodée aux singes, était associée à certains cas de paludisme chez l'Homme notamment en Asie (Singh et al. 2004; Cox-Singh et al. 2008; Kantele et Jokiranta 2011).

### C. Le parasite *Plasmodium falciparum*

#### 1. Généralités

Le phylum des Apicomplexa regroupe de nombreux parasites tels que *Plasmodium*, *Toxoplasma* ou encore *Babesia*. Ces parasites se caractérisent par la présence d'un organe unique et essentiel : l'apicoplaste, dont l'apparition est due à la symbiose ancestrale entre un organisme phagotrophique et une algue apparentée aux algues rouges (Keeling 2009; Sato 2011). L'apicoplaste possède son propre ADN, codant pour la synthèse d'acides gras (Waller et al. 1998), de l'hème (Nagaraj, Arumugam, et al. 2009a; Nagaraj, Prasad, et al. 2009b) ou encore les isoprénoïdes (Jomaa et al. 1999).

Les apicomplexes ont différents organites sécréteurs : les rophtries, les micronèmes et les granules denses, appelés complexe apical (**Figure 4**). Le rôle de ce complexe est de permettre l'adhésion et l'invasion de la cellule-hôte en sécrétant diverses protéines (Baum et al. 2008). Les autres organites présents sont une unique mitochondrie, un réticulum endoplasmique granuleux, un appareil de Golgi, un anneau polaire apical et un glideosome (Daher and Soldati-Favre 2009).



**Figure 4 : Schéma d'un mérozoïte de *Plasmodium*, mettant en évidence les organites majeurs et les structures cellulaires (image extraite de (Cowman et Crabb 2006)).**

Le génome complet, 23 mégabases, de *P. falciparum* a été publié en 2002. Il est composé de 14 chromosomes codant environ 5 300 gènes, riches en adénine et en thymine (environ 80%) (Gardner et al. 2002; Hall et al. 2002; Hyman et al. 2002). 54% des gènes possèderaient un ou plusieurs introns dans leur séquence. Une majorité des protéines (environ 47%) n'a pas de fonction connue et n'a pas d'homologue chez les autres organismes

## Introduction

à l'heure actuelle. 2/3 des protéines seraient spécifiques à *P. falciparum*, permettant ainsi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques au parasite (Florens et al. 2002). 31% des protéines auraient un ou plusieurs domaine(s) transmembranaire(s), 17% posséderaient un peptide signal et 5% auraient une similitude avec des protéines hypothétiques d'autres organismes (Gardner 2001; Gardner et al. 2013). Les génomes mitochondrial et plastidial ont été identifiés chez *P. falciparum* (Bozdech et al. 2003).

### 2. Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

Le cycle de vie de *P. falciparum* est complexe et nécessite 2 hôtes : un hôte intermédiaire, l'Homme, où il effectue son cycle asexué et un hôte définitif, l'anophèle où il effectue son cycle sexué.

#### **a. Chez l'anophèle : le cycle sexué**

Le cycle sexué a lieu chez l'anophèle femelle hématophage. Lors d'un « repas sanguin », le moustique ingère les parasites, sous forme de gamétocytes. Les gamétocytes se différencient alors en gamètes mâles et femelles au niveau de l'estomac. Un zygote diploïde est formé par la fusion d'un gamète mâle et d'un gamète femelle. Ainsi, la recombinaison génétique et la méiose commencent, le zygote évolue alors en oocinète. Celui-ci traverse la paroi stomacale, entraînant la perte de sa mobilité, adhère au pôle basal et se transforme en oocyste. Puis plusieurs mitoses successives ont lieu, formant ainsi une cellule syncytiale appelée sporoblaste. Après plusieurs divisions, l'oocyste contient des centaines de sporozoïtes, qui migreront à la surface de la cellule-mère. L'oocyste se rompt et libère les sporozoïtes dans l'hémolymphe. Ceux-ci entament alors leur migration vers les glandes salivaires du moustique (**Figure 5**). Les sporozoïtes seront ensuite transmis à l'Homme (hôte intermédiaire) lorsque l'anophèle prendra un autre « repas sanguin » (Aly, Vaughan, and Kappe 2009).

# Introduction

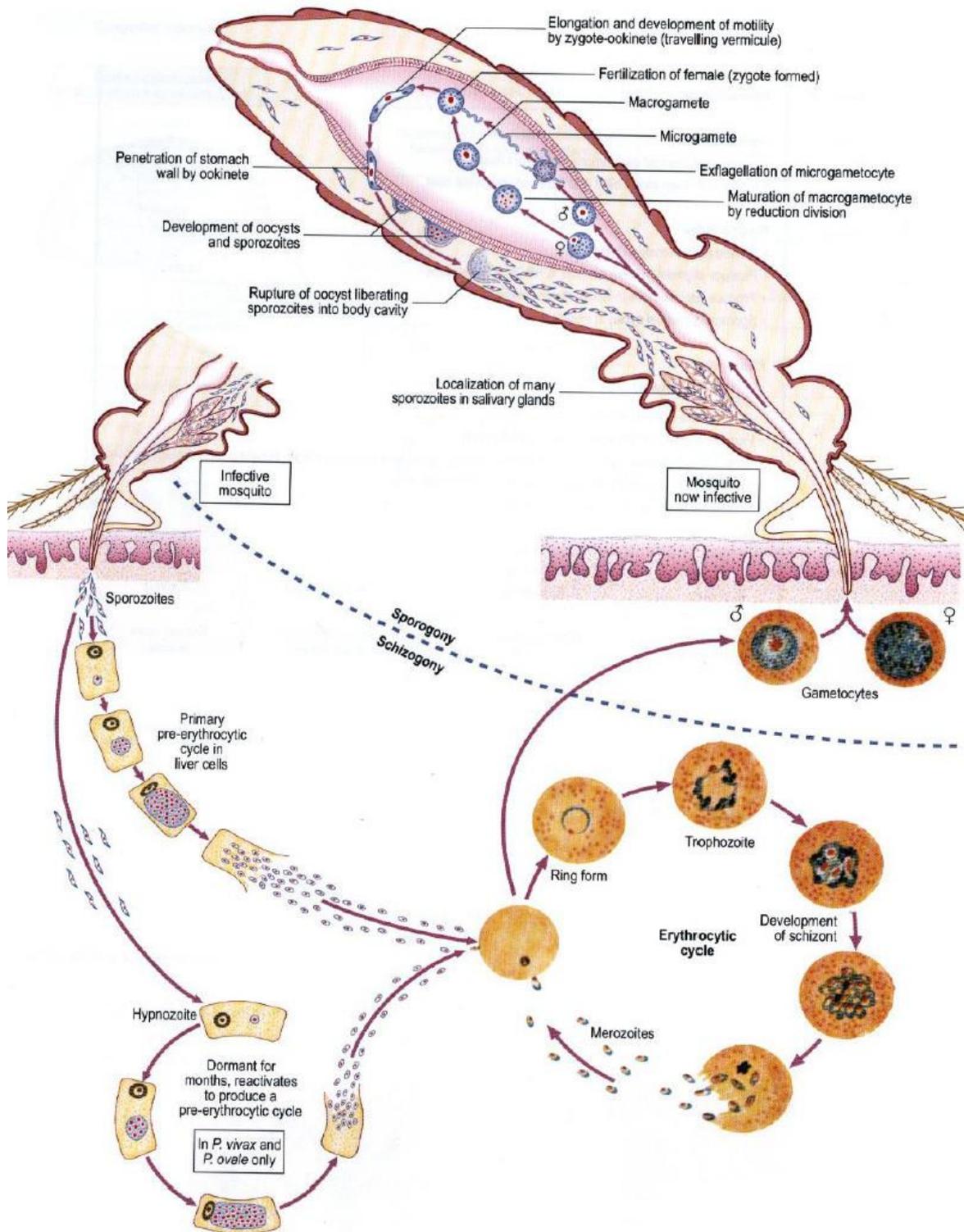


Figure 5 : Cycle de développement de *Plasmodium* (image extraite du site <http://www.medical-labs.net/plasmodium-2393/>)

## Introduction

### b. Chez l'Homme : le cycle asexué

Le cycle asexué est divisé en deux phases : la phase hépatique et la phase érythrocytaire.

#### i. Phase hépatique

Lors de sa piqûre, l'anophèle transmet des sporozoïtes dans la circulation sanguine de l'Homme. Les parasites mobiles se déplacent dans la peau, la moitié s'immobilise et meurt. Parmi l'autre moitié, 30% des parasites rejoignent la circulation lymphatique et sont phagocytés par les cellules dendritiques et les quelques formes exo-érythrocytaires présentes seront éliminées par le système immunitaire. Les 70% restants (soit 1/3 des parasites transmis lors du repas sanguin) passent dans la circulation sanguine et se dirigent vers le foie (Amino et al. 2006, 2007; Yamauchi Lucy M. et al. 2007). Ils traversent l'endothélium *via* les cellules de Kupffer et arrivent dans l'espace de Disse (Baer et al. 2007; Yuda and Ishino 2004). Après avoir traversé plusieurs hépatocytes, le sporozoïte s'arrête dans l'un d'eux et réalise son cycle de développement, protégé par la vacuole parasitophore (Frevet 2004). Le parasite se transforme en un trophozoïte uninuclée et subit des divisions cellulaires, aboutissant à un schizonte hépatique contenant des milliers de mérozoïtes (forme infectieuse des globules rouges). Le schizonte éclate et les mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine ou sous forme de mérosomes (**Figure 5**). Ces derniers, après avoir circulé dans le sang, libèrent les mérozoïtes dans les capillaires pulmonaires (Baer et al. 2007). La phase hépatocytaire peut durer jusqu'à 15 jours sans signe clinique apparent.

Chez *P. vivax* et *P. ovale*, certains trophozoïtes restent au niveau du foie dans une forme dormante appelée hypnozoïte, et sont responsables des accès palustres revenant plusieurs semaines à années après la première infection (**Figure 5**).

#### ii. Phase érythrocytaire

Les mérozoïtes, libérés dans la circulation sanguine, envahissent les érythrocytes. Le complexe apical (contenant les micronèmes, les rophtries et les granules denses et anneaux polaires) sécrète alors diverses protéines (adhésines, protéines de surface...), permettant l'interaction avec l'érythrocyte et entraîne alors une nouvelle orientation du parasite puis son internalisation dans celui-ci (**Figure 6**). Une vacuole parasitophore protège le parasite pendant son entrée dans l'hématie (Cowman, Berry, and Baum 2012) . A ce stade, le mérozoïte se différencie en anneau (1 à 13h), puis en trophozoïte (13 à 30h) et enfin en schizonte (30 à 44h).

## Introduction

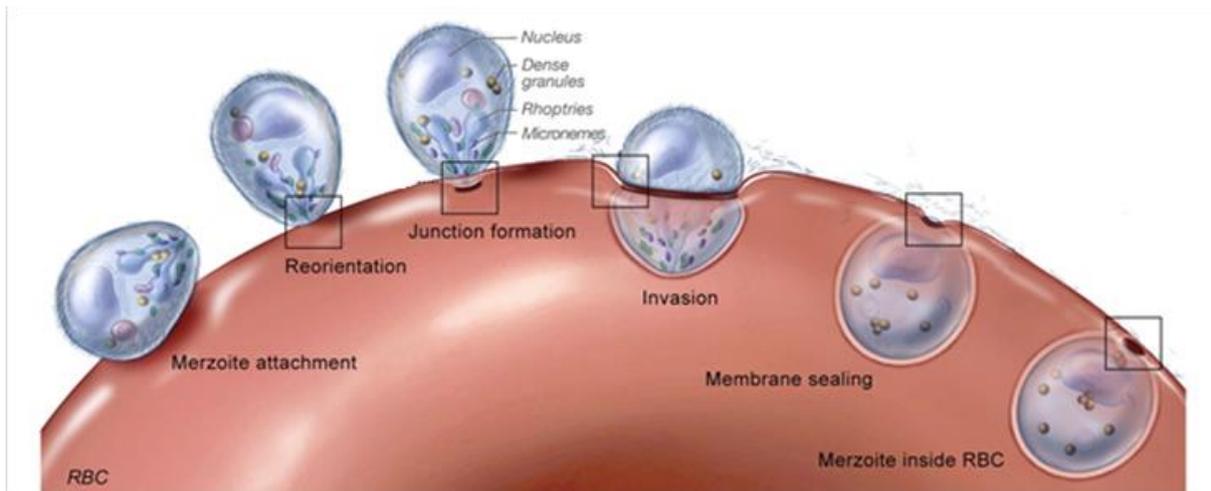


Figure 6 : Schématisation du mérozoïte pénétrant dans un érythrocyte (Srinivasan et al. 2011) ;

Après son internalisation, le parasite digère l'hémoglobine, formant l'hémozoïne (ou pigment malarique), qui est toxique pour lui et sera alors stockée dans une vacuole pigmentaire. Au stade trophozoïte, l'exportation des protéines à la surface de l'hématie augmente et des protubérances (ou knobs) sont alors formées. Le parasite subit plusieurs mitoses/divisions nucléaires sans rupture de l'enveloppe nucléaire et donne naissance au schizonte (forme de rosace), qui peut contenir jusqu'à 32 noyaux. Chaque noyau est ensuite entouré d'une membrane et possède ses propres organites : les mérozoïtes sont ainsi formés. L'éclatement de l'érythrocyte entraîne la libération des mérozoïtes infectieux dans la circulation sanguine. Ces derniers sont capables d'envahir à nouveau une hématie (Bannister et al. 2000). Cette phase érythrocytaire dure entre 24 et 72h selon l'espèce plasmodiale.

### *iii. La gamétocytogénèse*

En parallèle du cycle érythrocytaire, une partie des mérozoïtes se différencie en gamétocytes femelles ou mâles. L'avenir des mérozoïtes est déjà préétabli, les mérozoïtes issus du même schizonte deviendront des gamétocytes, ayant le même sexe ou infesteront de nouvelles hématies (Talman et al. 2004). Ce processus est encore mal connu à l'heure actuelle (William Trager 2005). Les gamétocytes sont séquestrés dans la rate et la moelle osseuse pendant environ 15 jours, puis libérés dans la circulation sanguine. L'anophèle femelle, lors d'un repas sanguin, pourra ingérer les parasites et un nouveau cycle sexué s'effectuera.

## III. La lutte contre le paludisme

### A. La « pathologie » du paludisme

Les premières phases du cycle de développement du parasite sont asymptomatiques. Les signes cliniques apparaissent au niveau de la phase érythrocytaire. Certains d'entre eux sont semblables à toutes les espèces plasmodiales. La différence réside dans la sévérité de la pathologie qui dépend de plusieurs facteurs : l'espèce infectante, le nombre de parasites

## Introduction

dans le sang et le plus important le statut immunitaire de l'hôte. En effet, les enfants et les voyageurs sont plus sensibles à la maladie et développeront des formes plus sévères contrairement aux personnes vivant dans les zones endémiques, ayant acquis un certain degré d'immunité, dû aux infestations répétées par les moustiques parasités.

### 1. Accès palustre simple

La primo-invasion est cliniquement muette et l'incubation peut durer de quelques jours à plusieurs mois en fonction de l'espèce infestante. Lors de l'éclatement des érythrocytes, les premiers symptômes apparaissent tels que de la fièvre modérée, des céphalées, des nausées, des vomissements et dans certains cas des diarrhées. Après l'apparition de ces symptômes non spécifiques, l'accès palustre survient et peut être divisé en trois stades bien distincts. Le premier est l'apparition de frissons intenses causés par une hypothermie (durée environ 1h), puis une sensation de chaleur avec une température pouvant atteindre 41°C (durée 3 à 4h) et pour terminer un stade de sueurs et de bien-être (durée 2 à 4h), marquant la fin de la crise. Dans certains cas, une splénomégalie et une anémie peuvent être détectées.

Depuis la découverte de la maladie, deux types de fièvres ont été identifiées. La fièvre tierce, causée par *P. falciparum*, *vivax* et *ovale*, survient tous les deux jours. Alors que la fièvre quarte apparaît tous les trois jours et est causée par *P. malariae*. Pour *P. knowlesi*, la fièvre est quotidienne mais il n'y a pas de récurrence.

En absence de traitement, notamment lors d'une infection à *P. falciparum* et parfois à *P. vivax*, la forme simple évolue vers une forme plus grave. Les symptômes alors identifiés sont des insuffisances rénale et respiratoire, une anémie grave, une hypoglycémie et une acidose peuvent y être associées (Mishra et al. 2007).

### 2. Accès palustre grave ou neuropaludisme

Le neuropaludisme ou accès pernicieux est principalement causé par *P. falciparum*. Les signes cliniques de cette forme grave sont une acidose importante, une hypoglycémie, des problèmes respiratoires, de très fortes convulsions, une perte de conscience de 30 minutes minimum, entraînant dans le pire des cas un coma (Mishra et al. 2007; White et al. 2013). Cette forme touche principalement les enfants en Afrique et les adultes en Inde. Le neuropaludisme est mortel dans 15% des cas et 20% des personnes touchées présentent des séquelles neurologiques (John et al. 2008; Murphy and Breman 2001).

Les causes de cette complication sont encore mal définies. En effet, plusieurs hypothèses sont émises à ce sujet (Van der Heyde et al. 2006). La première et la plus ancienne est la séquestration : l'adhésion des hématies parasitées aux capillaires cérébraux entraîne l'obstruction des vaisseaux, une anoxie et une accumulation de métabolites dans le

## Introduction

cerveau provoquant un coma (Dondorp et al. 2000). La deuxième théorie est la libération de toxines dans la circulation sanguine lors de la lyse des érythrocytes parasités, provoquant une réponse inflammatoire systémique et entraînant différents problèmes (œdèmes, perte de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique....) (Dorovini-Zis et al. 2011). La proposition la plus récente suggère que les dommages au foie seraient responsables des symptômes du neuropaludisme. Le foie permet la détoxification et son dysfonctionnement provoquerait l'accumulation de métabolites toxiques dans le cerveau. Cela a pour conséquence une élévation de la glutamine dans les astrocytes et conduirait à un œdème cérébral, une augmentation de la pression intracrânienne voire un coma (Martins and Daniel-Ribeiro 2013).

### **3. Le paludisme de la femme enceinte**

Le paludisme de la femme enceinte est causé par *P. falciparum*. Les hématies parasitées se trouvent piégées au niveau de l'endothélium placentaire et modifient ainsi les échanges entre la mère et le fœtus. Cela peut entraîner la mort de la mère et/ou de l'enfant, ainsi qu'un accouchement prématuré et/ou un petit poids de naissance pour le nourrisson, augmentant considérablement le taux de mortalité périnatale et le risque de retard de développement physique et intellectuel pour l'enfant (Rogerson et al. 2007; Desai et al. 2007). L'interaction entre les protéines parasitaires, situées à la surface de l'érythrocyte, et les protéines de l'hôte, exprimées à la surface des cellules endothéliales, du placenta ou des globules rouges sains, sont les raisons de l'accumulation et de la séquestration des hématies parasitées (Baruch 1999). La cytoadhérence des érythrocytes parasités s'explique par la présence de la chondroïtine sulphate A (CSA) à la surface du tissu placentaire (Maubert et al. 2000).

### **4. Le paludisme chronique**

Cette maladie touche principalement les enfants avec un système immunitaire peu développé, les expatriés et les immunodéprimés. Elle se caractérise par une légère fièvre (38°C), une anémie, une pâleur, une dyspnée, une asthénie et une splénomégalie. Le signe clinique le plus dramatique est l'anémie car elle peut causer une surmortalité, une aggravation de la dénutrition et une cachexie (Onwuamaegbu, Henein, and Coats 2004). Un retard staturo-pondéral est observé chez les enfants atteints. De plus, le taux de mortalité lié au paludisme est multiplié par 2 chez les enfants souffrant de sous-alimentation partielle et par 9 chez les enfants souffrant de sous-alimentation sévère (Caulfield, Richard, and Black 2004).

### **B. La « guerre » contre le paludisme**

#### **1. Impact socio-économique**

La malaria est la première maladie parasitaire au monde avec presque 600 000 décès en 2013. La majorité des cas est répertoriée dans les pays situés en zones tropicales et subtropicales. Pour ces pays endémiques, la malaria a un impact sur le développement socio-économique. En effet, elle peut faire diminuer le Produit Intérieur Brut (PIB) de l'ordre de 1%. Dans ces pays, lutter et éradiquer la malaria sont étroitement liés au développement des infrastructures et à la diminution du taux de pauvreté dans le pays. De plus, la malaria représente presque 50% des hospitalisations et 40% des dépenses de santé publique. Malgré les chiffres rassurants sur la diminution du nombre de cas palustres ces dix dernières années, les moyens de lutte aux échelles individuelle et collective ont un coût très important pour ces pays sous-développés ou en voie de développement. Il est donc crucial pour l'OMS de continuer la lutte contre le paludisme. En 2005, avec la World Health Assembly et ses partenaires, l'OMS a donc mis en place un projet pour faire baisser de 75% le nombre de cas et de décès d'ici 2015 (World Health Organization 2014). Cela passe par la mise en place de diagnostics rapides et une augmentation de la prévention dans les pays à risque.

#### **2. Le diagnostic et la prévention**

##### **a. Le diagnostic**

Le diagnostic du paludisme se fait en 2 étapes. Il y a en premier lieu l'observation clinique du patient et son historique. Les premiers indicateurs sont souvent l'intermittence des fièvres, la sensation de frisson-chaleur-sueur, un récent voyage en zone endémique pour les voyageurs.

Dans un deuxième temps, des examens biologiques plus poussés sont effectués. Le moins cher, le plus sûr et le plus sensible est le frottis sanguin. En effet, cette technique permet la détection rapide de l'espèce plasmodiale mise en cause et la numération des parasites dans le sang, appelé également parasitémie. Cette technique nécessite des compétences en microscopie optique (Bell and Peeling 2006).

Dans les zones endémiques, un kit à dépistage rapide mais plus onéreux a été mis en place. Le principe consiste à utiliser des bandelettes détectant des antigènes de *P. falciparum* ou *P. vivax* dans une goutte de sang. Ces résultats sont complétés par un frottis sanguin.

Une dernière technique, coûteuse et demandant beaucoup de précaution, peut être utilisée pour détecter l'espèce responsable de la maladie : la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). L'utilisation de couples d'amorces spécifiques de l'ARNr 18S permet de définir l'espèce (Johnston et al. 2006; Snounou, Viriyakosol, Jarra, et al. 1993; Snounou, Viriyakosol, Zhu, et al. 1993).

## Introduction

### b. La prévention

#### i. A titre collectif

Le moustique Anophèle est responsable de la transmission du paludisme entre les Hommes. Il est donc primordial de lutter contre ce vecteur afin de diminuer le nombre de cas palustres et le taux de mortalité. Plusieurs moyens existent pour limiter ce fléau.

Un des moyens les plus simples, accessible par la population endémique, est de supprimer les points d'eau stagnante afin de limiter les gîtes aquatiques contenant les larves des moustiques. Cette méthode est difficile à mettre en place dans les zones endémiques, notamment lors de la saison des pluies. Une recrudescence des moustiques a été observée pendant et après cette période (Cohen et al. 2013). L'assèchement des marais, le drainage ainsi que le remblaiement ont été mis en place dans les pays de l'hémisphère Nord (Europe, Amérique) pour participer à l'éradication du paludisme. La limitation des niches remonte au temps du roi de Babylone Nabuchodonosor, qui aurait recommandé de mettre du naphta ou de l'asphalte liquide pour tuer les larves.

A partir du XXème siècle, pour supprimer les moustiques les 1<sup>ers</sup> insecticides sont apparus. On peut citer comme premiers larvicides le trioxyméthylène ou encore l'acetoarséniate de cuivre (appelé aussi Vert de Paris). L'insecticide, le plus connu, est le DichloroDiphenylTrichloroethane (DDT), qui a été synthétisé en 1874 mais sera réellement utilisé à partir de 1939. Les premières pulvérisations intradomiciliaires apparaissent avec ce produit à effet rémanent.

Des moustiques résistants sont alors apparus, entraînant le lancement successif de différents insecticides tels que les organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes. Chaque produit employé a entraîné des résistances, quelques temps après leur mise en place sur le marché (Cui, Raymond, and Qiao 2006; Dabiré et al. 2008). D'après le rapport de l'OMS 2014, 39 pays ont noté une résistance des moustiques à au moins deux insecticides, expliquant ainsi l'élaboration permanente de nouveaux insecticides (Godfray 2013; World Health Organization 2013, 2014).

#### ii. A titre individuel

En parallèle de la prévention collective, la prévention de chaque individu est mise en place et consiste à limiter les piqûres de moustiques. Pour ce faire, un ensemble de divers répulsifs peut être utilisé tels que des aérosols, des lotions ou encore des crèmes. Il est aussi conseillé de porter des vêtements longs imprégnés d'insecticides, d'avoir des moustiquaires à chaque porte et fenêtre de la maison. Des moustiquaires imprégnées d'insecticides à base de pyréthriinoïdes sont donc distribuées aux populations des zones endémiques pour diminuer les piqûres durant leur sommeil. D'après l'OMS, 88 pays distribuent ces moustiquaires et 44% de la population Africaine en serait pourvue. Néanmoins, il semblerait que seulement 7% de la population à risque soit protégée grâce à l'utilisation des insecticides et des moustiquaires (Godfray 2013; World Health Organization 2014).

## 3. Les traitements et les résistances

Le paludisme est une maladie qui peut être guérie si elle est prise en charge rapidement et efficacement. Le médicament le plus ancien et efficace est la quinine, qui provient de l'écorce d'un arbre appelé Chinchona. C'est un alcaloïde naturel avec des propriétés antipaludique, antipyrétique et analgésique. La quinine est utilisée depuis des centaines d'années par les indigènes du Pérou et de l'Equateur pour soigner les fièvres. En 1620 en Amérique latine, les pouvoirs curatifs de cette poudre sont reconnus et les fièvres réagissant à ce traitement sont identifiées. Elle sera importée en Europe à partir du XVIIème siècle. De nombreux effets secondaires sont répertoriés, par exemple : des acouphènes, symptôme le plus fréquent, des céphalées, des troubles visuels.....Cependant, la quinine est encore utilisée de nos jours en cas de grossesse ou pour traiter les formes sévères du paludisme (Parija and Praharaj 2011).

Les premiers produits de synthèse sont apparus aux alentours de la première guerre mondiale. Il y a plusieurs grandes familles : les amino-8-quinoléines, qui ciblent les formes hépatocytaires, les sporozoïtes et les gamétocytes ; les amino-4-quinoléines, les arylamino alcools, les antifolates et les dérivés d'artémisinine, qui attaquent les formes intra-érythrocytaires. De plus, les antifolates touchent les sporozoïtes et les dérivés d'artémisinine ciblent les gamétocytes. L'artémisinine et ses dérivés (artésunate, artéméther) sont des traitements rapides, efficaces et ont des coûts plus faibles (White et al. 2009). Malgré des molécules avec des cibles et des fonctionnements différents, des parasites résistants apparaissent plus ou moins rapidement (**Tableau 1**) (Sinha, Medhi, and Sehgal 2014).

**Tableau 1 : Résumé des différents antipaludiques utilisés et date d'apparition des 1<sup>ères</sup> résistances (d'après (Sinha, Medhi, and Sehgal 2014; Wongsrichanalai et al. 2002).**

Famille du composé	Nom de la molécule	Date de mise en circulation	Date d'apparition de la première résistance
<b>Amino-8-quinoléines</b>	Primaquine	1928	
<b>Amino-4-quinoléines</b>	Chloroquine	1945	1957
	Amodiaquine	1947	
<b>Aryl-Amino-Alcool</b>	Quinine	1630	1910
	Mefloquine	1977	1982
	Halofantrine	1988	1993
<b>Antifolates</b>	Proguanil	1948	1949
	Pyriméthamine	1962	1967
<b>Artémisinine et ses dérivés</b>	Artémisinine	1971	1980
	Artésunate	1975	2008
	Artéméther		
	Atovaquone	1996	1996

## Introduction

Le rôle des quinolines n'est pas encore clairement défini mais il semblerait qu'elles bloquent le processus de dégradation de l'hème. Le parasite utilise l'hémoglobine pour sa croissance et la dégrade en globine et en hème. Ce dernier, étant toxique pour le parasite, va être stocké dans la vacuole digestive sous forme d'hémozoïne (ou pigment malarique) pour que le cycle de développement puisse continuer. En empêchant cette étape, l'hème sous forme libre va s'accumuler et causera la mort du parasite (Slater 1993).

La chloroquine, un composé de la famille des quinolines, est très utilisée dans la lutte contre le paludisme. La résistance de *P. falciparum* à cette molécule s'expliquerait par des phénomènes de mutations sur certains gènes. En effet, le parasite élimine plus facilement la chloroquine lorsque le gène PfCRT est muté, gène codant pour un transporteur vacuolaire (White 2004; Foley and Tilley 1997). Une étude de 2013 montre que des mutations sur le gène *PfMDR1* permettraient au parasite *P. falciparum* d'acquérir une résistance à la chloroquine (Elbadry et al. 2013). Cependant, il a été récemment démontré que la résistance à la chloroquine serait corrélée à un défaut du catabolisme de l'hémoglobine. Une diminution des parasites résistants à cette drogue a été observée en Afrique et en Asie (Lewis et al. 2014).

Les antifolates bloquent la voie métabolique des folates, qui sont des facteurs clés dans la synthèse de l'ADN. La pyriméthamine bloque la dihydrofolate reductase (DHFR) et la sulfadoxine (famille des sulphonamides) inhibe la dihydroptéroate synthetase (DHPS). Une étude, réalisée sur différentes souches de *P. vivax*, a démontré que des mutations sur le gène *dhfr* expliqueraient la résistance (Imwong et al. 2003).

Le mécanisme d'action de l'artémisinine et de ses dérivés est encore sujet à débat. Deux hypothèses sont émises : la première suggèrerait la génération de radicaux libres par ces produits, engendrant l'alkylation des protéines ; et la deuxième serait le blocage de l'ATPase du réticulum sarco-endoplasmique par l'artémisinine (Krishna et al. 2006).

Les parasites évoluant rapidement, la résistance aux drogues apparaît très vite après les premières utilisations. De plus, dans de nombreuses régions, des résistances à plusieurs médicaments ont été identifiées tels que la chloroquine, les antifolates et la méfloquine (Wongsrichanalai et al. 2002). Depuis 2001, l'OMS a donc mis en place une Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine (CTA) pour les cas de malaria sans complication. Les CTA sont utilisés généralement dans les zones où la résistance à la chloroquine a été établie. L'artémisinine a une demi-vie courte, en lui associant un composé avec une demi-vie plus longue, les cas de résistance sont diminués (Eastman and Fidock 2009; Woodrow and Krishna 2006). Plusieurs CTA existent : artésunate/amodiaquine, artésunate/sulfadoxine-pyriméthamine, artésunate/méfloquine, artéméther/luméfántrine et dihydroarthémisinine/pipéraquline. La CTA est choisie en fonction des résistances aux drogues partenaires identifiées sur le terrain. De plus, l'OMS recommande d'administrer une dose unique de primaquine en plus de la CTA car elle serait plus efficace pour éliminer les gamétocytes. Cependant, dans les zones où des multi-résistances existent, les CTA sont peu efficaces (Rogers et al. 2009).

## Introduction

En outre, il a été montré ces dernières années que des résistances aux CTA apparaissent. L'étude de Julianna Martha Sa montre que différents degrés de résistance à l'amodiaquine et à la chloroquine sont présents en Afrique et Amérique du Sud. En effet, plusieurs mutations sont possibles sur les gènes, *Pfmdr1* et *Pfcrt*, en fonction de l'historique des pressions médicamenteuses utilisées dans les différentes zones (Sá et al. 2009). De plus, ces deux composés appartiennent à la même famille, ce qui augmenterait la résistance croisée, comme cela a été observé pour la méfloquine et l'halofantrine (Rojas-Rivero et al. 1992). Effectivement, si deux composés appartiennent à la même famille ou ont le même mode d'action, la résistance croisée est possible. L'utilisation des CTA est efficace mais des cas de résistance à l'artémisinine commencent à émerger dans l'Asie du Sud, notamment au Cambodge et en Thaïlande (Amaratunga et al. 2012; A. M. Dondorp et al. 2009, 2012; Kyaw et al. 2013; Noedl et al. 2008; Phyo et al. 2012 ; Rogers et al. 2009).

En 2014, différentes équipes ont découvert que la résistance à l'artémisinine est corrélée avec le « kelch propeller domain » situé sur le chromosome 13 (K13) de *P. falciparum*. La résistance serait liée à une mutation du gène PF3D7\_1343700 sur le domaine K13. Selon les populations étudiées, entre 2001 et 2012, 17 mutations différentes ont été répertoriées sur le gène. Il s'agit d'un polymorphisme d'un seul nucléotide (appelé SNP) c'est-à-dire qu'une seule paire de base est différente pour le même gène dans chacun des cas. Certaines SNP sont prédominantes telles que C580Y. La conséquence d'une mutation sur le « kelch propeller domain » est la diminution de la clairance parasitaire c'est-à-dire l'augmentation du temps d'élimination des parasites par l'hôte (Ariey et al. 2014; Ashley et al. 2014; F. Huang et al. 2015; Isozumi et al. 2015; Ouattara et al. 2015; Takala-Harrison et al. 2014).

Selon un rapport de l'OMS, la diminution de l'efficacité des CTA serait due à une résistance à l'un des deux composés. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte comme l'environnement, les résistances déjà existantes, la dose et la durée des médicaments utilisés (Global report on Antimalarial Drug efficacy and Drug Resistance: World Health Organization. 2000–2010). Il est donc essentiel et primordial de poursuivre les recherches sur de nouveaux traitements possibles.

### 4. La vaccination

Actuellement, il n'existe pas encore de vaccin pour lutter contre le paludisme. Les premières études datent de 1987. Manuel Patarroyo a mis au point un vaccin synthétique contre *P. falciparum*, nommé le Spf66. Ce vaccin ne semble pas avoir d'effet sur le paludisme (Graves and Gelband 2006). Le fait qu'il n'existe pas de vaccin est dû à la complexité du cycle de vie et à l'important polymorphisme génétique du parasite. Pour l'Homme, il est donc difficile d'acquérir une immunité efficace, totale et stable dans le temps. Pour avoir une immunité plus efficace, cela impliquerait des expositions fréquentes au pathogène.

## Introduction

Trois stratégies différentes, basées sur les antigènes, sont en cours d'élaboration : la première consiste à bloquer la pénétration et le développement du sporozoïte dans les hépatocytes ; puis celle empêchant les mérozoïtes d'entrer et de se développer dans les érythrocytes ; et enfin celle bloquant la transmission du parasite à l'Homme, en induisant la production d'anticorps bloquant la maturation des stades sexués chez le moustique. La première stratégie a été choisie par la compagnie GSK (GlaxoSmithKline). En effet, depuis 1992, elle élabore un vaccin anti-sporozoïte contre *P. falciparum*, qui semble prometteur, appelé le RTS,S. C'est 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 (la partie RTS), co-exprimée dans *Saccharomyces cerevisiae* avec un antigène de surface du virus de l'hépatite B (la partie S). A ce complexe, est ajouté un adjuvant AS01 ou AS02.

### a. RTS,S/AS02

Le vaccin RTS,S/AS02 est un vaccin pré-érythrocytaire contre *P. falciparum*, développé par GSK. Son rôle serait de neutraliser les sporozoïtes et limiter le nombre d'hépatocytes infectés. A partir de 2001, il a été testé en Afrique sur des enfants. Des études ont montré que ce vaccin est sain, toléré et immunogénique. Il est administré en 3 fois et une protection partielle sur des adultes, ayant acquis une immunité naturellement, a été observée. Des études, dans différents pays tels que le Mozambique et la Gambie, ont prouvé une action positive du vaccin pour les enfants âgés de moins de 2 ans. Il permet une protection contre le paludisme et une prévention des cas graves (Alonso et al. 2004; Aponte et al. 2007; Bojang et al. 2001).

Des études montrent que ce candidat-vaccin a une efficacité de 30 à 50% pour protéger contre le paludisme et que 2 administrations seraient suffisantes pour acquérir une protection. Il semblerait que la protection contre la malaria diminue avec le temps mais reste efficace au moins 3 ans. De plus, la durée de protection serait liée à l'environnement. Une étude de phase III permettrait d'identifier les facteurs influant sur la durée de protection (Campo et al. 2014; Kester et al. 2008; Sacarlal et al. 2009)

En parallèle de ce candidat-vaccin, une comparaison a été effectuée entre les adjuvants AS01 et AS02. L'adjuvant AS01 serait plus performant et aurait une réponse humorale plus forte. En effet, RTS,S/AS01 entraîne une protection de 50% contre le paludisme alors que celle de RTS,S/AS02 est de 30% environ (Kester et al. 2009; Leroux-Roels et al. 2014).

### b. RTS,S/AS01

Le candidat-vaccin RTS,S/AS01 est actuellement en phase III d'essais cliniques dans 7 pays de l'Afrique sub-saharienne. Les derniers résultats obtenus montrent une efficacité d'environ 40% pour les enfants sur une période de 18 mois après la 1<sup>ère</sup> injection et qu'elle diminue avec le temps. Il semblerait que le vaccin ne soit plus efficace chez les jeunes

## Introduction

enfants, 12 à 18 mois après la dernière injection (Partnership 2015). De plus, le pourcentage de mortalité, quelle que soit la cause, entre les différents groupes (vaccinés ou non) ne montrent pas de différences : 1.2% pour les enfants et 1.9% pour les jeunes enfants contre 1.1% et 1.6% pour les groupes contrôles respectifs (Partnership 2015). Il semblerait que ce vaccin soit efficace en diminuant le nombre de cas palustres et les cas sévères de malaria. Ces résultats sont en accord avec des études réalisées auparavant, qui démontraient une diminution de 50% des formes graves du paludisme chez les enfants âgés de 5 à 17 mois et une diminution de la protection au cours du temps après la dernière injection (Agnandji et al. 2011, 2012, 2014; Riedmann 2014).

Malgré des résultats prometteurs contre le paludisme, certaines données sont contradictoires. En effet, une étude réalisée sur des enfants en 2014 par Miura et son équipe, démontre qu'il n'y a pas de différence significative sur la formation de l'oocyste ou les sporozoïtes entre des patients traités ou non (Miura et al. 2014). Alors que d'autres études ont montré que l'injection du vaccin avait un impact sur l'invasion des glandes salivaires et le nombre de sporozoïtes chez le moustique (Myung, Marshall, and Sinnis 2004). De plus, après la vaccination, des effets secondaires tels que des légers comas, des anémies, ont été répertoriés. Il semblerait également que le boost effectué entraîne des convulsions et des méningites (Partnership 2015).

Les premières analyses du candidat-vaccin RTS,S/AS01, montrant une diminution du nombre de cas palustres, sont encourageantes. Néanmoins des améliorations sont à entreprendre pour prolonger son efficacité au cours du temps et augmenter son efficacité sur les jeunes enfants. Il serait également intéressant d'avoir une meilleure compréhension de son action afin de limiter les effets secondaires identifiés.

### 5. Les recommandations aux voyageurs dans les zones endémiques

L'OMS recommande aux voyageurs d'utiliser des répulsifs, porter des vêtements longs et dormir sous une moustiquaire lors du séjour dans une zone endémique. Elle conseille également de prendre un traitement préventif avant, pendant et après le séjour dans une zone à risque. Cette chimioprophylaxie est adaptée en fonction du pays car ils sont classés en 3 groupes selon le niveau de résistance à la chloroquine. Le groupe 1 où il n'y a pas de résistance à la chloroquine, le groupe 2 où une résistance à la chloroquine a été observée et enfin le groupe 3 où il y a une multirésistance et une importante résistance à la chloroquine. Un ou plusieurs traitements sont possibles en fonction du groupe (**Tableau 2**). Les doses de ces traitements sont à adapter pour l'enfant en fonction de son poids et de son âge.

## Introduction

**Tableau 2 : Chimio prophylaxie antipaludique chez l'adulte selon les groupes de chimiorésistance en 2014**  
 (tableau extrait du rapport de l'institut de veille sanitaire :  
[http://www.invs.sante.fr/beh/2014/reco/pdf/2014\\_reco.pdf](http://www.invs.sante.fr/beh/2014/reco/pdf/2014_reco.pdf)) cp = comprimé

Groupe de chimiorésistance	Population générale	Femme enceinte
Groupe 1	<b>Chloroquine 100 mg/j</b> À prendre pendant le séjour et durant les 4 semaines qui suivent	
	<b>Chloroquine 100 mg/j + Proguanil 200 mg/j</b> À prendre pendant le séjour et durant les 4 semaines qui suivent le retour	
Groupe 2	<b>Atovaquone 250 mg + Proguanil 100 mg</b> 1 Cp*/j	<b>Atovaquone 250 mg + Proguanil 100 mg</b> 1 Cp/j
	À prendre pendant le séjour et durant la semaine qui suit le retour	Peut être envisagée si nécessaire.
Groupe 3	<b>Méfloquine 250 mg</b> 1 Cp/semaine	
	À commencer 10 à 21 jours avant le départ, pendant le séjour et durant les 3 semaines qui suivent le retour	
	<b>Doxycycline 100 mg/j</b> À prendre pendant le séjour et durant les 4 semaines qui suivent le retour	

### 6. Les nouvelles approches pour lutter contre le paludisme

Pour lutter contre le paludisme, l'amélioration des traitements est primordiale afin d'éviter au maximum les résistances. Une meilleure compréhension pharmacocinétique des produits utilisés est nécessaire afin de les rendre plus efficaces et spécifiques, et notamment de mieux déterminer le temps d'élimination du produit dans le sang et la dose à prescrire. De plus, il faut prendre en compte le facteur environnemental et enfin faire des études épidémiologiques plus approfondies sur les personnes exposées fréquemment aux piqûres de moustiques et ayant acquis une immunité (Sinha, Medhi, and Sehgal 2014).

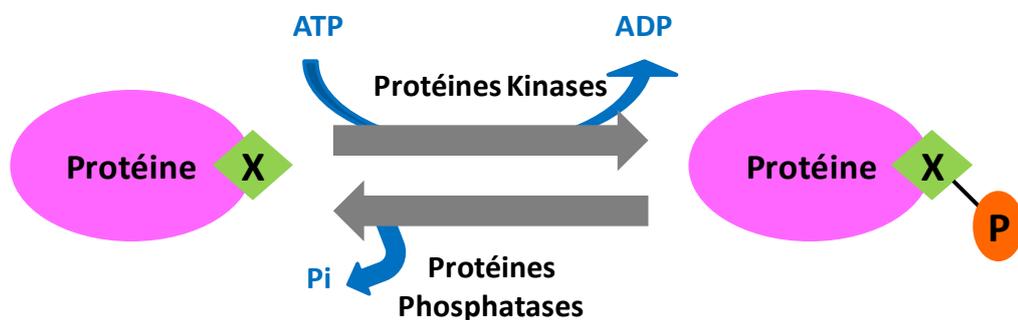
Pour continuer la lutte et limiter les résistances aux traitements, il faudrait découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Par exemple, identifier soit des protéines spécifiques au parasite *P. falciparum*, en réalisant des criblages à haut débit ; soit des protéines indispensables au développement, en utilisant la génétique inverse.

## Partie B : La Phosphorylation et la Déphosphorylation chez *Plasmodium falciparum*

Durant son cycle de développement, le parasite *P. falciparum* subit de multiples modifications structurales pour s'adapter à ses différents hôtes (Tuteja 2007) Son cycle de vie est donc très complexe nécessitant une régulation fine et rigoureuse, faisant intervenir de nombreuses protéines, qui sont encore mal connues actuellement (Chakrabarti et al. 2002; Doerig, Endicott, and Chakrabarti 2002). Des études récentes, sur le kinome et le phosphatome de *Plasmodium*, ont permis d'identifier des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et de montrer l'importance des kinases et des phosphatases dans le développement du parasite (Doerig et al. 2015; Guttery et al. 2014; Tewari et al. 2010).

Les modifications post-traductionnelles sont importantes car elles ont un impact sur la régulation des protéines. En effet, elles sont responsables d'une modification des acides aminés de la protéine entraînant un changement fonctionnel de celle-ci au niveau de son action, de sa demi-vie ou encore de sa localisation dans la cellule. Les modifications post-traductionnelles sont nombreuses et variées. Parmi celles-ci, on peut citer la méthylation, la glycosylation, l'ubiquitination, la biotinylation ou encore la phosphorylation.... La phosphorylation/déphosphorylation des protéines est l'un des mécanismes post-traductionnels les plus courants dans la cellule. La phosphorylation correspond au transfert d'un groupement phosphate d'un ATP donneur sur un résidu sérine, thréonine, tyrosine ou lysine d'une protéine au niveau de la chaîne latérale (**Figure 7**). Ce phénomène, réalisé par les kinases (ajout d'un groupement) et les phosphatases (retrait d'un groupement), intervient dans de nombreux processus biologiques tels que le métabolisme, la transmission des signaux, le cycle cellulaire....

Il est important de souligner que l'activité des kinases et des phosphatases est régulée par différentes protéines : d'autres kinases/phosphatases, des sous-unités régulatrices, des substrats ou pseudo-substrats.

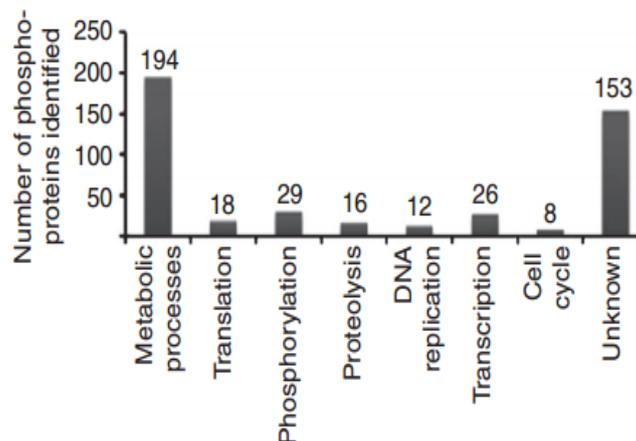


**Figure 7 : Schématisation des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation.** Une protéine kinase transfère un groupement phosphate (P) d'une molécule d'ATP au niveau d'un résidu sérine, thréonine, tyrosine ou lysine (correspondant au X) d'une protéine au niveau de sa chaîne latérale alors que la protéine phosphatases le retire sous la forme d'un phosphate inorganique (Pi).

## Introduction

Chez *P. falciparum*, le parasite emploie de nombreux mécanismes de transduction de signal à chaque étape de son développement. Des modifications post-traductionnelles ont été identifiées : phosphorylation, glycosylation, ubiquitination... (Doerig et al. 2015; Doug Chung et al. 2009).

Dans la suite de l'introduction, nous allons nous focaliser sur les enzymes kinases et phosphatases de *Plasmodium* impliquées respectivement dans les phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation des protéines. D'après une étude réalisée par Treeck et son équipe, la phosphorylation des protéines est de l'ordre de 26%, soulignant ainsi l'importance de ce phénomène chez le parasite (Treeck et al. 2011). En effet, ce sont des phénomènes de régulation ubiquitaire conservés dans de nombreux processus cellulaires, tels que la réplication de l'ADN, la transcription, la traduction, chez les eucaryotes et les procaryotes (**Figure 8**) (Solyakov et al. 2011).



**Figure 8 :** Histogramme représentant la répartition des protéines phosphorylées dans les principaux processus cellulaires chez *P. falciparum* (extrait de l'article (Solyakov et al. 2011)).

## I. Les kinases chez *Plasmodium falciparum*

### A. Les différentes familles des kinases

Deux études sur le génome de *P. falciparum* ont montré qu'il codait entre 89 et 99 protéines kinases (Anamika, Srinivasan, and Krupa 2005; Ward et al. 2004), correspondant à 1,1-1,6% du génome total. Parmi celles-ci, 72 appartiennent au groupe des kinases spécifiques des eucaryotes (les ePKs), 4 aux protéines kinases atypiques identifiées (aPKs) et 21 au groupe des kinases spécifiques des apicomplexes (les FIKKs) (Schneider and Mercereau-Puijalon 2005; Talevich, Mirza, and Kannan 2011; Ward et al. 2004) (**Tableau 3**).

Les ePKs peuvent être divisées en 7 familles distinctes :

La famille des caséines kinases : chez *P. falciparum*, un seul membre fait partie de ce groupe, la CK1. Chez les autres organismes plusieurs protéines constituent ce groupe, 4 chez la levure et 10 chez la drosophile par exemple. *In vitro*, il a été montré que CK1 pouvait

## Introduction

phosphoryler des protéines présentes dans des extraits parasitaires (Barik, Taylor, and Chakrabarti 1997).

La famille des CMGC : 18 kinases divisées en 4 groupes et sont impliquées dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. 9 protéines appartiennent au groupe des kinases dépendantes des cyclines (CDKs), 2 au « mitogen-activated protein kinases » (MAPKs), 3 au Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) et 4 aux protéines kinases homologues des CDKs (CLKs).

La famille des kinases dépendantes du calcium ou de la calmoduline (CamKs) : 15 kinases constituent ce groupe et ont divers rôle tels que la motilité de l'oocinète, la formation du microgamète, l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (Billker et al. 2004; Ishino et al. 2006; Siden-Kiamos et al. 2006). Chez *Plasmodium*, 13 kinases putatives ont été identifiées dont 7 caractérisées (Ward et al. 2004). Elles ont été nommées PfCDPK (Protéine Kinase Calcium Dépendante), et possèdent 4 domaines EF, permettant la fixation du calcium.

La famille des kinases AGC : elles interviennent dans différentes voies de signalisation importantes chez le parasite. Chez *P. falciparum*, le génome code pour trois protéines dépendant respectivement de l'AMP cyclique (PKA), de la GMP cyclique (PKG) ou de la calmoduline (PKB) (Doerig et al. 2008).

Les Tyrosines Kinases Like (TKLs) : 5 protéines étaient répertoriées en 2004 (Ward et al. 2004) mais l'étude du génome de *P. falciparum* n'en a dénombré que 4 (Abdi et al. 2010; Solyakov et al. 2011).

Les protéines kinases orphelines : regroupant 18 membres.

Les autres protéines kinases : regroupant 4 NIMA-related kinases (NIMA pour Never in Mitosis Gene A), 3 kinases Aurora (Reininger et al. 2011) et 4 kinases du groupe eIF2 $\alpha$ .

Les groupes des tyrosines kinases et des kinases STE (kinases stériles) ne sont pas présents dans le kinome de *Plasmodium*.

Les kinases FIKKs sont spécifiques des apicomplexes et 21 protéines constituent ce groupe (Anamika, Srinivasan, and Krupa 2005; Ward et al. 2004). Dans la plupart des espèces de *Plasmodium*, une à six protéines ont été identifiées alors que 21 membres ont été répertoriés chez *P. falciparum*. Cette dénomination est due à la présence du motif phénylalanine-isoleucine-lysine-lysine (FIKK) au niveau de la région N-terminale du domaine kinase de l'enzyme. De plus, toutes les protéines FIKKs possèdent le motif d'export PEXEL (Schneider and Mercereau-Puijalon 2005) et sont localisées au niveau de l'érythrocyte (Nunes et al. 2007). Elles auraient un rôle dans le remodelage de la membrane de l'érythrocyte et seraient exprimées principalement aux stades anneau et schizonte (Nunes et al. 2010).

## Introduction

**Tableau 3 : Les protéines kinases putatives de *P. falciparum*.** Tableau effectué à partir des données du kinome de *P. falciparum* (Solyakov et al. 2011; Talevich, Mirza, and Kannan 2011; Ward et al. 2004). Les protéines en gras ont été caractérisées.

Nom du groupe		Nom ou numéro d'accèsion des kinases	Fonction des kinases	
ePKs (72)	CK1 (1)	<b>PfCK1</b>		
	CMGC (18)	CDK (9)	<b>PfPK5, PfMRK, PfCRK1</b> , PfCK2, PfCRK3, PfCRK4, PfCRK5, <b>PfPK6</b> et PF3D7_1338900	Progression du cycle cellulaire
		MAPK (2)	<b>PfMAP1 et PfMAP2</b>	Régulation prolifération et différenciation cellulaires / transduction des signaux cellulaires
		GSK3 (3)	PfGSK3, PfPK1, PF3D7_1316000	Régulation de la prolifération cellulaire
		CLK (4)	PfCLK1, PfCLK2, PfCLK3 et PfCLK4	Epissage de l'ARN messager
	CamK (15)	<b>PfPK2, PfCDPK1, PfCDPK2, PfCDPK3, PfCDPK4, PfCDPK5, PfCDPK6, PfCDPK7</b> , PF3D7_0214600, PF3D7_0311400, PF3D7_0704500, PF3D7_0926000, PF3D7_1104900, PF3D7_1423600, PF3D7_1441300	Signalisation intracellulaire du calcium	
	AGC (5)	<b>PfPKA, PfPKB, PfPKG</b> et 2 kinases ajoutées à ce groupe PF11_0464, PF11_0227	Implication dans différentes voies de signalisation	
	TKL (4)	PfTKL1, <b>PfTKL2, PfTKL3</b> et PfTKL4	Implication dans la phase érythrocytaire	
	Orphelines (19)	<b>PfPK7, PfPK9, PfKIN</b> , PfEST, PF3D7_0107600, PF3D7_0203100, PF3D7_0321400, PF3D7_0724600, PF3D7_0926100, PF3D7_0926300, PF3D7_0928800, PF3D7_1106800, PF3D7_1148000, PF3D7_1247500, PF3D7_1331300, PF3D7_1441300, PF3D7_1433900, PF3D7_1474700, PF3D7_1450000		
	Autres (10)	NIMA (4)	<b>PfNEK1, PfNEK2, PfNEK3, PfNEK4</b>	Implication dans la schizogonie et la régulation cycle cellulaire
		Aurora (3)	<b>PfARK1, PfARK2, PfARK3</b>	Progression dans le cycle cellulaire
		eIF2 $\alpha$ (3)	<b>PfeIK1, PfeIK2, PfeIK4</b>	
FIKK (21)	PfFIKK, PfFIKK1, PfFIKK3, <b>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</b> et PfFIKK14	Remodelage de la membrane de l'érythrocyte (fonction putative)		
aPKs (4)	RIO (2)	PfRIO1, <b>PfRIO2</b>	Processing des ARNr	
	ABC1 (2)	PfABCK1, PfABCK2		

### B. Les kinases « essentielles » pour le parasite

Les kinases essentielles sont les protéines entraînant la mort du parasite à un moment du cycle de développement lorsque celles-ci sont absentes.

Un nombre important de protéines kinases de *Plasmodium* n'a pas d'orthologue chez l'Homme. De plus, peu de kinases ont été caractérisées (environ 40). Des études récentes sur le kinome de *Plasmodium*, utilisant la génétique inverse, ont montré l'existence de 36 kinases essentielles et 24 non essentielles pour le développement du parasite (**Tableau 4**). Cela s'explique par une redondance fonctionnelle d'environ 50% des protéines kinases.

## Introduction

Grâce aux expériences d'interruption des gènes, il a été montré que 24 kinases ont une fonction spécifique dans le développement sexué (Solyakov et al. 2011; Tewari et al. 2010).

**Tableau 4 : Les protéines kinases essentielles et non essentielles pour le développement du parasite. Les protéines kinases caractérisées sont représentées en gras.**

Kinases non essentielles	Kinases essentielles
<b>PfTKL2</b> , PfTKL4, <b>PfeIK1</b> , <b>PfeIK2</b> , <b>PfNEK2</b> , <b>PfNEK3</b> , <b>PfNEK4</b> , PfCRK5, <b>PfMAP1</b> , PfPK1, <b>PfCDPK4</b> , PfCDPK7, PfPKRP (PF3D7_0311400), PfPK8 (PF3D7_0203100), <b>PfPK7</b> , PF3D7_1338900, PfCDPK6, PF3D7_0214600, PF3D7_0704500, PF3D7_1104900, PF3D7_0926000, PF3D7_1441300, PF3D7_0715300, PF3D7_1450000, PF3D7_1247500, PF3D7_1423600	<b>PfCK1</b> , PfTKL1, <b>PfTKL3</b> , <b>PfPK4</b> , <b>PfNEK1</b> , PfCRK4, <b>PfPK6</b> , PfCRK3, <b>PfPK5</b> , <b>PfMRK</b> , <b>PfCRK1</b> , <b>PfMAP2</b> , PfCK2, PF3D7_1315500, PfGSK3, PfCLK1, PfCLK2, PfCLK3, PfCLK4, <b>PfPK2</b> , <b>PfCDPK1</b> , <b>PfCDPK5</b> , <b>PfCDPK2</b> , <b>PfCDPK3</b> , <b>PfARK1</b> , <b>PfARK2</b> , <b>PfARK3</b> , PF3D7_1145200 (PF11_0464), PF3D7_1121900 (PF11_0227), <b>PfPKG</b> , <b>PfPKA</b> , <b>PfPKB</b> , PfEST, PF3D7_1148000, <b>PfKIN</b> , <b>PfPK9</b>

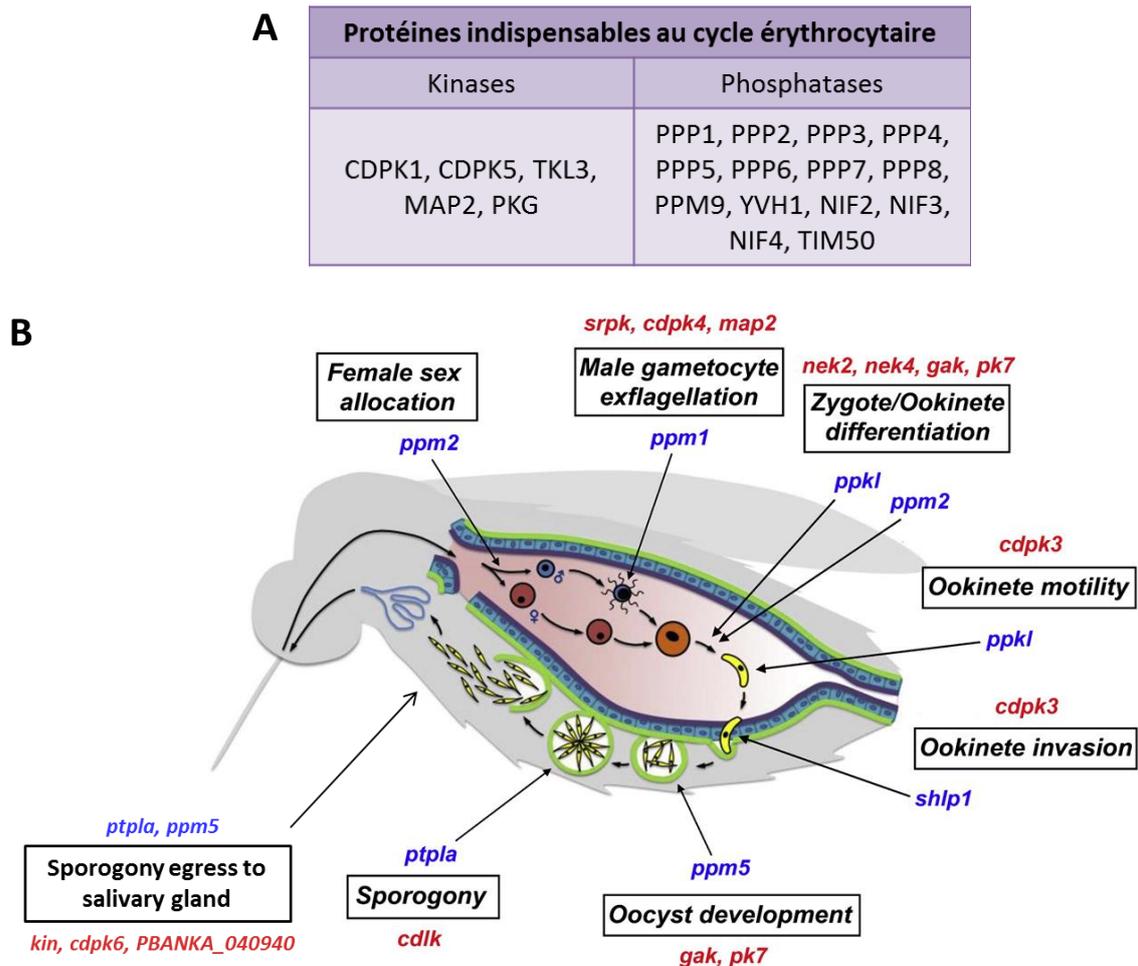
Le Dr. Tewari et son équipe ont analysé le kinome de *P. berghei*, composé de 73 protéines kinases putatives. Les kinomes de *P. berghei* et *P. falciparum* sont hautement conservés, une analogie sur l'importance et les fonctions des protéines kinases peut donc être envisagée. Néanmoins quelques différences existent : *P. berghei* possède une TKL supplémentaire (TKL6) et une unique protéine kinase FIKK, alors que *P. falciparum* possède 21 FIKKs (Tewari et al. 2010). Chez *P. berghei*, il a été montré que plus d'un tiers des gènes ePKs sont redondants dans le cycle érythrocytaire. La réalisation de mutants sur les ePKs a montré qu'ils avaient une importance dans le développement du zygote et dans la transmission (**Figure 9**).

Une autre étude réalisée par le Dr. Doerig, utilisant l'interruption de gènes, a montré que les protéines PbCRK1, PfMAP2, PfCK2, PfCDPK1 et PfPKG sont essentielles pour la schizogonie érythrocytaire (Doerig et al. 2010). En effet, une étude a montré que PfMAP2 est essentielle pour le développement du parasite contrairement à PfMAP1. De plus, en absence de cette dernière, PfMAP2 est surexprimée (Dorin-Semblat et al. 2007). Les protéines PfCDPK1, PfCDPK5 sont essentielles au niveau du cycle érythrocytaire notamment dans la libération des mérozoïtes et dans la réinvasion (**Figure 9A**) (Azevedo et al. 2013; Bansal et al. 2013; Dvorin et al. 2010; Green et al. 2008; Kato et al. 2008).

Parmi toutes les kinases, il y a également des protéines importantes pour le développement du parasite. En effet, l'absence de ces kinases cause des problèmes au

## Introduction

niveau du développement parasitaire. Une étude réalisée sur Pfark1 montre son importance au niveau de la schizogonie érythrocytaire. Elle aurait un rôle dans la formation du fuseau mitotique et son absence pourrait être responsable de modifications sur la croissance du parasite (Reininger et al. 2011). Une étude effectuée par le Dr. Dorin-Semblat en 2011, a montré par génétique inverse que PfNek1 est nécessaire pour l'achèvement du cycle asexué dans les érythrocytes. De plus, il semblerait que cette protéine soit exprimée dans les gamétocytes mâles uniquement, ce qui peut en faire une cible thérapeutique potentielle dans la lutte contre le paludisme (Dorin-Semblat et al. 2011).



**Figure 9 : Implication des protéines kinases et phosphatases au cours du cycle de développement de *Plasmodium*.** Les protéines kinases et phosphatases essentielles pour le parasite au cours de la phase érythrocytaire (A) et du développement chez le moustique (B). Les kinases sont écrites en rouge et les phosphatases en bleu. Les données sont issues des articles (Doerig et al. 2005; Guttery et al. 2014; Tewari et al. 2010). L'image est extraite de l'article de (Guttery et al. 2014) et complétée à l'aide des articles de (Doerig et al. 2015; Tewari et al. 2010).

Les kinases sont donc impliquées dans de nombreuses voies de signalisation et sont importantes/essentielles pour le développement du parasite.

### II. Les phosphatases chez *Plasmodium falciparum*

Pour réguler la balance phosphorylation/déphosphorylation des protéines, il y a les phosphatases, enzymes qui ont pour fonction d'enlever un groupement phosphate. Le nombre de phosphatases est réduit par rapport à celui des kinases. Cependant, cela est contrebalancé par un nombre important de régulateurs responsables notamment de la spécificité du substrat.

Chez les eucaryotes deux grandes familles de phosphatases ont été identifiées : les Protéines Tyrosine Phosphatases (PTPs) et les Protéines Sérine/thréonine Phosphatases (PSP). Les PTPs sont divisées en 3 groupes : le premier regroupant les PTPs classiques et les phosphatases à double spécificité (c'est-à-dire capable de déphosphoryler les résidus tyrosine et sérine/thréonine), le deuxième avec les PTPs de faibles poids moléculaires et le dernier avec les CDC25. Les PSPs sont également divisées en trois groupes : les phosphoprotéines phosphatases (PPP), les protéines phosphatases dépendantes d'ion métallique (PPM) et les protéines phosphatases dépendantes d'un aspartate (FCP/SCP).

#### A. Les différentes familles de phosphatases

Les premières études du génome de *Plasmodium* ont permis de mettre en évidence 27 phosphatases putatives, réparties en 4 grandes familles décrites chez l'Homme (Wilkes and Doerig 2008). Une analyse de 2014, a démontré l'existence de 67 phosphatases chez *P. falciparum* alors que 250 sont identifiées chez l'Homme. 33 protéines phosphatases n'ont pas d'orthologue humain et 6 sont spécifiques à ce phylum (Pandey et al. 2014). Dans ces études, les phosphatases ont été répertoriées en différentes familles distinctes (Pandey et al. 2014; Wilkes and Doerig 2008).

Chez *P. falciparum*, les protéines phosphatases ont été classées en 7 familles (**Tableau 5**):

Les métallophosphatases (PPM) peuvent être divisées en 2 familles : les phosphoprotéines phosphatases (PPP), constituées de 18 protéines ayant un site actif avec deux ions métalliques (fer, manganèse ou encore zinc...) est divisée en plusieurs groupes ; et la famille des PP2C regroupant 11 sérine/thréonine phosphatases, dépendantes d'un ion manganèse et d'un ion magnésium. 8 de ces protéines n'ont pas d'orthologue chez l'Homme et seulement PfPP2C est caractérisée chez *P. falciparum* (Mamoun et al. 1998).

La famille des HaloAcid Dehalogenase-like Hydrolases (HAD-like) : 10 protéines, utilisant une asparagine phosphorylée comme intermédiaire lors de l'hydrolyse de la liaison du phosphate. Ces protéines possèdent un « alpha/beta core domain » et un « small cap domain », 50% n'ont pas d'orthologue chez l'Homme.

Les protéines tyrosines phosphatases (PTPs) à double spécificité : 4 protéines constituent ce groupe dont 2 ont été caractérisées : PfYVH1 et PfPRL. Chez *P. falciparum*, les

## Introduction

PTPs classiques, de faible poids moléculaire ou appartenant au groupe CDC25 n'ont pas été identifiées.

La famille des exonucléases-endonucléases phosphatases (EEPs) : 8 protéines avec divers domaines catalytiques. La particularité de ce groupe est que ces enzymes ont le même mécanisme de clivage des ponts phosphodiester sur les substrats (Marchler-Bauer et al. 2011).

Les protéines histidines phosphatases (HPs) : 5 protéines ayant un cœur catalytique conservé avec un résidu histidine, qui est phosphorylé transitoirement au cours du cycle catalytique. Elles jouent un rôle fonctionnel dans le métabolisme, la signalisation et la régulation.

Les autres phosphatases : 4 protéines tyrosines phosphatases-like (PTP-like) et 10 phosphatases orphelines, divisées en quatre groupes (PAP2-like, Syja\_N, PTH2\_family et nucléosides phosphatases).

## Introduction

**Tableau 5 : Les protéines phosphatases putatives de *P. falciparum*.** Données venant des analyses du phosphatome de Wilkes (Wilkes and Doerig 2008) et de Pandey (Pandey et al. 2014). Les protéines en gras ont été caractérisées.

Nom du groupe	Nom ou numéro d'accèsion des phosphatases
PPM/PPP (18)	<b>PfPPP1, PfPPP2A, PfPPP5, PfPPP7, PfPPP2B, PfPPKL, PfSHLP1, PfSHLP2,</b> PfDRB1, PfGAP50, PF3D7_0925400, PF3D7_0927700, PF3D7_1018200, PF3D7_1403900, PF3D7_1406700, PF3D7_1464600, PF3D7_0107800, PF3D7_0912400
Histidine phosphatases (HP) (5)	PfPGM1, PfPGM2, PF3D7_1430300, PF3D7_0208400, PF3D7_0310300
Haloacid Dehalogenase (HAD_like) (10)	PF3D7_0515900, PF3D7_0726900, PF3D7_1012700, PF3D7_1226100, PF3D7_1355700, PF3D7_1363200, PF3D7_0715000, PF3D7_0817400, PF3D7_1118400, PF3D7_0303200
2-phosphoatidic acid phosphatases (PAP2_like) (3)	PF3D7_0625000.1, PF3D7_0625000.2, PF3D7_0805600
PPM/PP2C (PP2Cc) (11)	<b>PP2C,</b> PF3D7_0410300, PF3D7_0520100, PF3D7_0810300, PF3D7_0810500, PF3D7_1009600, PF3D7_1135100, PF3D7_1249300, PF3D7_1309200, PF3D7_1455000, PF3D7_1208900
Exonuclease-endonuclease phosphatases (EEP)(8)	PF3D7_0319200, PF3D7_0705500, PF3D7_1111600, PF3D7_0107200, PF3D7_0305600, PF3D7_1238600, PF3D7_1363500, PF3D7_1430600
SacL homology domain (Syja_N) (3)	PF3D7_0705500, PF3D7_0802500, PF3D7_1354200
Protein tyrosine phosphatase like protein (PTPLA) (1)	PF3D7_1331600
Rhodanese homolgy domain (RHOD) (2)	<b>PfMAPKP1</b> (PF3D7_1305500), PF3D7_1206400
Triphosphate tunnel metalloenzyme phosphatases (CYTH-like_Pase) (1)	PfPrt1 (PF3D7_0322100)
Peptidyl-tRNA hydrolase, type 2 (PTH2_family) (1)	PF3D7_0610500
Protein tyrosine phosphatase (PTPc) (4)	<b>PfYVH1, PfPRL,</b> PF3D7_1127000, PF3D7_1455100
Nucleoside phosphatase superfamily (2)	PF3D7_1431800, PF3D7_1322000

### B. Les phosphatases « essentielles » pour le parasite

Une étude réalisée en 2014 par le Dr. Guttery, a permis d'identifier le rôle des protéines phosphatases dans le développement du parasite *Plasmodium*. Des expériences de génétique inverse et de délétions chez *P. berghei* ont permis d'étudier la fonction/le rôle des protéines phosphatases.

Une conservation très importante entre le phosphatome de *P. berghei* et *P. falciparum*, a été observée. Ce qui est démontré chez *P. berghei* peut donc être déduit chez *P. falciparum* (Guttery et al. 2014). Néanmoins quelques différences sont à noter : deux

## Introduction

phosphatases sont spécifiques de *P. berghei* : PTP2 et NIF1, qui se rapprocheraient respectivement d'YVH1 et de NIF2 de *P. falciparum*, d'après une analyse phylogénétique des phosphatases. De plus, PPM10 serait spécifique à *P. falciparum* (Guttery et al. 2014).

Les analyses de génétique inverse suggèrent une redondance de la moitié des protéines phosphatases durant la phase érythrocytaire chez *P. berghei*. De plus, il semblerait que la majorité des PPM soit essentielle pour le stade érythrocytaire asexué (**Figure 9A**). Chez *P. falciparum*, PP5 semble interagir avec de nombreux partenaires et donc semble essentielle dans la croissance parasitaire (Pandey et al. 2014). PfPPKL a une grande similarité de séquence avec PP1 au niveau de sa partie C-terminale. La protéine, exprimée aux différents stades du développement parasitaire, semble jouer un rôle important dans la morphologie des oocinètes, la motilité et l'invasion (Guttery et al. 2014; Philip et al. 2012). De plus, elle aurait un rôle primordial dans la dégradation de l'hémoglobine (Pandey et al. 2014).

Il semblerait que 6 phosphatases soient essentielles pour le développement de l'oocyste et dans la transmission du parasite (**Figure 9B**). La mutation de 8 gènes : shlp2, ppm3, ppm4, ppm7, ppm8, ptp1, ptp2 et nif1 n'a pas d'impact/d'influence sur le cycle de vie du parasite, ces protéines seraient donc non essentielles pour le développement de *P. berghei* (**Tableau 6**).

**Tableau 6 : Récapitulatif des protéines phosphatases essentielles ou non pour le développement du parasite *P. berghei*. Les protéines en gras ont été caractérisées chez *P. falciparum*.**

Phosphatases essentielles	Phosphatases non essentielles
<b>PPP1, PPP2, PPP3, PPP4, PPP5, PPP6, PPP7, PPP8, PPM9, YVH1, PRL, NIF2, NIF3, NIF4, TIM50, PPM1, PPM2, <b>PPKL, SHLP1</b>, PPM5, PTPLA</b>	<b>SHLP2, PPM3, PPM4, PPM7, PPM8, PTP1, PTP2, NIF1</b>

Chez les eucaryotes, les protéines phosphatases de type 1 et 2A sont les plus importantes. En effet, elles réguleraient 90% de l'activité sérine/thréonine phosphatases dans la cellule. Chez *P. falciparum*, ces phosphatases ont été identifiées et caractérisées. Il a été démontré que PfPP2A joue un rôle essentiel dans le développement du parasite (Vandomme et al. 2014). PfPP1, étant le sujet de ma thèse, le chapitre suivant de l'introduction lui est consacré.

# Partie C : la Protéine Phosphatase de type 1 (PP1)

Le projet de ma thèse se focalise sur les régulateurs de la protéine phosphatase de type 1. La suite de cette introduction sera donc consacrée à la phosphatase PP1 et ses régulateurs chez les eucaryotes et chez *P. falciparum*.

## I. La protéine phosphatase de type 1

### A. Chez les eucaryotes

Chez l'Homme, 420 gènes codent pour les sérine/thréonine kinases alors que seulement 40 codent pour les sérine/thréonine phosphatases (Peti, Nairn, and Page 2012). Le faible nombre de phosphatases ne peut pas expliquer l'ensemble des phénomènes de déphosphorylation. Or une balance existe entre la phosphorylation-déphosphorylation des protéines dans la cellule. Il semblerait donc que des événements de régulation parallèle soient mise en place au sein de la cellule afin que les phosphatases exercent leurs différentes fonctions. Les principales phosphatases sont les protéines phosphatases de type 1 et 2A (appelées couramment PP1 et PP2A), et représentent 90% des phénomènes de déphosphorylation chez les eucaryotes (Moorhead, Trinkle-Mulcahy, and Ulke-Lemée 2007). Ces phosphatases sont les plus étudiées, et il a été montré que 650 complexes peuvent être formés avec PP1 contre 70 avec PP2A (Janssens and Goris 2001; Janssens, Longin, and Goris 2008). De plus, PP1 est la principale phosphatase impliquée dans les processus de déphosphorylation.

### 1. Généralités sur PP1

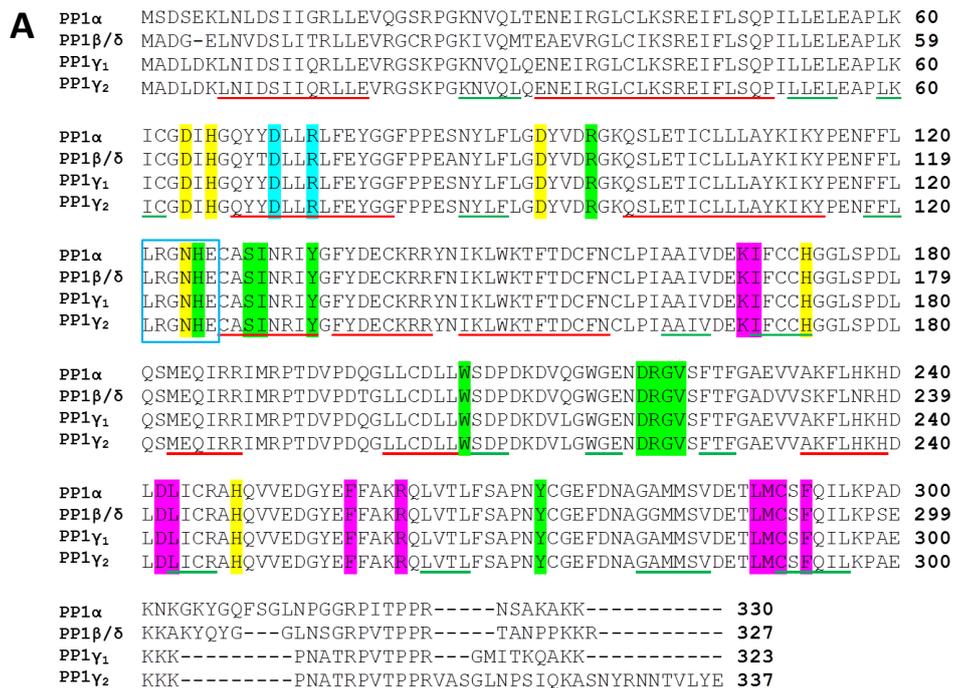
#### a. Présentation de PP1

La protéine phosphatase de type 1 (PP1) a été découverte dans les années 1940 et était connue sous le nom d'enzyme PR (Phosphorylation Reversible) ou phosphorylase phosphatase. PP1 est la première protéine phosphatase identifiée. Les premiers travaux ont montré son implication dans le métabolisme du glycogène. En effet, elle est capable de transformer la phosphorylase a active en phosphorylase b inactive (Cori 1945). Les phosphatases ont été divisées en deux groupes distincts : les phosphatases de type 1, qui déphosphorylent la sous-unité  $\beta$  de la phosphorylase kinase et sont sensibles aux inhibiteurs 1 et 2 ; et les phosphatases de type 2, qui déphosphorylent la sous-unité  $\alpha$  de la phosphorylase kinase et sont insensibles aux inhibiteurs 1 et 2 (P. Cohen 1981; Ingebritsen, Foulkes, and Cohen 1980). L'implication des protéines phosphatases dans la régulation du cycle cellulaire a été étudiée tardivement par rapport aux protéines kinases. Les premières recherches concernant PP1 se sont focalisées sur sa structure et son rôle. PP1 est toujours étudiée car beaucoup d'inconnues existent sur ses fonctions au sein de la cellule (Fardilha et al. 2010). PP1 possède la séquence LRGNHE, spécifique des protéines sérine/thréonine phosphatases.

# Introduction

## b. La structure de PP1

La PP1 est une holoenzyme, c'est-à-dire une protéine composée de 2 sous-unités : la sous-unité catalytique, nommée PP1c, et une sous-unité régulatrice variable. La sous-unité catalytique est très conservée entre les espèces. Chez les eucaryotes, un à huit gènes codent pour les isoformes de PP1c (Farkas et al. 2007). Chez les mammifères, trois gènes codent pour les 4 isoformes de PP1 : PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta/\delta$ , PP1 $\gamma_1$  et PP1 $\gamma_2$  (**Figure 10A**) (Ceulemans, Stalmans, and Bollen 2002; Cohen 1988; Moorhead, Trinkle-Mulcahy, and Ulke-Lemée 2007).



## B

	PP1 $\alpha$	PP1 $\beta/\delta$	PP1 $\gamma_1$	PP1 $\gamma_2$
PP1 $\alpha$	-	89%	91%	88%
PP1 $\beta/\delta$	-	-	87%	85%
PP1 $\gamma_1$	-	-	-	93%
PP1 $\gamma_2$	-	-	-	-

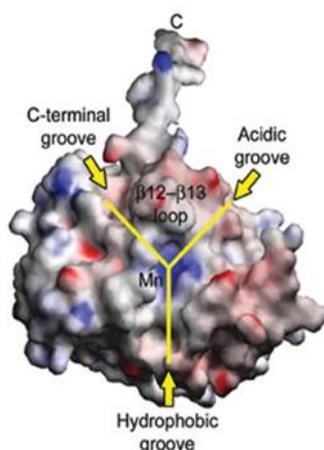
**Figure 10 : Les isoformes de PP1. A :** Alignement des séquences de PP1 $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma_1$  et  $\gamma_2$ . L'encadrement bleu représente la séquence spécifique des protéines sérine/thréonine phosphatases LRGNHE. Les structures secondaires de PP1 sont indiquées sur la séquence avec les hélices  $\alpha$  représentées par un trait rouge et les feuilletts  $\beta$  par un trait vert. Les résidus impliqués dans la liaison avec les ions métalliques sont surlignés en jaune, les résidus impliqués dans la liaison avec les toxines sont surlignés en vert. Les résidus formant la poche de fixation au motif RVxF et ceux jouant un rôle important dans la fixation des protéines cibles/substrats se liant au niveau du sillon C-terminal de PP1 sont respectivement surlignés en rose et bleu (alignement des séquences est basé sur l'article de (Peti, Nairn, and Page 2013)). **B :** Pourcentage d'identité entre les différents isoformes de PP1 de l'Homme.

## Introduction

La PP1c est extrêmement conservée entre les espèces, avec 70% des résidus invariants et des divergences uniquement sur les parties N-terminale et C-terminale (**Figure 10B**) (Ceulemans and Bollen 2004). Les isoformes PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta/\delta$  et PP1 $\gamma_1$  ont une répartition ubiquitaire alors que l'isoforme PP1 $\gamma_2$  est seulement présent dans les testicules (Andreassen et al. 1998; Chun et al. 1994; Shima et al. 1993). Grâce à cette forte homologie, la complémentation de PP1 d'un organisme à l'autre a été prouvée, indiquant ainsi une homologie de fonction de la phosphatase (Doonan et al. 1991; Sangrador et al. 1998).

### *i. La sous-unité catalytique de PP1 : PP1c*

La particularité de la sous-unité catalytique de PP1 est sa régulation *via* son interaction avec différentes sous-unités, au nombre de 200 (**Annexe 1**), lui conférant une localisation cellulaire, une spécificité de substrat et une régulation de son activité (Hubbard and Cohen 1993). La PP1 est composée de 3 sillons principaux : hydrophobe, hydrophile (ou acide) et le dernier au niveau de la partie C-terminale, permettant la fixation des sous-unités régulatrices. Ces sillons forment un Y (représenté en jaune, **Figure 11**) et se croisent au niveau du site catalytique (ou site actif) de PP1c. Le site catalytique est un sillon peu profond, qui permet la fixation de deux ions métalliques, le premier étant un ion manganèse et le deuxième un ion ferreux (**Figure 11**) (Ceulemans and Bollen 2004).

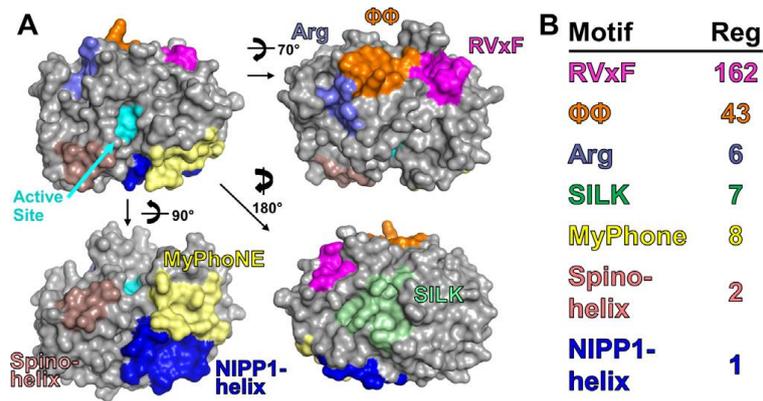


**Figure 11 : Représentation des différents sillons principaux de PP1c.** Les traits représentés en jaune correspondent aux sillons de PP1. Les ions métalliques se fixent à l'intersection des 3 sillons (Terrak et al. 2004).

### *ii. La conformation invariante de PP1*

Plusieurs cristaux d'holoenzyme de PP1 ont été réalisés et montrent que la conformation de la PP1 ne change pas ou très peu lorsque la PP1c se fixe à ses régulateurs (Egloff et al. 1995; Goldberg et al. 1995). De plus, la PP1c contient de nombreuses « régions » de liaison aux partenaires, représentant environ 90% de la surface de la PP1c (**Figure 12**) (Peti and Page 2015). Les résidus de PP1 impliqués dans la fixation aux différents motifs ne changent pas. Des études ont montré la présence d'une boucle  $\beta 12$ - $\beta 13$ , qui permet la fixation de toxines inhibitrices (J H Connor et al. 2000).

## Introduction



**Figure 12 : Les sillons de liaison à la protéine régulatrice PP1. A :** Représentation des surfaces de PP1 avec les différentes régions de fixation des régulateurs (RVxF en rose,  $\Phi\Phi$  en orange, Arg en violet, SILK en vert, MyPhoNE en jaune, NIPP1-helix en bleu foncé et Spino-helix en rose pâle). Le site actif est représenté en cyan. **B :** La présence des différents motifs dans les régulateurs confirmés de PP1 (189) (Image extraite de l'article de (Peti and Page 2015))

### iii. Inhibition par des toxines naturelles de la PP1

L'étude de la PP1 au cours des dernières décennies a montré qu'elle pouvait être inhibée par des toxines naturelles mais non spécifiques. L'utilisation de ces molécules a permis l'identification de nombreux régulateurs de la phosphatase. Les diverses toxines identifiées se fixent préférentiellement au site actif pour la microcystine ou au niveau du sillon hydrophobe pour l'acide okadaïque. Parmi les différentes toxines utilisées, nous pouvons citer également la calyculine A ou encore la tautomycine. L'acide okadaïque, à des concentrations plus faibles, inhibe également la protéine phosphatase de type 2A (Ceulemans and Bollen 2004).

### c. Les différentes fonctions de PP1

La protéine phosphatase de type 1c (PP1c), avec une taille variant de 35 à 38kDa, est associée à d'autres sous-unités. Elle est impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires vitaux tels que la méiose, l'apoptose, le métabolisme du glycogène, la synthèse des protéines, la contraction musculaire et la transcription (Bollen and Stalmans 1992; Bollen 2001; Ceulemans and Bollen 2004; Cohen 2002). PP1 joue également un rôle dans la progression du cycle cellulaire. Quelques exemples de l'action de PP1 durant le cycle cellulaire et dans la synthèse protéique vont être décrits dans ce paragraphe.

#### i. Le cycle cellulaire

Les protéines PP1 et Aurora B interagissent physiquement et ce complexe jouerait un rôle à plusieurs étapes du cycle. Lors de la mitose l'histone H3 permet la (dé)condensation des chromosomes si elle est (dé)phosphorylée par la protéine PP1 ou par Aurora B. De plus, le complexe Aurora B/PP1 pourrait intervenir aussi dans la cytokinèse ou encore dans la méiose (Ceulemans and Bollen 2004).

Au niveau de la transition G2/M, PP1 interagirait avec la protéine kinase Aurora A, qui est nécessaire dans la séparation des centrosomes.

## Introduction

Au niveau de la transition G1/M, PP1 serait impliquée dans le ré-assemblage de l'enveloppe nucléaire à la fin de la mitose. En effet, PP1 est recrutée au niveau de l'enveloppe nucléaire par AKAP149 (A-kinase anchoring protein 149) et déphosphoryle alors la Laminine B. L'absence de PP1 entraîne le déclenchement de l'apoptose (Steen et al. 2003).

Dans le cycle cellulaire, PP1 a de nombreux rôles, elle intervient/interagit avec de nombreux partenaires. Si PP1 n'est pas fonctionnelle à une de ses étapes, plusieurs conséquences sont possibles : un cycle cellulaire avec des anomalies, l'arrêt du cycle cellulaire voire l'apoptose. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a pu être montré que PP1 est essentielle pour l'intégrité cellulaire et la progression du cycle cellulaire (Andrews and Stark 2000). De plus, une déplétion ou une mutation sur Glc7, la PP1 de la levure, entraîne respectivement un arrêt de l'assemblage du réseau mitotique et des anomalies mitotiques (Bloecher and Tatchell 1999; Hisamoto, Sugimoto, and Matsumoto 1994). La PP1 semble donc essentielle pour le cycle cellulaire.

### ii. La synthèse protéique

Des études ont montré que PP1 intervenait au niveau de la transcription, au niveau de l'ARNm et au niveau de la traduction.

Lors de la traduction, eIF2 $\alpha$  joue un rôle important. Lors d'un stress, ce facteur est phosphorylé et l'initiation de la traduction est ralentie car le facteur eIF2B est séquestré. De plus, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  entraîne une augmentation de la traduction de l'activating-transcription-factor 4, qui est impliqué dans l'induction des gènes en réponse au stress. Quatre protéines kinases peuvent phosphoryler eIF2 $\alpha$ . Parmi celles-ci, la protéine kinase R qui peut se fixer à PP1. Il semblerait que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  soit corrélée avec l'activité de PP1. En effet, une hyperphosphorylation de ce facteur provoque une diminution de l'activité phosphatase de PP1 sur eIF2 $\alpha$  (Brush, Weiser, and Shenolikar 2003). L'action de PP1 sur ce dernier se fait grâce à l'intervention de GADD34 (Growth Arrest DNA Damage-inducible protein). Il semblerait que le complexe GADD34/PP1/inhibiteur 1 et le niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  soient étroitement liés durant l'étape de traduction (John H Connor et al. 2001).

## B. Chez *Plasmodium falciparum*

### 1. Séquence

Chez *P. falciparum*, une seule protéine phosphatase de type 1 (PF3D7\_1414400), appelée PfPP1c, a été identifiée et caractérisée. PfPP1c a une similarité de 80% avec ses homologues chez l'Homme et la levure *S. cerevisiae* (Bhattacharyya et al. 2002). PfPP1c est située au niveau du chromosome 14 et sa séquence est constituée de 304 acides aminés dont le motif LRGNHE, qui est spécifique des sérine/thréonine phosphatases. La caractérisation de PfPP1c a permis d'identifier 2 sites putatifs de phosphorylation de la PKC et 5 sites de la kinase caseine II.

## Introduction

En comparant la séquence de PfPP1c avec ses homologues, des similitudes au niveau du site catalytique (AA 10 à 300) et de la boucle  $\beta$ 12- $\beta$ 13 (AA 270 à 280) ont été observées (Bhattacharyya et al. 2002). De plus, la séquence de PfPP1c est la plus petite des PP1 identifiées, et ne possède pas de domaine riche en proline au niveau C-terminal. Tout comme ses homologues, PfPP1c est sensible aux inhibiteurs 1 et 2 humains (Kumar et al. 2002a).

### 2. Fonction

PfPP1c, comme ses différents homologues (levure, homme...), est responsable en grande partie de l'activité phosphatase chez *P. falciparum* (Bhattacharyya et al. 2002; Cayla, Garcia, and Baumgartner 2000; Yokoyama et al. 1998). En utilisant l'acide okadaïque, qui est un inhibiteur de la PP1 et PP2A, il a pu être montré que PfPP1c a une action prédominante dans le cycle érythrocytaire par rapport à PfPP2A (Dobson et al. 1999).

Des expériences d'interruption du gène de PfPP1c, en utilisant les siRNA, ont montré que la protéine est impliquée dans la progression du cycle cellulaire. En effet, une diminution de la croissance des parasites a pu être observée chez les parasites interférés (Kumar et al. 2002a). Des études sur le phosphatome de *Plasmodium*, en utilisant la génétique inverse, ont montré que la protéine PP1 semble essentielle au parasite au niveau du cycle érythrocytaire (Guttery et al. 2014). De plus, PfPP1c est impliquée dans la libération des mérozoïtes infectieux. En effet, la déphosphorylation de PfSBP1 (Skeletal Binding Protein 1), protéine impliquée dans la stabilisation membranaire des érythrocytes, par PfPP1c entraîne une perte d'interaction avec LANCL1, provoquant ainsi la rupture des érythrocytes (Blisnick et al. 2006).

## II. Les régulateurs de PP1c

### A. Chez les eucaryotes

#### 1. Généralités sur les régulateurs

Les premiers régulateurs de la phosphatase de type 1 ont été identifiés dans les années 1970 (Brandt, Killilea, and Lee 1974). Ces découvertes ont permis de mieux comprendre la difficulté à isoler PP1c. En effet, la PP1c n'est jamais seule dans la cellule, elle est toujours liée à une sous-unité régulatrice. Les régulateurs de PP1c peuvent être divisés en 2 groupes : les régulateurs primaires, qui ont toujours eu un site de fixation à PP1c, et sont présents dans tous les eucaryotes tels que l'inhibiteur 2 ou Sds22 ; et les régulateurs secondaires, qui ont acquis un ou plusieurs sites de fixation à PP1c au cours de l'évolution, par exemple Nek2 (Ceulemans and Bollen 2004; Ceulemans, Stalmans, and Bollen 2002). La fonction de ces différentes sous-unités régulatrices est tout aussi importante que la PP1c elle-même. En effet, ils interviennent dans la viabilité et la survie cellulaire (Hendrickx et al. 2009).

## Introduction

Chez les vertébrés, environ 200 protéines, interagissant avec PP1c, ont été répertoriées (**Annexe 1**). Ces protéines peuvent être soit des substrats de PP1c, soit des régulateurs de l'activité de la phosphatase de type 1 ou encore avoir une implication dans la localisation cellulaire de la PP1c (Bollen et al. 2010; Hendrickx et al. 2009).

### 2. Les propriétés du « code de fixation » à PP1

Les sous-unités régulatrices se fixent à PP1c respectant une sorte de « code de fixation », divisé en cinq fondements (Heroes et al. 2013) :

- Spécificité de fixation : les motifs de fixation à la PP1 sont spécifiques et n'interagissent avec aucun autre membre de la famille des phosphoprotéines phosphatases.
- Code universel : pas de changement durant l'évolution des eucaryotes.
- Dégénérescence : le motif de fixation RVxF possède une séquence consensus [K/R]-X-[V/I]-X-[F/W]. Les différentes séquences du motif identifiées s'expliquent par une différence d'affinité avec la PP1.
- Non exclusivité : l'interaction avec PP1 peut être di ou tri-mérique.
- Dynamique : les différents régulateurs peuvent entrer en compétition car ils peuvent se fixer au même site de liaison à la PP1. La fixation de PP1 avec son partenaire dépendra de sa concentration et de son affinité pour la phosphatase.

### 3. Les différents motifs d'interaction à PP1

Les sous-unités régulatrices se fixent à PP1 *via* différents motifs de fixation (**Tableau 7**). Il existe environ 30 motifs prédits pour la fixation à la phosphatase, supposant une spécificité d'interaction entre PP1 et son partenaire (Heroes et al. 2013). En général, ces motifs sont composés de 4 à 8 résidus et sont présents dans une partie non structurée de la protéine.

#### **a. Le motif RVxF**

Le motif RVxF est le premier motif identifié comme pouvant se fixer à PP1 (Egloff et al. 1997). C'est le motif le plus répandu, 90% des sous-unités régulatrices le possèdent (Bollen et al. 2010). Au cours de l'évolution, la dégénérescence du motif a pu être observée, sa séquence consensus est [R/K]-X<sub>1</sub>-[V/I]-X<sub>2</sub>-[F/W] où X<sub>1</sub> correspond à n'importe quel acide aminé et X<sub>2</sub> correspond à tous les acides aminés sauf la proline (Hendrickx et al. 2009; Wakula et al. 2003).

## Introduction

Ce motif a une forte affinité pour la PP1, les résidus de PP1 se fixant au motif RVxF sont invariants et conservés. Il y a une interaction protéine-protéine au niveau du sillon hydrophobe de PP1c, à environ 20Å du site actif. L'interaction entre la phosphatase et son partenaire n'entraînerait pas de changement conformationnel. Pour vérifier cela, il faudrait réaliser un cristal pour tous les complexes PP1/sous-unités régulatrices.

Le motif RVxF est essentiel et permet à la protéine de se lier à PP1. Cependant, des motifs secondaires de liaison à PP1c ont été identifiés. Ils ont une affinité plus faible pour la phosphatase de type 1 mais un de leur rôle principal serait de stabiliser le complexe et de permettre la fonction régulatrice de la sous-unité liée à PP1.

### b. Le motif FxxR/KxR/K

Ce motif de fixation F-x-x-[R/K]-x-[R/K] est retrouvé chez de nombreux régulateurs de PP1. Il est peu étudié par rapport au motif principal RVxF. Ce motif a été caractérisé lors de l'étude des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w (Ayllón et al. 2001; Ayllón et al. 2002). L'analyse des sites de fixation à PP1 de Bcl-2 a permis d'identifier deux séquences : FSRRYR et FTARGR. Des séquences similaires ont été retrouvées dans les séquences de Bcl-xl et Bcl-w : FELRYR et FETRFR respectivement. Le motif consensus d'interaction FxxR/KxR/K a ainsi été défini (Ayllón et al. 2002). De plus, la mutation du résidu R en G de ce motif bloque la fixation à PP1 $\alpha$ .

Le Dr Garcia et son équipe avait créé en 2004, un site web afin d'identifier de nouvelles protéines interagissant avec la phosphatase PP1c. Grâce aux séquences protéiques présentes dans la banque Swissprot, cet outil informatique permettait d'identifier de nouvelles protéines (A. Garcia et al. 2004). L'analyse informatique avait montré que 16% des séquences possédaient le motif R/KxVxF, 16% le motif FxxR/KxR/K et que seulement 3.9% avaient les 2 motifs (A. Garcia et al. 2004).

### c. Les autres motifs

- Motif SILK : sa séquence est [G/S]-I-L-[R/K], il se situe toujours du côté N-terminal du motif RVxF. La fixation se fait au niveau du sillon hydrophobe, c'est-à-dire sur la face opposée du site actif. Ce motif est conservé pour une partie des régulateurs et n'entraîne pas de changement de conformation de PP1 (Hendrickx et al. 2009). Le motif SILK de la protéine NIPP1 remplacerait le motif RVxF (Wakula et al. 2003).
- Motif MyPhoNE (myosin-phosphatase targeting subunit Mypt1): sa séquence consensus est R-x-x-Q-[V/I/L]-[K/R]-x-[W/Y], où x peut être n'importe quel acide aminé, et se trouve du côté N-terminal du motif RVxF. Six régulateurs ont été identifiés avec ce motif. Il semblerait que ce motif permette la reconnaissance de substrat (Hendrickx et al. 2009; Terrak et al. 2004).

## Introduction

- Motif IDoHA : la fixation se fait au niveau des sillons hydrophobe et hydrophile, et bloque l'activité phosphatase en recouvrant le site actif.
- Motif  $\phi$ - $\phi$  : ce motif est composé de deux résidus hydrophobes, tels qu'YF/VF/II, se fixant au niveau d'une poche hydrophobe de PP1. Cette poche est composée des acides aminés Arg74, Leu75, Tyr78, Met282, Ile295, Leu296 et Lys297. Ce motif se situerait 5 à 8 acides aminés en aval du motif RVxF. Le motif  $\phi$ - $\phi$  a été retrouvé chez certains régulateurs de PP1 comme les protéines PNUTS, Spinophiline et NIPP1, un des plus anciens régulateurs de la phosphatase (Choy et al. 2014; O'Connell et al. 2012).

**Tableau 7 : Tableau illustrant quelques motifs de fixation à PP1.** Pour chaque motif, des partenaires de PP1 et leur fonction sont données (d'après Heroes et al. 2013).

Motif	Sous-unité	Fonction
RVxF	Sous-unité G, Inhibiteurs 1-3	Fixation à PP1
SILK	Inhibiteur 2	
MyPhoNE	Mypt1	Sélection du substrat
SpiDoC	Spinophiline	
IDoHA	Inhibiteur 2	Inhibition
RNYF	iASPP	Inconnue
BiSTriP	SDS22	
Pseudosubstrat	Inhibiteur 1	Inhibition
AnkCap	Mypt1	Sélection du substrat

#### 4. Les différentes sous-unités régulatrices

La majorité des sous-unités régulatrices a un domaine de fixation à PP1c. La sous-unité n'est pas ordonnée et lorsqu'elle interagit avec PP1c, elle le devient partiellement (Mathieu Bollen et al. 2010; Heroes et al. 2013; Peti, Nairn, and Page 2013). Certaines protéines régulatrices peuvent avoir un changement de conformation lorsqu'elles se fixent à PP1. Pour vérifier cela, il faudrait réaliser un cristal pour tous les complexes PP1/sous-unités régulatrices (Heroes et al. 2013; Peti, Nairn, and Page 2013).

## Introduction

**Tableau 8 : Récapitulatif des différents régulateurs/effecteurs de PP1.**

Régulateurs de PP1	Type de régulateurs
Inhibiteur 1, Inhibiteur 2, Inhibiteur 3, DARP-32, NIPP1, CPI-17, Spinophiline	Inhibiteurs de PP1
Cdc25, Aurora A, Caspase 2, Ikaros, Aurora B, Nek2	Sous-unités substrats de PP1
Intégrine $\alpha$ 1B, GADD34, UR1, GI, PTG, Gm, Repoman, MYPT1, PNUTS, AKAPs	Sous-unités impliquées dans la localisation de PP1

Des analyses bioinformatiques, utilisant le logiciel DAVID (database for annotation, visualization and integrated discovery), ont permis d'identifier 189 régulateurs chez les vertébrés. Certains d'entre eux possèdent un motif ou un domaine spécifique:

- 6 régulateurs ont un carbohydrate binding module ou CBM21.
- 13 régulateurs possèdent un motif répété d'ankyrine.
- 11 régulateurs disposent de régions riches en poly-lysine.
- 20 régulateurs ayant un domaine de fixation aux nucléotides.
- 29 régulateurs avec un domaine riche en poly-proline.
- 13 régulateurs avec une région riche en glutamine.
- 6 régulateurs ont un domaine SH3.

Les domaines SH3 (Llanos et al. 2011) et les motifs répétés d'ankyrine (Terrak et al. 2004) semblent impliqués dans la fixation à la PP1. Les domaines riches en proline et poly-lysine peuvent se fixer aux niveaux des sillons acides et hydrophobes de la PP1 (Goldberg et al. 1995).

### a. Les différentes sous-unités substrats

Environ une douzaine de sous-unités ont été répertoriées comme des substrats de PP1 chez les vertébrés. 50% d'entre elles sont des enzymes activées par déphosphorylation sur un seul site. On peut citer en exemple CDC25, la ligase E3, BRCA1 ou la caspase 2 (Margolis et al. 2006; Nutt et al. 2009; Sankaran et al. 2007b). La déphosphorylation induite par PP1 permet la fixation de nombreux ligands sur des régulateurs (Traweger et al. 2008; Vietri et al. 2006). Les sous-unités substrats de PP1 peuvent également être des régulateurs de cette phosphatase comme l'inhibiteur 2 (Hurley et al. 2007) ou CPI-17 (Eto 2009) (**Tableau 8**).

## Introduction

### b. Les sous-unités impliquées dans la localisation

L'une des particularités des sous-unités se liant à PP1 est de modifier la localisation cellulaire de la phosphatase ainsi que sa spécificité de substrat. Ces sous-unités vont guider la PP1 vers différentes structures telles que le réticulum endoplasmique (grâce à GADD34), la mitochondrie, la chromatine (grâce à Repo-man) ou encore la membrane plasmique. Certaines protéines ont plusieurs sites de liaison à PP1 et sont impliquées dans différents processus métaboliques. Les plus connues sont GADD34, MYPT1, PNUTS et la spinophiline (**Tableau 8**).

Grâce à GADD34, PP1 déphosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ , qui bloque la traduction. GADD34 agit aussi sur le récepteur 1 du TGF $\beta$ , la kinase I- $\kappa$ B, les protéines TSC1 et 2 (Harding, Zhang, and Ron 1999; Shi et al. 2004; Watanabe et al. 2007; Li et al. 2008)

MYPT1 peut se fixer à plusieurs endroits sur PP1. Elle augmente l'activité de la phosphatase au niveau des chaînes légères de la myosine et inhibe son activité au niveau de la glycogène phosphorylase (Alessi et al. 1992).

La protéine PNUTS cible préférentiellement la PP1 au niveau du facteur de transcription LCP1, de la protéine télomérique TRF2 (Lee et al. 2009; Rose et al. 2008).

NIPP1 a un seul site de fixation à PP1c mais possède plusieurs fonctions. Il peut se fixer à l'ARN. En interagissant avec des facteurs de transcription, NIPP1 permet l'adressage de la phosphatase au complexe d'épissage (Jagiello et al. 1997, 2000; Tanuma et al. 2008; Trinkle-Mulcahy et al. 1999).

### c. Les sous-unités appartenant à la famille des inhibiteurs

#### *i. Présentation générale*

Généralement les sous-unités appartenant à la famille des inhibiteurs sont de petites protéines entre 15 et 30kDa, spécifiques à la PP1 (**Tableau 8**). Ces protéines ont été identifiées très tôt, en parallèle des recherches sur la phosphatase phosphorylase (Huang and Glinemann 1976). Ces sous-unités ont des ressemblances avec les protéines non structurées, elles sont hydrophobes et thermostables (Iakoucheva et al. 2002). Ces propriétés leur permettent de s'adapter à la structure de la protéine avec laquelle elle interagit. En général, les protéines inhibant la PP1 ont plusieurs sites de phosphorylation, permettant leur activation (Eto and Brautigan 2012; Eto et al. 2003). De plus, il faut noter que certaines de ces protéines se fixent à PP1 alors que celle-ci est déjà liée à une autre protéine (Eto, Kitazawa, and Brautigan 2004).

## Introduction

### ii. Les différents inhibiteurs

#### ➤ L'inhibiteur 1 (I1)

Un des plus anciens régulateurs de PP1 est l'inhibiteur 1. C'est une protéine de 165 acides aminés avec un poids moléculaire de 23kDa. I1 possède un motif de fixation RVxF au niveau de sa partie N-terminale (Egloff et al. 1997; Huang et al. 1999). Pour qu'I1 soit active, elle doit être préalablement phosphorylée sur un résidu thréonine grâce à la PKA (P. Cohen 1989). L'inhibiteur 1 agit comme un pseudosubstrat en se fixant au niveau du site actif de PP1 (Desdouits et al. 1995). Ce régulateur est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme du glycogène, la plasticité neuronale, la régulation de la phosphorylation de CREB (Brown et al. 2000; Connor et al. 2001; Genoux et al. 2002; Nakielny, Campbell, and Cohen 1991) ou la modulation des capacités cardiaques grâce à sa fonction régulatrice sur PP1 (Carr et al. 2002; Nicolaou, Hajjar, and Kranias 2009). La formation d'un complexe à plusieurs partenaires avec PP1 a été observée récemment. L'inhibiteur 1 se fixe à GADD34 et PP1, il y a formation d'un complexe à trois partenaires, la régulation de la phosphatase est alors phospho-dépendante (Connor et al. 2001).

DARP32, isoforme neuronal d'I1, joue un rôle primordial dans les voies de signalisation de la dopamine (Greengard, Allen, and Nairn 1999). Celui-ci a la particularité d'inhiber PP1 ainsi que la PKA. La phosphorylation de la thréonine 34 de DARP32 par PKA et PKC entraîne l'inhibition de la PP1 (Hemmings et al. 1984). La phosphorylation de la thréonine 75 de DARP32 par la CDK5 permet l'inhibition de la PKA (Bibb et al. 1999).

Ces observations prouvent une nouvelle fois que la régulation de PP1 est très complexe et qu'il est essentiel de continuer à comprendre son fonctionnement.

#### ➤ L'inhibiteur 3 (I3) et Sds 22

L'inhibiteur 3 est une petite protéine hydrophile, thermostable, composée de 126 acides aminés. I3 est une protéine inhibitrice de PP1 extrêmement conservée au cours de l'évolution (J. Zhang et al. 1998). L'inhibiteur 3 de l'Homme possède 2 motifs de fixation à PP1 : la séquence KKVEW, correspondant au motif RVxF, se fixe au niveau du sillon hydrophobe de PP1 ; et le deuxième au niveau des acides aminés 65 à 77 (L. Zhang et al. 2008). Ils sont tous les deux impliqués dans la fonction inhibitrice d'I3. L'inhibiteur 3 est une protéine nucléaire, pouvant se fixer à certains isoformes de PP1 tels que PP1 $\alpha$  et PP1 $\gamma_1$  (Huang et al. 2005). Il est intéressant de souligner que les parties N-terminale et C-terminale permettent la localisation de la protéine préférentiellement au niveau du noyau et au niveau du nucléole respectivement (Huang et al. 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, des mutations sur I3, ont montré son implication dans l'embryogenèse avec un retard ou un arrêt du processus, pouvant parfois causer la mort (Takemiya, Ariyoshi, and Shimazaki 2009).

Sds22, protéine nucléaire de 40kDa, possède 11 domaines LRR (Leucine Rich Repeat). Elle interagit et inhibe l'activité de PP1. Les domaines LRR permettent la fixation au niveau de la région  $\alpha 4/\alpha 5/\alpha 6$  de la PP1 (Ceulemans, Stalmans, and Bollen 2002). Chez la levure *S. pombe*, la protéine Sds22 est également essentielle pour la fission (Ohkura and Yanagida

## Introduction

1991). En effet, elle permet le maintien de Glc7, PP1 de la levure, à un taux normal au niveau nucléaire (Pedelini et al. 2007; Peggie et al. 2002). De plus, la délétion du gène provoque un arrêt du cycle au niveau de la mitose. Sds22 joue un rôle crucial dans la transition métaphase-anaphase, en régulant l'activité de PP1 (Ohkura and Yanagida 1991; Peggie et al. 2002; Pinsky et al. 2006; Stone et al. 1993). Sds22 est nécessaire dans la ségrégation des chromosomes et modulerait l'activité de la kinase Aurora B au niveau des centromères et des kinétochores (Posch et al. 2010).

Le complexe I3-PP1-Sds22 peut être formé car les deux protéines inhibitrices peuvent interagir simultanément avec PP1 (Lesage et al. 2007). Il a été montré chez la levure, que l'inhibiteur 3 et la protéine Sds22 permettraient la régulation de la fonction de PP1 au niveau nucléaire. En effet, l'absence de l'une d'elles est responsable d'une modification de la localisation nucléaire de la PP1, s'expliquant par un arrêt de la croissance cellulaire au niveau de la mitose et la formation d'un réseau mitotique aberrant (Eiteneuer et al. 2014; Pedelini et al. 2007; Peggie et al. 2002).

Il semblerait que Sds22 et I3 aient un rôle commun dans la régulation de PP1 chez la levure. Toutes les fonctions de l'inhibiteur 3 sont encore mal connues. Grâce à son interaction avec PP1, il semblerait qu'I3 puisse jouer un rôle dans de nombreux processus tels que la régulation et la division du cycle cellulaire.

### ➤ L'inhibiteur 2 (I2)

L'inhibiteur 2 est le plus ancien des régulateurs de PP1. C'est une protéine thermostable, non structurée (Huang and Glinsmann 1976; Huang et al. 2000). I2 est présent chez tous les mammifères, la levure, le Xénope, la drosophile... (Li, Satinover, and Brautigan 2007).

Trois sites de fixation à PP1 ont été identifiés sur l'inhibiteur 2, KGILKN, KSQKW et une hélice  $\alpha$ , et sont conservés au cours de l'évolution (Hurley et al. 2007) : le 1<sup>er</sup> site KGILKN (motif SILK) est situé au niveau des résidus 12 à 17 en N-terminal. Grâce à des délétions et des mutations de ce motif, l'importance de celui-ci a été montrée pour la régulation de la phosphatase. Le deuxième motif : KSQKW (motif RVXF) interagit avec PP1 au niveau du sillon hydrophobe. Le dernier motif est une longue hélice  $\alpha$  (AA 130 à 169), qui se fixe le long du sillon hydrophobe (AA 130 à 146) et au niveau du site actif de PP1 (AA 147-151), bloquant l'accès de PP1 à un autre partenaire (Hurley et al. 2007).

Pendant de nombreuses années, I2 était considéré comme un inhibiteur ou un activateur de la PP1 en fonction du statut de phosphorylation de la thréonine 73 au niveau du motif PXTTP (Hilioti and Cunningham 2003). En réalité, I2 intervient dans de nombreux complexes d'interaction où des kinases sont aussi régulées au cours du processus. La phosphorylation du motif PXTTP par GSK3, Cdc2, et la phosphorylation possible des sérines 86, 120, 121 expliquent toutes cette complexité. Ces modifications post-traductionnelles permettent une régulation du complexe.

## Introduction

Des études génétiques et biochimiques ont permis de montrer qu'I2 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, notamment dans la mitose, où son expression est maximale (Brautigan et al. 1990). La protéine I2 est phosphorylée par le complexe CDK2-B1 et se concentre au niveau des centrosomes (Li et al. 2006a). L'inhibiteur 2 se fixe au niveau du complexe Nek2-PP1, augmente l'activité de la kinase et initie la séparation chromosomique (Eto et al. 2002).

I2 est aussi impliquée dans l'entrée en mitose. En effet, il interagirait avec la kinase Aurora A et permettrait la régulation de la cycline B (Satinover, Brautigan, and Stukenberg 2006; Satinover et al. 2004). De plus, il a été démontré chez la levure qu'une surexpression de Glc8, homologue d'I2, permettait de compléter certaines mutations touchant le gène pour la kinase Aurora B. Il semblerait que l'action de l'inhibiteur 2 sur PP1 et par conséquent sur le complexe PP1/Aurora B permettrait de garder un équilibre et d'avoir une cytokinèse et une ségrégation des chromosomes correctes (Tung, Wang, and Chan 1995).

I2 a également un rôle dans l'embryogenèse. Des études réalisées, chez l'Homme et la levure *S. cerevisiae*, ont montré son implication dans la séparation des chromosomes et la synchronisation des mitoses *via* le complexe PP1-Aurora B (Tung, Wang, and Chan 1995; Wang, Stukenberg, and Brautigan 2008).

D'après ces quelques exemples, nous pouvons dire que l'inhibiteur 2 est impliqué dans de nombreux processus biologiques, grâce à son interaction avec PP1 et diverses kinases.

### ➤ eIF2 $\beta$

Le facteur d'initiation de la traduction 2, de type sous-unité  $\beta$  (eIF2 $\beta$ ) est une des sous-unités du facteur eIF2. Avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ , il permet l'initiation de la traduction. En effet, le facteur eIF2 lié à une GTP, se fixe à l'ARNt initiateur méthionine, le complexe ternaire est alors formé et la traduction peut alors se faire. Une étude de 2006, réalisée par Wakula et son équipe, a permis de montrer que la séquence d'eIF2 $\beta$  de l'Homme possède des motifs de fixation potentiels à PP1. Il a montré qu'eIF2 $\beta$  fonctionne comme un inhibiteur de la déphosphorylation de la glycogène phosphorylase et de la sérine 51 d'eIF2 $\alpha$  par PP1. De plus, eIF2 $\beta$  pourrait agir comme un activateur de sa propre déphosphorylation quand il est lié à PP1 (Wakula et al. 2006).

## **B. Chez *Plasmodium falciparum***

### **1. PflRR1**

Grâce à une analyse du génome de *P. falciparum*, 14 protéines contenant des motifs « Leucin Rich Repeat » ont pu être répertoriées (PflRR1-14). Les protéines LRR peuvent se fixer à différents ligands, leurs conférant plusieurs fonctions dans la régulation du cycle cellulaire et dans la transduction du signal. Chez *P. falciparum*, les protéines PflRR ont été identifiées au niveau du cycle érythrocytaire et ont un rôle dans l'invasion. Les protéines

## Introduction

possèdent de 4 à 10 motifs LRR, qui permettent l'interaction avec PP1 et sont surtout exprimées au niveau des stades trophozoïtes âgés et schizontes (Daher, Pierce, and Khalife 2007).

Une étude plus approfondie a été réalisée sur PflRR1. Cette protéine est un homologue de la protéine Sds22, identifiée chez la levure *Saccharomyces pombe* avec une identité de 42% et une similarité de séquence de 62%. Un seul gène codant pour PflRR1 a été identifié. C'est une protéine de 247 acides aminés, de 29,3kDa, contenant 9 motifs putatifs LRR. La séquence consensus est LXXLXXNXL où X représente n'importe quel acide aminé. De plus, PflRR1 possède du côté C-terminal, une structure conservée de 19 acides aminés, appelée « cap LRR » (Daher et al. 2006).

PflRR1 est exprimée tout au long du cycle asexué, avec un niveau maximal au stade schizonte. Son expression est aussi détectée au niveau des gamétocytes. Des études de localisation ont permis de montrer que la protéine PflRR1 est nucléocytoplasmique, tout comme PfPP1. PflRR1 aurait donc un rôle important tout au long du cycle de développement en modulant l'activité de PP1 (Daher et al. 2006).

Il a été démontré, grâce à différentes techniques (GST pull-down, Co-Immunoprécipitation), que PflRR1 interagit directement avec PfPP1. De plus, il semblerait que PflRR1 soit un partenaire spécifique à PfPP1 puisque la protéine ne semble pas interagir avec la protéine PfPP2A (Daher et al. 2006). Comme ses orthologues chez les mammifères, il semblerait que LRR1 inhibe *in vitro* l'activité phosphatase de PP1 chez *P. falciparum*. La fonction inhibitrice de PflRR1 a été confirmée dans le modèle d'ovocytes de Xénope. La micro-injection de l'acide okadaïque (est connu pour inhiber les phosphatases PP1 et PP2A, il sert de témoin positif) ou de l'ARNc de PflRR1 entraîne la maturation des ovocytes de Xénope, suggérant ainsi l'inhibition de la PP1 endogène (Daher et al. 2006)

## 2. PfI3

Le deuxième régulateur de *P. falciparum* identifié est l'inhibiteur 3 (PF3D7\_1031700), une protéine non structurée de 116 acides aminés, avec un poids moléculaire de 13,1kDa. PfI3 a une homologie de 31% avec l'inhibiteur 3 de l'Homme et 28% avec Ypi1 de la levure. La séquence protéique possède un motif RVxF dégénéré, la séquence KVVRW (Fréville et al. 2012).

Grâce à la spectroscopie RMN, il a été montré que PfI3 interagit avec PfPP1 au niveau de différentes régions. La mutation du tryptophane du motif KVVRW entraîne une diminution de l'interaction avec la phosphatase, supposant ainsi un rôle primordial du motif RVxF dans la liaison à PP1. Cependant il est intéressant de noter que d'autres régions seraient également impliquées dans l'interaction. Des expériences *in vitro* (tests ELISA et GST pull-down) ont été réalisées, montrant une diminution importante de l'interaction entre

## Introduction

PfPP1 et Pfl3, lorsque celui-ci est muté au niveau du motif RVxF. Des expériences de RMN, utilisant Pfl3 à de faibles et fortes concentrations, mettent en évidence au moins deux sites de fixation à PfPP1 avec des affinités différentes (Fréville et al. 2012).

Afin de définir la fonction de Pfl3, plusieurs approches ont été employées. Il a été démontré que Pfl3 interagit avec PfPP1 et Glc7 (PP1 de la levure), par la technique du double hybride en levure. Des tests de complémentation ont été réalisés sur des levures déficientes en I3. Malgré l'expression de Pfl3, les levures ne se sont pas développées, suggérant ainsi une spécificité d'action de l'inhibiteur 3 de *P. falciparum*. La réalisation de tests *in vitro* a ainsi mis en évidence que Pfl3 était un activateur de l'activité phosphatase, contrairement à ses homologues de mammifères et de levures (Fréville et al. 2012).

Chez *P. falciparum*, la protéine I3 est exprimée uniquement au niveau nucléaire. Pfl3, comme son orthologue chez la levure, est essentiel dans le développement du parasite. En effet, aucun parasite viable n'a pu être obtenu après des expériences de génétique inverse (Knock-out) (Fréville et al. 2012).

### 3. Pfl2

Le dernier régulateur identifié et caractérisé est l'inhibiteur 2 (PF3D7\_0320000), une protéine thermostable de 144 acides aminés, avec un poids moléculaire de 16,7kDa. C'est le plus petit inhibiteur 2 identifié à ce jour. En effet, les séquences protéiques d'I2 varient entre 164 et 205 acides aminés. Chez le parasite, un seul gène code pour ce régulateur, qui a une homologie d'environ 28% avec les autres inhibiteurs 2. Contrairement à son homologue humain, qui possède 3 motifs d'interaction : KGILK, RVXF et HYNE, Pfl2 n'en possède que 2, le motif RVXF, dans une partie non structurée en N-terminal, et le motif HYNE, au niveau d'une hélice  $\alpha$  en C-terminal (Fréville et al. 2013).

Des études de génétique inverse (réalisation d'un Knock-Out) ont montré que Pfl2 est essentiel au niveau du cycle érythrocytaire pour la survie du parasite. De plus, sa localisation est nucléocytoplasmique, comme la protéine PfPP1, ce qui suppose une régulation de l'enzyme à différents niveaux par l'inhibiteur 2 (Fréville et al. 2013).

Différentes approches (test de type ELISA, double hybride en levure) ont montré une interaction entre I2 et PP1 de *P. falciparum*. Des délétions ou des mutations des motifs d'interaction ont été effectuées. L'analyse des résultats montre une interaction entre les protéines PfPP1 et Pfl2 (sauvage, mutée ou délétée). De plus, Pfl2 interagit avec la PP1 de Xénope (Fréville et al. 2013).

Différentes approches ont montré que Pfl2 pouvait inhiber jusqu'à 80% l'activité de PP1. La mutation ou l'absence du motif HYNE entraîne une diminution de la fonction régulatrice de Pfl2 alors que pour le motif RVxF, une perte totale de la fonction est observée.

## Introduction

Ces résultats ont été confirmés en modèle d'ovocytes de Xénope. En effet, l'injection des protéines mutées sur le motif HYNE ou RVxF entraîne une faible maturation des ovocytes, suggérant une perte partielle ou totale de la fonction de Pfl2, alors que l'interaction est conservée (Fréville et al. 2013).

Des peptides dérivés du motif RVxF ou du motif HYNE de Pfl2 ont été utilisés en modèle d'ovocytes de Xénope ou sur une culture de *P. falciparum*. Il a été montré que les peptides bloquent la fonction régulatrice de Pfl2 en ovocytes. De plus, le peptide dérivé du motif RVxF inhibe la croissance parasitaire alors que celui du motif HYNE n'a pas d'effet (Fréville et al. 2013).

Toutes ces informations suggèrent donc que le motif RVxF est le motif d'interaction principal entre Pfl2 et PP1, contrairement au motif HYNE, qui jouerait plus un rôle de stabilisateur dans la formation du complexe Pfl2/PP1 (Fréville et al. 2013).





# Cadre et Objectifs



## Cadre et objectifs

La protéine phosphatase de type 1 (PP1) est l'enzyme responsable de 90% des déphosphorylations ayant lieu dans la cellule. La PP1 joue un rôle dans divers processus cellulaires tels que le métabolisme du glycogène, la transcription et le cycle cellulaire. Cette protéine est toujours associée à un régulateur (plus de 200 répertoriés), ce qui lui confère une localisation, une spécificité de substrat et une régulation de son activité.

Chez *P. falciparum*, la caractérisation de PfPP1 a permis de démontrer son rôle crucial dans la biologie du parasite. Les études récentes du phosphatome de *Plasmodium*, utilisant la génétique inverse, ont également confirmé son essentialité à la survie du parasite. En effet, l'interruption du gène codant pour PP1 (par des expériences de Knock-Out) a mis en évidence qu'aucune autre protéine phosphatase ne pouvait remplacer les fonctions de cette dernière. Malgré l'importance de PP1, son mode de fonctionnement et sa régulation sont encore mal définis aujourd'hui. Etant donné que cette phosphatase est toujours associée à un partenaire, les recherches du laboratoire se focalisent sur l'étude des régulateurs de PP1 chez *P. falciparum*.

Dans ce contexte, des analyses comparatives sur le génome de *P. falciparum* ont permis d'identifier 4 régulateurs potentiels de PfPP1 : PfLRR1, Pfl3, Pfl2 et PflF2 $\beta$ .

Les analyses *in silico* ont montré que ces protéines ont des séquences plus courtes et possèdent une homologie inférieure à 50% avec leurs homologues chez l'Homme et la levure. Différentes approches expérimentales, nous ont permis de montrer que LRR1, I3 et I2 sont exprimés par *Plasmodium* et interagissent avec la PfPP1. Tandis que PfLRR1 et Pfl2 sont des inhibiteurs de PfPP1, Pfl3, contrairement à ses homologues, en serait un activateur. Les expériences de génétique inverse suggèrent que ces régulateurs sont indispensables pour la survie du parasite. En effet, des expériences d'interruption de gène par Knock-Out n'ont pas permis d'obtenir des parasites viables. Enfin, il a été montré *in vitro* que l'utilisation de peptides pénétrant dérivés des motifs d'interaction RVxF de Pfl3, pouvait inhiber la croissance du parasite *P. falciparum*.

Suite aux résultats obtenus sur l'inhibiteur 2 de *P. falciparum* et dans le but d'approfondir et de poursuivre l'étude sur les régulateurs de PfPP1, les deux objectifs majeurs de ma thèse sont :

Dans un premier temps, les études se sont portées sur le rôle et l'impact d'un motif additionnel de liaison de Pfl2 sur l'interaction et la fonction de la phosphatase PfPP1. Notre première étude a montré que Pfl2 interagit avec PfPP1 et inhibe 80% de son activité. De plus, sa localisation nucléocytoplasmique, comme celle de PfPP1, suppose une régulation de la phosphatase à plusieurs niveaux. Des études de génétique inverse ont permis de suggérer que Pfl2 est essentiel au cycle de développement intra-érythrocytaire du parasite. Pfl2 possède deux motifs d'interaction : KTISW, correspondant au motif dégénéré RVxF, et HYNE. Une mutation du motif KTISW ou HYNE n'affecte pas l'interaction avec la PfPP1 alors qu'elle a un impact sur la régulation de l'activité phosphatase. En effet, la mutation du motif KTISW entraîne une perte totale de la fonction régulatrice de l'inhibiteur 2, tandis qu'une mutation

## Cadre et objectifs

sur le motif HYNE diminue de 50% seulement sa fonction. D'après les résultats obtenus, le motif KTISW semble donc essentiel pour la fonction régulatrice de Pfl2 alors que le motif HYNE aurait plus un rôle de stabilisateur pour le complexe Pfl2/PfPP1. L'analyse plus fine de la séquence de Pfl2 a montré l'existence d'un motif FxxR/KxR/K, dont la coprésence avec le motif RVxF a été rapportée. Son rôle dans Pfl2 n'a pas encore été défini. Par conséquent, nous avons entrepris différentes approches expérimentales afin d'évaluer la contribution du motif d'interaction FKEKRK (FxxR/KxR/K) de Pfl2, dans la relation structure/fonction du complexe Pfl2/PfPP1. Dans ce but, plusieurs axes ont été développés :

- L'importance du motif FxxR/KxR/K dans l'interaction avec PfPP1.
- L'impact de ce motif sur la fonction de Pfl2 vis-à-vis de la régulation de l'activité de PP1.
- L'étude *in vivo* du rôle du motif FKEKRK de I2 chez *P. falciparum*.

La seconde partie de ma thèse a consisté en la caractérisation moléculaire et fonctionnelle du facteur de traduction PfeIF2 $\beta$ . Celui-ci est décrit comme étant l'un des nombreux facteurs intervenant durant la traduction. eIF2 $\beta$ , avec les sous-unités eIF2 $\alpha$  et eIF2 $\gamma$ , forment le complexe eIF2, impliqué dans l'initiation de la traduction et essentiel à la synthèse protéique. En effet, eIF2 se fixe au GTP et à l'ARNt initiateur méthionine, permettant à ce dernier de se fixer à la petite sous-unité du ribosome, entraînant ainsi le processus de traduction. Le deuxième rôle d'eIF2 $\beta$ , décrit récemment, serait d'interagir avec PP1 et d'inhiber son activité. Chez *P. falciparum*, eIF2 $\beta$  a été identifié et montre des différences significatives avec son homologue humain, ce qui nous a amenés à l'étudier d'un point de vue biochimique et biologique, ainsi que la relation structure-fonction avec PfPP1. Pour répondre à ce sujet, plusieurs stratégies ont été mises en place :

- L'analyse bioinformatique de la séquence de PfeIF2 $\beta$ .
- La caractérisation de l'interaction potentielle entre PfeIF2 $\beta$ -PfPP1 et les motifs impliqués dans celle-ci.
- L'étude de la fonction de PfeIF2 $\beta$  sur l'activité de PP1 et de l'importance des motifs sur cette régulation.
- L'étude de la localisation et des fonctions d'eIF2 $\beta$  *in vivo* chez *Plasmodium*.





# Résultats



### I. Etude du motif d'interaction FKEKRK de Pfl2 chez *Plasmodium falciparum*

Des analyses par bioinformatiques ont permis d'identifier l'inhibiteur 2 chez *P. falciparum* (Pfl2). C'est une protéine non structurée de 144 acides aminés, le plus petit des I2 en comparaison à ses homologues, possédant deux motifs d'interaction à PP1. Le premier, KTISW, correspondant au motif dégénéré RVxF, et le deuxième, HYNE, sont très conservés dans la famille des inhibiteurs 2.

Une première étude sur Pfl2 a montré qu'il a une localisation nucléocytoplasmique, comme PfPP1, et qu'il est exprimé tout au long du cycle érythrocytaire (**Annexe 2**). Ces résultats supposent qu'I2 pourrait réguler PP1 à plusieurs niveaux chez le parasite. De plus, des expériences de génétique inverse ont mis en évidence son essentialité pour la survie du parasite. Différents tests, réalisés *in vitro* et dans un contexte cellulaire, ont permis de montrer que Pfl2 interagit avec PP1 (*P. falciparum* et Xénope) et qu'il inhibe son activité phosphatase. Grâce à des délétions de la séquence de Pfl2 ou des mutations sur les motifs d'interaction, l'importance de ces motifs a pu être démontrée. En effet, les mutations des motifs n'affectent pas l'interaction avec la phosphatase PP1. Cependant, la mutation du motif KTISW bloque la fonction inhibitrice de Pfl2, alors que celle du motif HYNE ne fait que la diminuer (Fréville et al. 2013). Tous les résultats obtenus indiquent l'implication d'autres motifs de liaison dans la formation du complexe I2/PP1 chez *P. falciparum* (**Annexe 2**).

Grâce à l'utilisation de la spectrométrie par RMN, un autre site d'interaction a été identifié entre les acides aminés 94-117 : le motif FKEKRK. Ce dernier, connu sous la forme FxxR/KxR/K, a été identifié initialement chez la protéine Bcl et a été décrit comme potentiel motif d'interaction à PP1 (Ayllón et al. 2002). Ce motif se trouve juste en amont du motif HYNE et semble présent dans plusieurs homologues de Pfl2.

Afin de mieux définir l'importance de ce motif dans la structure/fonction du complexe I2/PP1, des mutations ont été effectuées. Les différentes expériences réalisées ont mis en évidence que le motif FKEKRK est impliqué dans l'interaction avec PP1 et qu'il a une action sur la fonction régulatrice de Pfl2. De plus, il semble que seulement un des deux motifs KTISW ou FKEKRK soit suffisant pour observer une interaction avec la PP1. Par contre, il semblerait que la présence des deux motifs soit nécessaire pour que l'inhibiteur 2 puisse garder sa fonction régulatrice sur la phosphatase PP1.

En parallèle, un peptide dérivé du motif FxxR/KxR/K (séquence du motif FKEKRK répété en tandem couplé à une séquence pénétrante) a été utilisé pour déterminer l'impact de ce motif sur la croissance du parasite. D'après les résultats, un effet anti-plasmodial a été observé. Les résultats obtenus sur Pfl2 sont encourageants pour envisager l'utilisation de peptides inhibiteurs qui empêcherait la formation du complexe I2/PP1 chez *P. falciparum*.

**Identification of a *Plasmodium falciparum* inhibitor-2 motif involved in binding and regulation activity of the Protein Phosphatase type 1**

**Authors' name :**

Aline Fréville<sup>1#</sup>, Géraldine Tellier<sup>1#</sup>, Audrey Vandomme<sup>1</sup>, Christine Pierrot<sup>1</sup>, Jérôme Vicogne<sup>2</sup>, François-Xavier Cantrelle<sup>3</sup>, Alain Martoriat<sup>4</sup>, Katia Cailliau-Maggio<sup>4</sup>, Jamal Khalife<sup>1\*</sup> and Isabelle Landrieu<sup>3\*</sup>.

**Adresses:**

<sup>1</sup> Center for Infection and Immunity of Lille, Inserm U1019-CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

<sup>2</sup> UMR8161 – CNRS, Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Pr. Calmette BP 467, 59021, Lille Cedex, France.

<sup>3</sup> UMR8576 CNRS-Université Lille Nord de France, Interdisciplinary Research Institut (IRI), 59658 Villeneuve d'Ascq, France.

<sup>4</sup> EA4479, IFR147, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, SN3, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

# These authors contributed equally to this work.

Article type : Original Article

**\* Corresponding authors:**

Jamal Khalife, 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. Tel +33 3 20877968. Fax + 33 3 20877888. jamal.khalife@pasteur-lille.fr

Isabelle Landrieu, UMR8576, Interdisciplinary Research Institut (IRI), Parc CNRS de la Haute Borne, 59658 Villeneuve d'Ascq, France. Tel +33 3 62531714. Fax +33 3 62531701. isabelle.landrieu@univ-lille1.fr.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/febs.12960

**Running title:**

*Plasmodium falciparum* PP1/Inhibitor 2 complex

**Abstract:**

The regulation of PfPP1 phosphatase activity in *Plasmodium falciparum* remains to be deciphered. Data from homologous eukaryotic PP1 phosphatases suggest that several protein regulators should be involved in this essential process. One such regulator, named Pfl2 based on its primary sequence homology with eukaryotic I2, was recently shown to be able to interact with PfPP1 and to inhibit its phosphatase activity, mainly through the canonical “RVxF” binding motif. The details of the structural and functional characteristics of this interaction are investigated here. Using NMR spectroscopy, a second site of interaction is suggested to reside between residues D94-T117 and contains the “FxxR/KxR/K” binding motif present in other I2 proteins. This site seems to play in concert/synergy with the “RVxF” motif to bind PP1, as only mutations in both motifs were able to abolish completely this interaction. However, regarding the structure/function relationship, the mutation of either “RVxF” or “FxxR/KxR/K” motif is more drastic, as each mutation prevents the capacity of Pfl2 to trigger GVBD in micro-injected *Xenopus* oocytes. This indicates that the tight association of the Pfl2 regulator to the PP1 phosphatase, mediated by a two-site interaction, is necessary to exert its function. Based on these results, the use of a peptide derived from the “FxxR/KxR/K” Pfl2 motif was investigated for its potential effect on *Plasmodium* growth. This peptide, fused at its N-terminus to a penetrating sequence, was shown to accumulate specifically in infected erythrocytes and to have an anti-plasmodial effect.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*, protein phosphatase type 1, PP1 Inhibitor 2, NMR spectroscopy, protein-protein interaction.

**Introduction:**

Growing evidence indicates that phosphorylation signalling pathways, tightly controlled by the coordinated action of protein kinases and phosphatases, strongly affect essential aspects of *Plasmodium falciparum* development, propagation and survival. Early *in vitro* experiments using inhibitors of both these enzyme classes evidenced a drastic inhibition of parasite development and capacity to invade red blood cells [1-3]. More recently, studies focused on post-translational modifications revealed the central function of phosphatases in these processes [4-7]. Among these, *P. falciparum* protein phosphatase type 1 (PfPP1), the activity of which predominates in total parasite extracts [1, 8], seems to be of primordial importance. Gene knockdown experiments indeed indicated an essential role in parasite asexual development [9] and confirmed an earlier observation showing

that okadaic acid inhibits parasite growth mainly by interfering with PP1-like activity [1, 8]. In addition, the PfPPP1 present in the nucleocytoplasmic compartment [10] seems to be implicated in the release of infectious merozoites [11]. However, little is known about *Plasmodium* PP1 regulation, although eukaryotic PP1s are known to be controlled by multiple regulators that are as essential as PP1 itself.

Several studies have revealed that most interactors bind to PP1 through diverse degenerate sequence motifs [12-14]. These motifs function as PP1 ‘anchoring’ sites with variable number and combination for each regulator. This diversity directs PP1 different functions and enzymatic activity [12]. The canonical PP1 binding site present in nearly 90% of validated interactors is the “RVxF” motif [15]. Structural and functional approaches defined this consensus sequence as R/K(x<sub>1</sub>)<sub>0-1</sub>(V/I)(x<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>(F/W) where x<sub>2</sub> can be any residue except proline [16]. More in depth studies on Inhibitor 2 (I2), a conserved partner of PP1, reported the implication of two additional motifs in binding/function of this regulator. This includes the SILK motif which has been shown to be essential for I2 binding and HYNE which has been found to occupy the catalytic site of PP1 and to decrease its activity. The SILK motif can functionally replace the RVxF motif [16]. Additionally, a recent study by Llanos et al. identified a non-canonical ‘RNYF’ sequence as an additional PP1 interacting domain in the inhibitory member of the apoptosis-stimulating proteins of the p53 family (iASPP) [17]. In other regulators and beside the “RVxF” motif, several other docking motifs have been identified as essential in the regulation of PP1 activity and substrate specificity. The MyPhoNE motif, located in the N-terminal region relative to the RVxF motif of the myosin phosphatase targeting subunit Mypt1, was shown to participate in the positive selection of PP1 substrates [15, 18, 19]. More recently, structure analysis of the PP1 nuclear targeting subunit (PNUTS) bound to PP1 revealed the presence of a novel PP1 anchor domain : the ΦΦ motif [20], confirming earlier studies reporting the participation of this motif in the interaction of nuclear inhibitor of PP1 (NIPPI) and spinophilin [21, 22]. Finally, an additional “FxxR/KxR/K” motif present in anti-apoptotic proteins has been shown to be involved in PP1 binding but its relevance and functions remains to be explored [23]. It is notable that this latter motif in I2 regulators is just adjacent at the N-terminus of the HYNE sequence.

So far, in *P. falciparum*, three gene products have been characterized as potential PfPPP1 regulators. The first of them, PflRR1, corresponds to a *P. falciparum* ortholog of yeast sds22<sup>+</sup> described in *Schizosaccharomyces pombe* as a cell division regulator [10, 24]. In *P. falciparum* extracts, PflRR1 interacts with PfPPP1 and seems to be involved in cell cycle regulation. Accordingly, *Toxoplasma gondii* LRR1 overexpression damages parasite growth [25]. The second PfPPP1 interactor, called PflI3, displays sequence similarity to its mammalian counterpart Inhibitor 3 (I3), known as an essential PP1 regulator [26]. PflI3, unlike human I3, is a positive regulator of PP1 and lacks the capacity to complement Inhibitor 3 deficient yeast. *In vitro* studies revealed the ability of PflI3 to interact with PfPPP1 mostly through its “RVxF” motif. Additionally, reverse genetic studies suggested its essentiality for blood parasite growth as attempts to obtain PflI3 knock-out parasites were

unsuccessful [26]. Recently, we reported the identification and characterization of a third essential inhibitor named Pfl2 involved in *P. falciparum* development and survival [27]. Unlike the first two regulators, PflRR1 and PflI3, the amino acid sequence of Pfl2 is shorter (30%) than its homologs in other eukaryotic cells. Nevertheless, we have shown that conserved motifs, including “RVxF” and HYNE, are involved in interaction/function of Pfl2. It is important to emphasize that Pfl2 does not contain the binding site KGILK (“SILK” motif) present in other I2 homologs [28]. The functional relevance of the “RVxF”-dependent interaction in *P. falciparum*, based on the use of synthetic peptide corresponding to the “RVxF” motif of either Pfl2 or PflI3, has been established by preventing the function of these regulators *in vitro* and by the inhibition of parasite growth [27]. These observations strongly support the reverse genetic approaches indicating the essentiality of the regulators of PfPPP1.

Encouraged by the fact that the interaction of PfPPP1 with its regulators is critical for *P. falciparum* survival, we here refine the initial study of Pfl2 [27] to arrive at a molecular model of the interaction with PfPPP1, using NMR spectrometry, biochemical approaches and functional assays in *Xenopus* oocytes. These new results reveal that the “FxxR/KxR/K” motif is, along with the previously described “RVxF” motif, involved in interaction with PfPPP1 and in the inhibitory function of Pfl2. Based on these data, we have investigated the potential use of a peptide derived from the “FxxR/KxR/K” motif as an anti-plasmodial agent.

## Results:

### *1. Characterization of Pfl2 conformation in solution and mapping of Pfl2 sites interacting with PfPPP1 using NMR spectroscopy*

We previously established the ability of Pfl2 to interact with PfPPP1 [27]. Here we further explored the molecular aspects of the interaction using NMR spectroscopy as a first step to characterize the interaction site(s). The 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  spectrum of Pfl2 is typical of a disordered protein, with a poor dispersion of the  $^1\text{H}$  signals between 7.8 and 8.55 ppm, resulting in signal overlap. Assignment of the backbone atom resonances of Pfl2 was performed based on 3D spectra of the  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  doubly-labeled protein. This assignment does not cover the full-length protein as resonances that correspond to the region D94-T117 were not detected in the 2D spectra. For example, no  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  correlation is observed for G116 (Fig. 1A), although the S and T residues at its N and C-termini respectively should have offered a characteristic chemical shift signature for this SGT tripeptide. Additionally, only partial assignment is available in the region I75 to D94, again due to resonance broadening. The CA and CB chemical shift values of the assigned resonances confirm the global disordered nature of Pfl2 free in solution, as they are close to those expected for a random coil polymer (BMRB accession number 25108). However, closer examination of the experimental chemical shifts of Pfl2 amino acids based on comparison with chemical shift tables of expected values for a strictly random coil polymer [29] shows several regions with positive deviations correlated with

Accepted Article

a propensity to adopt an  $\alpha$ -helical conformation, in particular between amino-acids 18-30, 52-57, 71-75 and 132-140 (Fig. 1G). We used the available data to map the binding sites of  $^{15}\text{N}$ -Pfl2 for PfPP1 based on the principle that the local loss of flexibility of the disordered protein due to binding to the large PfPP1 would result in decreased signal intensity of the corresponding resonances (Fig. 1A-D). Accordingly, comparison of the intensities of corresponding signals in the 2D spectra from the free or PfPP1-bound  $^{15}\text{N}$ -Pfl2 protein reported along the protein sequence allowed the definition of bound regions of  $^{15}\text{N}$ -Pfl2 (Fig. 1C). The N-terminal region, between amino acid residues V5 to F41 loses all resonance intensity upon PfPP1 addition, clearly indicating immobilization of this region by binding. This region includes a sequence of Pfl2 that has a propensity to adopt helical conformation, based on the analysis of the chemical shifts (Fig. 1G). We also indirectly observed the binding of the region D94-T117, whose resonances are not detected, by the linear intensity decrease of the resonances corresponding to the residues flanking this region (Fig. 1C, Fig. 2A). In the C-terminal region of Pfl2 bound to PfPP1, the intensity of the resonances indeed increases linearly from T117 to regain their full intensity in the last 10, flexible, amino acid residues. This gradual increase of intensity is also observed from residue D94, which loses most of its corresponding resonance intensity upon PfPP1 binding, to residue N68, which shows the intensity of an amino acid in an unbound flexible region. This second region of binding, localized between D94 and T117 matches a region predicted to adopt an  $\alpha$ -helical secondary structure, based on primary sequence and contains the “FxxR/KxR/K” motif.

In our previous study, we clearly showed the implication of  $\text{K}_{12}\text{TISW}_{16}$  (“RVxF” motif, motif 1) by biochemical and functional approaches [27], supporting the NMR data presented in this work. In order to further inspect the contribution of  $\text{F}_{95}\text{KEKRRK}_{100}$  (“FxxR/KxR/K” motif, motif 2) present in the region D94-T117 immobilized by PfPP1 interaction, we mapped the interaction site(s) of Pfl2 mutated on motif 2 (F95, K98 and K100 were replaced by A) with PfPP1 using NMR spectroscopy in the same conditions as for the wild type Pfl2 protein. Only those resonances showing no chemical shift perturbations that could result from the primary sequence modifications of Pfl2 were used for the mapping (compare spectra D and F in Fig. 1). Comparison of the intensities of corresponding signals in the 2D spectra from the free or PfPP1-bound motif 2-mutated  $^{15}\text{N}$ -Pfl2 along the protein sequence showed that the region surrounding motif 1 presents the same profile of resonance intensity losses in presence of PfPP1 as for the wild-type (Fig. 1C-F). If the profile of intensity perturbation upon PfPP1 binding is similar in the N-terminal part of the motif 2-mutated  $^{15}\text{N}$ -Pfl2 protein, it is not the case in the C-terminal part containing motif 2. The profile of intensity ratios, downstream of the unassigned Pfl2 region [D94-T117], shows indeed a stable value close to the maximum observed along the all sequence (Fig. 1E) contrasting from the N to C increase of intensity ratios observed for the wild type Pfl2 protein (compare C and E in Fig. 1). PfPP1 thus still binds the “RVxF” motif of motif 2-mutated Pfl2 while mutations of residues F95, K98 and K100 to Alanines perturbed binding to the motif 2, confirming that the interaction is indeed mediated by both motifs 1 and 2.

## 2. Contribution of short motifs to the interaction between Pfl2 and PfPP1

Further experiments were performed in a cellular context using the *Xenopus* oocyte model. Oocytes were micro-injected with cRNAs encoding Pfl2 or mutated variants with motif 1 (W16 was replaced by A), motif 2 or both motifs (Fig. 2A) followed by the micro-injection of recombinant 6His-PfPP1 protein. Co-immunoprecipitation experiments from the *Xenopus* extracts show that the wild-type Pfl2 interacts with the PfPP1 phosphatase, and that mutations of both motifs 1 and 2 are necessary to decrease co-immunoprecipitation below detectable levels (Fig. 2B). However, under these experimental conditions, mutation of either motif 1 or motif 2 did not allow evidencing a variation of binding of mutated Pfl2 to PP1. To assess more precisely the involvement of each motif, *in vitro* experiments using an ELISA based assay with Pfl2 proteins and biotin-labelled PfPP1 were performed. Results presented in Fig. 2C confirmed the capacity of wild type Pfl2 (wt Pfl2) to bind PfPP1, the intensity of the detected signal depending on the amount of PfPP1 added. A loss of binding was observed for both mutated Pfl2 proteins, confirming the involvement of each motif in PfPP1 binding. When Pfl2 protein mutated on motif 1 alone or on motifs 1 and 2 was coated, a similar loss of binding of PfPP1 compared to the wt Pfl2 was observed, pointing out the major implication of the “RVxF” motif.

Finally, Surface Plasmon Resonance (SPR) measurements were performed to obtain further quantitative data on the contribution of each motif. Pfl2 or mutated variants were immobilized on sensor chips and increasing concentrations of PfPP1 were injected until steady state equilibrium was achieved. The direct binding of PfPP1 to wild type Pfl2 was confirmed by the sensorgrams that show a rapid association to reach equilibrium, followed by a dissociation phase when the buffer replaces the PfPP1 solution (Fig. 3A-D). The saturation curve obtained by plotting the maximum response reached at equilibrium for each concentration of analyte fits a non-linear regression for a two-binding site interaction (Fig. 3E). The biphasic nature of the interaction is visually clear from the Scatchard plot that reveals two distinct slopes correlated to two distinct dissociation constants (Fig. 3E). Dissociation constants derived from the non-linear regression of the saturation curve are a high affinity  $K_d$  of 47.9 nM and a low affinity  $K_d$  estimated to be 3.3  $\mu$  M. Experiments repeated using motif 2-mutated Pfl2 show that the interaction with PfPP1 is in this case mediated by a single site, as shown by the single slope in the Scatchard plot, while the affinity is strongly decrease with a dissociation constant estimated in the  $\mu$  M range (Fig. 3F). Mutation of motif 1 has a more drastic effect on the interaction as the amount captured on the motif 1-mutated Pfl2 chip upon PfPP1 injection was too low to calculate a dissociation constant (Fig. 3G). Mutation of both motif 1 and motif 2 of Pfl2 virtually abolished the interaction as almost no PfPP1 can be captured on the chip of Pfl2 mutated for both motifs. This shows that the highest  $K_d$  of 47.9 nM is to be attributed to interaction of PfPP1 with motif 1 of Pfl2.

These experiments conducted using various techniques concurred to show that although the “RVxF” motif of Pfl2 is a major site of interaction with PfPPP1, “FxxR/KxR/K” motif is also important for an efficient interaction.

### 3. Contribution of short motifs to the function of Pfl2

The contribution of motif 2 of Pfl2 for the interaction with PfPPP1 demonstrated as hereabove detailed, its impact on the function of Pfl2 was the next question to address. *Xenopus* oocytes are considered as a model and a major tool to study the phosphorylation/dephosphorylation process in signaling pathways involved in cell cycle progression from G2 to M phase, known as Germinal Vesicle Break-Down (GVBD). In our earlier studies, we have used this model where *Xenopus* PP1 (XePP1) exhibits >85% identity with PfPPP1 to examine the function of regulators of *P. falciparum*. We observed that the micro-injected Pfl2 was able to interact with XePP1 and to induce GVBD. When K<sub>12</sub>TISW<sub>16</sub> deleted or mutated Pfl2 was injected, no GVBD was observed, demonstrating the importance of the “RVxF” motif in Pfl2 regulatory activity [27]. In this work, we examined the ability of the F<sub>95</sub>KEKRRK<sub>100</sub> motif to affect Pfl2 function. To this end, we compared the ability of wild type Pfl2 to regulate XePP1 function to that of the Pfl2 protein mutated only on motif 1, motif 2 or motifs 1 and 2 together. Micro-injections of the corresponding cRNAs were performed in oocytes and the presence of each protein was checked by immunoblots using anti-HA mAb (Fig. 4A). Only Pfl2 mutated on both motifs 1 and 2 was unable to interact with XePP1, as shown by co-immunoprecipitation experiments (Fig. 4A, lane 6), while mutations in each motif alone did not prevent the interaction to PP1 (Fig 4A, lanes 4 and 5). Under these experimental conditions, mutation of either motif 1 or motif 2 did not allow evidencing a variation of binding of mutated Pfl2 to XePP1, as already seen for the immunoprecipitation in the same conditions of PfPPP1 (Fig. 2B). As to the effect on the induction of GVBD, none of the mutated proteins were, unlike wild type Pfl2, able to trigger the G2/M transition (Fig. 4B).

Next, we investigated the inhibitory capacity of Pfl2 towards PfPPP1, and in particular the contribution of motif 2 in this function as the involvement of the “RVxF” motif was previously reported [27]. The capacity of motif 2-mutated Pfl2 to regulate PfPPP1 activity was probed in a dephosphorylation assay of the pNPP (para Nitro Phenyl Phosphate) substrate by the recombinant PfPPP1 protein. Using a concentration of recombinant PfPPP1 within a range producing linear release of phosphate from the pNPP substrate, the effect of wt Pfl2 or motif 2-mutated Pfl2 protein addition was evaluated. As previously described, wt Pfl2 has the capacity to strongly decrease the phosphatase activity of PfPPP1 (Fig. 5). Mutation of the F<sub>95</sub>KEKRRK<sub>100</sub> motif of Pfl2 affected this capacity of inhibition as the phosphatase activity of PfPPP1 towards the pNPP substrate remained unaffected in presence of motif 2-mutated Pfl2 protein (Fig. 5). These data showed that motif 2 is also essential for the regulatory function of Pfl2 of PfPPP1 phosphatase activity, as was previously demonstrated for motif 1 [27].

#### 4. Effect of a peptide derived from the “FxxR/KxR/K” Pfl2 motif on PP1 phosphatase activity

Since the F<sub>95</sub>KEKRK<sub>100</sub> motif is clearly involved in PP1 binding and inhibition, we next tested whether a “FxxR/KxR/K” derived peptide named P3 (Fig. 6A) would be able to bind to PP1 and inhibit its function. The synthetic P3 peptide consists of two successive motifs 2 coupled at the N-terminus to a penetrating peptide (VKKKKIKREIKI), corresponding to a non-toxic shuttle that helps to deliver the peptide into the infected red blood cell [30] (Fig. 6A). P3 is able to bind to PfPP1 as shown by ELISA based experiments (Fig. 6B) but, despite this binding, it has no PfPP1 inhibitory activity by itself in an *in vitro* phosphatase assay using pNPP substrate (data not shown). Additionally, injection of P3 into oocytes does not trigger GVBD (Fig. 6C). Consequently, the *Xenopus* model was further used to investigate the ability of P3 to block Pfl2 function by pre-injecting peptides prior to injection of the wild type Pfl2 protein. This protocol completely abolished the Pfl2-dependent GVBD (Fig. 6D), in contrast to pre-injection of the control peptide (P6 corresponding to the penetrating peptide alone) that did not lead to any effect. Moreover, P3 pre-injection interfered with Pfl2-XePP1 interaction as revealed by immunoblot analysis carried out on co-immunoprecipitates with anti-His mAb (Fig 6E, Lane 3) while pre-injection of the control peptide P6 did not interfere with the binding. These data thus show that although P3 is able to interact with Pf/XePP1, it does not directly inhibit/increase the phosphatase activity but it nevertheless prevents the binding of Pfl2 to PP1, leading to an uncontrolled activity of PP1.

#### 5. Effect of the peptide derived from the “FxxR/KxR/K” Pfl2 motif on the growth of erythrocytic *P. falciparum* parasites

Our previous studies suggest that Pfl2 is essential to the completion of the *P. falciparum* erythrocytic cell cycle [27]. The demonstration that the P3 peptide was able to interfere with Pfl2 activity (Fig. 6D) led us to investigate the capacity of P3 to inhibit *P. falciparum* growth *in vitro*. FITC-labeled peptides were first used to confirm the uptake of the P3 peptide by blood stage parasites. FITC-P3 was able to penetrate infected erythrocytes and to accumulate within the nucleus of intracellular *P. falciparum* (Fig. 7A) while no peptides were observed in uninfected red blood cells, likely due to the absence of parasites (Fig. 7A, panel 1). The P3 peptide interferes with *P. falciparum* growth in a dose-dependent manner with an inhibition of about 45% at a concentration of 160  $\mu$  M (Fig. 7B). The significance of this growth inhibition was observed at 40 and 160  $\mu$  M of P3 ( $P < 0.001$ ) when compared to P6 peptide control.

## Discussion :

*Plasmodium falciparum* displays a complex life cycle involving several rounds of growth and multiplication that are essential to increase the parasite population and its rate of transmission. The pathogen displays many unusual features and the molecular systems underlying *Plasmodium* growth, division and differentiation are not clearly understood. Consequently, the identification of the molecular players involved in parasite development and the design of means to interfere with their functions could lead to innovative therapeutic strategies [31]. Protein phosphatases, which are major contributors to parasite growth and multiplication [1-7, 32-36], appear as targets of choice.

In previous work, we isolated a *P. falciparum* gene encoding a protein homologous to inhibitor 2 (PfI2) of protein phosphatase type 1 (PP1). We provided evidence that PfI2, which is expressed by the parasite and most likely essential to its development, is able to bind to PP1 and to inhibit its activity. We further showed that the K<sub>12</sub>TISW<sub>16</sub> and H<sub>102</sub>YNE<sub>105</sub> motifs are critical for PfI2 inhibitory activity. As the PfI2/PfPP1 interaction seems to be complex we decided to refine the earlier analysis in order to propose a detailed model of *P. falciparum* I2/PP1 binding.

NMR spectroscopy allowed us to obtain a detailed view of the regions involved in PfI2 interaction to PfPP1. The weak dispersion of the signals on the <sup>1</sup>H scale in the <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC, as well as the values of the CA and CB chemical shifts indicate a globally disordered protein, as observed for numerous PP1 regulators [37-41]. Assignment of the chemical shift resonances for all the residues in the 3D experiments was, however, not feasible due to resonance broadening localized in specific regions of the protein. No signal was indeed detected in the 2D <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC that corresponds to the region 95 to 116. This region exactly matches a helical prediction by PsiPred [42]. The broadening could thus be due to an unfavourable dynamical exchange of conformations in a region partially folded into an  $\alpha$  helix. This does not exclude the possibility that the broadening could additionally be due to dynamic contact between two proteins in this region, forming a loose dimer, or to tertiary contacts that were shown to involve the homologous C-terminus of human I2 [43, 44]. Despite the lack of signals to probe this region, the intensities of resonances corresponding to amino acids located in adjacent regions shows a clear trend indirectly indicating the immobilization of the invisible region by PfPP1 binding. In the C-terminal part, the intensity recovery from the point of attachment to the free C-terminus of PfI2 is linear as we previously observed for regions flanking the immobilized nucleus of aggregation of the disordered Tau protein inside fibers, as probed by NMR [45]. This linear trend is lost upon PfI2 motif 2 mutation (Fig. 1, compare C and E), indicating that it indeed indirectly probes an interaction with PfPP1 that is abolished for the motif 2-mutated protein.

The immobilized region contains the motif “FxxR/KxR/K” found in other PP1 regulators [46] and initially described in certain Bcl proteins [23]. In most I2 characterized so far, the C-terminus side of the “FxxR/KxR/K” motif is followed by a HYNE sequence [43]. From structure studies of PP1/I2 complex, it was suggested that HYNE may be directly responsible for the inhibition either by

preventing the access to the catalytic site and/or the displacement of Mn<sup>2+</sup> ion present in this catalytic site. Clarification of its functional role awaits further studies with I2 from other species (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*) where HYNE is absent [47]. In *P. falciparum*, although our mutation studies showed the involvement of HYNE motif in the function of Pfl2, the synthetic corresponding peptide did not exhibit any effect on the growth of the parasite, unlike the “RVxF” corresponding peptide [27]. This may be due to the capacity of native Pfl2 to displace the HYNE corresponding peptide.

Further analysis of Pfl2/PfPP1 NMR spectra in the Pfl2 region at the N-terminus side close to the “FxxR/KxR/K” site showed that the trend of linear intensity recovery of resonances is not as clear, as an additional region of contact with PfPP1 could be located between residues 70 and 80. This region also matches a prediction of helical tendency by PsiPred, as well as from the experimental CA chemical shifts, and assignment is only partial due to resonance broadening. The moderate decrease in intensity, to about half of the maximum resonance intensity, points to a secondary binding site. The N-terminal region containing K<sub>12</sub>TISW<sub>16</sub> (“RVxF”) motif is also included in a region showing a helical tendency of Pfl2 free in solution. The biochemical and NMR data clearly indicate multiple points of interaction with PfPP1, matching several regions of Pfl2 adopting a preferential helical conformation that could fold into fully populated  $\alpha$ -helices in a folding-upon-binding mechanism. The PP1 complex structures suggest a role of these transient preformed structures observed in the unbound state for the interaction with PP1 [43, 44]. NMR-based analysis of I2 indeed shows several partially formed  $\alpha$ -helices in its free form [38] that correspond to helices in the bound-state crystal and NMR structures of the I2/PP1 complex, although a large part of the I2 protein still remains disordered even upon binding to PP1 [43, 44]. The NMR structure of the I2/PP1 complex indeed shows that 75% of the bound I2 remains disordered, including a 71 amino-acid dynamic loop that connects two binding sites [43, 44].

The “RVxF” motif of Pfl2 is known to be a primary site of interaction and corresponds to the high affinity K<sub>d</sub> of 47.9 nM found by SPR, a similar value of 100 nM for Pfl3 binding to PfPP1 being found using the same methods, mediated by the Pfl3 “RVxF” homologous motif [26]. Despite the high affinity of the “RVxF” motif compared to the secondary site of interaction “FxxR/KxR/K”, this second contact point seems to be important for both Pfl2 interaction and function as its alteration by mutations strongly decreases the affinity for PfPP1, as characterized by a dissociation constant in the  $\mu$  M range (estimated K<sub>d</sub> of 4.8  $\mu$  M). Interaction of the single motif 1 or motif 2 mutant of Pfl2 can still be detected by co-immunoprecipitation from *Xenopus* oocytes with micro-injected PfPP1 or endogenous XePP1. In this qualitative experiment, the stoichiometry of Pfl2 to PP1 is not controlled and fails to detect the difference between the mutant that was picked up by more quantitative assays such as the ELISA titration or the SPR. These results are in agreement with previous data showing that the deletion of the “RVxF” motif or mutation of W<sub>16</sub> into alanine in Pfl2 did not abolish the interaction with PfPP1 in a yeast two-hybrid model [27]. This high affinity is, however, necessary to ensure the

inhibitory function of Pfl2 as removal of K<sub>12</sub>TISW<sub>16</sub> or F<sub>95</sub>KEKRK<sub>100</sub> alone prevented its function in the *Xenopus* oocyte model, or its capacity to inhibit PfPP1 *in vitro* phosphatase activity.

Because of the importance of the phosphorylation/dephosphorylation processes in the tight regulation of cellular signaling pathways, the pharmacological manipulation of protein dephosphorylation is an attractive and innovative therapeutic strategy. To create selective inhibition, it has been proposed to target the phosphatase regulators instead of the non-selective catalytic subunit. Interestingly, a recent study described the proteostatic action and protection of stressed cells by the selective inhibition of the human PP1 regulator GADD34 by guanabenz, a small molecule described initially as anti-hypertensive agent [48]. By extension, interfering with PfPP1 holoenzymes may create new means to develop antimalarial compounds. Proof-of-concept was provided that competing peptides derived from “RVxF” domains could bind to the PfPP1 catalytic subunit and inhibit downstream signaling pathways and *in vitro* experiments revealed their potent anti-parasitic activity [27]. These encouraging results led us to explore the potential to use of a competitive peptide (P3) for the secondary PP1 binding site of Pfl2, “FxxR/KxR/K”. The attraction of this strategy is that it could prove more specific for Pfl2 given that “RVxF” motif is a well-known motif for PP1 binding and is found in numerous interactors. As revealed by microscopy analysis, the FITC-P3 peptide was able to accumulate within the parasite nucleus. Interestingly, no peptide was detected in non-infected erythrocytes, suggesting specificity for infected cells that could be due to trapping by the interaction with PfPP1 and/or alternatively an increased stability of the peptide involved in the interaction. The P3 peptide was shown to bind to PP1, and in *Xenopus* oocytes, to disrupt XePP1/Pfl2 complexes and to inhibit Pfl2-dependant GVBD. Finally, P3 was able to inhibit *P. falciparum* growth although at a high (160 μM) concentration. We postulate that in *P. falciparum*, P3 is able to interact with PfPP1 and to disrupt the phosphatase complexes leading to a mis-controlled PP1 activity and, finally, to the death of the parasite. The affinity of the interfering peptide could be improved in future *via* the design of peptido-mimetics, but the P3 peptide nevertheless provides an encouraging starting point.

## **Experimental procedures:**

### ***1- Preparation of parasites***

*P. falciparum* 3D7 clone was grown according to Trager and Jensen [49] with slight modifications [26].

### ***2- Molecular cloning of Pfl2 and PfPP1***

*Pfl2* cDNA with optimized codons for recombinant expression in *Escherichia coli* was synthesized as described [27]. The coding regions of Pfl2 and PfPP1 were amplified by PCR with the primers Pr1-Pr2 and Pr7-Pr8 respectively (Table S1). PCR products were subcloned in a pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) and checked by sequencing. For expression of the recombinant proteins, the pETDuet-1 expression system was used for PfPP1 and pQE30 (Qiagen) for Pfl2 (Novagen). The restriction sites

for sub-cloning are mentioned in Table S1. To obtain the mutated *PfI2* versions, PCR-based site-directed mutagenesis was performed using Isis Proofreading DNA polymerase (Qbiogene) as previously described [27], the pQE30-PfI2 construction as templates, and the Pr3-Pr4 (“RVxF”-mutated PfI2: W<sub>16</sub>→A) or Pr5-Pr6 (“FxxR/KxR/K”-mutated PfI2: F<sub>95</sub>→A, K<sub>98</sub>→A, K<sub>100</sub>→A) as primers. Nucleotide replacements were verified by sequencing.

### **3- Recombinant protein expression in *E. coli***

Protein expression was carried out in the *E. coli* M15 strain for the recombinant pQE30 plasmids and the BL21 strain for pETDuet-1. The expression and purification of 6His-PfI2 proteins were carried out as previously described [27]. Numbering of the protein amino acid residues does not take the His-Tag into account and starts with the methionine 1 of PfI2. For isotope labeling, the PfI2 protein was produced in a M9 minimal medium containing 4 g/L glucose or 2 g/L [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose for expression of <sup>13</sup>C-labeled proteins, 1 g/L <sup>15</sup>N-ammonium chloride, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, MEM vitamin cocktail (Sigma) and ampicillin (100 mg/L). Proteins were purified in denaturing conditions or not without any effect on the resulting 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra.

### **4- NMR spectroscopy**

For NMR interaction experiments, the <sup>15</sup>N 6His-PfI2 was dissolved at 50 μM in a buffer containing 100 mM NaPi pH6.7, 100 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 10 mM DTT and 5% D<sub>2</sub>O. <sup>1</sup>H spectra were calibrated with 1 mM sodium 3-trimethylsilyl-3,3',2,2'-d<sub>4</sub>-propionate (TSP) as a reference. Spectra were recorded at 298K on a Bruker DMX600 spectrometer equipped with a triple resonance cryogenic probehead (Bruker, Karlsruhe, Germany). <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra were acquired on <sup>15</sup>N-labeled PfI2 or A<sub>95</sub>KEARA<sub>100</sub> mutated PfI2 proteins with 64 scans per increment, with 2048 and 256 points in the proton and nitrogen dimension, respectively. For the interaction experiments with PfPP1, 104 scans per increment were used to compensate the dilution due to the addition of PfPP1 in the same buffer at a 1:1 molar ratio. Three-dimensional HNCACB, HNCA, HNCACO and HNCO experiments were recorded at 0.2-0.3 mM for <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-labeled PfI2 proteins. Data processing was done using Topspin 2.1 program (Bruker). Peak picking and intensity measurements were performed using Sparky (T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco). Assignment was performed using MARS program for the automatic assignment of backbone atoms [50].

### **5- Surface Plasmon Resonance measurement analysis**

The SPR binding studies were performed on a BIACORE 2000 instrument. The PfI2 protein and mutated variants were captured on a CM5 sensor chip. The first flow channel of the sensor chip did not contain any immobilized ligand and served as a reference surface. The PfPP1 protein was diluted in HBS-P buffer (Biacore running course buffer) and injected over PfI2 at a 10 μL/min flow rate for

15 min in order to achieve steady state responses ( $R_{eq}$ ). Association was followed by a 5 min dissociation step. The surfaces were regenerated between binding cycles by one injection of 10 mM NaOH for 1 min. Saturation curves were obtained over a broad concentration of PfPP1 ranging from 25 nM to 3000 nM. Values were obtained as the average of three replicates on two distinct CM5 sensor chips.

### **6- Experiments in *Xenopus laevis* oocytes**

cRNA encoding wild-type or mutated Pfl2 were produced using the T7 mMessage mMachine Kit (Ambion), cRNAs were transcribed from T7 promoter-containing pGADT7 plasmids (1  $\mu$ g) previously linearized by BamHI restriction enzyme. cRNAs were precipitated by 2.5 M LiCl, washed in 70% ethanol, resuspended in 20  $\mu$  L diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water, and quantified by UV absorption at 260nm. cRNAs were analyzed in a denaturing agarose gel to control size of the transcripts. cRNA preparations were micro-injected as previously described. Each *Xenopus* oocyte (stage VI) was micro-injected with 60 nl of cRNA (1 mg/mL) in the equatorial region and incubated at 19°C in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES pH 7.4 supplemented with 50  $\mu$ g/mL streptomycin/penicillin, 225  $\mu$ g/mL sodium pyruvate, 30  $\mu$ g/mL trypsin inhibitor) for 15 h. Preparation of *Xenopus* oocytes and protein/peptide microinjection experiments were performed as previously described [51]. Regarding the pre-injection experiments, 100 ng of peptides were pre-injected in the oocytes 1 hour before 100 ng of 6His-Pfl2wt in PBS (Phosphate Buffer Saline). Germinal Vesicle BreakDown (GVBD) was detected by the appearance of a white spot at the apex of the animal pole.

### **7- ELISA Assays**

Binding of recombinant Pfl2, mutated Pfl2 proteins, or derived peptides (purchased from Genscript, USA) with a purity > 98%, were assessed by an ELISA based assay. In ELISA-based assays described previously [27], each well was coated with 100  $\mu$ L of 50  $\mu$ g/mL of Pfl2-derived peptide (P3, VKKKKIKREIKIFKEKRFKEKRK), control peptide (P6, VKKKKIKREIKI) or 5  $\mu$ g/mL of wt Pfl2 or different mutated Pfl2 proteins in PBS overnight at 4°C. BSA was used as control. Following washing with PBS-Tween20 0.1%, the plates were blocked with PBS containing 0.5% gelatine for 1 hour at room temperature. Coated-plates were then incubated with various concentrations of PfPP1 biotinylated with biotin-NHS according to the manufacturer's instructions (Calbiochem). Binding assays of biotin-PfPP1 with the peptides or proteins were performed as previously described [26]. The statistical significance was calculated with the Mann-Whitney U test for nonparametric data. *P* values < 0.05 are considered significant.

## **8- Immunoprecipitation and Western blot analyses**

Immunoprecipitation of HA-Tagged proteins expressed in oocytes from cRNA were performed according to the procedure described previously [51]. 18 h after cRNA injection, oocytes were lysed (in 50 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05% SDS, 0.5% Triton X100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml soybean trypsin inhibitor, 10 μg/ml benzamidine, 1 mM sodium vanadate) and centrifuged at 4°C for 15 min at 10,000 g. Supernatants were incubated with anti-HA (1/500, Invitrogen) or anti-His (1/500, Qiagen) antibodies for 4 h at 4°C. Protein A-Sepharose beads (5 mg, Amersham Biosciences) were added for 1 h at 4°C. Beads were collected by centrifugation, rinsed three times, resuspended in Laemmli sample buffer, and subjected to a 10% SDS-PAGE. Immune complexes attached to the beads were analyzed by Western blotting using anti-XePP1 (Santa Cruz Biotechnology, 1/15000), anti-HA (1/8000) or anti-His (1/10000) antibodies and the advanced ECL detection system (Amersham Biosciences).

## **9- Effect of PfI2 on PfPPP1 activity**

The activity of PfPPP1 with *p*-nitro-phenylphosphate (pNPP) as substrate was assayed as previously described [10]. Various amounts of PfI2 were added to PfPPP1 and preincubated for 30 min at 37°C before testing the PfPPP1 phosphatase activity. Results are presented as mean of increase or decrease of phosphatase activity, for three repetitions, in comparison to PfPPP1 incubated in the reaction buffer alone (100% activity).

## **10- Growth inhibition assay of *P. falciparum***

Assays were carried out in 96-well plates with a starting parasitemia of 0.5% at a haematocrit of 1% using SYBR Green I [52]. The peptides were added to the culture at various concentrations ranging from 2.5 μM to 160 μM (final concentrations) in a volume of 250 μl of RPMI-AlbuMAX (0.5%) and incubated for further 72 hours to allow completion of at least one cycle of all stages. Cultures SYBR Green I staining, fixation and parasite growth was assessed as previously described [27]. Results presented are percentages of inhibition of parasite growth compared to control wells without peptide. The statistical significance was calculated with the Mann-Whitney *U* test for nonparametric data.

## **11- Analysis of peptide uptake by *P. falciparum* infected red blood cells.**

The uptake of FITC-labeled P3 peptide by 3D7 *P. falciparum* infected erythrocytes (10 % parasitaemia) was carried out added at a final concentration of 80 μM [27]. The DNA was stained using DAPI (Sigma-Aldrich). FITC-labeled P3 peptide penetration was analysed by fluorescence microscopy (Zeiss, LSM710).

### Acknowledgments and authors' contributions:

We thank Hadidjatou Kalamou for technical assistance. The NMR facilities were funded by the Région Nord, CNRS, Pasteur Institute of Lille, European Community (FEDER), French Research Ministry and the University of Sciences and Technologies of Lille I. We gratefully acknowledge support from the TGIR-RMN-THC FR3050 CNRS. We thank Dr. R. J. Pierce for critical reading of the manuscript.

AF, JV, KCM, CP, JK, IL planned the experiments; AF, GT, AV, JV, CFX, AM, KCM, CP, IL performed the experiments; AF, GT, JV, KCM, CP, JK, IL analyzed the data; AF, JK, IL wrote the paper.

### References:

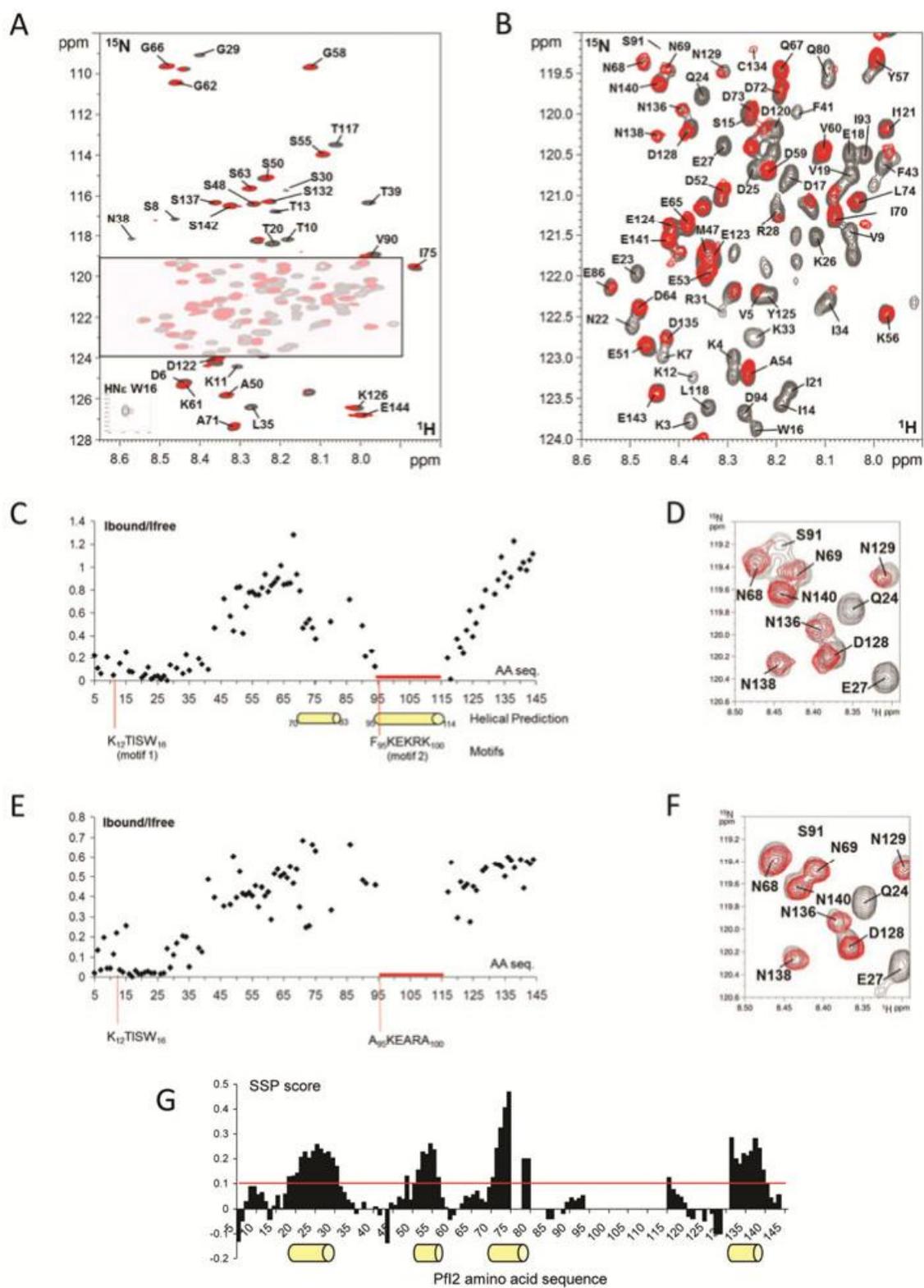
1. Yokoyama D, Saito-Ito A, Asao N, Tanabe K, Yamamoto M & Matsumura T (1998) Modulation of the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro by protein serine/threonine phosphatase inhibitors, *Biochem Biophys Res Commun.* **247**, 18-23.
2. Ward GE, Fujioka H, Aikawa M & Miller LH (1994) Staurosporine inhibits invasion of erythrocytes by malarial merozoites, *Exp Parasitol.* **79**, 480-7.
3. Dluzewski AR & Garcia CR (1996) Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* by kinase inhibitors, *Experientia.* **52**, 621-3.
4. Solyakov L, Halbert J, Alam MM, Semblat JP, Dorin-Semblat D, Reininger L, Bottrill AR, Mistry S, Abdi A, Fennell C, Holland Z, Demarta C, Bouza Y, Sicard A, Nivez MP, Eschenlauer S, Lama T, Thomas DC, Sharma P, Agarwal S, Kern S, Pradel G, Graciotti M, Tobin AB & Doerig C (2011) Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Nat Commun.* **2**, 565.
5. Doerig C & Tobin AB (2010) Parasite protein kinases: at home and abroad, *Cell Host Microbe.* **8**, 305-7.
6. Wilkes JM & Doerig C (2008) The protein-phosphatome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *BMC Genomics.* **9**, 412.
7. Treeck M, Sanders JL, Elias JE & Boothroyd JC (2011) The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries, *Cell Host Microbe.* **10**, 410-9.
8. Bhattacharyya MK, Hong Z, Kongkasuriyachai D & Kumar N (2002) *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a *glc7* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*, *Int J Parasitol.* **32**, 739-47.
9. Kumar R, Adams B, Oldenburg A, Musiyenko A & Barik S (2002) Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference, *Malar J.* **1**, 5.
10. Daher W, Browaeys E, Pierrot C, Jouin H, Dive D, Meurice E, Dissous C, Capron M, Tomavo S, Doerig C, Cailliau K & Khalife J (2006) Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by PflRR1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Mol Microbiol.* **60**, 578-90.
11. Blisnick T, Vincensini L, Fall G & Braun-Breton C (2006) Protein phosphatase 1, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites, *Cell Microbiol.* **8**, 591-601.
12. Heroes E, Lesage B, Gornemann J, Beullens M, Van Meervelt L & Bollen M (2013) The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity, *FEBS J.* **280**, 584-95.
13. Bollen M (2001) Combinatorial control of protein phosphatase-1, *Trends Biochem Sci.* **26**, 426-31.

14. Peti W, Nairn AC & Page R (2013) Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity, *FEBS J.* **280**, 596-611.
15. Bollen M, Peti W, Ragusa MJ & Beullens M (2010) The extended PP1 toolkit: designed to create specificity, *Trends Biochem Sci.* **35**, 450-8.
16. Wakula P, Beullens M, Ceulemans H, Stalmans W & Bollen M (2003) Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1, *J Biol Chem.* **278**, 18817-23.
17. Llanos S, Royer C, Lu M, Bergamaschi D, Lee WH & Lu X (2011) Inhibitory member of the apoptosis-stimulating proteins of the p53 family (iASPP) interacts with protein phosphatase 1 via a noncanonical binding motif, *J Biol Chem.* **286**, 43039-44.
18. Hendrickx A, Beullens M, Ceulemans H, Den Abt T, Van Eynde A, Nicolaescu E, Lesage B & Bollen M (2009) Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1, *Chem Biol.* **16**, 365-71.
19. Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T & Dominguez R (2004) Structural basis of protein phosphatase 1 regulation, *Nature.* **429**, 780-4.
20. Choy MS, Hieke M, Kumar GS, Lewis GR, Gonzalez-DeWhitt KR, Kessler RP, Stein BJ, Hossenberger M, Nairn AC, Peti W & Page R (2014) Understanding the antagonism of retinoblastoma protein dephosphorylation by PNU192756 provides insights into the PP1 regulatory code, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, 4097-102.
21. O'Connell N, Nichols SR, Heroes E, Beullens M, Bollen M, Peti W & Page R (2012) The molecular basis for substrate specificity of the nuclear NIPPI1:PP1 holoenzyme, *Structure.* **20**, 1746-56.
22. Ragusa MJ, Dancheck B, Critton DA, Nairn AC, Page R & Peti W (2010) Spinophilin directs protein phosphatase 1 specificity by blocking substrate binding sites, *Nat Struct Mol Biol.* **17**, 459-64.
23. Ayllon V, Cayla X, Garcia A, Fleischer A & Rebollo A (2002) The anti-apoptotic molecules Bcl-xL and Bcl-w target protein phosphatase 1alpha to Bad, *Eur J Immunol.* **32**, 1847-55.
24. Ohkura H & Yanagida M (1991) *S. pombe* gene sds22+ essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1, *Cell.* **64**, 149-57.
25. Daher W, Oria G, Fauquenoy S, Cailliau K, Browaeys E, Tomavo S & Khalife J (2007) A *Toxoplasma gondii* leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity, *Eukaryot Cell.* **6**, 1606-17.
26. Freville A, Landrieu I, Garcia-Gimeno MA, Vicogne J, Montbarbon M, Bertin B, Verger A, Kalamou H, Sanz P, Werkmeister E, Pierrot C & Khalife J (2012) *Plasmodium falciparum* inhibitor-3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival, *J Biol Chem.* **287**, 1306-21.
27. Freville A, Cailliau-Maggio K, Pierrot C, Tellier G, Kalamou H, Lafitte S, Martoriati A, Pierce RJ, Bodart JF & Khalife J (2013) *Plasmodium falciparum* encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1: perspectives for novel anti-plasmodial therapy, *BMC Biol.* **11**, 80.
28. Connor JH, Frederick D, Huang H, Yang J, Helps NR, Cohen PT, Nairn AC, DePaoli-Roach A, Tatchell K & Shenolikar S (2000) Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit, *J Biol Chem.* **275**, 18670-5.
29. Marsh JA, Singh VK, Jia Z & Forman-Kay JD (2006) Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between alpha- and gamma-synuclein: implications for fibrillation, *Protein Sci.* **15**, 2795-804.
30. Guergnon J, Dessauge F, Dominguez V, Viallet J, Bonnefoy S, Yuste VJ, Mercereau-Puijalon O, Cayla X, Rebollo A, Susin SA, Bost PE & Garcia A (2006) Use of penetrating peptides interacting with PP1/PP2A proteins as a general approach for a drug phosphatase technology, *Mol Pharmacol.* **69**, 1115-24.
31. Koyama FC, Chakrabarti D & Garcia CR (2009) Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in *Plasmodium*, *Mol Biochem Parasitol.* **165**, 1-7.
32. Doerig C, Abdi A, Bland N, Eschenlauer S, Dorin-Semblat D, Fennell C, Halbert J, Holland Z, Nivez MP, Semblat JP, Sicard A & Reininger L (2010) Malaria: targeting parasite and host cell kinomes, *Biochim Biophys Acta.* **1804**, 604-12.

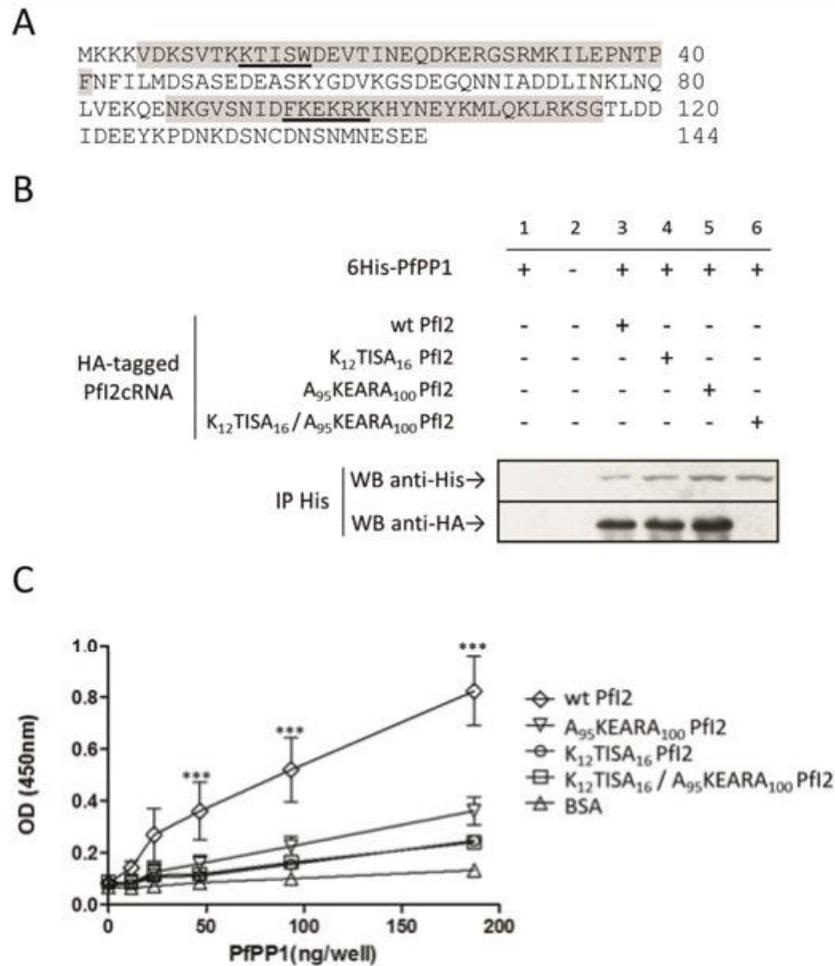
33. Anamika, Srinivasan N & Krupa A (2005) A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*, *Proteins*. **58**, 180-9.
34. Lasonder E, Treeck M, Alam M & Tobin AB (2012) Insights into the *Plasmodium falciparum* schizont phospho-proteome, *Microbes Infect*. **14**, 811-9.
35. Tewari R, Straschil U, Bateman A, Bohme U, Cherevach I, Gong P, Pain A & Billker O (2010) The systematic functional analysis of *Plasmodium* protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission, *Cell Host Microbe*. **8**, 377-87.
36. Doerig C (2004) Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy, *Biochim Biophys Acta*. **1697**, 155-68.
37. Ragusa MJ, Allaire M, Nairn AC, Page R & Peti W (2011) Flexibility in the PP1:spinophilin holoenzyme, *FEBS Lett*. **585**, 36-40.
38. Dancheck B, Nairn AC & Peti W (2008) Detailed structural characterization of unbound protein phosphatase 1 inhibitors, *Biochemistry*. **47**, 12346-56.
39. Huang HB, Chen YC, Tsai LH, Wang H, Lin FM, Horiuchi A, Greengard P, Nairn AC, Shiao MS & Lin TH (2000) Backbone 1H, 15N, and 13C resonance assignments of inhibitor-2 -- a protein inhibitor of protein phosphatase-1, *J Biomol NMR*. **17**, 359-60.
40. Huang HB, Chen YC, Lee TT, Huang YC, Liu HT, Liu CK, Tsay HJ & Lin TH (2007) Structural and biochemical characterization of inhibitor-1alpha, *Proteins*. **68**, 779-88.
41. Lin TH, Huang YC, Chin ML, Chen YC, Jeng HH, Lin FM, Shiao MS, Horiuchi A, Greengard P, Nairn AC & Huang HB (2004) 1H, 15N, and 13C resonance assignments of DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr. 32,000)-a protein inhibitor of protein phosphatase-1, *J Biomol NMR*. **28**, 413-4.
42. Buchan DW, Minneci F, Nugent TC, Bryson K & Jones DT (2013) Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench, *Nucleic Acids Res*. **41**, W349-57.
43. Hurley TD, Yang J, Zhang L, Goodwin KD, Zou Q, Cortese M, Dunker AK & DePaoli-Roach AA (2007) Structural basis for regulation of protein phosphatase 1 by inhibitor-2, *J Biol Chem*. **282**, 28874-83.
44. Marsh JA, Dancheck B, Ragusa MJ, Allaire M, Forman-Kay JD & Peti W (2010) Structural diversity in free and bound states of intrinsically disordered protein phosphatase 1 regulators, *Structure*. **18**, 1094-103.
45. Sillen A, Leroy A, Wieruszkeski JM, Loyens A, Beauvillain JC, Buee L, Landrieu I & Lippens G (2005) Regions of tau implicated in the paired helical fragment core as defined by NMR, *Chembiochem*. **6**, 1849-56.
46. Godet AN, Guergnon J, Maire V, Croset A & Garcia A (2010) The combinatorial PP1-binding consensus Motif (R/K)x(0,1)V/IxFxx(R/K)x(R/K) is a new apoptotic signature, *PLoS One*. **5**, e9981.
47. Templeton GW, Nimick M, Morrice N, Campbell D, Goudreault M, Gingras AC, Takemiya A, Shimazaki K & Moorhead GB (2011) Identification and characterization of AtI-2, an Arabidopsis homologue of an ancient protein phosphatase 1 (PP1) regulatory subunit, *Biochem J*. **435**, 73-83.
48. Tsaytler P, Harding HP, Ron D & Bertolotti A (2011) Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis, *Science*. **332**, 91-4.
49. Trager W & Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture, *Science*. **193**, 673-5.
50. Jung YS & Zweckstetter M (2004) Mars -- robust automatic backbone assignment of proteins, *J Biomol NMR*. **30**, 11-23.
51. Vicogne J, Cailliau K, Tulasne D, Browaeys E, Yan YT, Fafeur V, Vilain JP, Legrand D, Trolet J & Dissous C (2004) Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*, *J Biol Chem*. **279**, 37407-14.
52. Kelly JX, Smilkstein MJ, Brun R, Wittlin S, Cooper RA, Lane KD, Janowsky A, Johnson RA, Dodean RA, Winter R, Hinrichs DJ & Riscoe MK (2009) Discovery of dual function acridones as a new antimalarial chemotype, *Nature*. **459**, 270-3.
53. Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H & Asahi H (2009) *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer, *Exp Parasitol*. **121**, 144-50.

## Supporting information

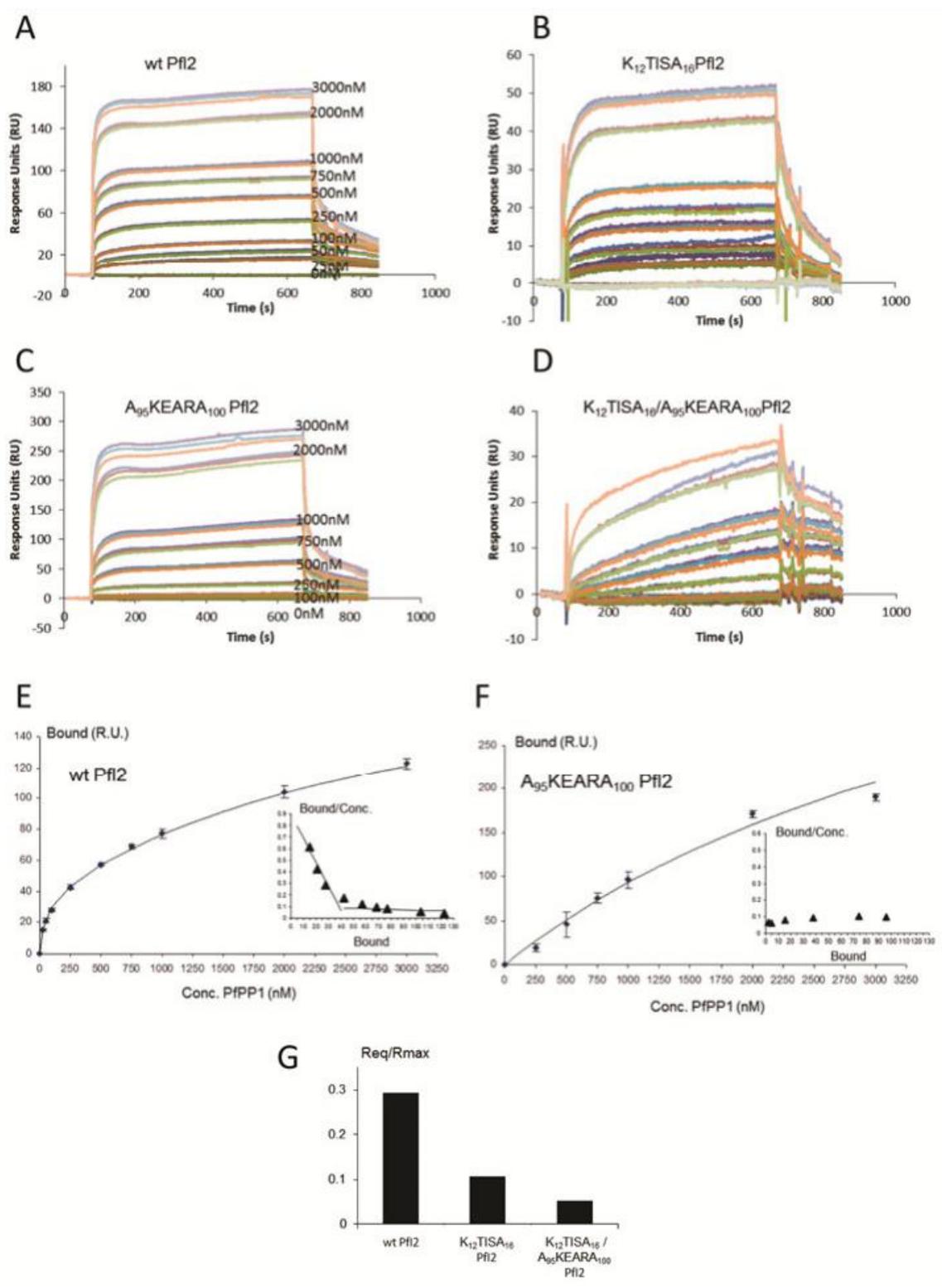
Table S1. List of primers used throughout this study.



**Fig. 1. Mapping of the Pfl2 interaction sites with PfPP1 based on resonance line broadening in 2D NMR spectra.** **A** and **B** Overlaid annotated  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC of  $^{15}\text{N}$ -Pfl2, free in solution (gray) or bound to PfPP1 (superimposed in red). The spectrum **B** corresponds to an enlargement of the highlighted zone in the full HSQC spectrum **A**. The resonance of the W16 side chain is enclosed in spectrum **A**. **C** and **E**. Graphic representation of the relative intensity ratio  $I/I_0$  of corresponding resonances in  $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$  HSQC spectra of Pfl2 (**C**) or  $\text{A}_{95}\text{KEARA}_{100}$  mutated Pfl2 (**E**) in the presence of an equimolar amount of PfPP1(I) versus free in solution ( $I_0$ ). Resonances between amino acid residues 95 and 115 are not detected (red bar). Helical prediction of secondary structure elements using PsiPred program are represented below the graph as cylinders. Pfl2 motifs 1 and 2 involved in interaction with PfPP1 are localized. **D** and **F**. Details of overlaid 2D  $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$  HSQC spectra of  $50 \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -Pfl2 (**D**) or  $\text{A}_{95}\text{KEARA}_{100}$  mutated Pfl2 (**F**) free in solution (gray) or with 1 molar amount of PfPP1 (superimposed in red). **G**. Secondary Structure Propensity of Pfl2 in solution. Secondary Structure Propensity (SSP, [29]) along the Pfl2 sequence calculated based on the available CA and CB chemical shifts (BMRB accession number 25108). SSP scores correspond to a calculated percentage of occupancy, the 0.1 threshold, here represented as a red line, being empirically proposed for significance. Regions with positive values are associated with a preferential  $\alpha$ -helical conformation, here presented as cylinders. The data were averaged on 5 residues.

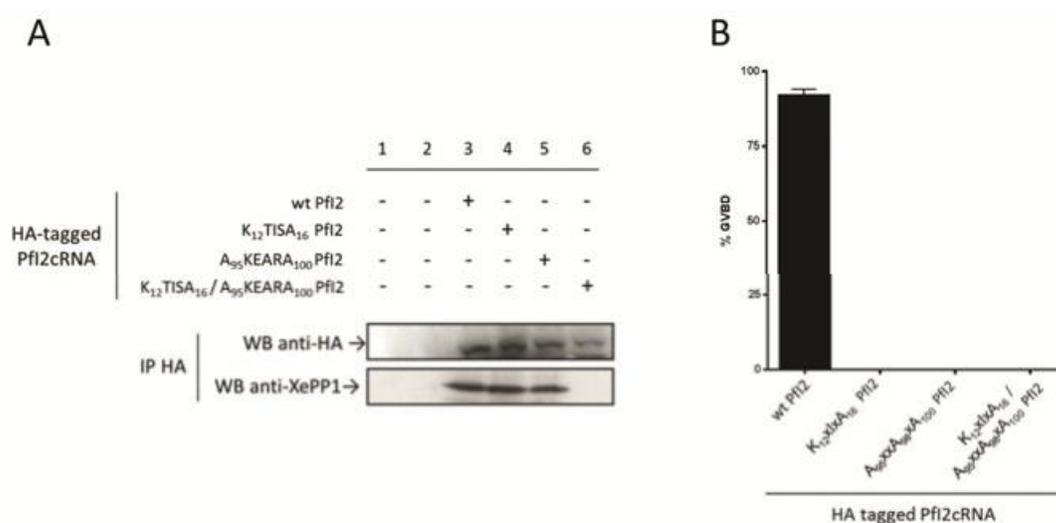


**Fig. 2. Interaction studies of Pf12 with PfPP1.** **A.** Amino acid sequence of *P. falciparum* inhibitor 2 Pf12. The residues corresponding to the immobilized regions due to PfPP1 binding are highlighted in gray. The residues corresponding to the “RVxF” and “FxxR/KxR/K” motifs, respectively called motif 1 and 2, are underlined **B.** Interaction of HA-Pf12 with 6His-PfPP1 in the oocyte model. Oocytes were co-injected with 6His-PfPP1 and cRNA sequences encoding the HA epitope fused at its C-terminus with wild type (wt) Pf12 (lane 3), K<sub>12</sub>TISA<sub>16</sub> mutated Pf12 (lane 4), A<sub>95</sub>KEARA<sub>100</sub> mutated Pf12 (lane 5), or K<sub>12</sub>TISA<sub>16</sub>/A<sub>95</sub>KEARA<sub>100</sub> mutated Pf12 (lane 6). As control oocytes were microinjected with vehicle (lane 2). Immunodetection using specific anti-His (*upper panel*) and anti-HA (*lower panel*) antibodies were performed after prior immunoprecipitation with anti-His (lanes 2-6) or anti-rabbit (control, lane 1) antibodies on oocyte extracts. **C.** Evaluation of the binding capacity of PfPP1 to Pf12 using an ELISA based assay. Increased quantities of biotinylated PfPP1 were added to wells coated with recombinant Pf12 or Pf12 mutated proteins (0.5 μg/well). Results are represented as mean and Standard Error of the Mean as error bars from three independent experiments. \*\*\*p < 0.001 when compared either to BSA or mutated Pf12. No statistical differences were found between mutated Pf12 proteins.

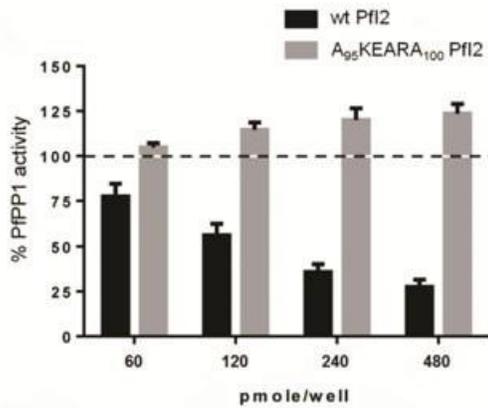


**Fig. 3: Surface plasmon resonance measurements of Pfl2/PfPP1 interaction.** A-D. Sensorgrams of a representative PfPP1 titration (from 25 nM to 3000 nM concentration) of wt Pfl2 (A),  $K_{12}TISA_{16}$  mutated Pfl2 (B),  $A_{95}KEARA_{100}$  mutated Pfl2 (C) and Pfl2 mutated on both motifs

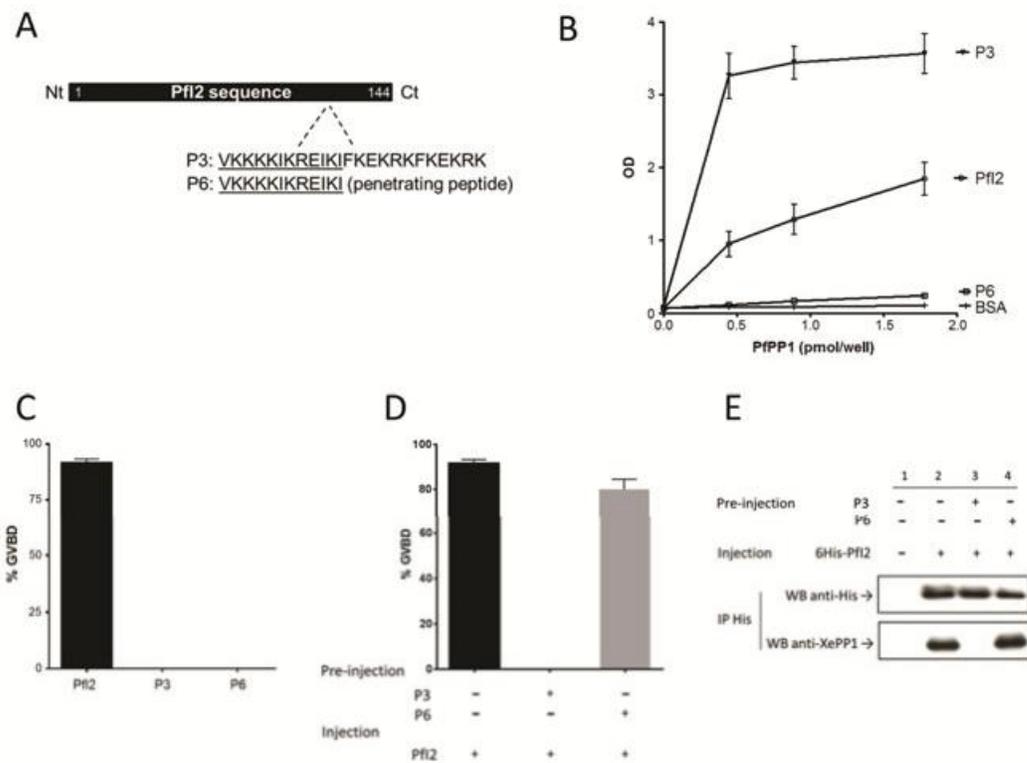
(K<sub>12</sub>TISA<sub>16</sub>/A<sub>95</sub>KEARA<sub>100</sub>) (D) immobilized on sensorchip. **E** and **F**. Plot of the maximum response Req in R.U. (Response Units) reached at equilibrium for each concentration of injected PfPP1 on a wt PfI2 (**E**) or A<sub>95</sub>KEARA<sub>100</sub> mutated PfI2 (**F**) functionalized chips. Results are represented as mean and standard deviations as error bars (n=3). The insert represents Scatchard plot, Req/PfPP1 Conc. (R.U./nM) versus Req (R.U.). **G**. Histogram showing the fraction of protein from the injected solution retained on the chip, defined as the ratio of Req compared to the R.U. maximum (Rmax) loaded on the chip, Rmax being in a similar range of 500-600 R.U. on the PfI2 (lane 1), K<sub>12</sub>TISA<sub>16</sub> mutated PfI2 (lane 2) and K<sub>12</sub>TISA<sub>16</sub>/A<sub>95</sub>KEARA<sub>100</sub> mutated PfI2 (lane 3) chips.



**Fig. 4. Interaction and functional evaluation of PfI2 in *Xenopus* oocytes.** **A.** Interaction of XEPP1 with HA-tagged PfI2 in the oocyte model. Immunodetection analyses using specific anti-XEPP1 antibodies (WB anti-XePP1) and anti-HA antibodies (WB anti-HA) were performed after prior immunoprecipitation from extracts, using anti-HA antibodies (lanes 2-6) or anti-rabbit antibodies as control (lane 1), of micro-injected wild type (wt) or mutated PfI2 proteins. Results show that XEPP1 is co-immunoprecipitated with wild type PfI2 (lane 3), K<sub>12</sub>TISA<sub>16</sub> mutated PfI2 (lane 4) or A<sub>95</sub>KEARA<sub>100</sub> mutated PfI2 (lane 5), but not with PfI2 mutated on both motifs (K<sub>12</sub>TISA<sub>16</sub>/A<sub>95</sub>KEARA<sub>100</sub>) (lane 6). As control oocytes were microinjected with vehicles (lanes 1 and 2). **B.** Induction of G2/M transition in *Xenopus* oocytes by wild type and mutated PfI2 proteins. Sets of 20 oocytes were microinjected with cRNA encoding wild type (wt), or mutated PfI2. Percentages of oocytes exhibiting germinal vesicle breakdown (GVBD) 18 hours after microinjection of cRNA are indicated. Each experiment was repeated at least three times. Results show that wt PfI2 is, unlike mutated PfI2, able to induce GVBD.

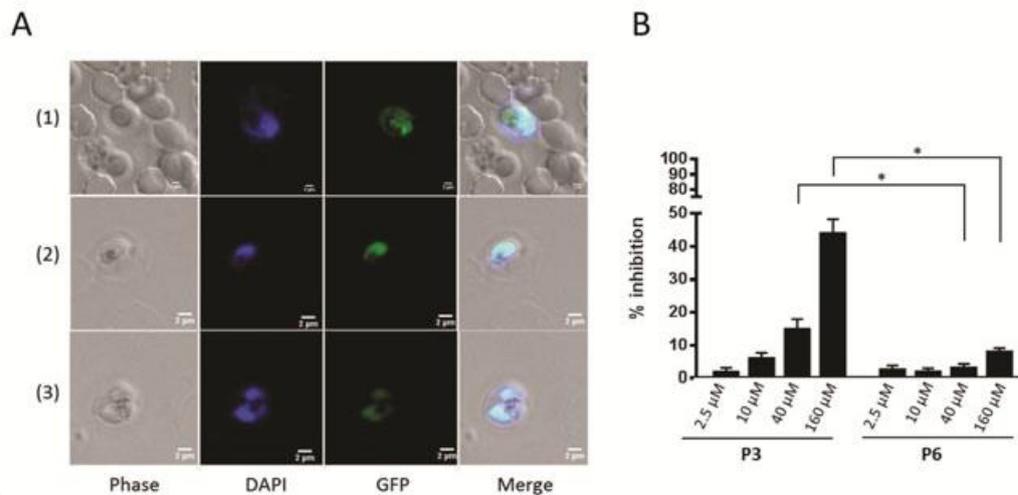


**Fig. 5. Contribution of FxxR/KxR/K motif to the inhibitory function of PfI2 on PfPP1 activity.** Recombinant PfPP1 was pre-incubated for 30 min at 37°C with various concentrations of wt PfI2 (black column) or PfI2 mutated protein (gray column) before the addition of pNPP. Dashed line corresponds to 100% PfPP1 activity (reaction buffer in the presence of pNPP). Results presented as % of relative increase or decrease are means of three independent experiments performed in duplicate with Standard Error of the Mean as error bars.



**Fig. 6. Effect of peptide derived from the “FxxR/KxR/K” PfI2 motif on PP1 phosphatase activity.** A. Schematic representation of PfI2, and sequence of peptide corresponding to the

“FxxR/KxR/K” motif (P3) and to penetrating peptide (P6). **B.** Interaction of P3 and P6 peptides *in vitro* with recombinant PfPP1 using an ELISA-based assay. Increased amounts of biotinylated PfPP1 were added into wells coated with peptides or recombinant PfI2 protein. Results are presented as mean  $\pm$  SEM from three distinct experiments performed in duplicate. **C.** Peptides induction of G2/M transition in *Xenopus* oocytes. GVBD appearance was monitored 18 hours after injection of 100 ng of PfI2, P3 or P6. Each experiment was carried out using a set of 20 oocytes and was repeated at least three times. Values are presented as percentages. **D.** Percentage of GVBD of PfI2-injected *Xenopus* oocytes in the presence or absence of P3 or P6 peptides. Peptides were micro-injected 2 hours before PfI2. **E.** Disruption of PfI2/XePP1 interaction after P3 and P6 peptide injections. Extracts from oocytes micro-injected with PfI2 alone (lane 2) or following preinjection with P3 (lane 3) or P6 (lane 4) were immunoprecipitated with anti-His antibodies. Immunodetection analysis with anti-XePP1 antibodies was performed on the immunoprecipitated fraction with anti-His antibodies. XePP1 is detected only in the immuno-complex obtained from the extracts corresponding to sole PfI2 injection (lane 2) and PfI2 injection with prior P6 injection (lane 4).



**Fig. 7. Effect of peptide derived from the “FxxR/KxR/K” PfI2 motif on the growth of erythrocytic *P. falciparum* parasites.** **A.** Selective penetration of FITC-labeled P3 peptides in 3D7 *P. falciparum*. (1), Note the absence of FITC-P3 in uninfected red blood cells. (2) and (3), higher magnification view of selective penetration of FITC-P3 into infected red blood cells. Note that FITC-P3 is present in the nucleocytoplasmic compartment, no accumulation is observed in food vacuole. **B.** Inhibition of 3D7 *P. falciparum* growth by a peptide corresponding to the F<sub>95</sub>KEKRK<sub>100</sub> PfI2 motif (P3). Parasites were incubated with different concentrations of peptide for 72 hours. P6 (corresponding to the penetrating peptide alone) was used as a negative control. Results presented as % of parasite growth inhibition are means + SEM of four independent experiments performed in duplicate. \*,  $p < 0.001$ .



## II. Le rôle du facteur eIF2 $\beta$ dans le réseau de régulation de PP1 chez *Plasmodium falciparum*

### A. Analyse *in silico* de PfeIF2 $\beta$

#### 1. Annotation de la séquence de PfeIF2 $\beta$

Des analyses de bioinformatique comparative ont permis l'identification, dans le protéome de *P. falciparum*, de différents partenaires de la protéine phosphatase 1 (PP1). En réalisant un alignement de la séquence d'eIF2 $\beta$  humain dans la banque de données de *PlasmoDB*, le facteur d'initiation de type 2 sous-unité  $\beta$  a été identifié, au niveau du chromosome 10, chez le parasite : PfeIF2 $\beta$  (PF3D7\_1010600).

La séquence codante de PfeIF2 $\beta$  a été amplifiée par PCR à partir de l'ADNc de *P. falciparum* dans le but de confirmer les informations présentes dans la banque de données. Après analyse, la séquence est composée de 669 nucléotides soit 222 acides aminés (**Figure 13**) confirmant ainsi les prédictions de la base de données PlasmoDB. De plus, grâce à plusieurs PCR, la présence d'un seul cadre de lecture et d'un unique codon stop a été vérifiée.

```

ATGGAAGATAAAGTTGAAGATGCTGGATCAGCTTTTGTGATTTAGATAAAAATAGTAAATGATGATTGCGAAACAGTTATT      80
M E D K V E D A G S A F V D L D K I V N D D S K Q L F
TGATTTTGGTGAGAAGAAAAGAAAAGAAGAAGAGAGGTTGTAGAAAAGGTAGAAGAGATTATTATAGATGGTACAG      160
D F G E K K K K K K K E V V E K V E E I I I D G T
GGAAAGTTTTTGAAGAGGAGCTGTATATCCATATGATGAATTATTACATCGAATTCAGATTAAATTAATAAACATAAC      240
G K V F E R G A V Y P Y D E L L H R I Q D L I N K H N
ATAGATTTATGTATATCTAAAAATATACTATTAAACCCCAAGTAGTTCGAGTTGGATCAAAAAAGTAGCATGGAT      320
I D L C I S K K Y T I K P P Q V V R V G S K K V A W I
TAATTTTAAAGATATATGTAAGTATATGAATAGAAATGAAGAACATGTTTTCCATTTTGTGTTTAGCAGAATTAGGAAGT      400
N F K D I C T I M N R N E E H V F H F V L A E L G T
AAGGATCAATAGCAGGAGAAGGACAATTAGTTTTAAAGGGAAAGTATGGACCTAAACATATTGAAGCACTCTTAAGAAAA      480
E G S I A G E G Q L V L K G K Y G P K H I E A L L R K
TATATTACTGAATATGTAAGTGTGCAAAATGTGTAAGTCTTAATACAACATATGGAAAAGGATAGTAGGACAAGACTTTT      560
Y I T E Y V T C Q M C K S P N T T M E K D S R T R L F
TCATCAGCACTGTAATGCTTGTGGAGCAAAAAGATCTGTTACAACCATTAAAGAGTGGTTTCCATGCTTTAGGAAGAGGTG      640
H Q H C N A C G A K R S V T T I K S G F H A L G R G
AACGAAGAAAGGCCAAGCATACTAATTAA
E R R K A K H T N .

```

Figure 13: Séquence codante de PfeIF2 $\beta$  et la séquence protéique correspondante.

## Résultats

Après avoir réalisé l'alignement des séquences protéiques d'eIF2 $\beta$  de *P. falciparum* et de l'Homme, plusieurs différences ont été observées. La séquence de PfeIF2 $\beta$  est composée de 222 acides aminés, elle est 30% plus courte que son homologue humain avec 335 acides aminés. Cependant, une identité de séquence de l'ordre de 47% est observée au niveau de la partie C-terminale. Dans cette partie, le domaine de la superfamille eIF2/eIF5 est présent (**Figure 14**, souligné en vert). Trois blocs lysines, qui jouent un rôle dans la liaison à l'ARN, sont identifiés sur la séquence d'eIF2 $\beta$  de l'Homme alors qu'un seul est présent chez *P. falciparum* (**Figure 14**, souligné en orange). Les motifs potentiels d'interaction à PP1, RVxF et FxxR/KxR/K sont conservés chez le parasite mais une différence existe (**Figure 14**, encadrement rouge et vert respectivement). Le motif KVAW, correspondant au motif dégénéré RVxF, se situe dans la partie C-terminale alors qu'il se trouve dans la partie N-terminale chez son homologue humain. Le motif C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>, situé dans la partie C-terminale, correspondant au motif doigt de zinc, est conservé chez les deux espèces (**Figure 14**, encadrement bleu). Il serait impliqué dans l'étape de reconnaissance du codon AUG (méthionine) de la traduction. Chez l'Homme, il existe deux sites de fixation à la GTP (DEEG et NKKD) contre un seul pour le parasite (DGIG) (souligné en bleu, **Figure 14**). De plus, une autre différence est observable chez le parasite, 3 sites de phosphorylation sont identifiés alors que quatre sont présents chez l'homme (la thréonine 90 et les sérines 23 et 205 chez le parasite, et les sérines 2, 13, 67 et 218 chez l'homme **Figure 14**, écrit en rouge).



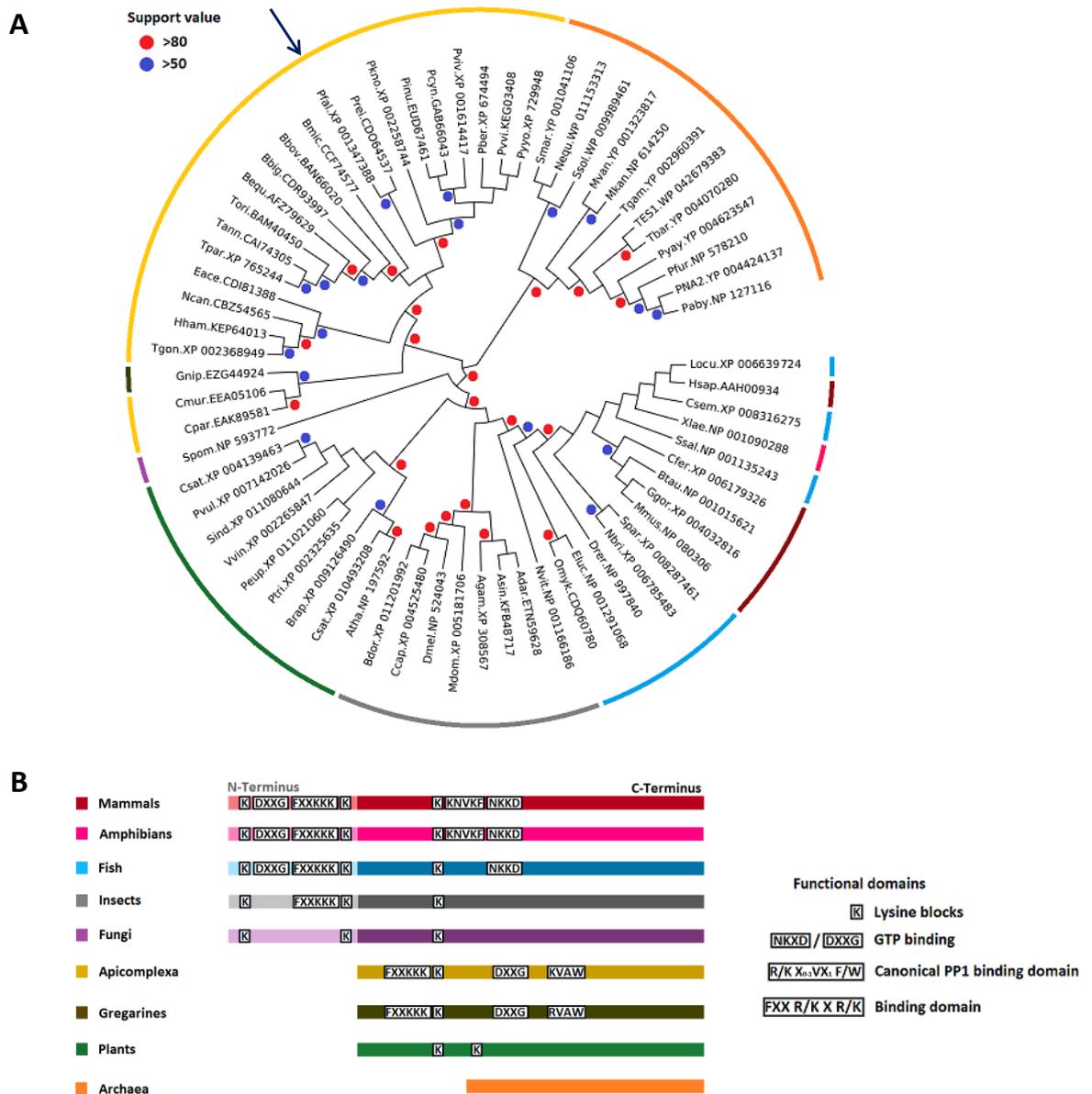
**Figure 14 : Alignement des séquences protéiques d'eIF2 $\beta$  de *P. falciparum* et de l'Homme.** Les traits colorés en orange, bleu et vert représentent respectivement les blocs lysines, les motifs de fixation au GTP et le domaine de la superfamille eIF2/eIF5. Les carrés vert, rouge et bleu désignent le motif de fixation FxxR/KxR/K, le motif d'interaction RVxF et le motif C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub> (doigt de zinc) respectivement. Les acides aminés écrits en rouge montrent les sites de phosphorylation identifiés/caractérisés.

## 2. Etude phylogénétique

Au vu des différences présentes sur la séquence protéique, un arbre phylogénétique d'eIF2 $\beta$  a été réalisé en se basant sur 67 espèces différentes. En prenant en compte tous les taxons, eIF2 $\beta$  semble former un groupe mono-phylogénétique sauf pour les mammifères, les poissons et les amphibiens (**Figure 15A**). Cependant, les caractéristiques moléculaires, incluant les domaines conservés tels que les motifs d'interaction ou de fixation au GTP, montrent que les différents facteurs des vertébrés sont semblables (**Figure 15B**). Il est aussi intéressant de noter que les champignons, les insectes, les poissons, les amphibiens et les mammifères ont une extension au niveau N-terminal d'eIF2 $\beta$ . De plus, le motif FxxR/KxR/K et un domaine de fixation au GTP supplémentaire ont été identifiés au niveau de cette partie

## Résultats

sauf pour les champignons. Ces différences suggèrent un gain de fonction pour ces organismes au cours de l'évolution (**Figure 15B**).



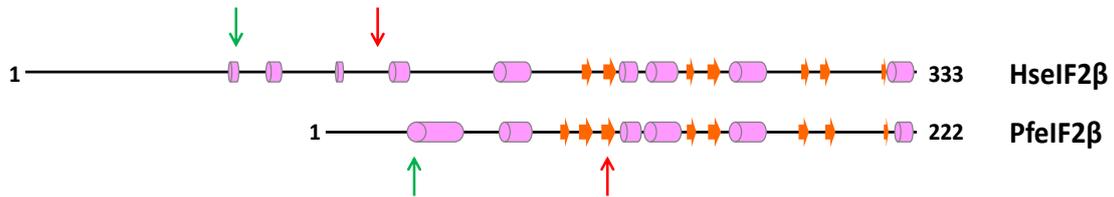
**Figure 15 : Etude phylogénétique de la séquence protéique du facteur eIF2β. A :** Représentation de l'arbre phylogénétique d'eIF2β, basé sur la séquence d'acides aminés de 67 espèces différentes, avec un maximum de probabilité. Les points bleus et rouge représentent les branches internes avec une valeur supérieure à 50 et 80% respectivement. La protéine eIF2β de *P. falciparum* est identifiée par une flèche. Les numéros d'accèsion sont regroupés dans le tableau 10 de la section Matériel et Méthodes. **B :** Représentation simplifiée de la séquence protéique d'eIF2β pour chaque groupe présent dans l'arbre.

### 3. Etude des structures secondaire et tertiaire

D'après différentes analyses structurales, PfeIF2β, protéine de 25.3kDa, est très structurée et composée de 6 hélices α et 8 feuillets β (9 hélices α et 7 feuillets β chez l'Homme). De plus, il est important de souligner que les motifs KVAW et FGEEKK se situent

## Résultats

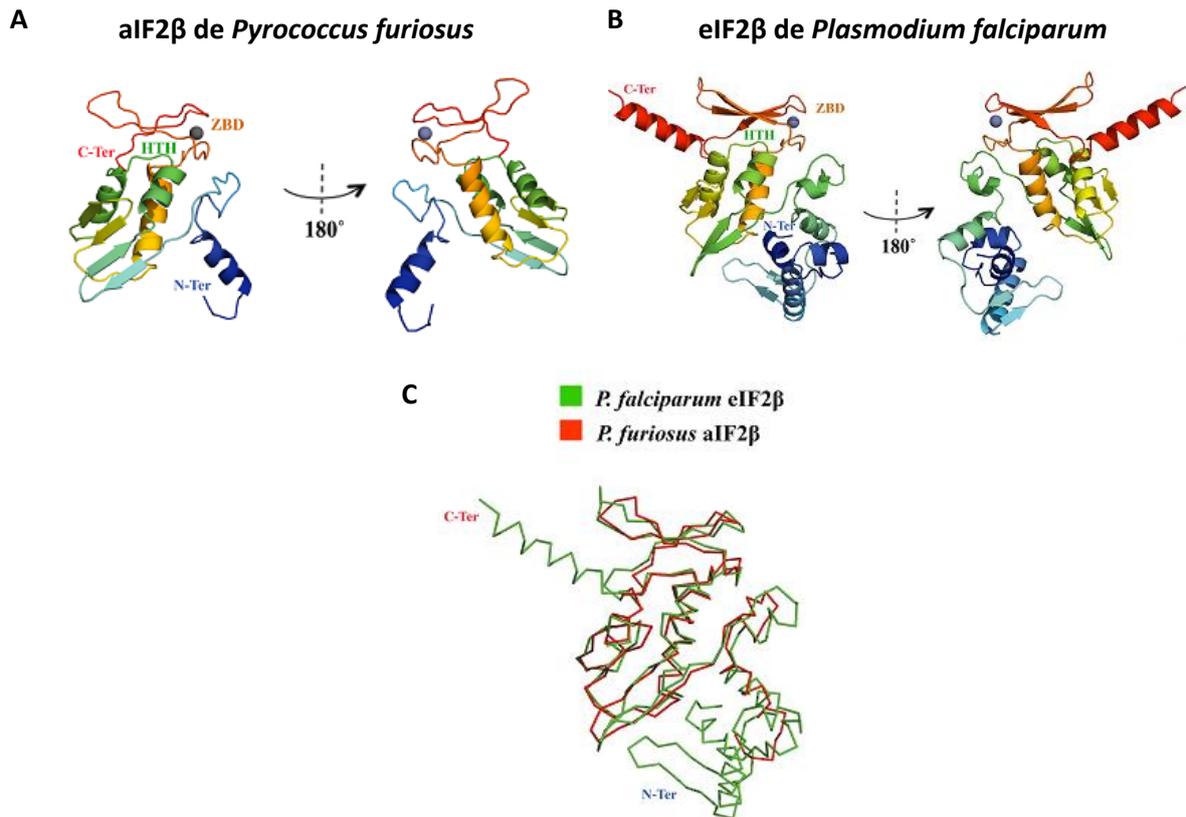
dans un feuillet  $\beta$  et une hélice  $\alpha$  respectivement (**Figure 16**), ce qui n'est pas habituel puisqu'en général, le motif d'interaction RVxF se situe dans une partie non structurée de la protéine.



**Figure 16 : Schématisation de la structure secondaire d'eIF2 $\beta$  de l'Homme et de *P. falciparum*.** Les cylindres roses et les flèches jaunes correspondent respectivement aux hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  (réalisé à partir des données issus du site Psipred). Les flèches verte et rouge représentent respectivement le motif FxxR/KxR/K et le motif RVxF.

Afin d'étudier la structure tertiaire de la protéine eIF2 $\beta$  de *P. falciparum*, une prédiction du modèle a été réalisée en se basant sur le facteur aIF2 $\beta$  de *Pyrococcus furiosus* (**Figure 17A**). L'obtention du modèle prédit de PseIF2 $\beta$  (**Figure 17B**) montre une conservation spatiale du domaine « helix-turn-helix » (HTH, représenté en vert foncé, **Figure 17**), qui fait partie des domaines de liaison à l'ADN. Le domaine HTH semble jouer un rôle dans l'interaction avec eIF2 $\gamma$  (Sokabe et al. 2006). De plus, la superposition des modèles met en évidence une conservation de la partie centrale de la protéine IF2 $\beta$  entre les deux espèces (**Figure 17C**).

## Résultats



**Figure 17 : Modélisation de la structure tertiaire de PfefIF2 $\beta$ .** Structure tertiaire d'eIF2 $\beta$  de *Pyrococcus furiosus* (A) et de *P. falciparum* (modèle prédit, B), représentée à 180°. (RMSD = 2.3Å). Les parties N-terminale et C-terminale sont colorées respectivement en bleu et rouge. Le domaine helix-turn-helix (HTH) et le domaine de fixation au zinc sont représentés en vert et orange respectivement. L'ion zinc est désigné par une sphère grise. Superposition des deux modèles (C)

### B. PfefIF2 $\beta$ et ses partenaires de la traduction

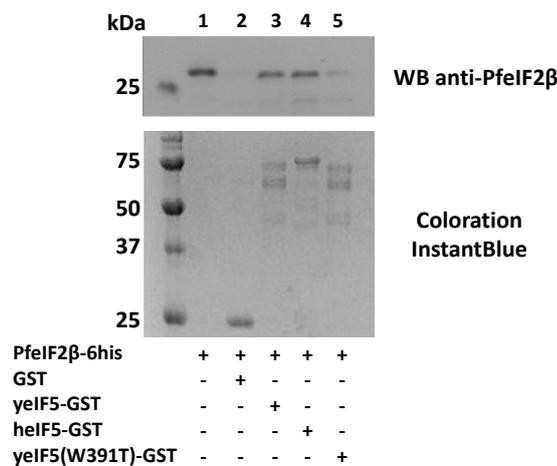
Nous avons recherché dans la banque de données PlasmoDB si les partenaires de PfefIF2 $\beta$  étaient identifiés chez *P. falciparum* dans le but d'étudier leur interaction. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  du complexe eIF2 ainsi que le facteur eIF5 sont identifiés chez le parasite. Nous avons amplifié les différentes séquences codantes par PCR sur l'ADN de *P. falciparum*. Après séquençage, la production des protéines recombinantes a été entreprise. L'obtention de protéines fonctionnelles de PfefIF5 et PfefIF2 $\alpha$  a échoué alors que nous avons réussi à produire la protéine PfefIF2 $\gamma$ . Cependant, nous n'avons pas encore réussi à montrer l'interaction de cette protéine avec PfefIF2 $\beta$ .

Au vu des homologies entre les séquences d'eIF5 dans différentes espèces (entre 25 et 35%, et plus particulièrement au niveau de la partie N-terminale), nous avons utilisé la protéine eIF5 de levure et de l'Homme pour vérifier leur capacité d'interaction avec PfefIF2 $\beta$  (collaboration avec le Dr. Pavitt, Angleterre).

Un GST pull-down a été réalisé avec la protéine recombinante PfefIF2 $\beta$ , les protéines eIF5 de l'Homme et de la levure. La révélation des protéines, avec le sérum anti-PfefIF2 $\beta$ ,

## Résultats

montre une bande à 25kDa lorsque la protéine PfelF2 $\beta$  est incubée avec la protéine eIF5-GST de la levure et de l'Homme (pistes 3 et 4, **Figure 18**) alors qu'une bande d'intensité plus faible est détectable lorsqu'elle est mise en contact avec la protéine eIF5 mutée au niveau du tryptophane 391 de la levure (piste 5, **Figure 18**). Les résultats obtenus montrent ainsi une interaction entre PfelF2 $\beta$  et le facteur eIF5. De plus, nous pouvons supposer un rôle du tryptophane 391 dans cette interaction, étant donné que sa mutation entraîne une diminution de celle-ci. En effet, dans la littérature, il a été montré que la partie C-terminale du facteur eIF5 est composée de régions riches en acides aminés acides et hydrophobes impliqués dans l'interaction avec la partie N-terminale du facteur eIF2 $\beta$  (Asano et al. 1999; Das and Maitra 2000).



**Figure 18 : Analyse de l'interaction entre PfelF2 $\beta$  et eIF5 par la technique du pull-down.** En haut de la figure est représenté le Western-blot anti-PfelF2 $\beta$  et en bas de la figure est représenté le gel d'acrylamide coloré avec une solution Instant Blue afin de définir la présence des protéines tagguées GST. La protéine PfelF2 $\beta$  est incubée avec la protéine GST seule (piste2), la protéine eIF5-GST de la levure (piste 3), la protéine eIF5-GST de l'Homme (piste 4) ou la protéine eIF5-GST mutée W391F de la levure (piste 5). La protéine PfelF2 $\beta$  sert de témoin positif (input 20%, piste 1).

La protéine recombinante PfelF2 $\beta$  interagit donc avec eIF5 et la conformation de la protéine semble fonctionnelle.

### C. Etude de l'interaction entre PfelF2 $\beta$ et PfPP1

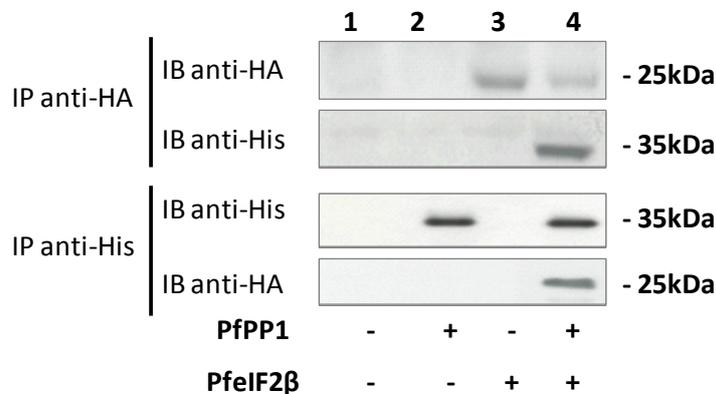
#### 1. Interaction avec PfPP1

La présence des motifs d'interaction RVxF et FxxR/KxR/K dans la séquence protéique de PfelF2 $\beta$ , nous a amenés à examiner si PfelF2 $\beta$  était capable d'interagir avec PfPP1.

Afin d'étudier cette interaction, trois approches ont été utilisées : la première consiste en l'utilisation du modèle d'ovocytes de Xénope, la deuxième est le test ELISA, afin de vérifier si l'interaction est directe et finalement la technique du GST pull-down pour confirmer les résultats obtenus.

## Résultats

L'interaction *in vivo* entre P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  et P<sub>f</sub>PPP1 est étudiée, en utilisant le modèle d'ovocyte de Xénope. Dans les ovocytes, la protéine P<sub>f</sub>PPP1-6His (**Figure 19**, pistes 2 et 4) et l'ARNm de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$ -HA (**Figure 19**, pistes 3 et 4) sont micro-injectés. Les lysats d'ovocytes sont récupérés et une Co-Immunoprécipitation (Co-IP) est réalisée grâce à l'épitope Histidine de P<sub>f</sub>PPP1 (en bas, **Figure 19**), ou à l'épitope HA de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  (en haut, **Figure 19**). Après la révélation des Western-blot, les analyses montrent que lorsque la protéine P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  est immunoprécipitée, une bande à 35kDa est visible avec l'anticorps anti-histidine, ce qui correspond à la taille de P<sub>f</sub>PPP1. De plus, lorsque la protéine P<sub>f</sub>PPP1 est immunoprécipitée, une bande est observable à 25kDa avec l'anticorps anti-HA, correspondant à la taille de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$ . Les résultats mettent en évidence une interaction entre les protéines eIF2 $\beta$  et PP1 de *P. falciparum* (**Figure 19**, piste 4) mais cela ne permet pas de déterminer si celle-ci est directe ou non.

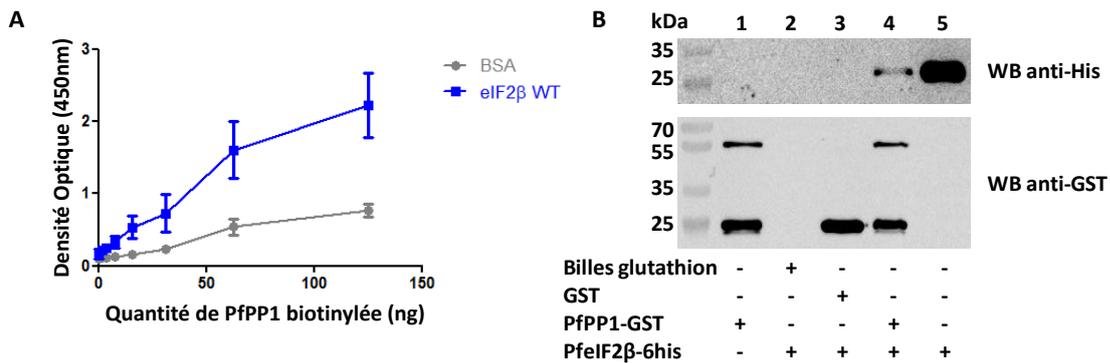


**Figure 19 : Interaction entre eIF2 $\beta$  et PP1 de *P. falciparum* dans les ovocytes de Xénope.** La protéine recombinante P<sub>f</sub>PPP1 (tag histidine, 35kDa) (pistes 2 et 4) et l'ARNm de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  (tag HA, 25kDa) (pistes 3 et 4) sont micro-injectés dans les ovocytes de Xénope. La piste 1 sert de contrôle négatif. Après récupération des lysats, des immunoprécipitations (IP) sont réalisées avec un épitope anti-HA (en haut) ou un épitope anti-His (en bas). Une séparation par SDS-PAGE suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose ont lieu. Les membranes sont ensuite incubées avec un anticorps anti-HA ou un anticorps anti-Histidine (IB : Immuno blot).

Afin de déterminer si l'interaction entre P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  et la phosphatase est directe, nous avons effectué un test de type ELISA. Nous avons pu observer que la protéine P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  interagissait avec la protéine P<sub>f</sub>PPP1 biotinylée et que l'intensité du signal augmente avec l'ajout croissant de la phosphatase (**Figure 20A**).

Ensuite, un GST pull-down a été réalisé. La protéine P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$ -6his est incubée avec la protéine P<sub>f</sub>PPP1-GST ou la GST seule fixée sur billes de glutathion. Un SDS-PAGE et un Western-blot sont ensuite réalisés. La révélation du Western-blot anti-histidine révèle la présence d'une bande aux alentours de 25kDa en présence de P<sub>f</sub>PPP1-GST (**Figure 20B**, piste 4) alors qu'aucune bande n'est observable avec la protéine GST seule ou avec les billes de glutathion (pistes 2 et 3, **Figure 20B**). Nous pouvons donc confirmer une interaction entre les protéines recombinantes eIF2 $\beta$  et PP1 de *P. falciparum*.

## Résultats



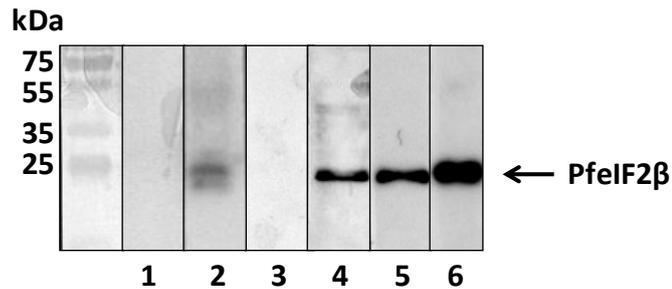
**Figure 20: Interaction *in vitro* entre PfeIF2β et PfPP1.** **A** : Test de type ELISA, la protéine recombinante PfeIF2β et la BSA (témoin négatif) sont coâtées à 1μg/puits, la protéine recombinante PfPP1 biotinylée est ajoutée par dose croissante. **B** : GST pull-down, les protéines GST (piste 3) ou PP1-GST (pistes 1 et 4) fixées aux billes de glutathion sont incubées avec la protéine recombinante PfeIF2β (2μg, pistes 2 à 4). La protéine PfeIF2β seule sert de témoin positif pour le Western-blot avec l'anticorps anti-histidine (piste 5). La protéine recombinante PfeIF2β est également incubée avec des billes de glutathion pour écarter une fixation non spécifique (piste 2). Chaque expérience a été réalisée deux fois.

Nous pouvons donc conclure que la protéine PfeIF2β interagit de façon directe avec la protéine PfPP1.

### 2. Expression d'eIF2β par *Plasmodium falciparum* et interaction avec PP1

Dans le but de vérifier l'expression de la protéine eIF2β par le parasite, un sérum dirigé contre la protéine recombinante PfeIF2β-6His a été élaboré (appelé dans la suite des résultats sérum anti-PfeIF2β). Il a ensuite été testé sur un culot de parasites *P. falciparum* (**Figure 21**, pistes 1 et 2), et la protéine recombinante PfeIF2β a servi de témoin positif (**Figure 21**, pistes 5 et 6). Un Western-blot a été réalisé et l'analyse des résultats montre une bande aux alentours de 25kDa, détectée dans le culot de parasites ainsi que la protéine recombinante PfeIF2β lors de l'utilisation du sérum anti-PfeIF2β (**Figure 21**, pistes 2 et 5 respectivement) alors qu'aucune bande n'est visible lors de l'emploi du sérum de souris saine. La révélation avec l'anticorps anti-histidine (**Figure 21**, piste 6) permet de reconnaître la protéine recombinante PfeIF2β et sert de témoin de taille. Nous pouvons donc dire que le sérum anti-PfeIF2β reconnaît les protéines native et recombinante de PfeIF2β.

## Résultats

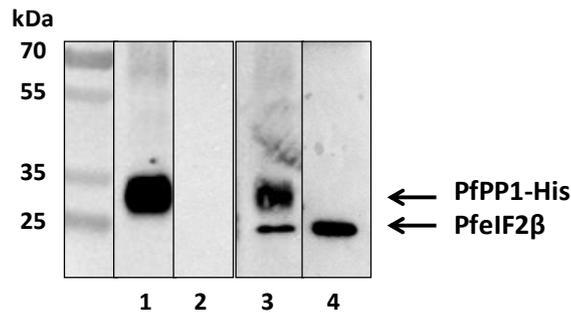


**Figure 21 : Analyse en Western-blot du sérum dirigé contre PfcIF2β.** Un culot de parasites *P. falciparum* (pistes 1 et 2), un extrait total de protéines solubles de *P. falciparum* (pistes 3 et 4, 20µg/puits) et la protéine recombinante PfcIF2β (pistes 5 et 6, 1µg/puits) ont été déposés sur un gel d'acrylamide 15% puis transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane a été mise en contact avec le sérum de souris saine (pistes 1 et 3), le sérum dirigé contre PfcIF2β (pistes 2, 4 et 5) et avec un anticorps anti-histidine (piste 6), qui sert de témoin.

Ne disposant pas d'antisérum dirigé contre PfPP1 pour réaliser des expériences de Co-IP/IB (IB : immuno-blot), nous avons voulu savoir si la protéine native eIF2β de *P. falciparum* pouvait interagir avec la protéine recombinante PfPP1. Nous avons tout d'abord vérifié que la protéine native était présente dans un extrait total parasitaire de *P. falciparum* (**Figure 21**, pistes 3 et 4). L'analyse révèle une bande aux alentours de 25kDa, ce qui correspond à la taille attendue de la protéine eIF2β native.

Etant donné que la protéine eIF2β du parasite est soluble, des expériences sur colonnes d'affinité ont été envisagées. L'extrait total parasitaire a été incubé avec PfPP1-6his, fixées sur des billes de Nickel. Après un Western-blot sur l'éluât, la révélation a été faite avec un anticorps anti-histidine et avec le sérum anti-PfcIF2β pour détecter respectivement les protéines PfPP1 et PfcIF2β. Les résultats mettent en évidence une bande aux alentours de 25kDa, correspondant à la protéine native eIF2β, lorsque l'extrait a été mis en contact avec la protéine PP1-6his fixées aux billes (**Figure 22**, piste 3). Ainsi la protéine native eIF2β du parasite interagit avec la protéine PfPP1. Afin de confirmer ces observations, nous avons réalisé la même expérience en utilisant la PP1-GST (glutathion S transferase) fixée aux billes de glutathion (résultats non présentés). Les résultats confirment l'interaction entre la protéine native eIF2β et la phosphatase de type 1 de *P. falciparum*.

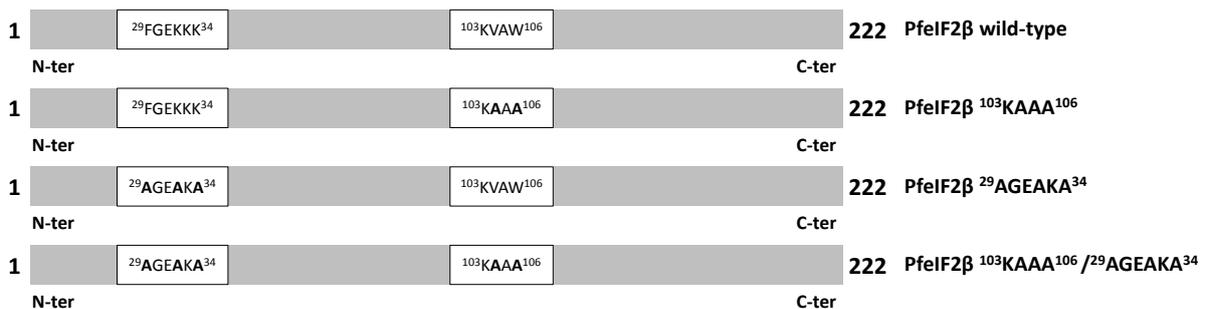
## Résultats



**Figure 22 : Analyse de l'interaction entre la protéine native eIF2 $\beta$  et PP1 de *P. falciparum*, par la technique du pull down.** Un extrait total parasitaire de *P. falciparum* a été incubé avec PfPP1-6his (fixées sur billes de Nickel). Après plusieurs lavages, les protéines sont éluées sur SDS-PAGE et transférées sur membrane de nitrocellulose. La protéine recombinante PfeIF2 $\beta$ -6his a servi de contrôle positif (piste 4). La membrane est incubée avec un anticorps anti-histidine (piste 1), le sérum de souris saine (piste 2) et le sérum anti-PfeIF2 $\beta$  (pistes 3 et 4). La révélation de la piste 3 avec le sérum anti-PfeIF2 $\beta$  met en évidence deux bandes, cela peut s'expliquer par le fait que le sérum aurait peut-être reconnu le tag histidine de la protéine recombinante PfPP1.

### 3. Implication des motifs dans la formation du complexe PfeIF2 $\beta$ /PfPP1

Suite à l'analyse de la séquence protéique, deux motifs d'interaction à la phosphatase ont été identifiés : le motif KVAW et le motif FGEKKK correspondant respectivement aux motifs dégénérés RVxF et FxxR/KxR/K. Nous avons donc voulu définir l'importance de ces motifs dans la liaison à PP1. Pour cela, des mutations ont été réalisées : deux acides aminés sur le motif KVAW et trois sur le motif FGEKKK ont été mutés en alanine (**Figure 23**). Les simples mutations (c'est-à-dire un seul motif d'interaction muté), ainsi que la mutation sur les deux motifs simultanément ont été effectuées.

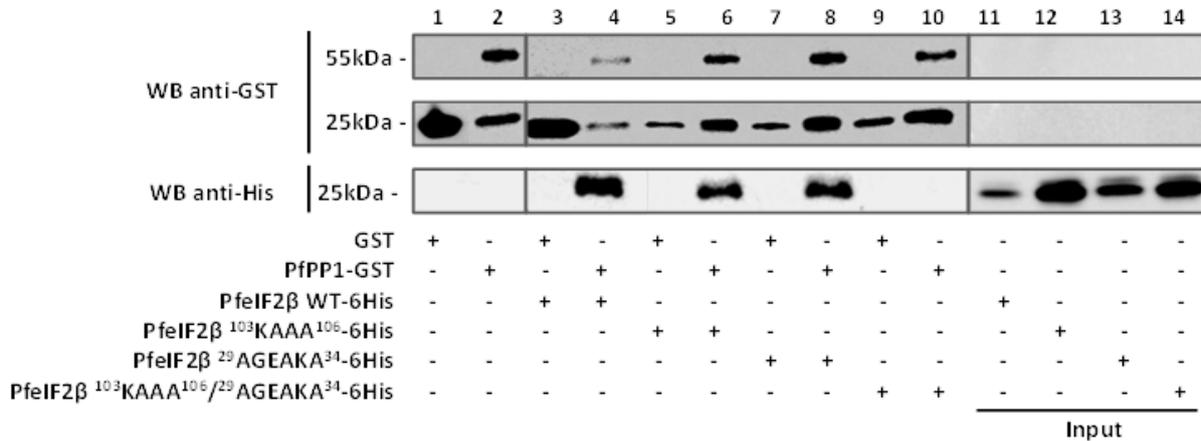


**Figure 23 : Représentation schématique des différentes constructions de PfeIF2 $\beta$**

Pour déterminer l'impact des mutations sur la formation du complexe PfeIF2 $\beta$ /PfPP1, des expériences de GST pull-down ont été réalisées. L'analyse des Western-blot anti-GST et anti-Histidine montre la présence d'une bande à 55kDa, correspondant à la taille de PfPP1-GST, et une bande à 25kDa, correspondant à la taille de PfeIF2-6his lorsque la protéine PfeIF2 $\beta$  sauvage (**Figure 24**, piste 4), la protéine PfeIF2 $\beta$  <sup>103KAAA106</sup> (**Figure 24**, piste 6) ou PfeIF2 $\beta$  <sup>29AGEAKA34</sup> (**Figure 24**, piste 8) sont incubées avec la protéine PfPP1-GST fixée sur billes. Lorsque la protéine PfeIF2 $\beta$  doublement mutée est mise en contact avec PfPP1-GST, la bande à 25kDa n'est pas détectable. Aucune bande n'est détectable à 25kDa lorsque les

## Résultats

différentes protéines PfeIF2 $\beta$  sont incubées avec la protéine GST seule (**Figure 24**, pistes 3, 5, 7 et 9). Nous pouvons donc déduire de ces observations, que la protéine mutée sur un seul motif d'interaction ne perturbe par l'interaction avec la phosphatase alors que la double mutation abolit totalement celle-ci. Ces résultats suggèrent ainsi qu'un seul motif est suffisant pour la formation du complexe PfPP1/PfeIF2 $\beta$ .



**Figure 24 : GST pull-down PfeIF2 $\beta$ /PfPP1.** Les billes de glutathion couplées à la protéine GST (pistes 1, 3, 5, 7 et 9) ou à la protéine PP1-GST (pistes 2, 4, 6, 8 et 10) sont incubées avec les protéines tagguées 6his : PfeIF2 $\beta$  (pistes 3, 4 et 11), PfeIF2 $\beta$ <sup>103</sup>KAAA<sup>106</sup> (pistes 5, 6 et 12), PfeIF2 $\beta$ <sup>29</sup>AGEAKA<sup>34</sup> (pistes 7,8 et 13) ou PfeIF2 $\beta$ <sup>103</sup>KAAA<sup>106</sup>/<sup>29</sup>AGEAKA<sup>34</sup> (pistes 9,10 et 14). Les pistes 1 et 2 servent de témoins négatifs. Après plusieurs lavages les protéines fixées aux billes sont séparées sur SDS-PAGE et transférées sur membrane de nitrocellulose. Le Western-blot anti-GST révèle deux bandes : une bande à 55kDa, correspondant à la protéine PfPP1-GST et une bande à 25kDa, correspondant à la protéine GST. Le Western-blot anti-Histidine montre une bande à 25kDa correspondant à la protéine PfeIF2 $\beta$  (sauvage ou mutée). L'expérience a été réalisée 2 fois avec des lots de protéines différents.

Les résultats obtenus semblent démontrer l'existence de deux motifs d'interaction impliqués dans la formation du complexe PfeIF2 $\beta$ -PfPP1. Néanmoins, il semble qu'un seul de ces motifs soit nécessaire pour l'interaction protéique.

### D. Rôle de PfeIF2 $\beta$ dans la régulation de l'activité phosphatase de PP1

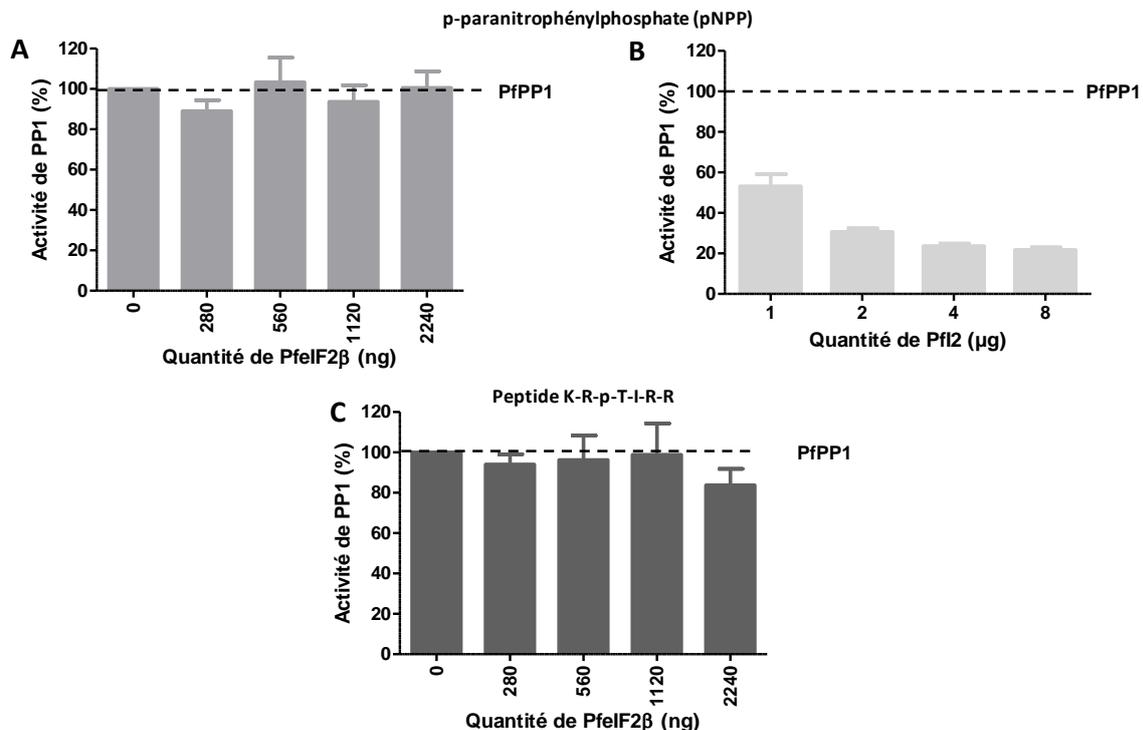
Après avoir montré que PfeIF2 $\beta$  interagissait avec PfPP1, nous avons voulu déterminer la fonction de celui-ci sur l'activité phosphatase. Dans le but de définir la fonction de la protéine PfeIF2 $\beta$ , plusieurs approches ont été effectuées : *in vitro* avec des tests colorimétriques utilisant des substrats phosphorylés et dans un contexte cellulaire avec le modèle d'ovocyte de Xénope.

# Résultats

## 1. Etude de la fonction de PfeIF2 $\beta$ sur PfPP1

Pour définir la fonction régulatrice de PfeIF2 $\beta$ , deux tests d'activité *in vitro* ont été réalisés : les tests utilisant le pNPP (para-nitrophénylphosphate) ou le peptide K-R-p-T-I-R-R, comme substrat.

Dans un premier temps, nous avons réalisé un test colorimétrique utilisant le pNPP, comme substrat phosphorylé. Nous observons qu'en présence de la protéine PfeIF2 $\beta$ , l'activité de la phosphatase est inchangée (**Figure 25A**) alors qu'il y a diminution de l'activité de PfPP1 visible lorsque l'inhibiteur 2 de *P. falciparum* est ajouté (**Figure 25B**). Le substrat utilisé n'est peut-être pas adapté pour définir la fonction régulatrice du facteur eIF2 $\beta$ . Un deuxième test d'activité a été entrepris, en employant un peptide phosphorylé K-R-p-T-I-R-R. Nous constatons une nouvelle fois que l'ajout de PfeIF2 $\beta$  n'influe pas sur l'activité phosphatase de PP1 (**Figure 25C**).



**Figure 25 : Régulation de l'activité phosphatase de PfPP1 par PfeIF2 $\beta$ .** A : Test d'activité pNPP avec la protéine eIF2 $\beta$ . B : Test d'activité pNPP avec la protéine Pfl2, servant de contrôle positif. C : Test d'activité avec le peptide K-R-p-T-I-R-R. La libération du phosphate, due à l'activité de PfPP1, est mesurée par densité optique à 405nm pour les tests pNPP et 620nm pour le test avec le peptide. Les pointillés représentent l'activité de base de PfPP1. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité de PfPP1 (+/- SEM et n = 3).

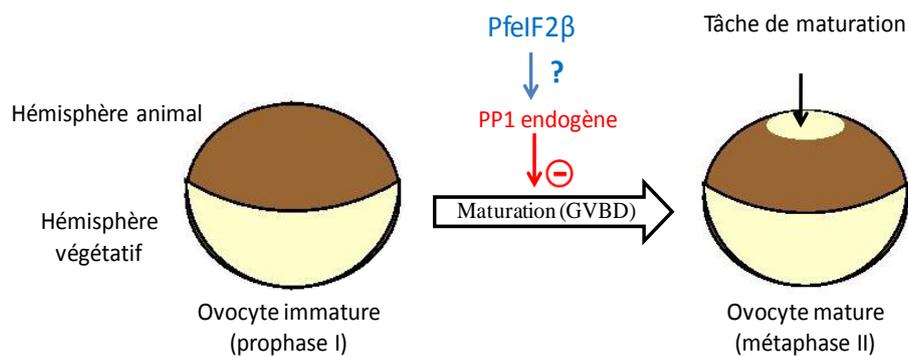
Les différents résultats ne permettent pas de définir *in vitro* la fonction de la protéine PfeIF2 $\beta$  sur l'activité phosphatase de PfPP1. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : le substrat utilisé ne serait pas adéquat pour définir la fonction du facteur eIF2 $\beta$  ou un autre partenaire doit être présent pour « activer » la fonction régulatrice de la protéine sur la phosphatase PP1.

## Résultats

### 2. Détermination du rôle de P<sub>feIF2</sub> $\beta$ au niveau de la transition G2/M de l'ovocyte de Xénope

Afin de déterminer le rôle potentiellement régulateur de P<sub>feIF2</sub> $\beta$  sur l'activité de PP1, le modèle d'ovocytes de *Xenopus laevis* est utilisé (collaboration avec le Dr. Katia Cailliau de l'équipe du Pr. Jean-François Bodart, Université Lille 1). La protéine PP1 est fortement conservée entre les espèces, de l'ordre de 80-85%, donc nous pouvons étudier la fonction de P<sub>feIF2</sub> $\beta$  sur la PP1 de Xénope.

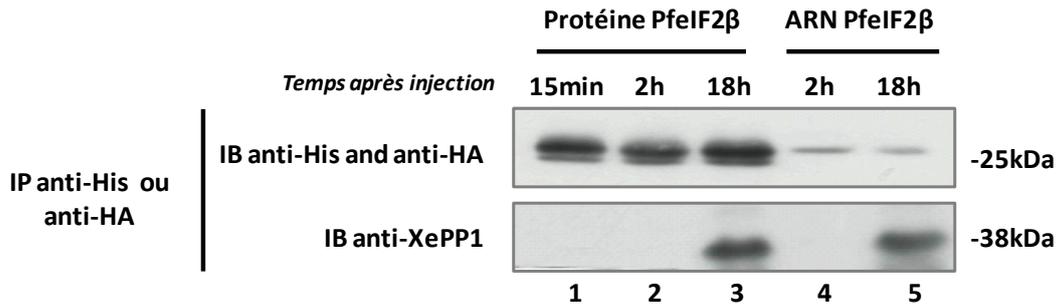
Les ovocytes de Xénope sont bloqués en prophase I de méiose sous l'action de plusieurs protéines dont la PP1. En effet, il a été montré que l'inhibition de cette phosphatase peut induire la maturation des ovocytes (ou GVBD) (Huchon, Ozon, and Demaille 1981). La transition G2/M activée, l'ovocyte atteindra le stade métaphase II. Cette maturation est observable par l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal de l'ovocyte, traduisant la rupture de la vésicule germinative (GVBD) (**Figure 26**).



**Figure 26 : Schéma simplifié expliquant l'action de PP1 dans la maturation de l'ovocyte de Xénope.**

Afin d'explorer le rôle de P<sub>feIF2</sub> $\beta$  dans ce modèle, il était important de vérifier l'interaction entre P<sub>feIF2</sub> $\beta$  et la PP1 de Xénope. Après la micro-injection de la protéine (**Figure 27**, pistes 1 à 3) ou de l'ARN (**Figure 27**, pistes 4 et 5) de P<sub>feIF2</sub> $\beta$  dans les ovocytes, les lysats sont récupérés au bout de 15 min, 2h et 18h (**Figure 27**, respectivement pistes 1, 2/4 et 3/5). Nous micro-injectons l'ARN ou la protéine de P<sub>feIF2</sub> $\beta$ , au cas où cette dernière ne serait pas fonctionnelle. Des Co-Immunoprécipitations sont ensuite réalisées avec l'épitope HA ou Histidine. L'analyse des Western-blot anti-XePP1 montre une unique bande de 38kDa (correspondant à la taille de XePP1) au bout de 18h, que ce soit pour la protéine ou l'ARN P<sub>feIF2</sub> $\beta$  (**Figure 27**, pistes 3 et 5). Il semblerait donc que P<sub>feIF2</sub> $\beta$  soit capable de se fixer à un orthologue de P<sub>f</sub>PP1. De plus, la formation du complexe P<sub>feIF2</sub> $\beta$ /XePP1 se fait entre 2h et 18h après l'injection de P<sub>feIF2</sub> $\beta$ .

## Résultats

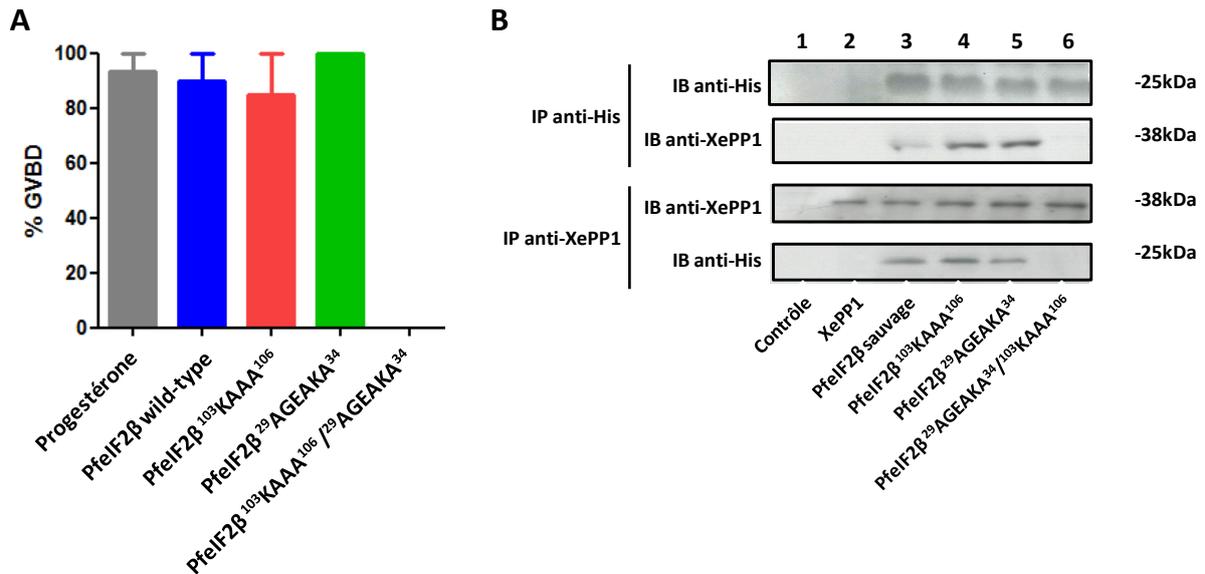


**Figure 27 : Interaction entre PfelF2β et XePP1 dans les ovocytes de Xénope.** La protéine (pistes 1 à 3) ou l'ARN de PfelF2β (pistes 4 et 5) ont été micro-injectés dans les ovocytes de Xénope. Des Co-Immunoprécipitations du complexe PfelF2β/XePP1 en utilisant l'épitope HA ou histidine ont été réalisées sur les lysats récupérés au bout de 15min (piste 1), 2h (pistes 2 et 4) et 18h (pistes 3 et 5).

Etant donné que PfelF2β interagit avec la PP1 de Xénope, nous pouvons suivre son rôle au niveau de la transition G2/M. Après la micro-injection de PfelF2β ou l'incubation avec de la progestérone (servant de contrôle positif) la GVBD est observée. Les résultats obtenus montrent une maturation des ovocytes, PfelF2β semble donc avoir une fonction inhibitrice sur l'activité de XePP1 (**Figure 28**).

Ensuite, les protéines recombinantes PfelF2β mutées ont été micro-injectées afin de déterminer l'impact des motifs sur la fonction régulatrice. Les résultats observés montrent la maturation des ovocytes lorsque la protéine PfelF2β<sup>103</sup> KAAA<sup>106</sup> ou PfelF2β<sup>29</sup> AGEAKA<sup>34</sup> est micro-injectée alors que la GVBD n'est pas induite lorsqu'il s'agit de PfelF2β<sup>103</sup> KAAA<sup>106</sup> / AGEAKA<sup>29</sup> / AGEAKA<sup>34</sup> (**Figure 28A**). Ensuite, des Co-Immunoprécipitations ont été effectuées avec l'épitope Histidine (pour la protéine PfelF2β, blot du haut, **Figure 28B**) ou avec l'anti-XePP1 (pour la PP1 de Xénope, blot du bas, **Figure 28B**) sur les lysats d'ovocytes. L'analyse des immunoblots révèle la présence de XePP1 lorsque les protéines PfelF2β sauvage, PfelF2β<sup>103</sup> KAAA<sup>106</sup> ou PfelF2β<sup>29</sup> AGEAKA<sup>34</sup> (**Figure 28B**, pistes 3 à 5, blot du haut) sont immunoprécipitées alors qu'aucune bande correspondant à XePP1 n'est détectée avec la protéine PfelF2β<sup>103</sup> KAAA<sup>106</sup> / AGEAKA<sup>29</sup> / AGEAKA<sup>34</sup> (**Figure 28B**, piste 6, blot du haut). Lorsque la XePP1 est immunoprécipitée, nous pouvons détecter la présence des protéines PfelF2β sauvage, PfelF2β<sup>103</sup> KAAA<sup>106</sup> et PfelF2β<sup>29</sup> AGEAKA<sup>34</sup> (**Figure 28B**, pistes 3 à 5, blot du bas) alors que la protéine doublement mutée ne l'est pas (**Figure 28B**, piste 6, blot du bas). Les résultats mettent en évidence une interaction entre la XePP1 et la protéine PfelF2β sauvage ou muté sur un seul motif d'interaction.

## Résultats



**Figure 28 : Effet des protéines PfeIF2β (sauvage ou mutées) sur l'activité de XePP1 dans les ovocytes de Xénope. A :** Pourcentage de GVBD induite par la progestérone (témoin positif) ou les protéines PfeIF2β (sauvage ou mutées). **B :** Vérification de l'interaction entre XePP1 et les protéines PfeIF2β mutées par Co-Immunoprécipitation avec l'épitope Histidine (blot du haut) ou avec l'anti-PP1 de Xénope (blot du bas).

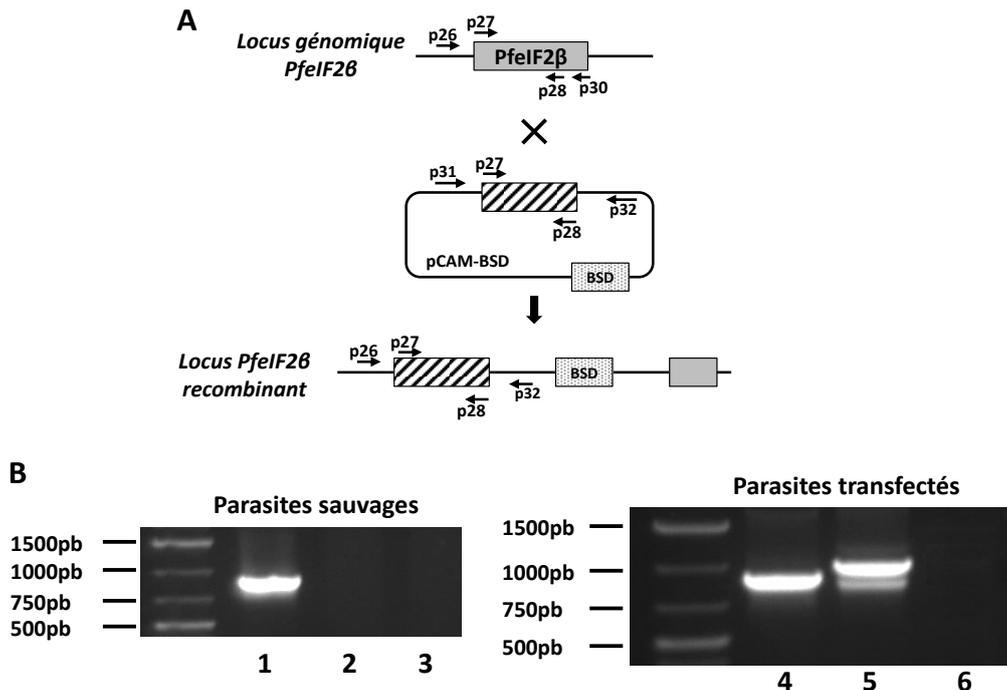
Un seul motif d'interaction semble donc suffisant pour que la protéine PfeIF2β conserve sa fonction inhibitrice et interagisse avec la PP1 de Xénope. La double mutation, abolissant l'interaction, empêche PfeIF2β de réguler la phosphatase.

### E. Etude du rôle du facteur eIF2β chez *Plasmodium*

Nous savons qu'eIF2β est très important dans l'initiation de la traduction et donc dans la synthèse protéique, ainsi que dans l'interaction avec la phosphatase de type 1. Dans le but de définir l'importance d'eIF2β dans le développement du parasite, des expériences de génétique inverse ont été réalisées chez *P. falciparum* et *P. berghei*.

Tout d'abord, nous avons essayé de déterminer l'importance du gène *eIF2β* dans le développement du parasite *P. falciparum*, en interrompant ce dernier. Nous avons tenté de générer des parasites « Knock-Out » grâce à l'utilisation du vecteur de recombinaison homologue pCAM. Les parasites *P. falciparum* 3D7 au stade anneau ont été transfectés avec la construction pCAM-BSD-pfeif2β (construction Knock-Out, **Figure 29A**). Le vecteur pCAM-BSD possède une cassette BSD conférant au parasite une résistance à la blasticidine. Après la transfection, les parasites sont maintenus sous milieu sélectif contenant de la BSD. Dans les parasites viables, la présence du plasmide et de l'intégration de la construction a été vérifiée par PCR sur l'ADN génomique, issu de ces parasites. L'ADN extrait de parasites sauvages a été utilisé comme témoin négatif. Au bout de 4 mois de culture, nous n'arrivons pas à détecter la présence d'une intégration alors que le plasmide est toujours présent (**Figure 29B**).

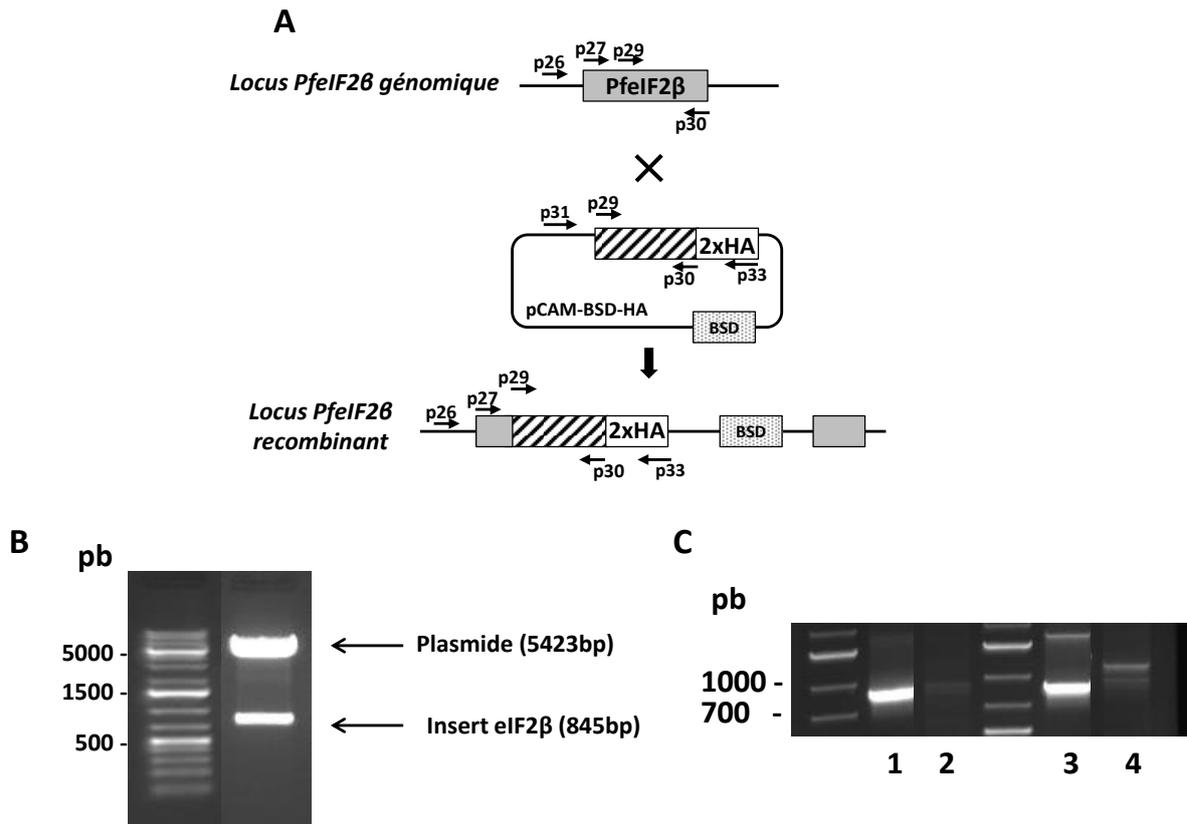
## Résultats



**Figure 29 : Etude de génétique inverse d'eIF2β chez *P. falciparum* : le Knock-Out.** **A** : Schéma du principe de génération des parasites KO par simple recombinaison homologue. Sont représentés le locus génomique sauvage de PfeIF2β, le plasmide pCAM-BSD-HA recombinant et le locus de PfeIF2β recombiné après recombinaison homologue. Les amorces utilisées pour la détection des différents fragments par PCR sont indiqués. **B** : Analyse par PCR de cultures de parasites 3D7 transfectés PfeIF2β. PCR réalisées sur l'ADN extrait de parasites sauvages (pistes 1 à 3) et de parasites transfectés (pistes 4 à 6). Détection du locus sauvage entier (pistes 1 et 4), détection du plasmide (pistes 2 et 5) et de l'intégration du construit (pistes 3 et 6) par PCR avec les couples d'amorces p27-p30, p31-p32 et p26-p32 respectivement.

Nous avons alors entrepris de vérifier l'accessibilité du gène PfeIF2β. Nous avons, par la même technique que précédemment décrite, généré des parasites « Knock-In ». Les parasites ont été transfectés avec la construction pCAM-BSD-HA-pfeif2β (construction Knock-In ou KI, **Figure 30A**). Le vecteur possède une cassette BSD conférant au parasite une résistance à la blasticidine et les parasites transfectés sont maintenus sous milieu sélectif contenant de la BSD. Dans les parasites viables, l'intégration de la construction a été vérifiée par PCR sur l'ADN génomique, issu de ces parasites. L'ADN extrait de parasites sauvages a été utilisé comme témoin négatif. Les fragments correspondant au locus sauvage et à l'intégration du construit ont été détectés chez les parasites transfectés (**Figure 30C**, pistes 3 et 4 respectivement). Le fragment correspondant à l'intégration du construit a été cloné dans le vecteur pCR2.1. L'ADN plasmidique obtenu a été séquencé et analysé, le fragment correspond à la construction de l'intégration KI. Pour vérifier la présence du plasmide, la technique du « plasmid rescue » a été employée. Des bactéries compétentes *E. coli* ont été transformées avec l'ADN extrait d'une culture de parasites transfectés. Après avoir récupéré l'ADN plasmidique de différentes colonies, une digestion enzymatique a été effectuée avec les enzymes PstI/BamHI afin de vérifier la présence du plasmide (**Figure 30B**). L'obtention de parasites mutants et les résultats prouvent ainsi que le locus PfeIF2β est accessible.

## Résultats



**Figure 30 : Etude de génétique inverse d'eIF2 $\beta$  chez *P. falciparum* : le Knock-In. A :** Schéma du principe de génération des parasites KI par simple recombinaison homologue. Sont représentés le locus génomique sauvage de PfelF2 $\beta$ , le plasmide pCAM-BSD-HA recombinant et le locus de PfelF2 $\beta$  recombiné après recombinaison homologue. Les amorces utilisées pour la détection des différents fragments par PCR sont indiqués. **B :** Résultat de la digestion enzymatique de l'ADN plasmidique, issu de bactéries compétentes transformées avec l'ADN génomique de parasites transfectés, afin de montrer la présence du plasmide pCAM-PfelF2 $\beta$ -HA dans la culture des parasites transfectés. **C :** Analyse par PCR de cultures de parasites 3D7 transfectés PfelF2 $\beta$ . PCR réalisées sur l'ADN extrait de parasites sauvages (pistes 1 et 2) et de parasites transfectés (pistes 3 et 4). Détection du locus sauvage entier (pistes 1 et 3) et de l'intégration du construit (pistes 2 et 4) par PCR avec les couples d'amorces p27-p30 et p26/p33 respectivement.

Le rôle d'eIF2 $\beta$  dans le développement du parasite *P. falciparum* n'a pas pu être défini par interruption du gène. Nous avons donc utilisé le modèle de *P. berghei*, espèce spécifique des rongeurs. Nous avons employé ce modèle car le Dr. Pino a mis au point une technique qui permet la transcription du gène étudié sous la dépendance d'un promoteur sensible à la tétracycline TetO7, après une double recombinaison homologue (**Figure 30A**) (Pino et al. 2012).

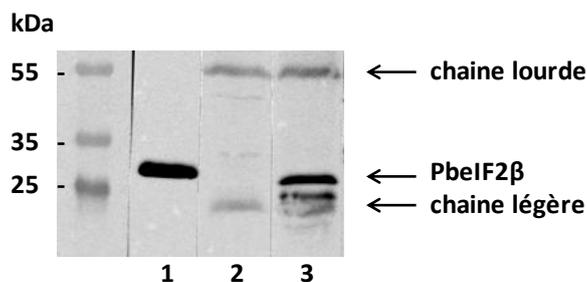
Dans un premier temps, une analyse de la séquence d'eIF2 $\beta$  de *P. berghei* (PBANKA\_120900) a été réalisée. L'alignement des séquences protéiques révèle une conservation de l'ordre de 95% entre les deux espèces (**Figure 31**).

## Résultats

<b>PfeIF2<math>\beta</math></b>	---MEDKVEDAGSAFVLDLKIIVNDDSKQLFD <b>FGEK</b> KKKKKKKEVVEKVEEIIIDGTGKVFERGAVYPYD	66
<b>PbeIF2<math>\beta</math></b>	MEEKIEEKIEDASKAFADVDK-VNDEATQLFD <b>FGEK</b> KKKKKKKEVVSQV-EVIIDGTGKVFEEKGAVYPYE	68
<b>PfeIF2<math>\beta</math></b>	ELLHRIQDLINKNHNIDLCISKKYTIKPPQVVRVGS <b>KKVAV</b> INFKDICTIMNRNEEHVHFVLAELGTEGS	136
<b>PbeIF2<math>\beta</math></b>	ELLHRIQDLINKNHNIDLCISKKYTIKPPQVVRVGS <b>KKVAV</b> INFKDICTIMNRNEEHVHFVLAELGTEGS	138
<b>PfeIF2<math>\beta</math></b>	IAGEGQLVVLKGYGPKHIEALLRKYITEYVTCQMCKSPNTIMEKDSRTRLFHQHCNACGAKRSVTTIKSG	206
<b>PbeIF2<math>\beta</math></b>	IAGEGQLVVLKGYGPKHIEALLRKYITEYVTCQMCKSPNTAMEKDSRTRLFHQHCNACGAKRSVTTIKSG	208
<b>PfeIF2<math>\beta</math></b>	FHALGRGERRKAKHTN	222
<b>PbeIF2<math>\beta</math></b>	FHALGRGERRKAKHTN	224

**Figure 31 : Alignement des séquences protéiques d'eIF2 $\beta$  de *P. falciparum* et de *P. berghei*.** Les encadrements vert et rouge représentent respectivement les motifs d'interaction FxxR/KxR/K et RVxR.

Etant donné la forte conservation protéique, nous avons voulu savoir si le sérum anti-PfeIF2 $\beta$  pouvait reconnaître son homologue chez *P. berghei*. Le sérum anti-PfeIF2 $\beta$  a été testé sur un culot de parasites *P. berghei*. En parallèle, la protéine recombinante PfeIF2 $\beta$  a été utilisée comme témoin (**Figure 32**, piste 1). Les analyses du Western-blot révèlent une bande à environ 25kDa, correspondant à la protéine PbeIF2 $\beta$  (**Figure 32**, piste 3). Le sérum reconnaît donc la protéine eIF2 $\beta$  présente chez *P. berghei*.

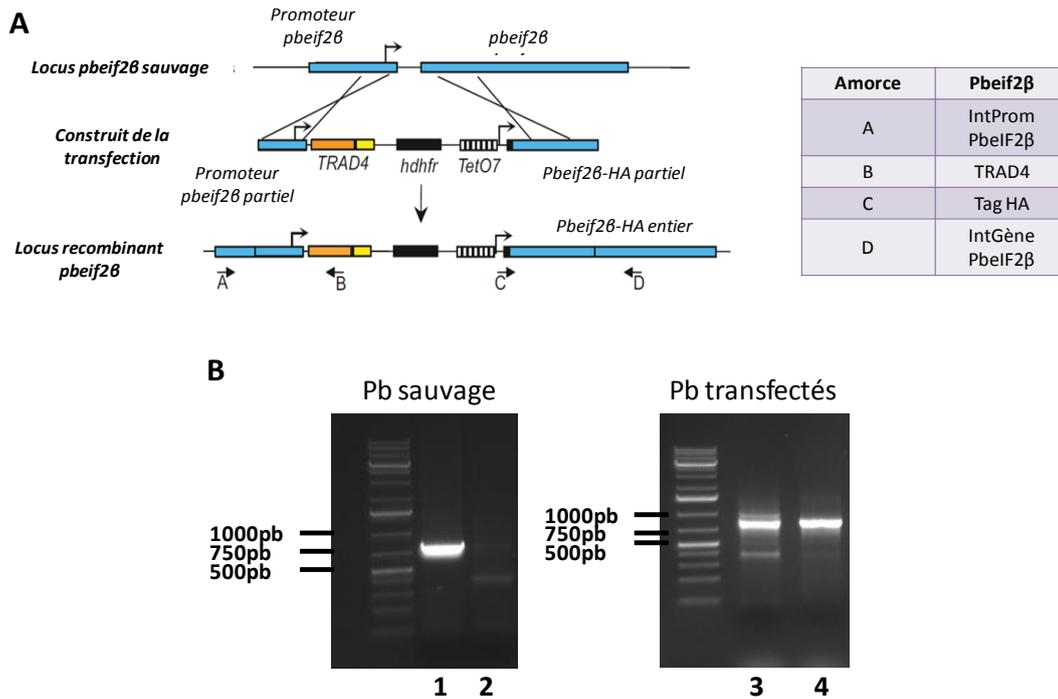


**Figure 32 : Détection de la protéine PbeIF2 $\beta$  par le sérum anti-PfeIF2 $\beta$ .** Un culot de parasites *P. berghei* (pistes 2 et 3), et la protéine recombinante PfeIF2 $\beta$  (piste 1) ont été déposés sur un gel d'acrylamide 15% puis transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec le sérum de souris saine (piste 2) et le sérum anti-PfeIF2 $\beta$  (pistes 1 et 3).

Afin de pouvoir réaliser un KO conditionnel de PbeIF2 $\beta$ , nous avons cloné la région promotrice (926 pb) et la région codante (729 pb) dans le vecteur pTRAD4-TetO7-HA-hDHFR (fourni par le Dr. Pino) (Matériel et méthodes partie I pour l'obtention de la construction) (**Figure 33A**). La transfection a été réalisée par électroporation sur des parasites *P. berghei* au stade schizonte. 30h après l'injection chez les souris, la pyriméthamine est ajoutée dans l'eau des souris pour sélectionner les parasites transfectés ayant intégré la construction.

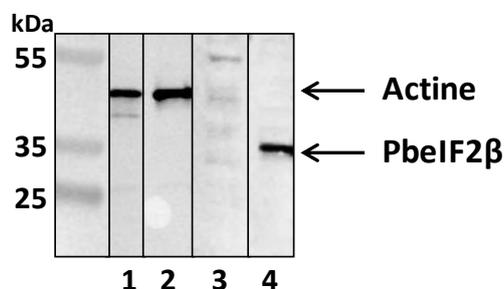
Après quelques jours, des parasites sont visibles dans les frottis sanguins. L'intégration du gène est alors vérifiée par PCR sur l'ADN génomique des parasites *P. Berghei* sauvages et transfectés (**Figure 33B**). Les résultats obtenus montrent une bande aux alentours de 800pb, qui n'est pas détectable chez les parasites sauvages (**Figure 33B**, pistes 4 et 2 respectivement). Cette bande correspond au fragment de l'intégration du gène. Ce produit de PCR a été cloné dans le vecteur pCR2.1, puis une transformation a été effectuée avec le kit TA cloning. L'ADN plasmidique a ensuite été séquencé et correspond bien à la construction de l'intégration KOc de PbeIF2 $\beta$ .

## Résultats



**Figure 33 : Etude de génétique inverse chez *P. berghei* avec le KO conditionnel. A :** Représentation schématique de la double recombinaison homologue pour le gène *pbeif2β*. Tableau expliquant la signification des lettres sur le schéma pour le construit *pbeif2β*. **B :** Génotypage, réalisé par PCR, sur l'ADN extrait des parasites sauvages (à gauche) et transfectés *PbeIF2β* (à droite). Détection du locus sauvage (pistes 1 et 3, utilisant les amorces p18-p33) et de l'intégration du gène (pistes 2 et 4, utilisant les amorces C et D (p32-p33)).

Nous avons alors vérifié la présence de la protéine *PbeIF2β*-HA dans un culot de parasites transfectés et sauvages. Après migration sur SDS-PAGE et la réalisation du Western-blot, les analyses avec l'anticorps anti-HA-biotinylé révèlent une bande aux alentours de 35kDa, correspondant à la protéine *PbeIF2β*. La protéine *PbeIF2β* a une taille d'environ 27kDa, la différence observée peut s'expliquer par une modification de la conformation de la protéine lorsque celle-ci est fusionnée au tag HA (**Figure 34**). La présence de la protéine d'intérêt dans les parasites transfectés, nous a permis de prévoir des expériences de clonages ainsi que des expériences de KO conditionnel par ajout de tétracycline.



**Figure 34 : Détection de la protéine *PbeIF2β* tagguée HA chez *P. berghei*.** Culot de parasites sauvages (pistes 1 et 3) et transfectés (pistes 2 et 4) de *P. berghei*, séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane est mise en contact avec un anticorps anti-actine (pistes 1 et 2), qui sert de contrôle positif, et un anticorps anti-HA-biotinylée (pistes 3 et 4) pour détecter la présence de la protéine *PbeIF2β*-HA.

### F. Tentative d'inhibition de la formation du complexe eIF2 $\beta$ /PP1 chez *Plasmodium falciparum* par des peptides synthétiques

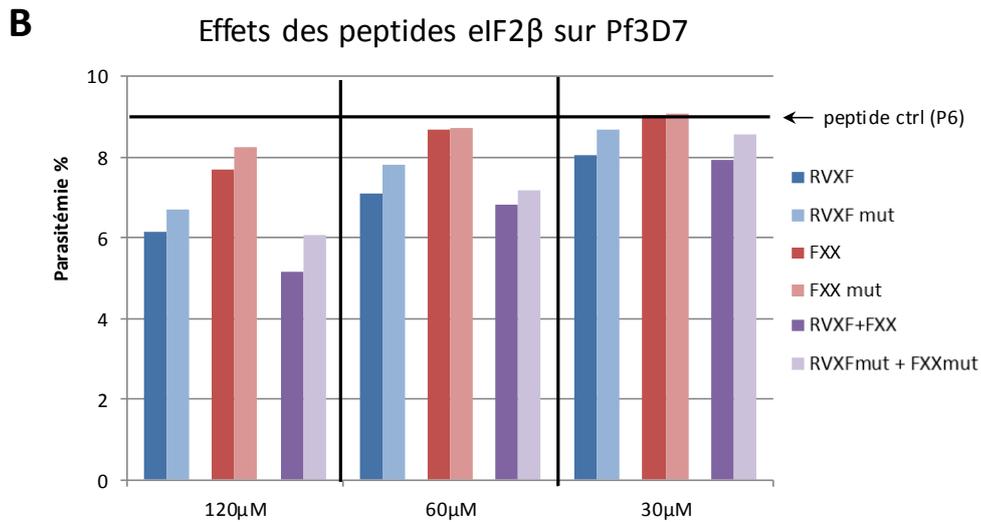
Afin d'étudier *in vivo* l'impact de l'interaction eIF2 $\beta$ /PP1 chez *P. falciparum*, des expériences d'inhibition de l'interaction utilisant des peptides synthétiques ont été effectuées. Les peptides sont composés de deux séquences : une séquence pénétrante «VKKKKIKREIKI » provenant de la casein kinase 2 $\alpha$  (CK2 $\alpha$ ) de *Theileria parva* (Guernon et al. 2006) et une séquence comprenant le motif d'interaction RVxF ou FxxR/KxR/K répété en tandem. Les peptides contenant les motifs mutés ont également été synthétisés ainsi qu'un peptide contrôle possédant uniquement la séquence pénétrante, qui n'est pas cytotoxique pour le parasite (**Figure 35A**). Les peptides fusionnés à la séquence pénétrante peuvent entrer dans les érythrocytes infectés par *P. falciparum* (Guernon et al. 2006).

Les premiers résultats montrent une légère diminution de la croissance parasitaire lorsque les peptides dérivés des motifs d'interaction sont présents, de façon dose-dépendante, par rapport au contrôle. Cependant, aucune différence n'est observée entre le peptide sauvage et le peptide muté correspondant (**Figure 35B**). Il semblerait que les peptides ne puissent pas interférer au niveau du complexe eIF2 $\beta$ /PP1 chez le parasite ou bien les peptides synthétisés ne pénètrent pas dans l'érythrocyte parasité. Afin d'écarter cette supposition, nous devrions tester les mêmes peptides marqués à un fluorochrome tel que le FITC afin de déterminer leur localisation.

## Résultats

**A**

Nom	Motif	Séquence
P15	RVxF	VKKKKIKREIKIKKVAWKKVAW
P16	RVxF muté	VKKKKIKREIKIKKAAAKKAAA
P17	FxxRxR	VKKKKIKREIKIFGEKKKFGEKKK
P18	FxxRxR muté	VKKKKIKREIKIAGEAKAAGEAKA
P6	Contrôle	VKKKKIKREIKI



**Figure 35 : Effet des peptides sur la croissance parasitaire de *P. falciparum*.** **A** : Tableau des différents peptides utilisés au cours des expériences. **B** : Inhibition de la croissance parasitaire en présence des peptides. Les parasites sont incubés avec différentes concentrations de peptides pendant 72h. La ligne du peptide P6 (contrôle négatif) correspond à la parasitémie de base. Les résultats représentent le pourcentage de parasitémie et sont représentatifs de 3 expériences faites indépendamment.







Matériels  
et  
Méthodes



### I. Matériels

#### A. Plasmides

Les plasmides pCR2.1-TOPO, pETDuet-1, pGEX4T3 et pGADT7 sont commercialisés respectivement par Invitrogen, Novagen, Life Sciences et Clontech. Les plasmides pCAM-BSD et pCAM-BSD-HA nous ont été fournis par le Dr. C. Doerig (Université de Monash, Melbourne, Australie), le plasmide pARL nous a été fourni par le Dr. C. Sanchez (Heidelberg, Allemagne) et le plasmide pTnewPRFp-TRAD4Ty-TetO7-HAPRF-hDHFR nous a été fourni par le Dr. P. Pino (Université de Genève, Suisse).

#### B. Anticorps

Les anticorps anti-HA, anti-penta His, anti-GST et anti-HA couplé à la biotine sont commercialisés par Roche, Qiagen, Life technologies et Abcam respectivement. L'anti-PP1 de Xénopé est commercialisé par Santa-Cruz biotechnology. La streptavidine couplée à la peroxydase est commercialisée par Invitrogen.

#### C. Culture de parasites *Plasmodium falciparum* 3D7

Les parasites *P. falciparum* 3D7 sont cultivés dans du milieu RPMI avec 10% de sérum humain AB+, 0.4% AlbuMAXTMII (Invitrogen), 0.2mM Hypoxanthine (CCPro) et 20µg/ml Gentamycine (Invitrogen), en présence d'érythrocytes O+ (W Trager and Jensen 1976). Les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide (5% CO<sub>2</sub>). Pour obtenir un culot de parasites, une lyse par saponine est réalisée (Umlas and Fallon 1971).

#### D. Amorces

Dans le tableau suivant sont indiquées toutes les amorces utilisées pour les différentes constructions réalisées durant la thèse. Les amorces sont dessinées en fonction des données génomiques issues de *PlasmoDB*. Pour le clonage par recombinaison homologue (R dans le **Tableau 9**), les amorces sont dessinées en utilisant le site <http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcrPrimersInit.do>.

## Matériels et méthodes

**Tableau 9 : Liste des amorces utilisées durant la thèse.** L : Ligation avec le kit TOPO TA cloning (Invitrogen), M : PCR par mutagenèse dirigée, R : Ligation par recombinaison homologue en utilisant le kit In-Fusion® HD Cloning (Clontech).

Nom	Séquence	Sens	Site de restriction	Nom de la protéine ou Utilisation	Vecteur	Clonage
<b>Production de protéine recombinante</b>						
p1	<b>GGATCC</b> GGAAGATAAAGTTGAAGATGCTGG	F	BamHI	PfeIF2β-6His	pETDuet-1	L
p2	<b>GGATCC</b> ATGGAAGATAAAGTTGAAGATGCTGG	F	BamHI	PfeIF2β-GST	pGEX4T3	L
p3	<b>GTCGACTT</b> AATTAGTATGCTTGGCCTTTC TTC	R	Sall	PfeIF2β-6His et PfeIF2β-GST	pETDuet-1 et pGEX4T3	L
p4	CAGTTATTTGATGCTGGTGAGGCGAAAGCGAAAAAGAAGAAG	F		PfeIF2β <sup>29</sup> AGEAKA <sup>34</sup> -6His	pETDuet-1	M
p5	CTTCTCTTTTTCGCTTTCGCCTCACCAGCATCAAATAACTG	R				
p6	CGAGTTGGATCAAAAAAGCAGCAGCGATTAATTTAAAG	F		PfeIF2β <sup>103</sup> KAAA <sup>106</sup> -6His	pETDuet-1	M
p7	CTTTAAAATTAATCGCTGCTGCTTTTTTGGATCCAACCTCG	R				
p8	<b>CATCACCA</b> CAGCC <b>AGGATCC</b> AGCTGAGCAGAATTTAGAACTTTAGATG	F	BamHI	PfeIF5-6His	pETDuet-1	R
p9	<b>CCGCAAGCTT</b> <b>GTCGACT</b> CAAATTGGTTCTTGAAGCTCC	R	Sall			
p10	<b>CATCACCA</b> CAGCC <b>AGGATCCA</b> ATGACTGAAATGCGAGTAAAAGC	F	BamHI	PfeIF2α-6His	pETDuet-1	R
p11	<b>CCGCAAGCTT</b> <b>GTCGACT</b> CTAACTTGAATTTCCATCATGTTTATC	R	Sall			
p12	<b>CATCACCA</b> CAGCC <b>AGGATCC</b> AGCTGAGCAGAATTTAGAACTTTAGATG	F	BamHI	PfeIF2γ-6His	pETDuet-1	R
p13	<b>CCGCAAGCTT</b> <b>GTCGACT</b> CAAATTGGTTCTTGAAGCTCC	R	Sall			
<b>Construction pour la production d'ARNm</b>						
p14	<b>GGATCCT</b> GGAAGATAAAGTTGAAGATGCTGGATCAG	F	BamHI	PfeIF2β ARNm	pGADT7	L
p15	<b>CTCGAGT</b> TAAATTAGTATGCTTGGCCTTTC TTCGTTCC	R	XhoI			
<b>Transfections chez <i>P. falciparum</i></b>						
p16	<b>CATATTTATTA</b> AACTGCAGGGATCAGCTTTTGGTTGATTTAG	F	PstI	KI PfeIF2β-HA	pCAM-BSD-HA	R
p17	<b>CATATGGATAGGATCC</b> ATTAGTATGCTTGGCCTTCTTC	R	BamHI			

## Matériels et méthodes

Nom	Séquence	Sens	Site de restriction	Nom de la protéine ou Utilisation	Vecteur	Clonage
p18	CATATTTATTA <del>AACTGCAGAT</del> GGAAGAT AAAGTTGAAGATGC	F	PstI	KO P <sub>feIF2β</sub>	pCAM-BSD	R
p19	CTAGA <del>ACTAGTGGATCC</del> GTTTACCTCTTC CTAAAGCATGG	R	BamHI			
p20	<del>CTCGAGAT</del> GGAAGATAAAGTTGAAGAT GCTGG	F	XhoI	P <sub>feIF2β</sub> -GFP	pARL	L
p21	<del>GGTACC</del> ATTAGTATGCTTGGCCTTTCTTC G	R	KpnI			
<b>Transfection KO conditionnel chez <i>P. berghei</i></b>						
p22	CGTGCCCGATTATG <del>CCGGC</del> CATGGAAGAA AAAATTGAAGAAAAAATTG	F	NaeI	Gene P <sub>beIF2β</sub>	pPRFp- TRAD4Ty- TetO7- HAPRF- hDHFR-1	R
p23	CCAAAAATTTAAC <del>GCTAGC</del> CCAAGGGCG TGGAAACCACTCTTG	R	NheI			
p24	ACAAAAAAGCGC <del>AGATCT</del> TATATAGTG ACTATACGCATTATAG	F	BglII	Promoteur P <sub>beIF2β</sub>		R
p25	ACATTTTAAGCTT <del>CCGCGG</del> GTATAATTCC CTTTATATTGATTCTC	R	SacII			
<b>Génotypage</b>						
p26	GAACAAAACATTGAAAAGGGCCA	F		Intégration KI et KO de P <sub>feIF2β</sub>		
p27	CTGCAGATGGAAGATAAAGTTGAAGAT GC	F		KO P <sub>feIF2β</sub>		
p28	GGATCCGTTTACCTCTTCCTAAAGCATG G	R				
p29	CTGCAGGGATCAGCTTTTGTGATTAG	F		KI P <sub>feIF2β</sub>		
p30	GGATCCATTAGTATGCTTGGCCTTTCTTC	R				
p31	GTAATTTATGGGATAGCGATTTTTTTTAC TGTCTG	F		Détection de l'épisme chez Pf		
p32	CCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAG	R				
p33	GCCATATCCAAGCTTTTAAGCATAATCTG G	R				
p34	CTTGCTCTTGCCAGGCGCGAC	F		Intégration du promoteur P <sub>beIF2β</sub>		
p35	GGCCATCACAAATATGAAACAG	R				
p36	CTGCAGCAAATGTCAGGTTACCCCTAT GACGTGC	F		Intégration du gène P <sub>beIF2β</sub>		
p37	GTGTTTTGCTTTTCTTTCTTTCTCCC	R				
<b>Détermination des codons start et stop</b>						

## Matériels et méthodes

Nom	Séquence	Sens	Site de restriction	Nom de la protéine ou Utilisation	Vecteur	Clonage
p38	GAGTATATATTTAATTTTCTCCAAAATA TAAG	F		Vérification codon start		
p39	GTCGACTTAATTAGTATGCTTGGCCTTTC TTC	R				
p40	ACGCGTATGGAAGATAAAGTTGAAGAT GCTGG	F				
p41	GCAGAATTAGGAACTGAAGGATC	F		Vérification codon stop		
p42	GTATATTAATAAATAAATATTAATAAAG CGTC	R				

## II. Méthodes

### A. Etude *in silico* des séquences

La séquence protéique du facteur d'initiation de traduction eIF2 $\beta$  de l'Homme (HseIF2 $\beta$ , numéro d'accèsion AAH00934) a été alignée dans la base de données PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>). L'alignement des différentes séquences d'eIF2 $\beta$  a été réalisé par ClustalW en utilisant le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor.

### B. Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique du facteur eIF2 $\beta$  des eucaryotes a été réalisée en utilisant 67 séquences protéiques provenant de 22 apicomplexes, 1 gregarine, 5 mammifères, 1 amphibien, 8 poissons, 9 plantes, 8 insectes, 12 archées et 1 levure. Les numéros d'accèsion des différentes séquences ont été répertoriés dans le **tableau 10**. Les séquences ont été alignées grâce au programme MAFFT (v7) (Katoh and Standley 2013). Après l'alignement, les régions ambiguës ont été enlevées en utilisant le programme Gblocks (v0.91b) (Castresana 2000). L'alignement final contient 129 gaps d'acides aminés. En se basant sur Bayesian Information Criterion (BIC) et Akaike Information Criterion, corrected (AICc), le meilleur modèle a été obtenu. En utilisant le programme MEGA6.06 sous le modèle JTT + I + G avec 1000 bootstrap (Tamura et al. 2013), l'arbre phylogénétique avec un maximum de probabilités a été choisi.

**Tableau 10 : Liste des séquences, avec leur numéro d'accèsion, utilisées pour l'arbre phylogénétique du facteur eIF2 $\beta$ .**

Espèces	Numéro d'accèsion
<i>Plasmodium falciparum</i>	XP_001347388
<i>Plasmodium berghei</i>	XP_674494
<i>Plasmodium knowlesi</i>	XP_002258744

## Matériels et méthodes

Espèces	Numéro d'accension
<i>Plasmodium vivax</i>	XP_001614417
<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	XP_729948
<i>Plasmodium reichenowi</i>	CDO64537
<i>Plasmodium cynomologi</i>	GAB66043
<i>Plasmodium inui</i>	EUD67461
<i>Plasmodium vinckei vinckei</i>	KEG03408
<i>Babesia equi</i>	AFZ79629
<i>Babesia bigemina</i>	CDR93997
<i>Babesia microtis</i>	CCF74577
<i>Babesia bovis</i>	BAN66020
<i>Theileria annulata</i>	CAI74305
<i>Theileria orientalis</i>	BAM40450
<i>Theileria parva</i>	XP_765244
<i>Hammondia hammondi</i>	KEP64013
<i>Eimeria acervulina</i>	CDI81388
<i>Neospora caninum</i>	CBZ54565
<i>Cryptosporidium parvum</i>	EAK89581
<i>Cryptosporidium muris</i>	EEA05106
<i>Toxoplasma gondii</i>	XP_002368949
<i>Gregarina niphandrodes</i>	EZG44924
<i>Homo sapiens</i>	AAH00934
<i>Mus musculus</i>	NP_080306
<i>Bos taurus</i>	NP_001015621
<i>Gorilla gorilla</i>	XP_004032816
<i>Camelus ferus</i>	XP_006179326
<i>Xenopus laevis</i>	NP_001090288
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_593772
<i>Nanoarcheum equitans</i>	WP_011153313
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	WP_009989461
<i>Pyrococcus sp. NA2</i>	YP_004424137
<i>Pyrococcus abyssi GE5</i>	NP_127116
<i>Thermococcus sp. ES1</i>	WP_042679383
<i>Thermococcus barophilus</i>	YP_004070280
<i>Pyrococcus yayanassii CH1</i>	YP_0046623547
<i>Thermococcus gammatolerans EJ3</i>	YP_002960391

## Matériels et méthodes

Espèces	Numéro d'accension
<i>Methanococcus vanielii</i> SB	YP_001323817
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19	NP_614250
<i>Staphylothermus marinus</i> F1	YP_001041106
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	NP_578210
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_197592
<i>Phaseolus vulgaris</i>	XP_007142026
<i>Cucumis sativus</i>	XP_004139463
<i>Sesamum indicum</i>	XP_011080644
<i>Camelina sativa</i>	XP_010493208
<i>Vitis vinifera</i>	XP_002265847
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002325635
<i>Populus euphratica</i>	XP_011021060
<i>Brassica rapa</i>	XP_009126490
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_524043
<i>Ceratitis capitata</i>	XP_004525480
<i>Bactrocera dorsalis</i>	XP_011201992
<i>Anopheles darling</i>	ETN59628
<i>Anopheles sinensi</i>	KFB48717
<i>Anopheles gambiae</i>	XP_308567
<i>Musca domestica</i>	XP_005181706
<i>Nasonia vitripennis</i>	NP_001166186
<i>Danio rerio</i>	NP_997840
<i>Salmo salar</i>	NP_001135243
<i>Esax lucius</i>	NP_001291068
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CDQ60780
<i>Lepisosteus oculatus</i>	XP_006639724
<i>Stegastes partitus</i>	XP_008287461
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	XP_008316275
<i>Neolamprologus brichardi</i>	XP_006785483

### C. Etude de la structure secondaire

La modélisation de PflF2 $\beta$  a été effectuée grâce à l'utilisation du serveur Robetta (<http://robeta.bakerbab.org/>). Grâce au logiciel RESPROX (Berjanskii et al. 2012), la meilleure structure a été obtenue. Celle-ci a été réalisée en utilisant le programme Shrodinger's Maestro (Schrödinger: Schrödinger Maestro Package. In: Maestro, version 99.

## Matériels et méthodes

New York: LLC; 2014) package Protein Preparation Wizard. L'alignement de eIF2 $\beta$  de *P. falciparum* et de *Pyrococcus furiosus* (PFDB: 2DCU, chain B, Crystal choisi par le programme dans la Databank car il a une homologie structurale) a été réalisé avec le serveur Dali (Holm and Rosenström 2010).

### D. Expression des protéines recombinantes et purification

#### 1. Réalisation des constructions

Pour obtenir la séquence codante de PfeIF2 $\beta$ , des PCR ont été réalisées, avec les couples d'amorces p1-p3 et p2-p3 (décrits dans le **Tableau 9**), sur l'ADNc d'une culture asynchrone de parasites *P. falciparum* 3D7, avec la polymérase Advantage2 (Clontech). Les produits de PCR ont été sous-clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO et séquencés. Après analyse et vérification des séquences, la région codante de PfeIF2 $\beta$  a été sous-clonée dans les plasmides pETDuet-1 et pGEX4T3 pour avoir une protéine fusionnée à l'étiquette 6histidine ou GST respectivement. Les bactéries compétentes *E. coli* BL21 (Invitrogen) ont été transformées avec les ADN plasmidiques afin d'induire l'expression des protéines.

Pour obtenir les différentes constructions des mutants de PfeIF2 $\beta$ , des mutagénèses dirigées par PCR ont été réalisées, employant le kit ISIS Proofreading DNA Polymerase (Qbiogene). PfeIF2 $\beta$  sauvage en pETDuet-1 a été utilisé comme matrice, avec les couples d'amorces p4-p5 et p6-p7 (**Tableau 9**) pour obtenir respectivement la construction mutée sur le site FxxR/KxR/K nommée PfeIF2 $\beta$ -<sup>29</sup>AGEAKA<sup>34</sup> et sur le site RVxF nommée PfeIF2 $\beta$ -<sup>103</sup>KAAA<sup>106</sup>. Pour obtenir la protéine mutée sur les deux motifs d'interaction, une mutagénèse dirigée par PCR a été réalisée sur la séquence de PfeIF2 $\beta$ -<sup>29</sup>AGEAKA<sup>34</sup> avec les amorces p6-p7. Les différentes PCR ont été réalisées selon le protocole fourni. L'ADN plasmidique, ayant servi de matrice, a été digéré par l'enzyme DpnI, puis les transformations dans les bactéries compétentes BL21 ont été réalisées. Après vérification par séquençage, les protéines recombinantes sont produites.

Pour obtenir, la construction PfeIF2 $\beta$  en pGADT7, une PCR a été réalisée sur l'ADNc, issu d'une culture de parasites asynchrone de *P. falciparum*, avec le couple d'amorces p14-p15 (**Tableau 9**) grâce au kit Advantage2 PCR. Les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO et séquencés. Après analyse et vérification des séquences, la région codante de PfeIF2 $\beta$  a été sous-clonée dans le plasmide pGADT7, qui permettra la synthèse de l'ARNm de PfeIF2 $\beta$ .

Pour avoir la séquence codante de PfeIF2 $\alpha$ , PfeIF2 $\gamma$  et PfeIF5, des PCR ont été effectuées, avec les couples d'amorces p10-p11, p12-p13 et p8-p9 respectivement (décrits dans le **Tableau 9**), sur l'ADNc d'une culture asynchrone de parasites *P. falciparum* 3D7, avec la polymérase Advantage2 (Clontech). Le produit de PCR est ligé au plasmide pETDuet-1, au niveau des sites de restriction BamHI/Sall, grâce au kit In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning (Clontech). Les bactéries compétentes Stellar sont transformées avec le plasmide contenant le produit de

## Matériels et méthodes

PCR. Après analyse et vérification des séquences, les bactéries BL21 seront transformées avec l'ADN et les protéines recombinantes sont ensuite produites.

### **2. Production des protéines recombinantes tagguées 6Histidines**

#### **a. Protéine P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$**

Les bactéries compétentes *E. coli* BL21 ont été transformées pour permettre la production des différentes protéines de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  (sauvage et mutées). La production de la protéine P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  a été induite par l'ajout de 500 $\mu$ M d'IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, Euromedex) dans du milieu LBA et en présence de 50 $\mu$ M de ZnCl<sub>2</sub> pendant 3h à 30°C. Les bactéries sont lysées dans un tampon de lyse (20mM Tris-HCl pH 7.4, 500mM NaCl, 50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> (Sigma), 40mM Imidazole, 1% Triton-X100, DNase et un cocktail inhibiteur de protéases (Roche)) pendant 1h à 4°C sur roue. Après sonication (BRANSON Digital Sonifier) et centrifugation (10 000tr/min, 30min à 4°C), l'extrait protéique obtenu est filtré et mis en contact avec les billes Ni-NTA agarose (préalablement équilibrées avec le tampon de lyse) (Macherey-Nagel), 1h à 4°C. Après 10 lavages avec un tampon 20mM Tris-HCl pH 7.4, 500mM NaCl, 50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 40mM Imidazole, les protéines sont éluées dans du tampon d'éluion (20mM Tris-HCl pH 7.4, 500mM NaCl, 50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 600mM Imidazole) pendant 1h à 4°C. Celles-ci sont ensuite dialysées une nuit à 4°C contre le tampon 20mM Tris-HCl pH 7.4, 500mM NaCl, 50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>. La pureté de la protéine est vérifiée par SDS-PAGE 15% coloré par la solution SimplyBlue™ Safe Staining (Invitrogen). La protéine recombinante P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  sauvage tagguée 6his a été analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour confirmer son identité. Les protéines sont ensuite dosées en utilisant le kit BCA assay et/ou le nanovueplus (GE Healthcare).

Les protéines P<sub>f</sub>eIF2 $\alpha$ , P<sub>f</sub>eIF5 sont produites dans les mêmes conditions que la production de la protéine P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$ . La production de la protéine P<sub>f</sub>eIF2 $\gamma$  est aussi effectuée dans les mêmes conditions sauf qu'il faut ajouter 25mM de MgCl<sub>2</sub> dans chaque tampon.

#### **b. Protéines P<sub>f</sub>PPP1**

La protéine recombinante P<sub>f</sub>PPP1-6his est obtenue après une induction( avec 500mM d'IPTG) faite sur la nuit à 16°C en présence de 1mM MnCl<sub>2</sub> dans du milieu LBA. Le culot est repris dans du tampon de lyse (20mM Tris, 150mM NaCl, 20mM Imidazole, 1mM MnCl<sub>2</sub>, 1% Triton-X100, 1mg/mL lysozyme (Sigma), un cocktail inhibiteur de protéases, et de la DNase). Après une incubation d'1h sur roue à 4°C, une sonication et une centrifugation de 30min à 10000tr/min à 4°C sont réalisées. Le surnageant filtré (filtre 0,45 $\mu$ m) est déposé sur la colonne de Nickel (Protino® Ni-NTA Columns 1mL, Macherey-Nagel) de la chromatographie (Biologic LP de Biorad). La protéine P<sub>f</sub>PPP1 est ensuite éluée dans un tampon d'éluion (20mM Tris, 150mM NaCl, 600mM Imidazole, 1mM MnCl<sub>2</sub>) et dialysée toute une nuit à 4°C, contre un tampon Tris 20mM, NaCl 150mM et MnCl<sub>2</sub> 1mM. La protéine est déposée sur gel d'acrylamide 15%, puis colorée avec la solution SimplyBlue™ Safe Staining, parallèlement la protéine est dosée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanovue).

## Matériels et méthodes

### **3. Production des protéines recombinantes tagguées GST**

L'expression de la protéine recombinante PflF2 $\beta$ -GST sauvage est réalisée, selon le protocole précédemment décrit avec quelques modifications, notamment au niveau des différents tampons utilisés qui ne contiennent pas d'imidazole. L'extrait protéique est mis en contact avec des billes Glutathione-Sepharose (Sigma) (préalablement réhydratées 1h dans du tampon 20mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0,1% Triton-X100) une nuit à 4°C. Après 5 lavages avec le tampon 20mM Tris-HCl pH 7.4, 500mM NaCl, 50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton-X100, les billes sont conservées dans un tampon 20mM Tris-HCl pH7.4, 500mM NaCl, 50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> à 4°C (1v/1v).

L'expression des protéines PfPP1-GST ou GST utilise le même protocole sauf que les tampons contiennent 150mM de NaCl, il n'y a pas de ZnCl<sub>2</sub> et pour la protéine PfPP1, 1mM de MnCl<sub>2</sub> doit être ajouté pour garder son activité.

### **E. Obtention d'un sérum anti-PflF2 $\beta$**

#### **1. Immunisation de souris**

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

La protéine recombinante PflF2 $\beta$  soluble est utilisée pour immuniser des souris Balb/c. 50 $\mu$ g de protéines diluées dans de l'hydroxyde d'alun (Alu-gel-S, Serva) (1v/1v) sont injectés par voie intra-péritonéale. Deux boosts sont effectués à J21 et J35 dans les mêmes conditions. Une pré-saignée est effectuée le jour de la première injection, qui servira de contrôle négatif (appelé sérum de souris saine). A J49, un prélèvement sanguin au niveau du sinus rétro-orbital est réalisé, le sérum est titré par Western-blot. Si le titre est correct, un prélèvement en intracardiaque est effectué quelques jours plus tard.

#### **2. Tests des sérums d'immunisation par Western-blot**

La protéine recombinante PflF2 $\beta$  ainsi que des extraits protéiques de parasites sauvages sont déposés sur gel d'acrylamide 15% puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Après saturation des membranes avec un mélange PBS-lait 5%, les membranes sont incubées avec le sérum anti-PflF2 $\beta$  et le sérum de souris saine à différentes dilutions (1/50 à 1/2000) sur la nuit à 4°C. Après plusieurs lavages avec une solution PBS-Tween 0,4%, les membranes sont incubées avec un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (1/50 000 dans un mélange PBS-lait 5%) pendant 1h. Après un nouveau cycle de lavages, les protéines sont révélées en utilisant un kit de détection par chimioluminescence (DURA, Pierce) et la lecture se fait grâce à l'ImageQuantLAS4000 (GE Healthcare).

## Matériels et méthodes

### **F. Détection de PfcIF2 $\beta$ natif chez Plasmodium**

Pour les Western-blot, des culots de schizontes purifiés de *P. falciparum* ou de *P. berghei*, et/ou 20 $\mu$ g d'extraits parasitaires solubles de *P. falciparum* sont repris dans du tampon de charge 1X (tampon 3X: 150mM Tris-HCl pH 6.5, 7.5% SDS, 15%  $\beta$ -mercaptoethanol, 30% glycérol et 0.25% de bleu bromophénol), séparés sur SDS-PAGE 4-20% et transférés sur membranes de nitrocellulose. Pour la détection de PfcIF2 $\beta$  ou de PbcIF2 $\beta$ , les membranes sont incubées avec le sérum anti-PfcIF2 $\beta$  (1/1000<sup>e</sup> dans du PBS lait 5%).

### **G. Test d'interaction entre PfPP1 et PfcIF2 $\beta$**

#### **1. Par GST pull-down**

2 $\mu$ g de protéine recombinante PfcIF2 $\beta$  (sauvage ou mutée) sont incubés avec la PP1-GST ou la GST seule fixées aux billes de glutathion et 25 $\mu$ g de BSA dans un tampon de « binding » (20mM Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl, 1mM MnCl<sub>2</sub>, 50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 20mM Hepes, 0.2mM EDTA, 0.1% Triton-X100, 1mM DTT et un cocktail d'inhibiteur de protéase) pendant 2h à 4°C sur roue. Après 5 lavages avec le tampon de binding, les protéines sont éluées dans du tampon de charge 1X, déposées sur gel d'acrylamide puis transférées sur membranes de nitrocellulose. Les membranes sont incubées avec un anticorps anti-penta His (1/2 000<sup>e</sup>) ou un anticorps anti-GST (1/2 000<sup>e</sup>). Un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase est utilisé comme anticorps secondaire (1/50 000<sup>e</sup>) et la révélation se fait grâce au kit de détection et l'utilisation de l'ImageQuantLAS4000.

#### **2. Par immunoprécipitation**

Pour déterminer si une interaction existe entre la protéine PfPP1 et la protéine native PfcIF2 $\beta$ , une immunoprécipitation est réalisée. Pour ce faire, 2mg d'extrait parasitaires solubles, issus de schizontes purifiés de *P. falciparum*, sont incubés une heure avec les billes de Ni-NTA agarose à 4°C sur roue puis avec les billes PP1-6his durant une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, les protéines sont éluées dans un tampon de charge 1X, déposées sur SDS-PAGE 4-20% et transférées sur membrane de nitrocellulose. Les membranes sont incubées avec le sérum de souris saine (1/1 000<sup>e</sup>), le sérum anti-PfcIF2 $\beta$  (1/1 000<sup>e</sup>) et l'anticorps anti-penta His (1/2 000<sup>e</sup>). L'anti-IgG de souris couplé à la peroxydase est utilisé comme anticorps secondaire (1/50 000<sup>e</sup>) et ensuite une détection par chimioluminescence est effectuée.

### **H. Test d'activité *in vitro***

#### **1. Test pNPP**

Le test para-NitroPhénylPhosphate (pNPP) (Sigma) est utilisé dans le but de définir l'activité de PfPP1 vis-à-vis du substrat (Barik 1993; Daher et al. 2006), le pNPP, selon le

## Matériels et méthodes

protocole donné par le fournisseur. Une gamme de dilution a été réalisée afin de définir la concentration de PfPP1 nécessaire pour obtenir une Densité Optique (DO) de 1. Différentes concentrations de la protéine recombinante PflF2 $\beta$ , diluée dans le tampon Tris 10mM pH7.4, sont incubées avec PfPP1, pendant 30min à 37°C. Le substrat pNPP est ajouté pendant 1h à 37°C. La libération du para-NitroPhénol, traduisant l'action de la phosphatase, est alors mesurée par lecture de la densité optique à 405nm.

### 2. Test d'activité sérine/thréonine phosphatase

L'activité phosphatase de PfPP1 vis-à-vis d'un substrat phosphorylé sur une thréonine est mesurée en utilisant le kit Ser/Thr Phosphatase Assay Kit 1 (K-R-pT-I-R-R) (Merck Millipore), selon les recommandations du fournisseur. La quantité optimale de 400ng de PfPP1 a été déterminée parmi une gamme de concentration. Des doses croissantes de la protéine PflF2 $\beta$  sont ajoutées à la phosphatase et incubées 30min à 37°C. 75 $\mu$ M de phospho-peptides sont ajoutés et une incubation d'1h à 37°C est réalisée. L'arrêt de la réaction se fait par l'ajout du tampon Malachite Green suivie d'une incubation de 15min à température ambiante afin que la réaction colorée se produise. La quantité de phosphate libéré est mesurée par lecture de la densité optique à 620nm.

### I. Extraction de l'ADN et des protéines de parasites

#### 1. Préparation de l'ADN

L'ADN total est extrait à partir d'un culot de schizontes purifiés de parasites, en utilisant le kit KAPA Express Extract (KAPABioSystem) selon les recommandations du fournisseur, afin de réaliser les génotypages.

L'ADN génomique est obtenu à partir de schizontes purifiés lysés dans un tampon contenant 50mM Tris pH7.5, 150 $\mu$ g/ml protéinase K et 2% SDS, durant 2h à 55°C, suivi de 2 étapes d'extraction avec du phénol-chloroforme (ajout d'un volume). L'ADN génomique est ensuite précipité avec l'acétate de sodium pH5.2 (0.1 volume) et de l'éthanol 100% (2 volumes). Après 2 lavages, l'ADN génomique est repris dans de l'eau puis dosé à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanovue). L'ADN génomique sera utilisé comme matrice pour obtenir les séquences codantes de nos protéines.

#### 2. Préparation des extraits parasitaires solubles

Les schizontes purifiés sont lysés dans un tampon 20mM Tris pH7.4, 150mM NaCl, 0,5% Triton-X100 et des anti-protéases. L'extrait subit 7 cycles de congélation dans l'azote liquide/ décongélation dans un bain-marie à 37°C puis une étape de 5 cycles de sonication (15 secondes de pulses suivi de 15 secondes de repos). L'échantillon est centrifugé 30min à 14 000g à 4°C puis le surnageant est récupéré. Ce processus est réalisé jusqu'à ne plus avoir

## Matériels et méthodes

un culot au fond du tube. L'extrait protéique est récupéré, dosé en utilisant le kit BCA (Pierce) et conservé à -80°C.

### J. Induction de la GVBD en ovocytes de Xénope

#### 1. Préparation de l'ARNm de PfelF2 $\beta$

5 $\mu$ g d'ADN de PfelF2 $\beta$ -pGADT7 sont linéarisés par l'enzyme de restriction HindIII (Fast Digest, Fermentas), selon les recommandations du fournisseur. Puis la synthèse de l'ARNm de PfelF2 $\beta$  est effectuée en utilisant le kit T7 mMessage mMachine (Ambion) selon le protocole donné. Afin de vérifier la qualité et de confirmer la taille de l'ARNc de PfelF2 $\beta$ , un gel d'agarose, contenant 0.4g d'agarose, 5ml de MOPS 10X, 37ml d'eau, 8ml de formaldéhyde et 2 $\mu$ l de bromure d'éthidium (BET), est réalisé.

#### 2. Induction de la GVBD

La préparation des ovocytes de Xénope et les expériences de micro-injection ont été effectuées comme décrit précédemment (en collaboration avec l'équipe du Pr. Jean-François Bodart, Université Lille 1) (Vicogne et al. 2004). Chaque expérience est réalisée sur 20 ovocytes de Xénope provenant de deux ou trois animaux différents. L'ARN de PfelF2 $\beta$  sauvage ou les protéines recombinantes PfelF2 $\beta$  (sauvages ou mutées) sont micro-injectés. La progestérone est utilisée comme témoin positif dans ces expériences. La GVBD (Germinal Vesicle BreakDown) est détectée par l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal après 15h à 18h environ.

Pour effectuer l'immunoprécipitation, la protéine PfelF2 $\beta$  (sauvage ou mutée) est micro-injectée dans les ovocytes de Xénope (20 ovocytes par expériences provenant d'animaux différents). 15min après les injections, les ovocytes sont lysés dans un tampon (50mM HEPES pH7.4, 500mM NaCl, 0.05% SDS, 0.5% Triton-X100, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mg/ml BSA (bovine serum albumin), 10 $\mu$ g/ml leupeptine, 10 $\mu$ g/ml d'aprotinine, 10 $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10 $\mu$ g/ml benzamidine, 1mM PMSF et 1mM sodium vanadate) et centrifugés 15min à 10 000g à 4°C. Pour détecter la protéine PfelF2 $\beta$ -6his, une électrophorèse suivie d'un Western-blot sont réalisés sur les extraits d'ovocytes de Xénope. La membrane est finalement incubée avec un anticorps anti-penta His (Qiagen).

#### 3. Co-Immunoprécipitation (Co-IP)

Pour étudier l'interaction de PfelF2 $\beta$  avec la PP1 de Xénope, une Co-Immunoprécipitation a été réalisée. La protéine recombinante PfelF2 $\beta$  est micro-injectée dans les ovocytes. Les extraits d'ovocytes sont récupérés et mis en présence de l'anticorps anti-penta His (1/100<sup>e</sup>) ou anticorps anti-lapin (1/100<sup>e</sup>, Santa cruz biotechnology) et de protéine G Sépharose. L'élution et le Western-blot sont réalisés comme précédemment décrit. La membrane est incubée avec les anticorps anti-XePP1 (1/15 000<sup>e</sup>, Santa Cruz

## Matériels et méthodes

Biotechnology) ou l'anti-penta His (1/10 000<sup>e</sup>) pour détecter respectivement la PP1 de Xénope et la protéine recombinante P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  avec le kit ECL (Santa Cruz Biotechnology).

Afin d'étudier l'interaction entre PP1 et eIF2 $\beta$  de *P. falciparum*, la protéine recombinante P<sub>f</sub>PP1 et l'ARN de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  ont été micro-injectés dans les ovocytes de Xénope. L'ARN de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  a été micro-injecté seul pour servir de contrôle négatif. L'extrait d'ovocytes est préparé 15min après les injections. 180 $\mu$ l d'extrait d'ovocytes lysés dans le tampon PY (Azzi et al. 1994) sont incubés avec 2 $\mu$ l d'anticorps souhaités pendant 3 à 4h sur roue. Puis 50 $\mu$ l d'une solution à 50% de protéines A Sépharose (Sigma) sont ajoutés pendant 1h. Après des lavages, les billes sont reprises dans 6 $\mu$ l de tampon de charge, l'électrophorèse puis le transfert sur membrane de nitrocellulose sont réalisés. La Co-Immunoprécipitation est effectuée avec les anticorps anti-penta His, anti-HA ou l'anti-IgG de souris, qui sert de contrôle. Les membranes sont incubées soit avec l'anticorps anti-HA pour détecter P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$ , soit avec l'anticorps anti-penta His pour détecter P<sub>f</sub>PP1. Pour la révélation, le kit Western blotting Luminol Reagent a été utilisé (sc-2048, Santa Cruz Biotechnology).

### K. Génétique inverse chez *P. falciparum*

#### 1. Préparation des plasmides

Pour obtenir les séquences qui serviront pour le Knock-In (KI) et le Knock-Out (KO), des PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique de *P. falciparum*, avec les couples d'amorces p16-p17 et p18-p19 respectivement (**Tableau 9**). Les produits de PCR sont insérés au niveau des sites de restriction *Pst*I et *Bam*HI, respectivement dans le vecteur pCAM-BSD-Hémagglutinine (HA) pour la construction tagguée en 3' (afin de vérifier l'accessibilité au locus), et dans le vecteur pCAM-BSD pour la construction du côté 5' (afin de déterminer son essentialité) de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$ . Les deux vecteurs possèdent une cassette BSD conférant une résistance à la blasticidine (BSD). Les constructions sont ensuite vérifiées par séquençage.

#### 2. Préparation des parasites et transfection

Les cultures de parasites avec une parasitémie de 8% minimum et une majorité de formes anneaux sont synchronisées par un double traitement au sorbitol (Vernes et al. 1984). 48h après la synchronisation, si la parasitémie est supérieure à 9% avec au moins 90% de formes anneaux et un hématoците de 3%, la transfection peut être réalisée.

100 $\mu$ g d'ADN plasmidique et 210 $\mu$ L de cytomix 1X (120mM KCl, 0.15mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM EGTA pH7.6, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25mM HEPES pH7.6, ajuster le pH à 7.6 avec du KOH et compléter à 100ml avec de l'eau) complétés avec de l'eau pour avoir un volume final à 300 $\mu$ L, sont mis dans une cuve d'électroporation. 75 $\mu$ L d'un culot de cultures (ce qui correspond à environ 100 millions de parasites), et 25 $\mu$ L de cytomix 1,43X sont ajoutés dans la cuve. L'électroporation est réalisée en utilisant l'électroporateur BIORAD (Gene pulser Xcell) avec les paramètres suivants : 300V, 950 $\mu$ F,  $\infty$   $\Omega$ , 2mm (Sidhu, Valderramos, and Fidock 2005). Les parasites sont ensuite maintenus dans un flacon 25cm<sup>2</sup>

## Matériels et méthodes

avec du milieu RPMI AGH gazé au trigaz (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>). 4h après l'électroporation, le milieu est à nouveau changé.

Pour sélectionner les parasites transformés, 48h après l'électroporation, la blasticidine est ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 2,5µg/mL. Les parasites, ayant intégré la construction dans leur génome, sont résistants et apparaissent 4 à 6 semaines après la transfection et toujours sous pression sélective.

### 3. Vérification de la transfection

Pour vérifier l'intégration du gène P<sub>f</sub>elF2β KI et KO dans le génome, un génotypage et un « plasmid rescue » sont réalisés.

La méthode « plasmid rescue » consiste en une extraction de l'ADN génomique, sur un culot de cultures asynchrones de parasites sauvages et transfectés, en utilisant le kit KAPA Express Extract selon les recommandations du fournisseur. Des bactéries compétentes *E. coli* DH5α (Invitrogen) sont alors transformées avec l'ADN génomique provenant des parasites transfectés. Après une digestion de l'ADN plasmidique par les enzymes de restrictions PstI/BamHI afin de vérifier la présence du plasmide et de l'insert, le séquençage est réalisé.

En parallèle, une PCR est effectuée sur l'ADN génomique avec les couples d'amorces p29-p30 et p26-p33 (**Tableau 9**) dans le but de vérifier respectivement la présence du gène P<sub>f</sub>elF2β (contrôle positif) et la présence de l'intégration (le primer 33 correspond au tag HA) pour la construction P<sub>f</sub>elF2β KI. Une PCR est effectuée sur l'ADN génomique avec les couples d'amorces p27-p30, p31-p32 et p26-p32 afin de vérifier respectivement la présence du gène P<sub>f</sub>elF2β (témoin positif), la présence du plasmide et la présence de l'intégration pour la construction P<sub>f</sub>elF2β KO. Le fragment, correspondant à l'intégration, est cloné dans le vecteur pCR2.1 et les bactéries compétentes *E. coli* TOP10 sont transformées avec cette construction (Kit TOPO TA Cloning, Invitrogen). L'ADN plasmidique est ensuite séquencé afin de vérifier la séquence du fragment intégré.

## L. Interruption conditionnelle de gène chez *P. berghei*

### 1. Préparation des plasmides

Le promoteur de P<sub>b</sub>elF2β est amplifié par PCR sur l'ADN génomique de *P. berghei* en utilisant le kit Taq polymérase Advantage2 avec le couple d'amorces p24-p25. Le produit de PCR est ligé au plasmide pPRFp-TRAD4Ty-TetO7-HAPRF-hDHFR-1 (fourni par P. Pino de l'université de Genève, Suisse) (Pino et al. 2012), au niveau des sites de restriction *BglII/SacII*, grâce au kit In-Fusion® HD Cloning (Clontech). Les bactéries compétentes Stellar sont transformées avec le plasmide contenant le promoteur. Par séquençage, l'intégrité de la séquence a été vérifiée. Puis une PCR est réalisée sur l'ADN génomique de *P. berghei* en utilisant le couple d'amorces p22-p23, afin d'amplifier une partie du gène de P<sub>b</sub>elF2β. Le produit de PCR est alors inséré dans le vecteur pPRFp-TRAD4Ty-TetO7-HAPRF-hDHFR-1

## Matériels et méthodes

contenant le promoteur, au niveau des sites de restriction *NaeI/NheI*. L'intégrité des séquences est vérifiée par séquençage.

Pour permettre la double recombinaison homologe, le plasmide contenant le gène et le promoteur de *Pbelf2β* est linéarisé par l'enzyme *NheI*. Après purification sur gel, le plasmide linéarisé est précipité à l'acétate de sodium et repris dans 20μl d'eau.

### 2. Préparation des schizontes

Un prélèvement sanguin, en présence d'héparine, est réalisé sur un rat mâle (âgé de 6 semaines, Fischer), infecté par *P. berghei*, ayant une parasitémie comprise entre 5 et 15%, au niveau du sinus rétro-orbitaire. 2ml de sang prélevés sont mis en culture dans des flacons de 75cm<sup>3</sup> avec 50ml de RPMI AGH, gazés au trigaz et incubés durant 16h à 37°C sous agitation (54tr/min). La culture est ensuite centrifugée 10min à 1 800tr/min sans frein à 4°C. Un frottis sanguin est effectué, puis un gradient de Nycodenz à 55% (fait extemporanément avec du PBS) est alors réalisé afin de séparer les schizontes des érythrocytes et autres cellules. Une centrifugation de 30min à 2 300tr/min à 4°C sans frein est effectuée. Deux phases sont alors visibles : la phase supérieure contenant le RPMI AGH, et la phase inférieure constituée des cellules sanguines et des débris. Les schizontes, réunis au niveau d'un anneau, sont situés à l'interface des deux phases. L'anneau est récupéré et lavé deux fois en PBS. Les schizontes purifiés sont utilisés directement pour la transfection.

### 3. Transfection et injection aux animaux

Une partie des schizontes purifiés, 20μl d'ADN plasmidique linéarisé (soit environ 30μg d'ADN, pour une injection de 10μg par souris) et 100μl de tampon Nucleofector human T cell complet (Lonza) sont placés dans une cuvette d'électroporation. L'électroporation est réalisée avec un appareil de type Amaxa® Nucleofector® avec le programme U33. Les parasites électroporés sont repris avec du PBS. A chaque souris mâle CD1 (venant du fournisseur Charles River) âgée de 6 semaines, 100μl de la préparation sont alors injectés par voie intra-veineuse. 30h après l'injection, la pyriméthamine (70mg repris dans 10ml de DMSO puis complété à 1L d'eau à un pH compris entre 3.5 et 5) est ajoutée à l'eau de boisson afin de sélectionner les parasites transfectés/recombinants. En effet, le plasmide possède une cassette, contenant la dihydrofolate réductase humaine conférant la résistance à la pyriméthamine, qui après recombinaison homologe est insérée dans le génome. Grâce à des frottis sanguin effectués deux fois par semaine, la parasitémie peut être suivie.

### 4. Vérification de la transfection

Afin de vérifier l'intégration du gène *Pbelf2β* dans le génome, un génotypage est effectué sur les parasites se développant dans les souris sous pyriméthamine. Le génotypage est réalisé par PCR avec le couple d'amorces p36-p37 pour déterminer l'intégration du gène. Le produit de PCR obtenu est cloné dans le vecteur pCR2.1 TOPO, en utilisant le kit TOPO TA

## Matériels et méthodes

Cloning selon le protocole recommandé (Invitrogen). Les bactéries compétentes *E. coli* TOP10 sont transformées avec le produit de ligation. L'ADN plasmidique obtenu est alors vérifié par séquençage.

Un Western-blot est effectué afin de vérifier l'expression de la protéine PbeIF2 $\beta$  fusionnée au tag HA (hémagglutinine). Un culot de parasites et un culot de schizontes maturés (du sang parasité dilué avec du sang sain de souris est mûri une nuit dans du milieu RPMI, à une agitation de 54tr/min à 37°C) sont élués dans du tampon de charge 1X et séparés sur SDS-PAGE 4-20%, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont incubées avec un anticorps anti-HA couplé à la biotine (1/2 500<sup>e</sup>) et la streptavidine HRP (1/150 000<sup>e</sup> diluée en PBS BSA 5%).

### M. Elaboration de peptides dérivés des motifs d'interaction

Des peptides dérivés des motifs KVAW et FGEKKK sont dessinés en se référant à l'article de Guernon (Guernon et al. 2006). Les peptides sont composés d'une séquence pénétrante « VKKKKIKREIKI » et du motif d'interaction répété deux fois. Les différents peptides utilisés sont énoncés dans le tableau ci-dessous. Ces peptides ont été synthétisés par Interchim.

**Tableau 11 : Liste des peptides dérivés des motifs utilisés durant ce projet.**

Nom	Motif	Séquence	Masse molaire
P15 (vw22)	RVxF	VKKKKIKREIKIKKVAWKKVAW	2736.55g/mol
P16 (va22)	RVxF muté	VKKKKIKREIKIKKAAAKKAAA	2450.17g/mol
P17 (vk24)	FxxR/KxR/K	VKKKKIKREIKIFGEKKKFGEKKK	2946.73g/mol
P18 (va24)	FxxR/KxR/K muté	VKKKKIKREIKIAGEAKAAGEAKA	2566.15g/mol
P6	Séquence pénétrante	VKKKKIKREIKI	1510.96g/mol

### N. Test des peptides dérivés des motifs d'interaction sur la croissance de *P. falciparum*

Les expériences sont réalisées en plaque 96 puits, avec une culture de parasites à un hématocrite de 1% et une parasitémie initiale de 0,5%. Les peptides sont ajoutés à différentes concentrations (concentrations finales de 30, 60 et 120 $\mu$ M) dans 250 $\mu$ l de RPMI-AGH et incubés 48h pour permettre aux parasites d'effectuer un cycle. Ensuite 50 $\mu$ l de SYBR Green I 1X (servant à marquer l'ADN des parasites) dilués dans un tampon (contenant 20mM Tris-HCl pH8.8, 138mM NaCl (Invitrogen)), sont ajoutés sur les cultures et celles-ci restent à l'obscurité 30min à température ambiante. Le paraformaldéhyde est ajouté, avec une concentration finale de 1%, afin de fixer les érythrocytes puis le tout est conservé à l'obscurité à 4°C.

## Matériels et méthodes

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, sur un dot-plot à deux paramètres (FL1-SSC) (Izumiyama et al. 2009). La fluorescence des érythrocytes sains est ajustée pour être entre  $10^0$  et  $10^1$ . Les résultats sont présentés en pourcentage de fluorescence des érythrocytes totaux.







# Discussion



## Discussion

Le parasite *Plasmodium falciparum* possède un cycle de développement complexe avec 2 hôtes : l'anophèle, où il effectue son cycle sexué et l'homme, où il effectue ses cycles asexués. Durant ces différentes phases, le parasite subit de nombreuses étapes de développement, lui permettant ainsi de se multiplier, de s'adapter et d'évoluer très rapidement. Ces étapes peuvent contribuer au développement rapide de résistances aux traitements antipaludiques existants. Il est donc important de continuer les recherches sur la biologie et le fonctionnement de ce parasite.

Toutes les étapes du développement de *P. falciparum* nécessitent la mise en place d'une régulation coordonnée et fine. Un des axes majeurs de recherches, ces dernières années, concerne les phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation dans la régulation cellulaire et plus particulièrement au niveau des modifications post-traductionnelles potentiellement impliquées dans la division (A Bloecher and Tatchell 2000; Hsu et al. 2000). Des études récentes sur le kinome de *Plasmodium* ont pu mettre en évidence que certaines kinases sont essentielles au développement et à la survie du parasite (Doerig et al. 2010; Guttery et al. 2014; Tewari et al. 2010). Face à ces kinases, *Plasmodium* possède des phosphatases, connues pour être responsables des processus de déphosphorylation, qui participent à la régulation fonctionnelle des protéines.

Les études menées au laboratoire portent sur la régulation des phosphatases de type 1 et 2A du parasite puisque les études réalisées ont montré que ces enzymes sont cruciales pour son développement. En effet, PfPP1 est essentielle principalement dans le cycle érythrocytaire du parasite et au niveau de la libération des mérozoïtes infectieux (Blisnick et al. 2006; Kumar et al. 2002). Nos recherches nous ont permis de caractériser trois régulateurs : la protéine Leucine-Rich-Repeat (PfLRR1), l'Inhibiteur 3 (Pfi3) et l'Inhibiteur 2 (Pfi2) chez le parasite. Dans ce contexte, nous avons montré que PfLRR1 et Pfi2 inhibent l'activité de la phosphatase PfPP1 alors que Pfi3 l'active. Des études de génétique inverse suggèrent que ces régulateurs sont aussi essentiels que la PfPP1c elle-même (Daher et al. 2006b; Fréville et al. 2012, 2013).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu montrer l'importance d'un motif d'interaction de Pfi2 dans la relation structure/fonction de ce régulateur. Nous avons également étudié eIF2 $\beta$  (eukaryotic initiation factor type 2 subunit  $\beta$ ), un facteur de l'initiation de la traduction, comme un régulateur potentiel de PfPP1.

### I. L'inhibiteur 2 de *Plasmodium falciparum*

#### A. Rôle des motifs d'interaction dans la formation du complexe Pfl2/PfPP1

Dans une première étude, nous avons montré que l'inhibiteur 2 est exprimé par le parasite, qu'il présente une localisation nucléocytoplasmique, et qu'il semble être essentiel pour le développement érythrocytaire de *P. falciparum*. La protéine Pfl2, composée de 144 acides aminés (205 chez l'Homme), est la plus petite avec une séquence plus courte au niveau N-terminal par rapport à ses homologues I2. Ces derniers possèdent trois motifs d'interaction à PP1 : KGILK, RVxF et HYNE alors que seulement 2 motifs ont été identifiés dans la séquence de Pfl2 : RVxF et HYNE. Le motif KGILK a été identifié dans la séquence de différents I2, y compris celle de l'Homme, au niveau de la partie N-terminale et semble jouer un rôle important dans la régulation de l'activité de PP1 (Huang et al. 1999; Park and DePaoli-Roach 1994). En effet, l'absence de ce motif chez certains I2 (levure, rat) montre une diminution de la fonction inhibitrice sur la phosphatase (Osawa et al. 1996; Tung, Wang, and Chan 1995). Le second motif, ayant pour séquence consensus [R/K]-X-[V/I]-X-[W/F], est décrit comme le motif principal d'interaction à PP1. En effet, sa mutation ou sa délétion perturbe l'interaction voire l'abolit complètement. Ce motif, plus connu sous le nom RVxF, est présent chez de nombreux régulateurs de PP1. Le dernier HYNE est situé dans la partie C-terminale de la protéine. Malgré l'absence dans la partie N-terminale du motif KGILK, Pfl2 interagit avec PfPP1 *via* ses motifs RVxF et HYNE. La mutation ou la délétion de l'un des deux motifs diminue l'interaction. Dans le but de mieux définir cette interaction ainsi que les motifs impliqués, nous avons utilisé la spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) combinée à des approches biochimiques et biologiques.

Grâce aux expériences de RMN, plusieurs régions d'interaction entre PfPP1 et Pfl2 ont été définies plus précisément : la première contenant le motif RVxF, la deuxième au niveau des résidus 70-80 et la dernière au niveau des acides aminés 95-116. Au niveau de cette dernière région, le motif FKEKRK (correspondant au motif FxxR/KxR/K), initialement décrit dans les protéines apoptotiques Bcl, a été identifié (Ayllón et al. 2002). Il est également présent dans de nombreux régulateurs de PP1. Nous avons montré que le motif FxxR/KxR/K est impliqué dans l'interaction avec PfPP1. Grâce au BIACORE et aux tests de type ELISA, nous avons mis en évidence que la mutation de ce motif induit une diminution d'interaction avec la phosphatase PP1.

Ces résultats confirment les observations faites précédemment, en démontrant la présence de plusieurs sites d'interaction à PfPP1 sur la séquence de Pfl2. Différentes approches (ELISA, Ovocytes de Xénope, Co-IP) ont mis en évidence une perte d'interaction avec PfPP1 lorsque Pfl2 est mutée sur les motifs RVxF et FxxR/KxR/K. Ces observations suggèrent que le motif RVxF est aussi important que le motif FxxR/KxR/K dans l'interaction. De plus, les motifs FxxR/KxR/K et HYNE sont proches l'un de l'autre, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la mutation du premier affecte la structure du second, empêchant ainsi la formation et la stabilisation du complexe. Au vu des résultats obtenus durant ces études, nous supposons que les motifs RVxF et FxxR/KxR/K sont des sites d'interaction

## Discussion

« primaire » alors que le motif HYNE est un site « secondaire ». Afin de définir l'importance de chaque motif dans la formation du complexe Pfl2/PfPP1, il faudrait déterminer les constantes d'association/dissociation entre PfPP1 et les différentes versions de Pfl2 (sauvage, muté sur un seul motif ou sur deux motifs) grâce au BIACORE ou à l'ITC (Isothermal Titration Calorimetry). De plus, l'analyse du spectre I2/PP1 de *P. falciparum* par RMN met en évidence un autre site d'interaction au niveau des résidus 70-80. Afin de valider la possibilité d'un 2<sup>ème</sup> site d'interaction secondaire, des expériences supplémentaires devront être effectuées.

Les résultats que nous avons obtenus avec Pfl2 sont différents de ceux obtenus avec Pfl3 alors que ces deux protéines, thermostables et non structurées, appartiennent à la même famille des inhibiteurs de PP1. En effet, nous avons démontré que la mutation du motif RVxF de Pfl3 abolit l'interaction, supposant ainsi un unique site d'interaction à PfPP1.

### B. Importance des motifs d'interaction dans la fonction régulatrice de Pfl2

Nous avons ensuite étudié l'impact du motif FxxR/KxR/K dans la fonction inhibitrice de Pfl2 sur l'activité phosphatase de PP1. La mutation du motif entraîne une perte de la fonction inhibitrice de Pfl2 (ovocytes de Xénope, test pNPP). Il semble donc que le motif soit essentiel pour la fonction régulatrice de la protéine. La mutation du motif RVxF ou HYNE provoque également une perte de la fonction inhibitrice de Pfl2 sur l'activité phosphatase. Nous pouvons donc conclure que chaque motif est nécessaire à la fonction de Pfl2.

L'analyse structure-fonction du complexe Pfl2/PfPP1, nous a permis de définir trois sites d'interaction à PfPP1 : RVxF, FxxR/KxR/K et HYNE. En effet, la présence du motif RVxF ou FxxR/KxR/K est suffisante pour avoir une interaction protéine-protéine alors que les 3 motifs sont nécessaires, essentiels à la fonction inhibitrice de Pfl2 (**Tableau 12**).

**Tableau 12 : Tableau récapitulatif du rôle des motifs d'interaction de Pfl2 dans la relation structure/fonction du complexe I2/PP1 chez *P. falciparum*.**

	Pfl2			
	Sauvage	RVxF	FxxR/KxR/K	HYNE
Interaction à PfPP1	+++	++	++	+
Fonction inhibitrice	+++	-	-	-

### C. Importance du complexe Pfl2/PfPP1 dans le développement du parasite

Nous savons que l'inhibiteur 2 est important pour le développement du parasite *P. falciparum*. Nous avons donc voulu déterminer l'importance du motif FxxR/KxR/K dans l'interaction entre Pfl2 et PfPP1. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un peptide dérivé du motif FxxR/KxR/K de Pfl2. Dans un premier temps, nous avons démontré que ce peptide interagit avec la protéine PfPP1 (test ELISA). Puis, en utilisant le modèle d'ovocytes de Xénope, nous avons observé que la micro-injection du peptide dérivé du motif FxxR/KxR/K interfère dans la formation du complexe Pfl2/XePP1. Etant donné que le peptide se fixe à PP1 et empêche la formation Pfl2/XePP1, nous avons voulu observer l'impact de ce peptide sur le développement du parasite. L'utilisation du peptide dérivé du motif FxxR/KxR/K inhibe la croissance parasitaire d'environ 45% à 160µM. Nous avons montré dans notre 1<sup>ère</sup> étude que l'utilisation du peptide dérivé du motif RVxF inhibe la croissance de 80% à 80µM alors que celui du motif HYNE n'a pas d'impact sur la croissance parasitaire.

Ces différents résultats suggèrent un ordre d'importance des motifs dans la formation du complexe Pfl2/PfPP1 et mettent en évidence l'importance de ce dernier dans le développement du parasite. Les peptides sont une preuve de concept puisque leur utilisation permet de bloquer les interactions protéine-protéine au niveau de zones importantes. La formation du complexe protéique et/ou le changement conformationnel induisant une ou des fonction(s) biologique(s) est alors bloqué (Buchwald 2010; Guergnon et al. 2006). Différentes études réalisées sur le complexe AMA1-RON2 (protéines de surfaces impliquées dans l'invasion) de *Plasmodium*, ont mis en évidence que l'utilisation de peptides empêche l'interaction de ces protéines, inhibant ainsi l'invasion des érythrocytes (Pihan et al. 2015; Vulliez-Le Normand et al. 2012; G. Wang et al. 2014). Malgré les différentes études réalisées montrant que AMA1 peut être une cible thérapeutique viable, des études récentes ont montré que l'absence de AMA1 chez les parasites n'empêche pas la formation d'une « moving jonction » fonctionnelle ((Bargieri et al. 2013; Giovannini et al. 2011). La recherche de petites molécules connues, pouvant inhiber l'interaction protéique, est également utilisée pour trouver des nouveaux moyens de lutte. L'identification des molécules se fait en réalisant des criblages de banques de composés chimiques. Cette approche a montré des résultats prometteurs en ciblant l'interaction entre PP1c et son partenaire. En effet, l'utilisation du guanabenz, une petite molécule, empêche la fixation entre GADD34 et PP1c et permet une protéostasie cellulaire (Tsaytler et al. 2011).

L'inhibiteur 2 pourrait être une cible thérapeutique prometteuse. En effet, nous avons montré une différence de séquence entre l'inhibiteur 2 de l'Homme et du parasite (absence de la partie N-terminale). De plus, nous avons vu que l'utilisation de peptides dérivés des motifs d'interaction à PP1 est encourageante. Il faudrait réaliser des études cristallographiques afin de définir de façon plus précise les différentes régions et résidus impliqués dans l'interaction entre I2 et PP1 de *P. falciparum* afin de définir des peptides inhibiteurs appropriés et/ou des petites molécules pouvant bloquer l'interaction protéine-protéine.

### D. Identification de nouveaux partenaires de Pfl2

I2 intervient dans de nombreux processus cellulaires notamment dans la régulation du cycle cellulaire et qu'il interagit avec différentes kinases telles que Pin1, Aurora A. Le complexe I2/PP1/kinase est encore mal défini. Toutefois, nous savons que le complexe Nek2/PP1/I2 est impliqué dans la séparation des chromosomes. I2, en étant associé à PP1, se fixe à Nek2 et augmente son activité, permettant ainsi l'initiation de la séparation des chromosomes (Eto et al. 2002; Fry, Meraldi, and Nigg 1998). De plus, il a été montré que la protéine I2 est impliquée dans la ségrégation des chromosomes lors de la cytokinèse ou de l'embryogenèse en régulant la balance Aurora B/PP1 (Tung, Wang, and Chan 1995; W. Wang, Stukenberg, and Brautigam 2008).

Afin de mieux définir l'importance du complexe I2/PP1 chez *P. falciparum*, il serait intéressant d'étudier les kinases qui interagissent avec ce complexe. Pour identifier les partenaires, un criblage de banques de *P. falciparum* (disponible au laboratoire) avec le complexe PfPP1/Pfl2 comme appât, pourrait être effectué en utilisant la technique du triple hybride. Cette approche permettrait d'identifier de nouveaux partenaires de PP1/I2 du parasite et peut-être même des protéines spécifiques au parasite, qui permettrait d'élargir les pistes de recherche pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques

### II. Le facteur eIF2 $\beta$ chez *Plasmodium falciparum*

eIF2 $\beta$  est le facteur d'initiation de la traduction de type 2 sous-unité  $\beta$ . Il intervient dans la traduction, en formant le complexe eIF2 avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ . Récemment, il a été décrit comme un potentiel régulateur de PP1 (Wakula, 2006). Nous avons donc entrepris l'étude de cette protéine chez *P. falciparum*.

#### A. L'analyse structurale du facteur eIF2 $\beta$

eIF2 $\beta$  a été identifié chez les archées, les bactéries et les eucaryotes. C'est une protéine conservée entre les espèces. Cependant l'analyse phylogénétique de plusieurs séquences protéiques d'eIF2 $\beta$  a permis de noter des différences. La plus grande différence est que les taxons des apicomplexes et des archées ne possèdent pas d'extension du côté N-terminal. Il semblerait que cette partie soit apparue au cours de l'évolution, en même temps que les facteurs de traduction eIF5 et eIF2B (composé de 3 sous-unités régulatrices et 2 sous-unités catalytiques), ces deux facteurs n'étant pas présents chez les archées (Yatime et al. 2007). La fonction de ces deux facteurs (eIF5 et la sous-unité  $\epsilon$  du facteur eIF2B) est de permettre l'échange GTP/GDP, lié au complexe eIF2. Dans la banque de données PlasmoDB, le facteur eIF5 de *P. falciparum* a été identifié contrairement au facteur eIF2B $\epsilon$ , qui n'a pas été répertorié. Il semblerait donc qu'au cours de l'évolution *P. falciparum* n'ait pas acquis le facteur eIF2B $\epsilon$ , ni l'extension en N-terminal du facteur eIF2 $\beta$ . De plus, P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  possède un unique domaine de fixation au GTP alors que deux ont été identifiés chez ses homologues, supposant ainsi un site d'action différent pour les facteurs eIF5 et eIF2B $\epsilon$  au cours de la traduction.

Une autre différence observable est la présence d'un seul bloc lysine au niveau de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  alors que les eucaryotes généralement en possèdent trois dont deux se situant dans la partie N-terminale. Dans la littérature, il est décrit qu'une seule région est suffisante pour la liaison à l'ARN. Cependant, des études complémentaires ont montré que les régions riches en lysines pouvaient avoir une autre fonction, elles seraient impliquées dans la liaison eIF2 $\beta$ /eIF5 ou eIF2B $\epsilon$  (cf. partie eIF2 $\beta$  et ses partenaires de la traduction). Nous supposons que cette différence est due à l'absence du facteur eIF2B $\epsilon$  chez le parasite. Une autre hypothèse, pouvant expliquer la présence de trois blocs lysines, est que l'interaction entre eIF2 $\beta$  et ses partenaires de la traduction se fait via des régions différentes (un ou plusieurs blocs lysines).

L'analyse de la séquence de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  a mis en évidence trois sites de phosphorylation potentiels d'après les données issues du phosphoprotéome alors que chez l'homme 4 sites ont été identifiés. La position des acides aminés phosphorylables est différente : en effet chez *P. falciparum*, les résidus sont les sérines 23 et 205 et la thréonine 90 alors que chez l'homme ce sont les sérines 2, 13, 67 et 218. La phosphorylation ou non de ces résidus est importante puisqu'elle peut avoir un impact sur la fonction de la protéine ainsi que sur l'interaction avec ses différents partenaires (R. Benne et al. 1978; Issinger et al. 1976).

## Discussion

Une similitude entre la séquence d'eIF2 $\beta$  de *P. falciparum* et de l'Homme est la présence du motif C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub> (acides aminés 168-171 et 191-194, correspondant aux résidus 281-284 et 302-305 respectivement chez l'Homme), correspondant au motif doigt de zinc, au niveau de la partie C-terminale. Ce domaine est un motif structural important, composé de deux polypeptides courts. Il est en général constitué de résidus cystéines et histidines. Les résidus cystéines sont essentiels pour la fonction d'eIF2 $\beta$ . En effet, la mutation de l'un d'eux entraîne une protéine non fonctionnelle (Castilho-Valavicius, Thompson, and Donahue 1992). Afin d'étudier l'importance de ce motif dans la structure et la fonction de PfelF2 $\beta$ , des mutations et des délétions pourraient être envisageables.

L'analyse de PfelF2 $\beta$  a permis d'identifier au niveau C-terminal, le domaine de la superfamille eIF2/eIF5. De plus, l'obtention du modèle prédit d'eIF2 $\beta$  du parasite a mis en évidence la conservation du domaine HTH (connu également sous le nom de domaine  $\alpha/\beta$ ), au niveau de la partie centrale de la protéine, qui semble impliqué dans la liaison avec eIF2 $\gamma$  (Sokabe et al. 2006).

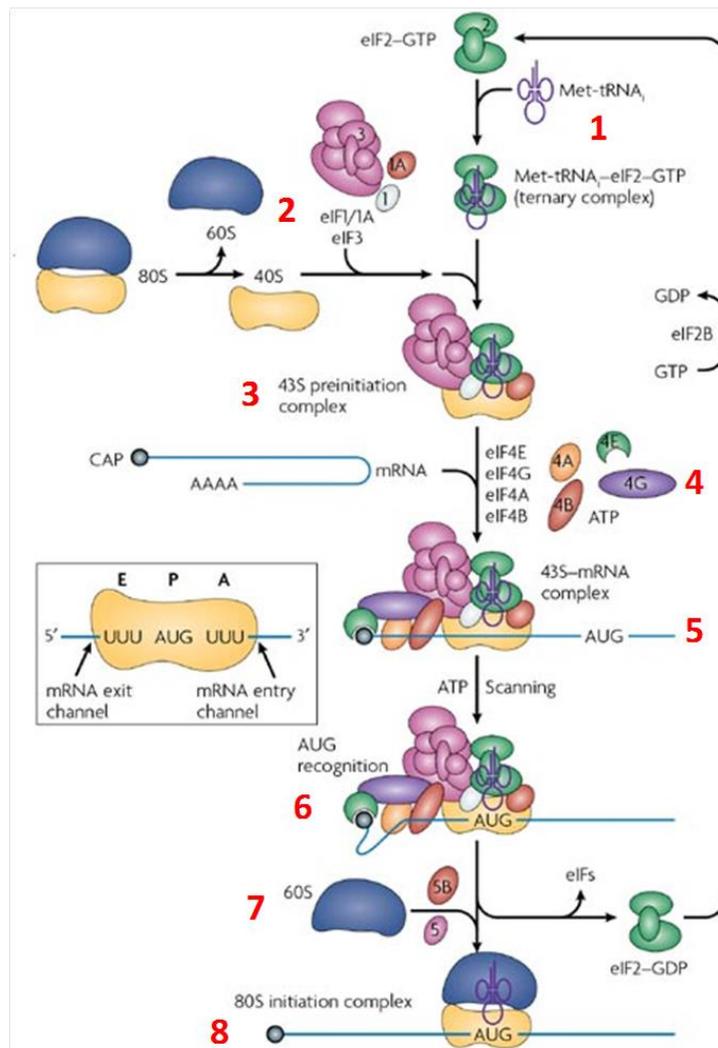
Enfin, l'analyse de la séquence de PfelF2 $\beta$  a montré la présence de deux motifs potentiels d'interaction à PP1 : le motif RVxF et le motif FxxR/KxR/K. Le modèle de PfelF2 $\beta$  prédit nous a permis d'observer que le motif FxxR/KxR/K se trouvait au niveau d'une hélice  $\alpha$ . Nous avons aussi constaté que le motif RVxF se situait au niveau d'un feuillet  $\beta$ , contrairement à celui de la séquence d'eIF2 $\beta$  de l'homme, qui se trouve dans une région non structurée. Il est possible que la séquence de PfelF2 $\beta$  étant plus courte et plus structurée explique la place occupée par le motif RVxF.

En conclusion de ce chapitre, nous avons vu que PfelF2 $\beta$  est une protéine plus courte et plus structurée que ses homologues. En effet, 52% de la protéine eIF2 $\beta$  du parasite est structurée contre 34 % pour la protéine de l'Homme. La séquence de PfelF2 $\beta$  a de nombreuses différences avec la séquence humaine, notamment la localisation des motifs d'interaction potentiels à PP1, ce qui permet de suggérer un mécanisme d'interaction et/ou d'action différent de ses homologues.

### B. eIF2 $\beta$ et ses partenaires de traduction

La fonction principale du facteur eIF2 $\beta$  est de participer à l'initiation de la traduction avec plusieurs partenaires. Il fait partie du complexe eIF2, essentiel pour la traduction, avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ . En effet, eIF2 interagit avec le GTP *via* la sous-unité  $\gamma$  et avec l'ARNt initiateur méthionine. Le complexe ternaire est alors formé. Au cours des différentes étapes de l'initiation de la traduction eIF2 $\beta$  interagit également avec le facteur eIF5 et eIF2B (**Figure 36**). Les analyses *in silico* d'eIF2 $\beta$  ont montré différents domaines d'interaction avec les partenaires. Nous avons donc voulu vérifier leur présence chez *P. falciparum*.

## Discussion



**Figure 36 : Les différentes étapes de l'initiation de la traduction.** 1 : la formation du complexe ternaire (TC). Le complexe eIF2 est divisé en trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Le GTP va se fixer à la sous-unité eIF2 $\gamma$  et va permettre l'identification de la région de liaison à l'ARNt méthionine (ARNt-Met). Le complexe eIF2-GTP se lie à l'ARNt initiateur méthionine. 2 : la formation du complexe pré-initiation 40S. La sous-unité 40S du ribosome va venir se lier aux facteurs eIF1 et eIF1A. Le complexe est stable et va acquérir une conformation dite « ouverte ». eIF3, formé de plusieurs sous-unités, interagit avec la sous-unité du ribosome pour stabiliser le complexe. eIF5 se fixe à eIF1A afin de garder la conformation ouverte du complexe. 3 : la formation du complexe pré-initiation 43S. Les 2 complexes précédemment formés vont se fixer l'un à l'autre. eIF1, eIF1A et eIF3 facilitent la fixation de TC à la sous-unité 40S du ribosome. eIF5 se fixe au facteur eIF2. L'ARNt-Met se positionne directement sur le site P du ribosome grâce à la reconnaissance codon-anticodon. 4 : l'activation de l'ARNm. Le facteur eIF4E se positionne au niveau de la coiffe en 5' de l'ARNm et ainsi les facteurs eIF4G et eIF4A sont recrutés. Le complexe de la coiffe est alors obtenu. La protéine PABP (poly(A) binding protein) s'attache sur la queue polyA de l'ARNm en 3' (non représenté). eIF4G interagit avec PABP, la circularisation de l'ARNm a lieu. 5 : le complexe de pré-initiation s'attache à l'ARNm activé grâce aux facteurs eIF4F, PABP et eIF3. La conformation ouverte de la sous-unité 40S permet l'attachement de l'ARNm au complexe 43S. 6 : balayage et reconnaissance du codon start. La conformation ouverte de la sous-unité ribosomiale, les différents facteurs d'initiation de la traduction et l'ATP permettent au complexe d'avancer le long de l'ARNm. L'hydrolyse de l'ATP par eIF4a stimule le balayage, le codon start AUG est identifié. 7 : l'identification du codon start entraîne l'hydrolyse d'eIF2-GTP par eIF5. Cette action permet la libération d'eIF2-GDP et des autres facteurs. Le facteur eIF5B permet la liaison des deux sous-unités du ribosome, entraînant la libération des facteurs eIF1A et eIF5B-GDP. 8 : le complexe d'initiation 80S est prêt pour la phase d'élongation de la traduction. En parallèle, eIF2-GDP reprendra une forme active eIF2-GTP par l'action du facteur eIF2B, un nouveau cycle d'initiation pourra alors démarrer.

## Discussion

### 1. Le complexe eIF2

La sous-unité eIF2 $\beta$  forme, avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ , le complexe eIF2, qui est essentiel à la synthèse protéique. L'étude de P $\beta$ eIF2, nous a amenés à vérifier la présence des deux autres sous-unités chez le parasite par génomique comparative. Nous avons identifié ces partenaires chez *P. falciparum* et avons entrepris le clonage et la production des protéines recombinantes. A ce jour, nous avons réussi à obtenir uniquement la protéine P $\beta$ eIF2 $\gamma$  et nous sommes actuellement en train de réaliser différentes expériences afin de démontrer l'interaction entre les deux sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  chez le parasite.

Les différentes études réalisées sur le complexe eIF2 ne permettent pas de définir clairement l'assemblage des trois sous-unités. eIF2 $\gamma$  serait le cœur du complexe, il interagit avec les sous-unités  $\beta$  et  $\alpha$ , sans que celles-ci ne soient en contact. Chez *Sulfolobus solfataricus*, eIF2 $\beta$  se fixe à eIF2 $\gamma$  via son domaine  $\alpha/\beta$  (correspondant au domaine HTH) et son domaine ZBD, alors que chez *Pyrococcus furiosus*, seul le domaine  $\alpha/\beta$  semble impliqué (Yatime et al. 2007). La différence d'interaction entre les deux protéines serait due aux conditions expérimentales. Etant donné l'importance du complexe eIF2 pour l'initiation de la traduction, il serait intéressant de déterminer quelles sont les interactions entre les trois sous-unités et de définir les régions impliquées chez *P. falciparum*, en réalisant différents tests (ELISA, GST pull-down, RMN, cristallographie). En effet, chez la levure, différentes études ont montré que la modification (mutation, changement structurale) de l'une des trois sous-unités, entraînait une perte d'intégrité du complexe eIF2 modifiant la synthèse protéique et la croissance cellulaire (Cigan et al. 1989; Donahue et al. 1988; Hannig et al. 1993). Il faudrait envisager une étude plus approfondie sur les sous-unités P $\beta$ eIF2 $\alpha$  et P $\beta$ eIF2 $\gamma$  afin de déterminer leur importance pour le complexe eIF2 et leur rôle dans le développement du parasite.

### 2. Le facteur eIF5

eIF5 interagit avec le complexe eIF2 et permet l'hydrolyse du GTP en GDP d'eIF2 entraînant la libération des différents facteurs d'initiation lorsque le ribosome est formé. Il est également décrit dans la littérature qu'il interagit avec le facteur eIF2 $\beta$ . Nous avons donc par génomique comparative, identifié le facteur eIF5 chez *P. falciparum*.

Afin d'examiner si P $\beta$ eIF2 $\beta$  interagit avec P $\beta$ eIF5, nous avons tenté de produire cette dernière. Malgré différentes conditions de production testées, nous n'avons pas obtenu la protéine recombinante P $\beta$ eIF5. La taille de la protéine, la nature des codons et/ ou la richesse en résidu asparagine peuvent expliquer la difficulté à obtenir la protéine. Etant donné l'existence d'une homologie, 30% avec une identité de 49% au niveau de la partie N-terminale, entre le facteur eIF5 de *P. falciparum*, de l'Homme et de la levure, nous avons étudié l'interaction avec les homologues de P $\beta$ eIF5 (collaboration avec le Dr. Pavitt, Angleterre). Nous avons alors mis en évidence une interaction entre les deux facteurs. De

## Discussion

plus, nous avons constaté que la mutation W391F d'eIF5 de levure diminue l'interaction avec eIF2 $\beta$ .

Ces résultats sont cohérents avec différentes études réalisées sur l'interaction eIF5/eIF2 $\beta$ . En effet, les recherches effectuées sur le facteur eIF5 ont permis de définir deux zones, riches en acides aminés acides et aromatiques, dans la partie C-terminale, impliquées dans l'interaction avec eIF2 $\beta$ . Des mutations au niveau de ces zones entraînent une diminution ou une perte d'interaction avec eIF2 $\beta$  (Asano et al. 1999; Das and Maitra 2000). L'acide aminé tryptophane a également été identifié sur la partie C-terminale de P<sub>f</sub>eIF5, supposant son implication dans l'interaction avec P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$ . De plus, il a été montré que la partie C-terminale d'eIF5 interagissait avec la partie N-terminale d'eIF2 $\beta$ , *via* les motifs riches en lysines. En effet, l'absence ou la mutation des blocs lysines d'eIF2 $\beta$  entraîne une diminution d'interaction avec eIF5 (Asano et al. 1999; Das and Maitra 2000). Afin de vérifier l'importance de la partie C-terminale de P<sub>f</sub>eIF5 et la partie N-terminale de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  dans l'interaction, il faudrait réaliser des délétions et/ou des mutations des lysines de P<sub>f</sub>eIF2 $\beta$  et des acides aminés acides et aromatiques de P<sub>f</sub>eIF5. Afin de contourner les difficultés à produire P<sub>f</sub>eIF5 sous forme recombinante, nous pourrions utiliser le modèle d'ovocytes de Xénope pour répondre à ces questions en collaboration avec le Dr. Katia Cailliau (Université de Lille 1).

Par ailleurs, nous savons que le complexe eIF2 est à nouveau actif grâce à eIF2B $\epsilon$ , qui permet l'échange GTP/GDP. Or ce facteur est absent chez *P. falciparum*. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'eIF5 pourrait jouer ce rôle chez le parasite. De plus, d'après les informations issues de PlasmoDB, il semblerait que P<sub>f</sub>eIF5 interagisse également avec P<sub>f</sub>eIF2 $\alpha$  (par la technique du double hybride en levure). Cela n'est pas impossible, puisque la séquence de P<sub>f</sub>eIF2 $\alpha$  possède un domaine de fixation au GTP au niveau de sa partie N-terminale (DMEG). Ayant réussi à obtenir les séquences codantes de eIF5 et eIF2 $\alpha$  au cours notre étude, nous pourrions confirmer cette interaction en utilisant les modèles de levure et/ou d'ovocytes de Xénope. Au vu des informations, il semble que le facteur P<sub>f</sub>eIF5 puisse intervenir à différents moments *via* de nombreux partenaires, nous pourrions déterminer l'importance de ce facteur dans le développement du parasite en réalisant une interruption du gène. Nous pourrions également identifier ces partenaires en réalisant un criblage de banque de *P. falciparum*.

eIF2 $\beta$  interagit avec différents partenaires lors de l'initiation de la traduction. Ces facteurs semblent importants pour la synthèse protéique et pour la croissance cellulaire. Il serait intéressant d'identifier et de caractériser les différents facteurs de traduction présents chez *P. falciparum*, d'étudier les interactions et définir leur importance dans le développement parasitaire. Dans ce contexte récent, une étude a montré qu'un composé, nommé DDD107498, peut inhiber la synthèse protéique. C'est un composé avec des propriétés pharmacocinétiques intéressantes (solubilité, clairance, EC<sub>50</sub> à 1nM). Une seule administration semble suffisante pour bloquer la transmission et obtenir une chimio-protection. Ce composé a une activité anti-malarique au niveau de plusieurs stades du développement du parasite. La cible de cette molécule est le facteur d'élongation 2 (eEF2), responsable de la translocation du ribosome le long de l'ARNm de façon GTP dépendante

## Discussion

(Baragaña et al. 2015). Ces résultats permettent d'ouvrir de nouvelles voies de recherche dans l'identification de drogues/médicaments contre le paludisme.

### C. eIF2 $\beta$ : un régulateur et/ou un substrat de PP1

Il semblerait que le facteur eIF2 $\beta$  soit un interacteur secondaire de PP1, c'est-à-dire qu'il a acquis la fonction d'interagir et potentiellement de réguler la phosphatase au cours de l'évolution (Wakula et al. 2006), grâce à l'acquisition de motifs d'interaction à PP1. Nous avons donc essayé de déterminer le rôle de ce facteur sur l'activité de PfPP1.

#### 1. eIF2 $\beta$ : un interacteur de PP1 ?

Lors de notre étude sur PfeIF2 $\beta$ , nous avons identifié deux motifs d'interaction potentiels à PP1 : RVxF et FxxR/KxR/K. Nous avons démontré que PfeIF2 $\beta$  interagit directement avec PfPP1 par différentes approches. De plus, nous avons mis en évidence qu'un seul des deux motifs est suffisant pour avoir une interaction avec PfPP1. En effet, la mutation d'un seul motif n'interrompt pas l'interaction avec la phosphatase alors que celle-ci est abolie lorsque les deux motifs sont mutés. De plus, ces observations suggèrent aussi l'absence d'autres régions d'interaction entre PfeIF2 $\beta$  et la phosphatase. Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée par Wakula et son équipe, qui a montré qu'eIF2 $\beta$  interagit avec PP1 *via* le motif RVxF. De plus, des délétions ont permis de détecter la présence d'un deuxième site de fixation à PP1 dans la partie C-terminale d'eIF2 $\beta$ , au niveau des 100 derniers acides aminés (Wakula et al. 2006).

#### 2. eIF2 $\beta$ : un inhibiteur de PP1 ?

Après avoir mis en évidence l'interaction entre PfeIF2 $\beta$  et PfPP1, nous avons voulu définir son rôle sur l'activité de la phosphatase. Nous avons effectué *in vitro* des tests d'activité utilisant des substrats phosphorylés. Les différentes expériences réalisées ne nous ont pas permis de définir la fonction régulatrice de PfeIF2 $\beta$ . Les différentes hypothèses émises sont tout d'abord que les substrats des tests d'activité, que nous avons utilisés, ne seraient pas adéquats ; la deuxième serait que la protéine PfeIF2 $\beta$  doit être associée à un partenaire pour avoir une conformation idéale afin d'exercer sa fonction sur PfPP1 ; ou bien il se pourrait que l'état de phosphorylation de la protéine ait une incidence sur sa fonction.

Afin de définir la fonction de PfeIF2 $\beta$ , nous avons utilisé le modèle d'ovocyte de Xénope. L'ovocyte est bloqué en prophase I de méiose. La micro-injection d'inhibiteurs de phosphatases, tels que l'acide okadaïque ou des anticorps anti-PP1, permet la maturation de l'ovocyte au stade métaphase II. La transition G2/M est visible par l'apparition d'une tache blanche au pôle animal de l'ovocyte, on parle alors de GVBD. La micro-injection de la protéine PfeIF2 $\beta$  entraîne la maturation des ovocytes. Il semblerait donc que PfeIF2 $\beta$  ait une fonction inhibitrice sur l'activité de PP1.

## Discussion

Ces observations sont en accord avec les résultats concernant l'étude du facteur eIF2 $\beta$  humain. La fonction de HuelF2 $\beta$  a été testée sur PP1 et PP2A et les résultats ont mis en évidence une fonction inhibitrice de HuelF2 $\beta$  spécifique de PP1. De plus, eIF2 $\beta$  bloquerait la déphosphorylation par PP1 de la glycogène phosphorylase et de la sérine 51 d'eIF2 $\alpha$ . Par ailleurs, il semblerait qu'eIF2 $\beta$  soit un activateur de sa propre déphosphorylation lorsqu'il est en présence de PP1 (Wakula et al. 2006). Au vu des différences observées avec ses homologues, il serait intéressant de voir si PfelF2 $\beta$  interagirait et régulerait l'activité de PfPP2A.

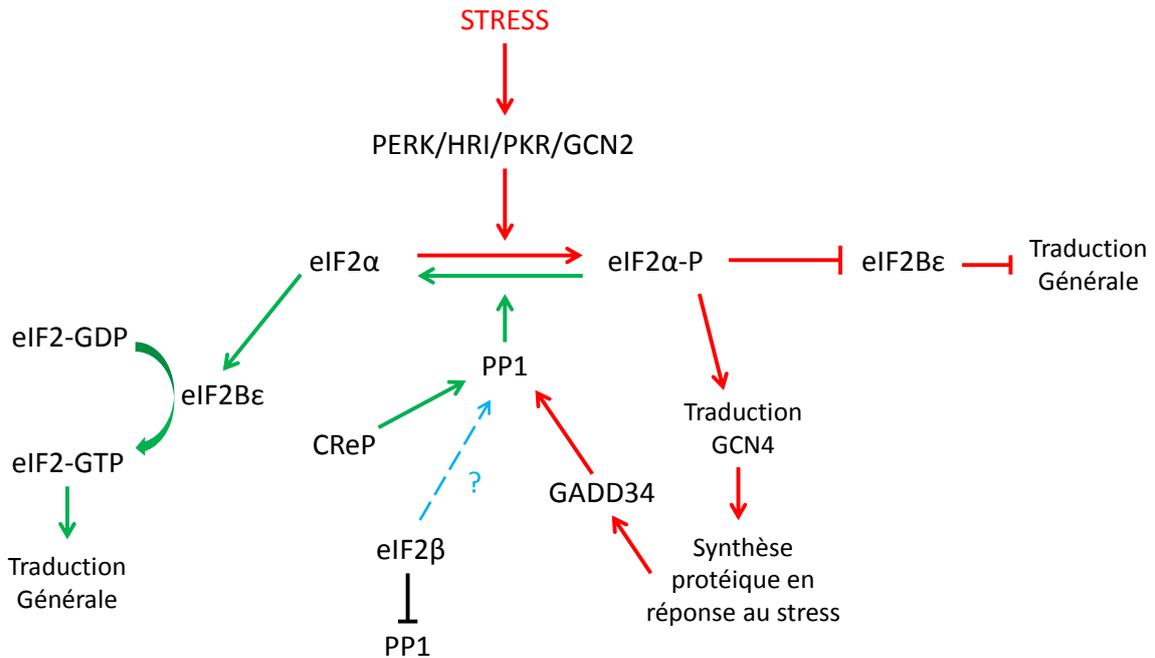
Nous avons ensuite testé l'impact des mutations des motifs d'interaction sur la fonction régulatrice de PfelF2 $\beta$ . Les protéines mutées sur un seul motif entraînent la maturation des ovocytes alors que celle-ci est absente lorsque la protéine est doublement mutée. Cette absence s'explique par un défaut d'interaction avec la PP1 de Xénope. Ces résultats confirment les observations des tests d'interaction obtenus *in vitro*. De plus, ils mettent en évidence l'importance des motifs dans la fonction régulatrice de PfelF2 $\beta$ . En effet, la mutation d'un seul motif bloque la fonction régulatrice de la protéine sur l'activité phosphatase de PP1.

Nous pouvons donc conclure que PfelF2 $\beta$  interagit et inhibe PP1 *via* 2 motifs d'interaction. Néanmoins, il est important de souligner qu'un seul motif semble suffisant pour l'interaction avec PP1 et pour que PfelF2 $\beta$  exerce sa fonction inhibitrice. Pour Pfi2, nous avons vu qu'un seul motif était suffisant pour l'interaction alors que les deux étaient nécessaires pour avoir une protéine fonctionnelle.

### 3. eIF2 $\beta$ : un substrat de PP1 ?

Nous savons que eIF2 $\beta$  avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  forme le complexe eIF2 dans la traduction. De plus, il a été montré que l'association GADD34 (Growth Arrest and DNA-Damage inducible protein) ou CReP (Constitutive Repressor of eIF2 $\alpha$  Phosphorylation) avec PP1 entraîne la déphosphorylation de la sérine 51 du facteur eIF2 $\alpha$ . En effet, CReP est constitutivement présent dans les cellules, il interagit avec PP1 en formant un complexe stable et permet le maintien d'un taux basal d'eIF2 $\alpha$  phosphorylée (Brush, Weiser, and Shenolikar 2003; John H Connor et al. 2001; Jousse et al. 2003). Lors d'un stress, la protéine eIF2 $\alpha$  peut être phosphorylée par 4 kinases différentes (PKR, GCN2, HRI et PERK). Cette phosphorylation excessive va bloquer la traduction des protéines et induire un programme d'expression de gènes en réponse au stress. Parmi les protéines exprimées, GADD34 est présent et va interagir avec PP1 afin de déphosphoryler eIF2 $\alpha$  dans le but de reprendre la traduction (**Figure 37**). GADD34 fait partie d'une boucle rétroactive négative. Ces deux facteurs, GADD34 et CReP, permettent de réguler la traduction en fonction des différents signaux perçus par la cellule (John H Connor et al. 2001; Jousse et al. 2003).

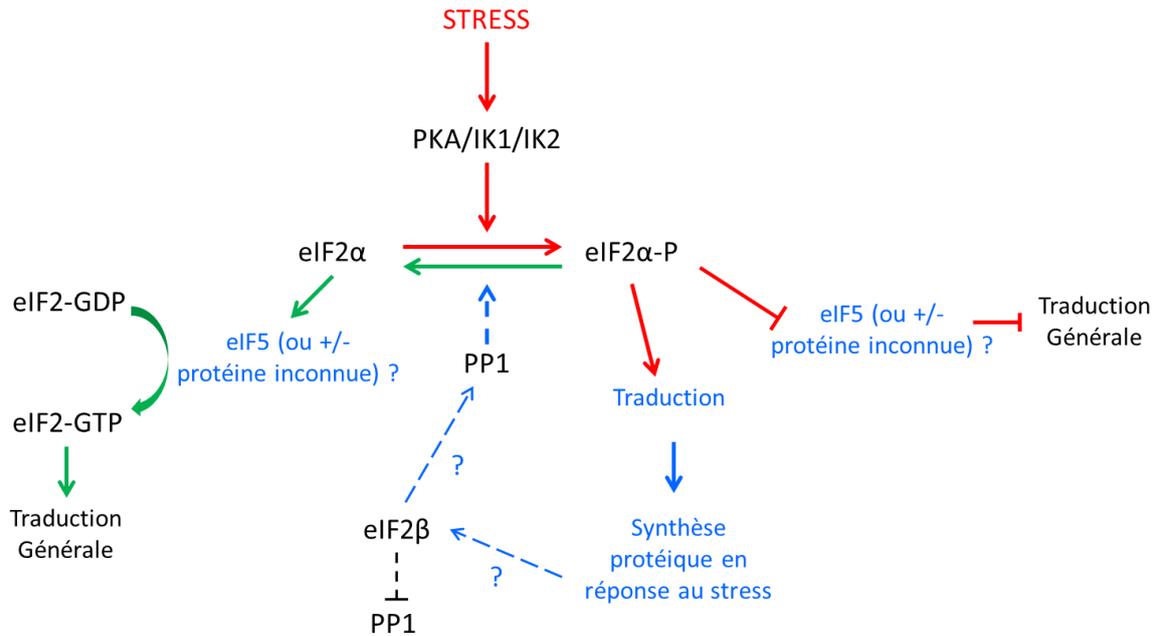
## Discussion



**Figure 37 : Représentation schématique de la régulation de la phosphorylation/déphosphorylation du facteur eIF2α chez les mammifères.** En vert est représentée la traduction en condition normale et en rouge est représenté le mécanisme durant un stress. En noir est représentée l'inhibition de PP1 par eIF2β et la flèche bleue en pointillés représente un rôle potentiel d'eIF2β dans la phosphorylation/déphosphorylation du facteur eIF2α via PP1.

Chez *P. falciparum*, par génomique comparative, ni GADD34, ni CREP n'ont pu être identifiés dans la banque de données PlasmoDB. Nous supposons que PfeIF2β pourrait remplacer GADD34. Il est présent durant la traduction et interagit avec PP1. Nous supposons que son « degré » de phosphorylation pourrait lui permettre d'être un substrat de PP1 et non un régulateur (**Figure 38**). Nous ne pouvons pas exclure la présence d'éventuels partenaires. Pour définir ce rôle chez le parasite, il faudrait réaliser une transfection permettant l'expression de la protéine PfeIF2β fusionnée à un tag, GFP par exemple, et suivre la quantité de signal détectée dans une culture de parasites stressés puisque l'expression de GADD34 a lieu en période de stress. Ces expériences sont réalisables puisque nous avons montré l'accessibilité du locus *pfeif2β*. Nous pourrions également détecter la quantité d'eIF2α phosphorylé/déphosphorylé en période de stress afin de déterminer le rôle de PfeIF2β.

## Discussion



**Figure 38 : Représentation schématique et hypothétique d'une « possible » régulation de la phosphorylation/déphosphorylation du facteur eIF2α chez *P. falciparum*.** En vert est représentée la traduction en condition normale et en rouge est représenté le mécanisme durant un stress. Le rôle d'eIF2β sur la PP1 est représenté par des pointillés noirs car la fonction inhibitrice doit être confirmée. La protéine eIF5 est en bleu car son rôle exact et l'interaction avec ses partenaires doivent être identifiés. Les flèches en pointillés bleus suggèrent le processus de régulation de la traduction mais la fonction exacte reste à déterminer.

Par ailleurs, une étude réalisée chez *S. cerevisiae* a montré l'absence de GADD34 et de CReP. Il a été démontré que le facteur eIF2γ interagit avec PP1 et permet ainsi la déphosphorylation du facteur eIF2α. La particularité de cette protéine est d'avoir une extension en N-terminale, comprenant le motif KKVAF (motif RVxF), que ne possèdent pas ses homologues (Homme, Drosophile, *S. pombe*). Cette extension semble jouer un rôle dans la déphosphorylation d'eIF2α (Rojas, Gingras, and Dever 2014). L'hypothèse émise est que le facteur eIF2γ pourrait combler l'absence de CReP chez la levure. L'alignement entre eIF2γ de la levure et de *P. falciparum* met en évidence une forte homologie de séquence. Cependant, aucun motif RVxF n'a été identifié sur la séquence du parasite. Il est donc difficile de supposer que P<sub>f</sub>eIF2γ puisse jouer le rôle de CReP. Il faudrait dans un premier temps vérifier son interaction avec P<sub>f</sub>PP1. Puis nous pourrions déterminer le taux d'eIF2α phosphorylé lorsque le gène p<sub>f</sub>eif2γ est interrompu (en parallèle avec des parasites sauvages), par des expériences de génétique inverse (réalisation d'un KO chez *P. falciparum*).

Une étude réalisée par Zhang en 2010 a montré que l'absence de la kinase IK2 chez *P. falciparum* ou *P. berghei* n'avait pas d'impact sur le développement au stade érythrocytaire ou chez le moustique. Cependant, le développement des sporozoïtes dans les glandes salivaires chez les parasites P<sub>b</sub>eIK2(-) est modifié, entraînant une perte d'infectiosité (Zhang et al. 2010). De plus, l'absence de la protéine IK2 empêche la phosphorylation du facteur eIF2α et provoque une transformation prématurée des parasites au stade hépatocytaire, entraînant la perte de leur pouvoir infectieux (Zhang et al. 2010). Nous avons essayé de détecter la présence du facteur eIF2α phosphorylé et déphosphorylé dans un extrait de parasites sauvages, grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre eIF2α de *Toxoplasma*.

## Discussion

L'analyse du Western-blot a permis de détecter la présence du facteur eIF2 $\alpha$  alors que la forme phosphorylée ne l'a pas été. Cette absence de détection peut s'expliquer par une faible quantité de la forme phosphorylée dans l'extrait. Il faudrait vérifier avec d'autres extraits parasitaires pour confirmer ces observations.

Une étude récente a montré qu'eIF2 $\beta$  avait une localisation cytoplasmique avec une très faible présence au niveau nucléaire (ratio concentration nucléaire/cytoplasmique 0,013). La protéine eIF2 $\beta$  serait transportée du noyau vers le cytoplasme par la protéine CRM1, une exportine nucléaire. Le blocage de CRM1, par la leptomyicine B, provoque une accumulation d'eIF2 $\beta$  dans le noyau (Bohnsack et al. 2002). PfPPP1 a une localisation nucléocytoplasmique, il se pourrait donc que PfeIF2 $\beta$  puisse jouer un rôle de substrat et/ou de régulateur de la phosphatase au niveau nucléaire. Afin de déterminer la localisation de PfeIF2 $\beta$ , nous avons essayé d'exprimer de façon épisomale la protéine PfeIF2 $\beta$  fusionnée à un tag GFP, grâce au plasmide pARL contenant un promoteur fort. Nous n'avons pas obtenu de parasites viables suite à la transfection (expérience réalisée 3 fois de façon indépendante), supposant une surexpression de la protéine d'intérêt qui est toxique pour le parasite. Nous sommes actuellement en train d'effectuer des expériences d'immunofluorescence chez *P. falciparum* et *berghei*, afin de déterminer la localisation d'eIF2 $\beta$  et de déterminer si celle-ci est différente en fonction des stades du cycle érythrocytaire. Nous essayerons de réaliser une transfection avec le vecteur pCAM-BSD-GFP (fourni par le Dr. Luc Reininger, Institut Cochin, France) afin d'exprimer la protéine PfeIF2 $\beta$  fusionnée au tag GFP sous son propre promoteur.

### 4. Le rôle d'eIF2 $\beta$ dans le cycle de vie du parasite

Afin d'étudier le rôle de eIF2 $\beta$  chez *P. falciparum*, nous avons réalisé des expériences de génétique inverse en réalisant un Knock-out (KO) et un Knock-In (KI). Malgré l'accessibilité du locus PfeIF2 $\beta$ , nous n'avons pas encore réussi à montrer l'intégration de la construction KO dans la culture des parasites transfectés. Il semble donc que PfeIF2 $\beta$  soit essentielle pour le parasite. Dans le but de répondre à ces interrogations et de définir la fonction de eIF2 $\beta$  chez le parasite, nous avons alors utilisé l'interruption conditionnelle de gène chez *P. berghei*, espèce spécifique des rongeurs. Grâce à cette approche, il est possible d'éteindre l'expression du gène d'intérêt par ajout de tétracycline (Pino et al. 2012). Suite à l'obtention de parasites transfectés ayant intégré la construction, nous réaliserons des clonages et éteindrons le gène dans le but de définir l'importance de PfeIF2 $\beta$  aux différents stades du cycle. Il est fort probable que PfeIF2 $\beta$  soit essentiel dans le développement du parasite. En effet, une étude, réalisée chez les souris agouti yellow, a montré que l'homozygotie pour eIF2s2<sup>-/-</sup> (autre appellation pour eIF2 $\beta$ ) entraîne la mort de l'embryon. La protéine eIF2 $\beta$  est importante pour la viabilité cellulaire (Heaney et al. 2009). De plus, il a été montré qu'eIF2 $\beta$  est impliquée dans le cancer des testicules : la délétion du gène *eIF2s2* diminue l'incidence du cancer (Heaney et al. 2009). eIF2s2 étant impliquée dans le développement des cellules germinales adultes, nous pourrions définir le rôle d'eIF2 $\beta$  au niveau des gamétocytes du parasite. Il serait particulièrement intéressant d'observer l'impact sur la différenciation du gamétocyte en gamète mâle au niveau de l'estomac et/ou définir la capacité des gamétocytes à former l'oocinète chez le moustique. Toutefois il est

## Discussion

important de rappeler que la protéine eIF2 $\beta$  tient une place importante dans l'initiation de la traduction. Par conséquent, il est difficile de faire la distinction entre cette fonction et sa capacité à interagir avec PP1. Il est possible que les deux rôles soient liés. Dans le but d'explorer son 2<sup>ème</sup> rôle, il serait intéressant d'introduire des mutations au niveau des motifs d'interaction à PP1 et d'évaluer la capacité d'eIF2 $\beta$  d'effectuer sa ou ses fonction(s) cellulaire(s).

Afin d'étudier *in vivo* l'importance du complexe PfeIF2 $\beta$ /PfPP1, nous avons utilisé des peptides dérivés des motifs d'interaction RVxF et FxxR/KxR/K. Les peptides ont pour but d'empêcher l'interaction entre PfPP1 et PfeIF2 $\beta$ . Les résultats préliminaires ne montrent pas d'inhibition de la croissance parasitaire en présence des peptides, même à de fortes concentrations. Une hypothèse pouvant expliquer une absence d'effet sur la croissance parasitaire serait leur localisation dans une partie structurée de la protéine et donc l'utilisation du peptide n'est pas efficace. Cette hypothèse pourrait expliquer les observations faites lors de l'étude du complexe Pfl2/PfPP1. En effet, l'utilisation du peptide dérivé du motif RVxF de Pfl2 entraîne une inhibition de la croissance parasitaire à de faibles concentrations alors que celui dérivé du motif FxxR/KxR/K devait être utilisé à de fortes concentrations pour observer un effet. De plus, le peptide dérivé du motif HYNE ne montre pas d'impact sur la croissance parasitaire. Chez Pfl2, le motif RVxF se situe dans une partie non structurée de la protéine alors que les deux autres motifs se trouvent dans une partie structurée. Les différentes observations faites sur l'utilisation des peptides mettent en avant la difficulté pour ces derniers de bloquer l'interaction protéine-protéine lorsque les régions impliquées (« hot spot ») se situent dans une partie structurée de la protéine. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait synthétiser différents peptides des partenaires de PP1, puis définir leur impact sur la formation du complexe protéique en fonction de leur positionnement dans la séquence. De plus, il faudrait vérifier l'interaction entre les peptides et PfPP1 (test de type ELISA), puis déterminer s'il y a une compétitivité entre les peptides et la protéine PfeIF2 $\beta$  et vérifier ainsi si la présence du peptide bloque la formation du complexe PfeIF2 $\beta$ /PP1 (modèle en ovocytes de Xénope).

### D. Identifier de nouveaux partenaires de PfeIF2 $\beta$

La présence d'acide aminés phosphorylables suppose l'interaction avec des protéines kinases. Chez l'homme, 4 kinases peuvent phosphoryler eIF2 $\beta$  : la protéine kinase CK2 phosphoryle les résidus sérine 2 et 67, la PKA et la PKC phosphorylent respectivement la sérine 218 et la sérine 13, et la kinase DNA-PKA dont les résidus impliqués ne sont pas encore identifiés (Benne 1976; Issinger et al. 1976; Ting et al. 1998; Welsh 1994). Les différentes études réalisées sur la phosphorylation d'eIF2 $\beta$  dans les cellules de mammifères ont montré qu'elle varie en fonction des conditions environnantes telles qu'un choc thermique, le diabète (Duncan and Hershey 1984; Garcia et al. 1996) et qu'elle est importante. Chez *P. falciparum*, des analyses bio-informatiques et des expériences de génétique inverse ont permis de répertorier les différentes kinases présentes chez le parasite et de définir leur importance dans son développement. La kinase PKC ne semble pas être présente alors que les kinases CK2 et PKA ont été répertoriées chez le parasite et semblent essentielles pour son développement.

## Discussion

La phosphorylation du facteur eIF2 $\beta$  est étudiée notamment avec la kinase CK2. C'est une caséine kinase 2 constitutivement active, son expression est ubiquitaire et elle est essentielle pour les eucaryotes. Un des rôles de la protéine CK2 serait de conserver une conformation fonctionnelle des facteurs intervenant dans la traduction. La protéine CK2 phosphoryle les résidus sérine au niveau de la partie N-terminale de eIF2 $\beta$  et se fixe au niveau de la partie C-terminale de eIF2 $\beta$ . De plus, il semblerait que la phosphorylation du facteur eIF2 $\beta$  par CK2 soit contrebalancée par l'action de la protéine phosphatase de type 2A (Llorens et al. 2003, 2005, 2006). Chez le parasite, la kinase CK2 fait partie de la famille des kinases CMGC impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Une étude réalisée par le Dr. Doerig a montré que PfCK2 semblait essentielle dans la schizogonie érythrocytaire du parasite (Dastidar et al. 2012).

Chez *P. falciparum*, nous n'avons pas étudié l'impact de la phosphorylation du facteur eIF2 $\beta$ . Etant donné les différences observées entre les sites de phosphorylation et l'identification des kinases, il serait intéressant d'étudier la relation eIF2 $\beta$ /kinases ainsi que les complexes PP1/eIF2 $\beta$ /kinases chez le parasite. Nous pourrions dans un premier temps étudier l'interaction entre PfeIF2 $\beta$  et les kinases de *Plasmodium* identifiées par des tests *in vitro* de type ELISA ou GST pull-down et déterminer également les régions/résidus impliqués dans cette interaction. Nous pourrions aussi définir la fonction des kinases ainsi que le(s) résidu(s) phosphorylé(s) en utilisant de l'ATP marqué (selon le protocole de l'article (Satinover et al. 2004)). Nous pourrions par la suite étudier le complexe PP1/eIF2 $\beta$ /kinase chez *P. falciparum*, par la technique du triple hybride en levure, puisque nous avons émis l'hypothèse que le facteur eIF2 $\beta$  pouvait être un substrat de PP1 en fonction de son état de phosphorylation.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu déterminer la présence d'un motif additionnel d'interaction à PP1 : le motif FKEK RK au niveau de la partie C-terminale, grâce à la RMN. Nous avons montré que ce motif est tout aussi important que le motif RVxF dans l'interaction à PP1 et que les deux sont nécessaires pour la formation du complexe Pfl2/PfPP1. Le motif FKEK RK, comme les autres motifs, est important pour la fonction régulatrice de Pfl2 sur l'activité phosphatase de PP1. Et nous avons mis en évidence que le peptide dérivé de ce motif avait un effet antiplasmodial.

Dans un second temps, nous avons montré que le facteur eIF2 $\beta$  interagit avec PP1 et qu'un seul des deux motifs RVxF et FGEK RK est suffisant pour cette interaction. De plus, PfeIF2 $\beta$  aurait un rôle inhibiteur sur la fonction phosphatase de PP1. Une nouvelle fois, la présence d'un motif semble suffisante pour avoir une protéine régulatrice. Afin de définir l'importance d'eIF2 $\beta$  pour le parasite *Plasmodium*, des expériences de génétique inverse ont montré l'accessibilité au locus du gène et l'interruption de celui-ci est en cours de réalisation.

Ces différentes études réalisées sur les régulateurs de PfPP1 ont permis d'accroître nos connaissances sur le réseau de régulation de la phosphatase chez *Plasmodium* et d'identifier de nouveaux partenaires potentiels. Ces résultats permettront d'ouvrir de nouveaux axes de recherche et découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques dans la lutte contre le paludisme.







# Annexes



## Annexes

### Annexe 1 : Tableau récapitulatif de l'interactome de PP1

**Annexe 1 : Interactome de PP1 chez les vertébrés.** Tableau récapitulatif des protéines connues pour réguler PP1, avec le nom des gènes et les fonctions associées (extrait de l'article (M Fardilha et al. 2010) complété avec l'article de (Heroes et al. 2013))

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
AATK	LMKT1	Apoptose	(Gagnon et al. 2007)
AHCYL1	IRBIT	Régulation d'IP3R	(Devogelaere et al. 2007)
AKAP1	AKAP149	Réassemblage de l'enveloppe nucléaire	(Rikke L. Steen et al. 2000; Rikke L Steen et al. 2003)
AKAP5	AKAP79		
AKAP9	AKAP450	Transmission synaptique, fonction centrosomale	(Felicello, Gottesman, and Avvedimento 2001; Takahashi et al. 1999; Westphal et al. 1999)
AKAP11	AKAP220	Coordination du signal PKA/PP1	(Schillace and Scott 1999; Tanji et al. 2002)
AKT1	PKB	Apoptose	(C. S. Chen et al. 2005; Choudhury et al. 2006)
ANKRD28	PITK	Transcription	(Kwiek, Thacker, and Haystead 2007; Kwiek et al. 2006)
ANKRD42	SARP1 et SARP2	Facteur de transcription putatif	(Gareth J Browne et al. 2007)
ANP32A	I1 <sup>PP2A</sup>	Stimulation de PP1 et inhibition de PP2A	(Katayose et al. 2000)
ANP32B	I2 <sup>PP2A</sup>	Stimulation de PP1 et inhibition de PP2A	(Katayose et al. 2000)
APAF1	CED4	Apoptose	(Flores-Delgado et al. 2007)
APC	APC		
AR	Récepteur androgène	Epissage et transcription	(S. Chen et al. 2009)
ATM	AT1	Cycle cellulaire, réponse aux dommages de l'ADN	(C. Y. Guo, Brautigan, and Larner 2002; C. Guo et al. 2007; Mi et al. 2007; Tang et al. 2008)

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
AURKA	Aurora-A	Cycle cellulaire	(Katayama et al. 2001; Ohashi et al. 2006; Satinover, Brautigan, and Stukenberg 2006; Satinover et al. 2004)
AURKB	Aurora-B	Cycle cellulaire	(Emanuele et al. 2008; Sugiyama et al. 2002; W. Wang, Cronmiller, and Brautigan 2008)
AXIN1	AXIN	Signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine	(Luo et al. 2007; Jiang, Luo, and Howe 2009)
BAD	BCL2L8	Apoptose	(V Ayllón et al. 2000, 2001; Verónica Ayllón et al. 2002; Flores-Delgado et al. 2007; A. Garcia et al. 2003, 2004)
BAX	BCL2L4	Apoptose	(Flores-Delgado et al. 2007)
BCL2	BCL2	Apoptose	(V Ayllón et al. 2001; Bricchese and Valette 2002; A. Garcia et al. 2003, 2004)
BCL2L1	BCL-x	Apoptose, épissage	(Verónica Ayllón et al. 2002; Boon-Unge et al. 2007; Kim 2008; Garcia et al. 2003, 2004; Yang et al. 2004)
BCL2L2	BCL-w	Apoptose	(Verónica Ayllón et al. 2002; A. Garcia et al. 2003, 2004)
BRCA1	BRCA1 ou PSCP	Cycle cellulaire, réparation de l'ADN	(Y. Liu, Virshup, and White 2002; Sankaran et al. 2007a; Yu et al. 2008)
C7orf16	GSBS ou substrat G	Inhibition de PP1	(Aitken et al. 1981; Endo et al. 1999; K. U. Hall et al. 1999)
CAMSAP3	NEZHa2		
CASC1	CASC1		
CASC5	KNL1		

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
CASP2	Caspase 2	Apoptose	(Nutt et al. 2009)
CASP9	Caspase 9 ou APAF3	Apoptose	(Dessauge et al. 2006)
CAV1	CAV ou CGL3	Cycle cellulaire	(Henkhaus et al. 2008; Pp et al. 2003; Radel and Rizzo 2005)
CCDC8	CCDC8		
CD2BP2	CD2BP2		
CDC25C	CDC25C	Cycle cellulaire	(Margolis and Kornbluth 2004; Margolis et al. 2003, 2006)
CDCA2	Repo-Man	Cycle cellulaire et viabilité cellulaire	(Laura Trinkle-Mulcahy et al. 2006; Vagnarelli et al. 2009)
CDK5R1	CDK5P35 ou NCLK	Développement du système nerveux central	(Agarwal-Mawal and Paudel 2001; T. Li, Chalifour, and Paudel 2007; K. Sato et al. 2007)
CENPE	CENPE		
CEP192	CEP192		
CHCHD3	CHCHD3		
CHCHD6	CHCHD6		
CLCN7	CLC7		
CNST	Consortine		
CSMD1	CSMD1		
CSRNP2	CSRNP2		
CSRNP3	CSRNP3		
DCX	Doublecortine	Migration neuronale	(Santra et al. 2009; Shmueli et al. 2006)
DDX31	DEAD box protein 31		
DLG2	Chapsyn-110		
DGL3	SAP102		
DZIP3	DZIP3		

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
EIF2AK2	PKR	Synthèse protéique, infection à HSV-1	(Eley, Russell, and Tisdale 2007; Hakki and Geballe 2008; S. L. Tan et al. 2002)
EIF2S2	eIF2 $\beta$	Initiation de la traduction	(Wakula et al. 2006)
ELFN1	ELFN1		
ELFN2	ELFN2		
ELL	ELL1		
FARP1	FERM		
FER	Kinase FER ou TYK3	Cycle cellulaire	(Pasder et al. 2006)
FKBP15	FK506BP15		
GPATCH2	GPATCH2		
GPR12	GPR12		
GRM1	mGluR1	Transmission glutamatergique	(Crocì et al. 2003; Enz 2007)
GRM5	mGluR5	Transmission glutamatergique	(Crocì et al. 2003; Enz 2007)
GRM7	mGluR7b	Transmission glutamatergique	(Enz 2002, 2007)
GRXCR1	Glutaredoxine		
HCFC1	HCF1	Transcription et cycle cellulaire	(Ajuh et al. 2000)
HDAC6	HDAC6		
HDAC10	MGC149722	Transcription	(Brush et al. 2004)
HSPA5	MIF5	Chaperonne, modulation de l'activité de PP1 $\gamma$ 2	(Chun et al. 1994)
HSPA8	HSP71	Adhésion des plaquettes	(Polanowska-Grabowska et al. 1997)
HSPB6	Hsp20		
HYDIN	HYDIN		
I4	Pseudogène	Inhibition de PP1	(Shirato et al. 2000)
IKZF1	Ikaros		
ITGA2B	Intégrine $\alpha$ IIb		
ITGA3	Intégrine, chaîne $\alpha$ 3	Régulation de la phosphorylation de l'intégrine	(Mutz et al. 2006)
ITPR1	IP3R1		

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
ITPR3	IP3R3		
KCNA6	KCNA6		
KCNK10	KCNK10		
KDM4A	JMJD2A	Contrôle épigénétique de la transcription et de la mémoire à long terme	(Koshibu et al. 2009)
KDM5B	JARID1B		
KIAA0430	LIMKAIN b1		
KIAA1244	KIAA1244		
KIAA1949	Phostensine	Réarrangement de l'actine	(Kao et al. 2007)
KIF13A	Famille des kinésines (membre 13A)	Cycle cellulaire	(Santra et al. 2009)
KIF18A	KIF18A		
LMNB1	Laminine B	Assemblage de la laminine nucléaire	(Steen and Collas 2001; Thompson et al. 1997)
LMTK2	AATYK2	Régulation de PP1 et de PP1 R2 à la surface membranaire	(H. Wang and Brautigam 2002)
LMTK3	LMTK3		
LRRC67	TLRR	Transformation et formation de la queue des spermatozoïdes	(R. Wang, Kaul, and Sperry 2010; R. Wang and Sperry 2008)
MAP1B	MAP1B		
MAPK1	ERK2 ou p38	Activation d'eIF2B par IGF1	(Quevedo, Salinas, and Alcázar 2003)
MAPK3	ERK1	Activation d'eIF2B par IGF1	(Quevedo, Salinas, and Alcázar 2003)
MAPK8	JNK	Apoptose complexe JNK/Bcl2/PP1	(Brichese, Cazettes, and Valette 2004; Monick et al. 2006)
MAPT	TAU	Assemblage et stabilité des microtubules	(Liao et al. 1998)
MCM7	MCM7		
MKI67	MKI67		
MPHOSPH10	MPHOSPH10		

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
MYEF2	MEF2	Survie des cellules neuronales, modulation cardiaque et différenciation terminale des muscles cardiaques, vasculaire et squelettiques	(Perry et al. 2009)
MYO16	MYR8	Développement du cerveau	(Patel et al. 2001)
MYO1D	Myosin-ID		
NCAM1	NCAM180 et NCAM140	Développement et maintien du système nerveux	(Bu, Kannicht, and Reutter 2005; Büttner and Horstkorte 2010)
NCL	Nucléodine	Cycle cellulaire, apoptose	(Morimoto et al. 2007)
NCOR1	N-Cor	Régulation de la différenciation des cellules souches neuronales	(Hermanson, Jepsen, and Rosenfeld 2002)
NEFL	NF-L	Morphologie et plasticité et/ou transmission neuronale ?	(Terry-Lorenzo et al. 2000)
NEK2A	NEK2A	Fonction centrosomale, ségrégation chromosomique	(Helps et al. 2000; Lou et al. 2004)
NEK2A	NEK2A-T	Fonction nucléaire	(Margarida Fardilha et al. 2004; W. Wu et al. 2007)
NOC2L	NIR		
NOMI	SGD1 (protéine nucléolaire avec un domaine 1 MIF4G)	Ciblage de PP1 au nucléole	(Gunawardena et al. 2008)
NONO	P54nrb		
OCLN	Occludine	Régulation négative de l'assemblage des jonctions serrées	(Rao 2009; Seth et al. 2007)
OPN3	Opsin-3		
ORC5	ORC5		
PARD3	Par-3 ou Bazooka	Formation jonctions serrées fonctionnelles ?	(Traweger et al. 2008)
PCDH7	Protocadhérine 7-c	Interaction cellule-cellule (neurone)	(Yoshida et al. 1999)
PCDH11X	Protocadhérine 11X		
PCIF1	PCIF1		
PER2	FASPS	Rythme circadien	(Yoshida et al. 1999)

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
PFKM	PFK1	Glycolyse ?	(Sumin Zhao and Lee 1997)
PHACTR1	Phosphatase et régulateur 1 de l'actine	Activité synaptique et cytosquelette d'actine	(Patrick B Allen et al. 2004)
PHACTR3	Scapinine	Association avec des structures nucléaires non chromatidiennes et mobilité/diffusion cellulaire	(Sagara, Arata, and Taniguchi 2009; Sagara et al. 2003)
PHACTR4	Phosphatase et régulateur 4 de l'actine	Régulation du tube neural et de la fermeture de la fissure optique	(T. H. Kim et al. 2007)
PHRF1	PHRF1		
PKMYT1	PKMYT1		
PLCL1	PRIP-1 ou Phospholipase C-like 1	Régulation de l'inhibition synaptique via le contrôle de la phosphorylation du récepteur GABA	(Yanagihori et al. 2006; Yoshimura et al. 2001)
POLD3	P68		
PPP1R1A	Inhibiteur 1 (I1)	Inhibition de PP1, métabolisme du glycogène, plasticité synaptique, contraction musculaire, fonction cardiaque	(F L Huang and Glinsmann 1976; Rodriguez et al. 2006) Nicolaou P
PPP1R1B	DARPP-32	Neurotransmission	(H. C. Hemmings et al. 1984; Svenningsson, Nairn, and Greengard 2005; Svenningsson et al. 2004)
PPP1R1C	IPP5	Apoptose	(X. Wang et al. 2008; Zeng et al. 2009)
PPP1R2	Inhibiteur 2 (I2)	Inhibition de PP1	(H. B. Huang et al. 1999; M. Li, Satinover, and Brautigan 2007)
PPP1R3A	GM	Métabolisme du glycogène	(Johnson et al. 1996; Suzuki et al. 2001; Toole and Cohen 2007)
PPP1R3B	GL	Métabolisme du glycogène	(M J Doherty et al. 1995; Montori-Grau et al. 2007; G. Moorhead et al. 1995)

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
PPP1R3C	PTG	Métabolisme du glycogène	(Armstrong et al. 1997; Brady et al. 1997; G J Browne et al. 2001; Martin J. Doherty, Young, and Cohen 1996; Printen, Brady, and Saltiel 1997; Toole and Cohen 2007)
PPP1R3D	PPP1R6	Métabolisme du glycogène	(Armstrong et al. 1997; Toole and Cohen 2007)
PPP1R3E	KIAA1443		(Ceulemans, Stalmans, and Bollen 2002; Munro et al. 2005)
PPP1R3F	HB2E		(Ceulemans, Stalmans, and Bollen 2002; Mukherji et al. 2006)
PPP1R3G			(Ceulemans, Stalmans, and Bollen 2002)
PPP1R7	Sds22	Mitose, régulation de la fonction spermique de la polarité et de la forme des cellules épithéliales	(Dinischiotu et al. 1997; Grusche et al. 2009; S. Mishra et al. 2003; Peggie et al. 2002)
PPP1R8	NIPP1	Epissage	(Monique Beullens et al. 1992; Tanuma et al. 2008; L Trinkle-Mulcahy et al. 1999)
PPP1R8	NIPP-T	Epissage ?	(Margarida Fardilha et al. 2004)
PPP1R9A	Neurabinine 1	Plasticité et transmission synaptique, signalisation dendritique via les voies glutamatergique et dopaminergique	(Kelker et al. 2007; MacMillan et al. 1999; Terry-Lorenzo, Carmody, et al. 2002)
PPP1R9B	Spinophiline ou Neurabinine 2	Plasticité et transmission synaptique, signalisation dendritique via les voies glutamatergique et dopaminergique	(P B Allen, Ouimet, and Greengard 1997; Feng et al. 2000; Kelker et al. 2007; Sarrouilhe et al. 2006; Terry-Lorenzo, Carmody, et al. 2002; Terry-Lorenzo, Elliot, et al. 2002)

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
PPP1R10	PNUTS	Épissage, décondensation chromosomique, apoptose, dégradation protéasomale et activité synaptique rétinienne	(Patrick B. Allen et al. 1998; Y. M. Kim et al. 2003; Kreivi et al. 1997; Landsverk et al. 2005; S.-J. Lee et al. 2007; Rose et al. 2008; Udho et al. 2002)
PPP1R11	Inhibiteur 3 (I3)	Inhibition PP1, apoptose, fonction spermiqque	(J. Zhang et al. 1998; L. Zhang et al. 2008b)
PPP1R12A	MYPT1	Ciblage de la myosine et de l'actine	(Alessi et al. 1992; Terrak et al. 2004)
PPP1R12B	MYPT2	Ciblage de la myosine et de l'actine, ciblage de la myosine phosphatase au cœur	(G. Moorhead et al. 1998; Okamoto et al. 2006)
PPP1R12C	P85	Ciblage de la myosine et de l'actine	(I. Tan et al. 2001)
PPP1R13B	P53BP2-like	Apoptose	(Helps et al. 1995; Z. J. Liu, Lu, and Zhong 2005)
PPP1R13L	IASPP		
PPP1R14A	CPI-17	Inhibition de l'augmentation d'activité de la myosine phosphatase musculaire lors de la contraction	(Eto 2009; Eto et al. 1997)
PPP1R14B	PHI-1	Modulation rétraction des cellules endothéliales et épithéliales	(Eto, Karginov, and Brautigam 1999; Eto 2009; Tountas et al. 2004)
PPP1R14C	KEPI-CPI-17-like	Inhibiteur de PP1 dépendant de PKC (implication dans addiction)	(Eto 2009; Gong et al. 2005; Q. R. Liu et al. 2002)
PPP1R14D	GBPI-1 ou GBPI-2	Inhibition de PP1 lorsqu'elle est phosphorylée	(Eto 2009; Q.-R. Liu et al. 2004)
PPP1R15A	GADD34	Synthèse protéique, régulation de l'exposition à la calréticuline, signalisation TGFβ	(Brush, Weiser, and Shenolikar 2003a; John H Connor et al. 2001; Kepp et al. 2009; W. Shi et al. 2004)
PPP1R15B	CReP	Synthèse protéique	(Heather P Harding et al. 2009; Jousse et al. 2003)

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
PPP1R16A	MYPT3	Ciblage de la myosine et de l'actine, translocation des récepteurs nucléaires	(Skinner and Saltiel 2001; Sueyoshi et al. 2008; Vereshchagina et al. 2004)
PPP1R16B	TIMAP	Régulation de la barrière endothéliale pulmonaire	(Csontos and Czikora 2008; K. Kim et al. 2005)
PPP1R17	Substrat G		
PPP1R18	Phostensine		
PPP1R21	CCDC128		
PPP1R26	DRIM BP		
PPP1R27	DYSFIP1		
PPP1R32	IIIG9		
PPP1R35	LOC221908		
PPP1R36	LOC145376		
PPP1R37	LRRC68		
PPP1R42	TLRR		
PREX2	PREX-2		
PTK2	FAK	Adhésion focale	(Andreassen et al. 1998; Fresu and Bianchi 2001)
RAF1	CRAF	Activation de RAF1 entraîne l'inactivation de la voie de signalisation MEK/ERK	(Jaumot and Hancock 2001; Mitsuhashi et al. 2003)
RB1	RB	Inhibition du cycle cellulaire, progression en phase S et apoptose	(Berndt and Ludlow 2004; Durfee et al. 1993; Tamrakar and Ludlow 2000)
RB1CC1	RB1CC1		
RBM26	RBM26		
RIMBP2	RIMBP2		
RIPP1		Fonction ribosomale?	(M Beullens, Stalmans, and Bollen 1996)
RL1	Protéines de neurovirulence ICP34.5/ $\gamma_1$ 34.5	Inhibition de la synthèse protéine en relation avec GADD34	(He, Gross, and Roizman 1997, 1998; C. Zhang et al. 2008)
RPGRIP1L	RPGRIP1L		

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
RPL5	Protéine ribosomale L5	Fonction ribosomale ?	(Hirano, Ito, and Hartshorne 1995)
RRP1B	RRP1B		
RYR1	Récepteur à la ryanodine 1	Activité des canaux à ions dans les muscles cardiaques et squelettiques	(Terentyev et al. 2003; S Zhao et al. 1998)
RYR2	Récepteur à la ryanodine 2	Activité des canaux à ions dans les muscles cardiaques	(Marx et al. 2000; Terentyev et al. 2003)
SACS	SACSIN		
SFI1	SFI1		
SFPQ	PSF	Epissage	(Gozani, Patton, and Reed 1994; C. J. Huang et al. 2007; Patton et al. 1993)Hirano K, 1996
SFRS13A	SRp38 O NSSR OU FUSIP	Régulation de l'épissage en réponse au stress cellulaire	(Y. Shi and Manley 2007)
SH2D4A	SH2D4A		
SH3GLB1	Endophiline B1t		
SH3RF2	HePP1	Fonction cardiaque ?	(C. Y. Chen et al. 2010)
SHOC2	SUR8	Effecteur M-RAS, M-RAS cible cet holoenzyme afin d'activer RAF1	(Rodriguez-Viciano et al. 2006)
SLC7A14	Solute carrier 7A14		
SLC9A1	NHE1	Régulation des échanges Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	(Misik et al. 2005)
SLC12A2	NKCC1	Transport de chlore, potassium et sodium	(Darman, Flemmer, and Forbush 2001; Gagnon et al. 2007)
SMARCB1	SNF5 OU INI1	Complexe avec PP1 et GADD34. Ciblage de PP1 au niveau des substrats potentiels associés avec le complexe hSWI/SNF	(D. Y. Wu et al. 2002)
SPATA2	SPATA2		
SPOCD1	SPOCD1		
SPRED1	SPRED1		
SPZ1	SPZ1		
SRSF10	SRp38		

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
STAU	Staufen	Translocation de l'ARNm et traduction	(Brendel et al. 2004; Monshausen et al. 2002)
SYTL2	SYTL2		
TAT p14	TAT-1	Transcription de HIV, ciblage de PP1 au noyau	(Ammosova et al. 2005; Nekhai et al. 2007)
TLX1	TCL3	Point d'arrêt du cycle cellulaire	(Riz and Hawley 2005)
TMEM132C	TMEM132C		
TMEM132D	TMEM132D		
TMEM225	TMEM225		
TNS1	Tensin 1		
TP53	P53 ou TRP53	Apoptose	(Haneda et al. 2004; Helps et al. 1995; "J. Biol. Chem.-1995-Takenaka-5405-11.pdf" n.d.; D. W.-C. Li et al. 2006)
TP53BP2	p53BP2 ou PPP1R13A	Apoptose	(Helps et al. 1995; Sullivan and Lu 2007)
TP53BP2		Apoptose	(Helps et al. 1995; Sullivan and Lu 2007)
TRA2B	TRAD2β		
TRIM28	KAP1		
TRIM42	TRIM42		
TRPC4AP	TRPC4AP		
TRPC5	TRP5		
TSC2	TSC2		
TSKS	TSKS		
UBN1	Ubinucléine 1		
URI1	URI		
VDR	Récepteur à la vitamine D	Cycle cellulaire et différenciation	(Bettoun et al. 2002, 2004)
VPS54	VPS54		
WBP11	SIPP-1 ou SNP70	Epissage	(Llorian et al. 2004, 2005)
WDR81	WDR81		

## Annexes

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Référence
WNK1	WNK1		
WWC1	KIBRA		
YLPM1	ZAP3	Fonction nucléaire	(Tran et al. 2004; Ulke-Lemée et al. 2007)
YWHAG	14-3-3 $\gamma$		
YWHAZ	14-3-3 zeta	Spermatogenèse	(Z. Huang et al. 2004; Puri et al. 2008)
ZBTB38	ZBTB38		
ZCCHC9	ZCCHC9		
ZFYVE1	ZFYVE1		
ZFYVE16	Endofine	Augmentation du recrutement de PP1 au niveau du récepteur 1 BMP	(W. Shi et al. 2007)
ZFYVE9	SARA	Augmentation du recrutement de PP1 au niveau du récepteur 1 au TGF $\beta$	(Bennett and Alpey 2002; W. Shi et al. 2004)
ZSWIM3	ZSWIM3		

## Annexes

### Annexe 2:

#### *Plasmodium falciparum* encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1: perspectives for novel anti-plasmodial therapy

Aline Fréville, Katia Cailliau-Maggio, Christine Pierrot, Géraldine Tellier, Hadidjatou Kalamou, Sophia Lafitte,  
Alain Martoriati, Raymond J Pierce, Jean-François Bodart and Jamal Khalife

Article publié en 2014





# Bibliographie



## Bibliographie

### A

- Abdi, Abdirahman, Sylvain Eschenlauer, Luc Reininger, and Christian Doerig. 2010. "SAM Domain-Dependent Activity of PfTKL3, an Essential Tyrosine Kinase-like Kinase of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(19): 3355–69.
- Adl, Sina M et al. 2007. "Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists." *Systematic biology* 56(4): 684–89.
- Adl, Sina M. et al. 2005. "The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52(5): 399–451.
- Adl, Sina M et al. 2012. "The Revised Classification of Eukaryotes." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59(5): 429–93.
- Agarwal-Mawal, Alka, and Hemant K. Paudel. 2001. "Neuronal Cdc2-like Protein Kinase (Cdk5/p25) Is Associated with Protein Phosphatase 1 and Phosphorylates Inhibitor-2." *Journal of Biological Chemistry* 276(26): 23712–18.
- Agnandji, Selidji Todagbe et al. 2011. "First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children." *The New England journal of medicine* 365(20): 1863–75.
- Agnandji, Selidji Todagbe et al. 2012. "A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants." *The New England journal of medicine* 367(24): 2284–95. Agnandji, Selidji Todagbe et al. 2014. "Efficacy and Safety of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination: A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites." *PLoS Medicine* 11(7).
- Aitken, Alastair et al. 1981. "A Specific Substrate from Rabbit Cerebellum for Guanosine-3' 25' - Monophosphate-Dependent Protein Kinase." 256(7): 3501–6.
- Ajuh, Paul M. et al. 2000. "Association of a Protein Phosphatase 1 Activity with the Human Factor C1 (HCF) Complex." *Nucleic acids research* 28(3): 678–86.
- Alessi, D. et al. 1992. "The Control of Protein Phosphatase-1 by Targetting Subunits. The Major Myosin Phosphatase in Avian Smooth Muscle Is a Novel Form of Protein Phosphatase-1." *European Journal of Biochemistry* 210(3): 1023–35.
- Allen, P B, C C Ouimet, and P Greengard. 1997. "Spinophilin, a Novel Protein Phosphatase 1 Binding Protein Localized to Dendritic Spines." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(18): 9956–61.
- Allen, Patrick B et al. 2004. "Phactrs 1-4: A Family of Protein Phosphatase 1 and Actin Regulatory Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(18): 7187–92.
- Allen, Patrick B., Young Guen Kwon, Angus C. Nairn, and Paul Greengard. 1998. "Isolation and Characterization of PNUTS, a Putative Protein Phosphatase 1 Nuclear Targeting Subunit." *Journal of Biological Chemistry* 273(7): 4089–95.
- Alonso, P.L. et al. 2004. "Efficacy of the RTS,S/AS02A Vaccine against *Plasmodium Falciparum* Infection and Disease in Young African Children: Randomised Controlled Trial." *Lancet* 364: 1411–20.
- Aly, Ahmed S I, Ashley M Vaughan, and Stefan H I Kappe. 2009. "Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host." *Annual review of microbiology* 63: 195–221.
- Amaratunga, Chanaki et al. 2012. "Artemisinin-Resistant *Plasmodium Falciparum* in Pursat Province, Western Cambodia: A Parasite Clearance Rate Study." *The Lancet. Infectious diseases* 12(11): 851–58. Amino, Rogerio et al. 2006. "Quantitative Imaging of *Plasmodium* Sporozoites in the Mammalian Host." *Comptes Rendus - Biologies* 329(11): 858–62.
- Amino, Rogerio et al. 2007. "Imaging Malaria Sporozoites in the Dermis of the Mammalian Host." *Nature protocols* 2(7): 1705–12.
- Ammosova, Tatyana et al. 2005. "Nuclear Targeting of Protein Phosphatase-1 by HIV-1 Tat Protein." *Journal of Biological Chemistry* 280(43): 36364–71.

## Bibliographie

- Anamika, N. Srinivasan, and a. Krupa. 2005. "A Genomic Perspective of Protein Kinases in *Plasmodium Falciparum*." *Proteins: Structure, Function and Genetics* 58(1): 180–89.
- Andreassen, P R, F B Lacroix, E Villa-Moruzzi, and R L Margolis. 1998. "Differential Subcellular Localization of Protein Phosphatase-1 Alpha, gamma1, and Delta Isoforms during Both Interphase and Mitosis in Mammalian Cells." *The Journal of cell biology* 141(5): 1207–15.
- Andrews, P D, and M J Stark. 2000. "Type 1 Protein Phosphatase Is Required for Maintenance of Cell Wall Integrity, Morphogenesis and Cell Cycle Progression in *Saccharomyces Cerevisiae* 1." *J.Cell Sci.* 113 ( Pt 3(0021-9533): 507–20.
- Aponte, John J. et al. 2007. "Safety of the RTS,S/AS02D Candidate Malaria Vaccine in Infants Living in a Highly Endemic Area of Mozambique: A Double Blind Randomised Controlled Phase I/IIb Trial." *Lancet* 370(9598): 1543–51.
- Ariey, Frédéric et al. 2014. "A Molecular Marker of Artemisinin-Resistant *Plasmodium Falciparum* Malaria." *Nature* 505(7481): 50–55.
- Armstrong, Christopher G., Gareth J. Browne, Philip Cohen, and Patricia T W Cohen. 1997. "PPP1R6, a Novel Member: Of the Family of Glycogen-Targetting Subunits of Protein Phosphatase 1." *FEBS Letters* 418(1-2): 210–14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01385-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01385-9).
- Asano, K et al. 1999. "Conserved Bipartite Motifs in Yeast eIF5 and eIF2Bepsilon, GTPase-Activating and GDP-GTP Exchange Factors in Translation Initiation, Mediate Binding to Their Common Substrate eIF2." *The EMBO journal* 18(6): 1673–88.
- Ascenzi, A. 1999. "Malaria Diseases and Parasites." *Parassitologia* 41(1-3): 33–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10697831> (June 30, 2015).
- Ashley, Elizabeth A et al. 2014. "Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria." *The New England journal of medicine* 371(5): 411–23.
- Ayllón, V et al. 2000. "Protein Phosphatase 1alpha Is a Ras-Activated Bad Phosphatase That Regulates Interleukin-2 Deprivation-Induced Apoptosis." *The EMBO journal* 19(10): 2237–46.
- Ayllón, Verónica et al. 2001. "Bcl-2 Targets Protein Phosphatase 1 Alpha to Bad." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166(12): 7345–52.
- Ayllón, Verónica et al. 2002. "The Anti-Apoptotic Molecules Bcl-xL and Bcl-W Target Protein Phosphatase 1α to Bad." *European Journal of Immunology* 32(7): 1847–55.
- Azevedo, Mauro F et al. 2013. "Inhibition of *Plasmodium Falciparum* CDPK1 by Conditional Expression of Its J-Domain Demonstrates a Key Role in Schizont Development." *The Biochemical journal* 452(3): 433–41.
- Azzi, Lyamine et al. 1994. "Purification of a 15-kDa cdk4- and cdk5-Binding Protein \*." 269(18): 13279–88.

## **B**

- Baer, Kerstin et al. 2007. "Release of Hepatic *Plasmodium Yoelii* Merozoites into the Pulmonary Microvasculature." *PLoS Pathogens* 3(11): 1651–68.
- Bannister, L. H. et al. 2000. "A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium Falciparum* Asexual Blood Stages." *Parasitology Today* 16(10): 427–33.
- Bansal, Abhisheka et al. 2013. "Characterization of *Plasmodium Falciparum* Calcium-Dependent Protein Kinase 1 (PFCDPK1) and Its Role in Microneme Secretion during Erythrocyte Invasion." *Journal of Biological Chemistry* 288(3): 1590–1602.
- Baragaña, Beatriz et al. 2015. "A Novel Multiple-Stage Antimalarial Agent That Inhibits Protein Synthesis." *Nature* 522(7556): 315–20.
- Bargieri, Daniel Y et al. 2013. "Apical Membrane Antigen 1 Mediates Apicomplexan Parasite Attachment but Is Dispensable for Host Cell Invasion." *Nature communications* 4: 2552.
- Barik, S. 1993. "Expression and Biochemical Properties of a Protein Serine/threonine Phosphatase Encoded by Bacteriophage Lambda." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(22): 10633–37.

## Bibliographie

- Barik, S, R E Taylor, and D Chakrabarti. 1997. "Identification, Cloning, and Mutational Analysis of the Casein Kinase 1 cDNA of the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum. Stage-Specific Expression of the Gene." *The Journal of biological chemistry* 272(42): 26132–38.
- Baruch, D I. 1999. "Adhesive Receptors on Malaria-Parasitized Red Cells." *Baillière's best practice & research. Clinical haematology* 12(4): 747–61.
- Baum, Jake, Tim Wolf Gilberger, Freddy Frischknecht, and Markus Meissner. 2008. "Host-Cell Invasion by Malaria Parasites: Insights from Plasmodium and Toxoplasma." *Trends in Parasitology* 24(12): 557–63.
- Bell, David, and Rosanna W. Peeling. 2006. "Evaluation of Rapid Diagnostic Tests: Malaria." *Nature Reviews Microbiology* 4(9): S34–38.
- Benne, R, J Edman, R R Traut, and J W Hershey. 1978. "Phosphorylation of Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(1): 108–12.
- Benne, R O B, T H E Journal, and O F Biological. 1976. "Phosphorylation."
- Bennett, Daimark, and Luke Alphey. 2002. "PP1 Binds Sara and Negatively Regulates Dpp Signaling in *Drosophila Melanogaster*." *Nature genetics* 31(4): 419–23.
- Berjanskii, Mark et al. 2012. "Resolution-by-Proxy: A Simple Measure for Assessing and Comparing the Overall Quality of NMR Protein Structures." *Journal of biomolecular NMR* 53(3): 167–80.
- Berndt, Norbert, and John W Ludlow. 2004. "Interaction between the Retinoblastoma Protein and Protein Phosphatase 1 during the Cell Cycle." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 281: 17–32.
- Bettoun, David J. et al. 2002. "A Vitamin D Receptor-Ser/Thr Phosphatase-p70 S6 Kinase Complex and Modulation of Its Enzymatic Activities by the Ligand." *Journal of Biological Chemistry* 277(28): 24847–50.
- Bettoun, David J et al. 2004. "Ligand Modulates VDR-Ser/Thr Protein Phosphatase Interaction and p70S6 Kinase Phosphorylation in a Cell-Context-Dependent Manner." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90: 195–98.
- Beullens, M, W Stalmans, and M Bollen. 1996. "Characterization of a Ribosomal Inhibitory Polypeptide of Protein Phosphatase-1 from Rat Liver." *European journal of biochemistry / FEBS* 239(1): 183–89.
- Beullens, Monique, Aleyde Van Eynde, Willy Stalmans, and Mathieu Bollen. 1992. "The Isolation of Novel Inhibitory Polypeptides of Protein Phosphatase 1 from Bovine Thymus Nuclei." *Journal of Biological Chemistry* 267(23): 16538–44.
- Bhattacharyya, Mrinal K., Zheng Hong, Darin Kongkasuriyachai, and Nirbhay Kumar. 2002. "Plasmodium Falciparum Protein Phosphatase Type 1 Functionally Complements a *glc7* Mutant in *Saccharomyces Cerevisiae*." *International Journal for Parasitology* 32(6): 739–47.
- Bibb, J a et al. 1999. "Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 Modulates Dopamine Signalling in Neurons." *Nature* 402(6762): 669–71.
- Billker, Oliver et al. 2004. "Calcium and a Calcium-Dependent Protein Kinase Regulate Gamete Formation and Mosquito Transmission in a Malaria Parasite." *Cell* 117(4): 503–14.
- Blisnick, Thierry, Laetitia Vincensini, Gamou Fall, and Catherine Braun-Breton. 2006. "Protein Phosphatase 1, a Plasmodium Falciparum Essential Enzyme, Is Exported to the Host Cell and Implicated in the Release of Infectious Merozoites." *Cellular Microbiology* 8(4): 591–601.
- Bloecher, A, and K Tatchell. 2000. "Dynamic Localization of Protein Phosphatase Type 1 in the Mitotic Cell Cycle of *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of cell biology* 149(1): 125–40.
- Bloecher, Andrew, and Kelly Tatchell. 1999. "Defects in *Saccharomyces Cerevisiae* Protein Phosphatase Type I Activate the Spindle/kinetochore Checkpoint." *Genes and Development* 13(5): 517–22.
- Bohnsack, Markus T. et al. 2002. "Exp5 Exports eEF1A via tRNA from Nuclei and Synergizes with Other Transport Pathways to Confine Translation to the Cytoplasm." *EMBO Journal* 21(22): 6205–15.

## Bibliographie

- Bojang, Kalifa a. et al. 2001. "Efficacy of RTS,S/AS02 Malaria Vaccine against Plasmodium Falciparum Infection in Semi-Immune Adult Men in The Gambia: A Randomised Trial." *Lancet* 358(9297): 1927–34.
- Bollen, M. 2001. "Combinatorial Control of Protein Phosphatase-1." *Trends in biochemical sciences* 26(7): 426–31.
- Bollen, M, and W Stalmans. 1992. "The Structure, Role, and Regulation of Type 1 Protein Phosphatases." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 27(3): 227–81.
- Bollen, Mathieu, Wolfgang Peti, Michael J. Ragusa, and Monique Beullens. 2010. "The Extended PP1 Toolkit: Designed to Create Specificity." *Trends in Biochemical Sciences* 35(8): 450–58.
- Boon-Unge, Kritsanapol et al. 2007. "Emetine Regulates the Alternative Splicing of Bcl-X through a Protein Phosphatase 1-Dependent Mechanism." *Chemistry and Biology* 14(12): 1386–92.
- Bozdech, Zbynek et al. 2003. "The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of Plasmodium Falciparum." *PLoS Biology* 1(1): 85–100.
- Brady, Matthew J., John a. Printen, Cynthia Corley Mastick, and Alan R. Saltiel. 1997. "Role of Protein Targeting to Glycogen (PTG) in the Regulation of Protein Phosphatase-1 Activity." *Journal of Biological Chemistry* 272(32): 20198–204.
- Brandt, H, S D Killilea, and E Y Lee. 1974. "Activation of Phosphorylase Phosphatase by a Novel Procedure: Evidence for a Regulatory Mechanism Involving the Release of a Catalytic Subunit from Enzyme-Inhibitor Complex(es) of Higher Molecular Weight." *Biochemical and biophysical research communications*.
- Brautigan, D L et al. 1990. "Cell Cycle Oscillation of Phosphatase Inhibitor-2 in Rat Fibroblasts Coincident with p34cdc2 Restriction." *Nature* 344(6261): 74–78.
- Brendel, Cornelia et al. 2004. "Characterization of Staufen 1 Ribonucleoprotein Complexes." *The Biochemical journal* 384(Pt 2): 239–46.
- Brichese, Laetitia, Gabrielle Cazettes, and Annie Valette. 2004. "JNK Is Associated with Bcl-2 and PP1 in Mitochondria: Paclitaxel Induces Its Activation and Its Association with the Phosphorylated Form of Bcl-2." *Cell Cycle* 3(10): 1312–19.
- Brichese, Laetitia, and Annie Valette. 2002. "PP1 Phosphatase Is Involved in Bcl-2 Dephosphorylation after Prolonged Mitotic Arrest Induced by Paclitaxel." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294(2): 504–8.
- Brown, G P et al. 2000. "Long-Term Potentiation Induced by Theta Frequency Stimulation Is Regulated by a Protein Phosphatase-1-Operated Gate." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(21): 7880–87.
- Browne, G J et al. 2001. "The Level of the Glycogen Targetting Regulatory Subunit R5 of Protein Phosphatase 1 Is Decreased in the Livers of Insulin-Dependent Diabetic Rats and Starved Rats." *The Biochemical journal* 360(Pt 2): 449–59.
- Browne, Gareth J et al. 2007. "SARP, a New Alternatively Spliced Protein Phosphatase 1 and DNA Interacting Protein." *The Biochemical journal* 402(1): 187–96.
- Brush, Matthew H, Douglas C Weiser, and Shirish Shenolikar. 2003. "Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 Alpha to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the Alpha Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2." *Molecular and cellular biology* 23(4): 1292–1303.
- Brush, Matthew H. et al. 2004. "Deacetylase Inhibitors Disrupt Cellular Complexes Containing Protein Phosphatases and Deacetylases." *Journal of Biological Chemistry* 279(9): 7685–91.
- Bu, Bettina, Christoph Kannicht, and Werner Reutter. 2005. "Novel Cytosolic Binding Partners of the Neural Cell Adhesion Molecule : Mapping." *Cloning* 2(11): 6938–47.
- Buchwald, Peter. 2010. "Small-Molecule Protein-Protein Interaction Inhibitors: Therapeutic Potential in Light of Molecular Size, Chemical Space, and Ligand Binding Efficiency Considerations." *IUBMB life* 62(10): 724–31.
- Büttner, Bettina, and Rüdiger Horstkorte. 2010. "Intracellular Ligands of NCAM." *Advances in experimental medicine and biology* 663: 55–66.

## Bibliographie

### C

- Campo, Joseph J. et al. 2014. "Duration of Vaccine Efficacy against Malaria: 5TH Year of Follow-up in Children Vaccinated with RTS,S/AS02 in Mozambique." *Vaccine* 32(19): 2209–16.
- Carr, Andrew N et al. 2002. "Type 1 Phosphatase , a Negative Regulator of Cardiac Function Type 1 Phosphatase , a Negative Regulator of Cardiac Function." *Society* 22(12): 4124–35.
- Castilho-Valavicius, B, G M Thompson, and T F Donahue. 1992. "Mutation Analysis of the Cys-X2-Cys-X19-Cys-X2-Cys Motif in the Beta Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2." *Gene expression* 2(3): 297–309.
- Castresana, J. 2000. "Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis." *Molecular biology and evolution* 17(4): 540–52.
- Caulfield, Laura E., Stephanie a. Richard, and Robert E. Black. 2004. "Undernutrition as an Underlying Cause of Malaria Morbidity and Mortality in Children Less than Five Years Old." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71(2 SUPPL.): 55–63.
- Cayla, Xavier, Alphonse Garcia, and Martin Baumgartner. 2000. "A Theileria parva Type 1 Protein Phosphatase Activity." *Molecular and Biochemical Parasitology* 110: 161–66.
- Ceulemans, Hugo, and Mathieu Bollen. 2004. "Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button." *Physiological reviews* 84(1): 1–39.
- Ceulemans, Hugo, Willy Stalmans, and Mathieu Bollen. 2002. "Regulator-Driven Functional Diversification of Protein Phosphatase-1 in Eukaryotic Evolution." *BioEssays* 24(4): 371–81.
- Chakrabarti, Debopam et al. 2002. "Protein Farnesyltransferase and Protein Prenylation in Plasmodium Falciparum." *The Journal of biological chemistry* 277(44): 42066–73.
- Chen, Chang Shi et al. 2005. "Histone Acetylation-Independent Effect of Histone Deacetylase Inhibitors on Akt through the Reshuffling of Protein Phosphatase 1 Complexes." *Journal of Biological Chemistry* 280(46): 38879–87.
- Chen, Chun Yu et al. 2010. "FLJ23654 Encodes a Heart Protein Phosphatase 1-Binding Protein (Hepp1)." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391(1): 698–702.
- Chen, Shaoyong, Cristina T. Kesler, Bryce M. Paschal, and Steven P. Balk. 2009. "Androgen Receptor Phosphorylation and Activity Are Regulated by an Association with Protein Phosphatase 1." *Journal of Biological Chemistry* 284(38): 25576–84.
- Choudhury, Goutam Ghosh et al. 2006. "C-Src Couples PI 3 kinase/Akt and MAPK Signaling to PDGF-Induced DNA Synthesis in Mesangial Cells." *Cellular Signalling* 18(11): 1854–64.
- Choy, Meng S et al. 2014. "Understanding the Antagonism of Retinoblastoma Protein Dephosphorylation by PNUITS Provides Insights into the PP1 Regulatory Code." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (19): 1–6.
- Chun, Y S et al. 1994. "PP1 Gamma 2, a Testis-Specific Protein-Serine/threonine-Phosphatase Type 1 Catalytic Subunit, Is Associated with a Protein Having High Sequence Homology with the 78-kDa Glucose-Regulated Protein, a Member of the 70-kDa Heat Shock Protein Family." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(8): 3319–23.
- Cigan, A M, E K Pabich, L Feng, and T F Donahue. 1989. "Yeast Translation Initiation Suppressor sui2 Encodes the Alpha Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2 and Shares Sequence Identity with the Human Alpha Subunit." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(8): 2784–88.
- Cohen, Justin M et al. 2013. "Rapid Case-Based Mapping of Seasonal Malaria Transmission Risk for Strategic Elimination Planning in Swaziland." *Malaria journal* 12: 61.
- Cohen, P. 1981. "The Role of Calmodulin, Troponin, and Cyclic AMP in the Regulation of Glycogen Metabolism in Mammalian Skeletal Muscle." *Advances in cyclic nucleotide research* 14: 345–59.
- Cohen. 1989. "The Structure and Regulation of Protein Phosphatases." *Annual review of biochemistry* 58: 453–508.
- Cohen, P T. 1988. "Two Isoforms of Protein Phosphatase 1 May Be Produced from the Same Gene." *FEBS letters* 232(1): 17–23.

## Bibliographie

- Cohen, Patricia T W. 2002. "Protein Phosphatase 1--Targeted in Many Directions." *Journal of cell science* 115(Pt 2): 241–56.
- Connor, J H et al. 2000. "Cellular Mechanisms Regulating Protein Phosphatase-1. A Key Functional Interaction between Inhibitor-2 and the Type 1 Protein Phosphatase Catalytic Subunit." *The Journal of biological chemistry* 275(25): 18670–75.
- Connor, John H et al. 2001. "Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Assembles a Novel Signaling Complex Containing Protein Phosphatase 1 and Inhibitor 1 Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Assembles a Novel Signaling Complex Containing Protein Phosphatase." 21(20): 6841–50.
- CORI, C F. 1945. "Enzymatic Reactions in Carbohydrate Metabolism." *Harvey lectures* 41: 253–72.
- Cowman, Alan F, Drew Berry, and Jake Baum. 2012. "The Cellular and Molecular Basis for Malaria Parasite Invasion of the Human Red Blood Cell." *The Journal of cell biology* 198(6): 961–71.
- Cowman, Alan F., and Brendan S. Crabb. 2006. "Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites." *Cell* 124(4): 755–66.
- Cox-Singh, Janet et al. 2008. "Plasmodium Knowlesi Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46(2): 165–71.
- Croci, Cristina, Heinrich Sticht, Johann Helmut Brandstätter, and Ralf Enz. 2003. "Group I Metabotropic Glutamate Receptors Bind to Protein Phosphatase 1C: Mapping and Modeling of Interacting Sequences." *Journal of Biological Chemistry* 278(50): 50682–90.
- Csortos, Csilla, and Istvan Czikora. 2008. "TIMAP Is a Positive Regulator of Pulmonary Endothelial Barrier Function." *... of Physiology-Lung ...* 295: 440–50.
- Cui, Feng, Michel Raymond, and Chuan-Ling Qiao. 2006. "Insecticide Resistance in Vector Mosquitoes in China." *Pest management science* 62(11): 1013–22.

## D

- Dabiré, Kounbobr Roch et al. 2008. "Dynamics of Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector Anopheles Gambiae in a Rice Growing Area in South-Western Burkina Faso." *Malaria journal* 7: 188.
- Dacks, Joel B., Giselle Walker, and Mark C. Field. 2008. "Implications of the New Eukaryotic Systematics for Parasitologists." *Parasitology International* 57(2): 97–104.
- Daher, Wassim et al. 2006. "Regulation of Protein Phosphatase Type 1 and Cell Cycle Progression by PfLRR1, a Novel Leucine-Rich Repeat Protein of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Molecular Microbiology* 60(3): 578–90.
- Daher, Wassim, Raymond Pierce, and Jamal Khalife. 2007. "Census, Molecular Characterization and Developmental Expression of Leucine-Rich-Repeat Proteins in Plasmodium Falciparum." *Molecular and Biochemical Parasitology* 155(2): 161–66.
- Daher, Wassim, and Dominique Soldati-Favre. 2009. "Mechanisms Controlling Glideosome Function in Apicomplexans." *Current Opinion in Microbiology* 12(4): 408–14.
- Darman, Rachel B., Andreas Flemmer, and Biff Forbush. 2001. "Modulation of Ion Transport by Direct Targeting of Protein Phosphatase Type 1 to the Na-K-Cl Cotransporter." *Journal of Biological Chemistry* 276(37): 34359–62.
- Das, S, and U Maitra. 2000. "Mutational Analysis of Mammalian Translation Initiation Factor 5 (eIF5): Role of Interaction between the Beta Subunit of eIF2 and eIF5 in eIF5 Function in Vitro and in Vivo." *Molecular and cellular biology* 20(11): 3942–50.
- Dastidar, Eeshita G et al. 2012. "Involvement of Plasmodium Falciparum Protein Kinase CK2 in the Chromatin Assembly Pathway." *BMC Biology* 10(1): 5.
- Desai, Meghna et al. 2007. "Epidemiology and Burden of Malaria in Pregnancy." *Lancet Infectious Diseases* 7(2): 93–104.

## Bibliographie

- Desdouits, F et al. 1995. "Mechanism of Inhibition of Protein Phosphatase 1 by DARPP-32: Studies with Recombinant DARPP-32 and Synthetic Peptides." *Biochemical and biophysical research communications* 206(2): 652–58.
- Dessaige, Frédéric et al. 2006. "Identification of PP1alpha as a Caspase-9 Regulator in IL-2 Deprivation-Induced Apoptosis." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177(4): 2441–51.
- Devogelaere, Benoit et al. 2007. "Protein Phosphatase-1 Is a Novel Regulator of the Interaction between IRBIT and the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor." *The Biochemical journal* 407(2): 303–11.
- Dinischiotu, Anca, Monique Beullens, Willy Stalmans, and Mathieu Bollen. 1997. "Identification of sds22 as an Inhibitory Subunit of Protein Phosphatase-1 in Rat Liver Nuclei." *FEBS Letters* 402(2-3): 141–44.
- Dobson, Sean et al. 1999. "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* 99(2): 167–81.
- Doerig, Christian et al. 2008. "Protein Kinases of Malaria Parasites: An Update." *Trends in Parasitology* 24(12): 570–77.
- Doerig, Christian et al. 2010. "Malaria: Targeting Parasite and Host Cell Kinomes." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1804(3): 604–12.
- Doerig, Christian, Oliver Billker, David Pratt, and Jane Endicott. 2005. "Protein Kinases as Targets for Antimalarial Intervention: Kinomics, Structure-Based Design, Transmission-Blockade, and Targeting Host Cell Enzymes." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1754(1-2): 132–50.
- Doerig, Christian, Jane Endicott, and Debopam Chakrabarti. 2002. "Cyclin-Dependent Kinase Homologues of Plasmodium Falciparum." In *International Journal for Parasitology*.
- Doerig, Christian, Julian C. Rayner, Artur Scherf, and Andrew B. Tobin. 2015. "Post-Translational Protein Modifications in Malaria Parasites." *Nature Reviews Microbiology*.
- Doherty, M J et al. 1995. "Amino Acid Sequence and Expression of the Hepatic Glycogen-Binding (GL)-Subunit of Protein Phosphatase-1." *FEBS letters* 375(3): 294–98.
- Doherty, Martin J., Peter R. Young, and Patricia T W Cohen. 1996. "Amino Acid Sequence of a Novel Protein Phosphatase 1 Binding Protein (R5) Which Is Related to the Liver- and Muscle-Specific Glycogen Binding Subunits of Protein Phosphatase 1." *FEBS Letters* 399(3): 339–43.
- Donahue, T F, A M Cigan, E K Pabich, and B C Valavicius. 1988. "Mutations at a Zn(II) Finger Motif in the Yeast eIF-2 Beta Gene Alter Ribosomal Start-Site Selection during the Scanning Process." *Cell* 54(5): 621–32.
- Dondorp, a M, P a Kager, J Vreeken, and N J White. 2000. "Abnormal Blood Flow and Red Blood Cell Deformability in Severe Malaria." *Parasitology today (Personal ed.)* 16(6): 228–32.
- Dondorp, Arjen M et al. 2009. "Artemisinin Resistance in Plasmodium Falciparum Malaria." *The New England journal of medicine* 361(5): 455–67.
- Dondorp, Arjen M et al. 2012. "Artemisinin Resistance in Plasmodium Falciparum Malaria." *N Engl J Med* 361(5): 455–67.
- Doonan, J H et al. 1991. "A cDNA Encoding Rabbit Muscle Protein Phosphatase 1 Alpha Complements the Aspergillus Cell Cycle Mutation, bimG11." *The Journal of biological chemistry* 266(28): 18889–94.
- Dorin-Semblat, Dominique et al. 2007. "Functional Characterization of Both MAP Kinases of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum by Reverse Genetics." *Molecular Microbiology* 65(5): 1170–80.
- Dorin-Semblat, Dominique et al. 2011. "Plasmodium Falciparum NIMA-Related Kinase Pfnek-1: Sex Specificity and Assessment of Essentiality for the Erythrocytic Asexual Cycle." *Microbiology* 157(10): 2785–94.
- Dorovini-Zis, Katerina et al. 2011. "The Neuropathology of Fatal Cerebral Malaria in Malawian Children." *American Journal of Pathology* 178(5): 2146–58.

## Bibliographie

- Doug Chung, Duk W., Nadia Ponts, Serena Cervantes, and Karine G. Le Roch. 2009. "Post-Translational Modifications in Plasmodium: More than You Think!" *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Duncan, R, and J W Hershey. 1984. "Heat Shock-Induced Translational Alterations in HeLa Cells. Initiation Factor Modifications and the Inhibition of Translation." *The Journal of biological chemistry* 259(19): 11882–89.
- Durfee, T et al. 1993. "The Retinoblastoma Protein Associates with the Protein Phosphatase Type 1 Catalytic Subunit." *Genes & development* 7(4): 555–69.
- Dvorin, Jeffrey D et al. 2010. "A Plant-like Kinase in Plasmodium Falciparum Regulates Parasite Egress from Erythrocytes." *Science (New York, N.Y.)* 328(5980): 910–12.

## E

- Eastman, Richard T., and David A. Fidock. 2009. "Artemisinin-Based Combination Therapies: A Vital Tool in Efforts to Eliminate Malaria." *Nature Reviews Microbiology* 7(12): 864–74.
- Egloff, M P, P T Cohen, P Reinemer, and D Barford. 1995. "Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Human Protein Phosphatase 1 and Its Complex with Tungstate." *Journal of molecular biology* 254(5): 942–59.
- Egloff, Marie-Pierre et al. 1997. "Structural Basis for the Recognition of Regulatory Subunits by the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 1." *The EMBO journal* 16(8): 1876–87.
- Eiteneuer, Annika et al. 2014. "Inhibitor- 3 Ensures Bipolar Mitotic Spindle Attachment by Limiting Association of SDS 22 with Kinetochores-Bound Protein Phosphatase - 1." *EMBO journal* 33(22).
- Elbadry, Maha a et al. 2013. "Survey of Plasmodium Falciparum Multidrug Resistance-1 and Chloroquine Resistance Transporter Alleles in Haiti." *Malaria journal* 12: 426.
- Eley, Helen L, Steven T Russell, and Michael J Tisdale. 2007. "Effect of Branched-Chain Amino Acids on Muscle Atrophy in Cancer Cachexia." *The Biochemical journal* 407(1): 113–20.
- Emanuele, Michael J et al. 2008. "Aurora B Kinase and Protein Phosphatase 1 Have Opposing Roles in Modulating Kinetochores Assembly." *The Journal of cell biology* 181(2): 241–54.
- Endo, S et al. 1999. "Molecular Identification of Human G-Substrate, a Possible Downstream Component of the cGMP-Dependent Protein Kinase Cascade in Cerebellar Purkinje Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(5): 2467–72.
- Enz, Ralf. 2002. "The Metabotropic Glutamate Receptor mGluR7b Binds to the Catalytic Gamma-Subunit of Protein Phosphatase 1." *Journal of neurochemistry* 81(5): 1130–40.
- Enz, Ralf et al. 2007. "The Trick of the Tail: Protein-Protein Interactions of Metabotropic Glutamate Receptors." *BioEssays* 29(1): 60–73.
- Eto, Masumi. 2009. "Regulation of Cellular Protein Phosphatase-1 (PP1) by Phosphorylation of the CPI-17 Family, C-Kinase-Activated PP1 Inhibitors." *Journal of Biological Chemistry* 284(51): 35273–77.
- Eto, Masumi, and David L. Brautigan. 2012. "Endogenous Inhibitor Proteins That Connect Ser/Thr Kinases and Phosphatases in Cell Signaling." *IUBMB Life* 64(9): 732–39.
- Eto, Masumi, Elizabeth Elliott, Todd D Prickett, and David L Brautigan. 2002. "Inhibitor-2 Regulates Protein Phosphatase-1 Complexed with NimA-Related Kinase to Induce Centrosome Separation." *The Journal of biological chemistry* 277(46): 44013–20.
- Eto, Masumi, Andrei Karginov, and David L. Brautigan. 1999. "A Novel Phosphoprotein Inhibitor of Protein Type-1 Phosphatase Holoenzymes." *Biochemistry* 38(51): 16952–57.
- Eto, Masumi, Toshio Kitazawa, and David L Brautigan. 2004. "Phosphoprotein Inhibitor CPI-17 Specificity Depends on Allosteric Regulation of Protein Phosphatase-1 by Regulatory Subunits." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(24): 8888–93.

## Bibliographie

- Eto, Masumi, Craig Leach, Nikolaos a Tountas, and David L Brautigan. 2003. "Phosphoprotein Inhibitors of Protein Phosphatase-1." *Methods in enzymology* 366: 243–60.
- Eto, Masumi, Shingo Senba, Fumi Morita, and Michio Yazawa. 1997. "Molecular Cloning of a Novel Phosphorylation-Dependent Inhibitory Protein of Protein Phosphatase-1 (CPI17) in Smooth Muscle: Its Specific Localization in Smooth Muscle." *FEBS Letters* 410(2-3): 356–60.

## F

- Fardilha, M et al. 2010. "The Physiological Relevance of Protein Phosphatase 1 and Its Interacting Proteins to Health and Disease." *Current medicinal chemistry* 17(33): 3996–4017.
- Fardilha, Margarida et al. 2004. "Alternatively Spliced Protein Variants as Potential Therapeutic Targets for Male Infertility and Contraception." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030: 468–78.
- Farkas, Ilona et al. 2007. "Arabidopsis PPP Family of Serine/threonine Phosphatases." *Trends in plant science* 12(4): 169–76.
- Feliciello, a, M E Gottesman, and E V Avvedimento. 2001. "The Biological Functions of A-Kinase Anchor Proteins." *Journal of molecular biology* 308(2): 99–114.
- Feng, J et al. 2000. "Spinophilin Regulates the Formation and Function of Dendritic Spines." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16): 9287–92.
- Florens, Laurence et al. 2002. "A Proteomic View of the Plasmodium Falciparum Life Cycle." *Nature* 419(6906): 520–26.
- Flores-Delgado, Guillermo, Cathy W Y Liu, Richard Sposto, and Norbert Berndt. 2007. "A Limited Screen for Protein Interactions Reveals New Roles for Protein Phosphatase 1 in Cell Cycle Control and Apoptosis." *Journal of Proteome Research* 6(3): 1165–75.
- Foley, Mick, and Leann Tilley. 1997. "Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance." *International Journal for Parasitology* 27(2): 231–40.
- Fresu, Marco, and Mariarita Bianchi. 2001. "Cell-Cycle-Dependent Association of Protein Phosphatase 1 and Focal Adhesion Kinase." *Biochemical ...* 414: 407–14.
- Frevert, Ute. 2004. "Sneaking in through the Back Entrance: The Biology of Malaria Liver Stages." *Trends in Parasitology* 20(9): 417–24.
- Fréville, Aline et al. 2012. "Plasmodium Falciparum Inhibitor-3 Homolog Increases Protein Phosphatase Type 1 Activity and Is Essential for Parasitic Survival." *Journal of Biological Chemistry* 287(2): 1306–21.
- Fréville, Aline et al. 2013. "Plasmodium Falciparum Encodes a Conserved Active Inhibitor-2 for Protein Phosphatase Type 1: Perspectives for Novel Anti-Plasmodial Therapy." *BMC biology*.
- Fry, A M, P Meraldi, and E A Nigg. 1998. "A Centrosomal Function for the Human Nek2 Protein Kinase, a Member of the NIMA Family of Cell Cycle Regulators." *The EMBO journal* 17(2): 470–81.

## G

- Gagnon, Kenneth B E, Roger England, Lisa Diehl, and Eric Delpire. 2007. "Apoptosis-Associated Tyrosine Kinase Scaffolding of Protein Phosphatase 1 and SPAK Reveals a Novel Pathway for Na-K-2C1 Cotransporter Regulation." *American journal of physiology. Cell physiology* 292(5): C1809–15.
- Garcia, A M et al. 1996. "Effect of Diabetes on Protein Synthesis Rate and Eukaryotic Initiation Factor Activities in the Liver of Virgin and Pregnant Rats." *Biology of the neonate* 69(1): 37–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8777248> (July 6, 2015).
- Garcia, Alphonse et al. 2003. "Serine/threonine Protein Phosphatases PP1 and PP2A Are Key Players in Apoptosis." *Biochimie* 85(8): 721–26.

## Bibliographie

- Garcia, ALphonse et al 2004. "New Insights in Protein Phosphorylation: A Signature for Protein Phosphatase 1 Interacting Proteins." *Comptes Rendus - Biologies* 327(2): 93–97.
- Gardner, Malcolm J et al. 2002. "Sequence of Plasmodium Falciparum Chromosomes 2 , 10 , 11 and 14." *October* 419(October): 531–34.
- Gardner, Malcolm J et al.2013. "Europe PMC Funders Group Genome Sequence of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." 419(6906): 3–9.
- Gardner, Malcolm J. 2001. "A Status Report on the Sequencing and Annotation of the P. Falciparum Genome." *Molecular and Biochemical Parasitology* 118(2): 133–38.
- Genoux, David et al. 2002. "Protein Phosphatase 1 Is a Molecular Constraint on Learning and Memory." *Nature* 418(6901): 970–75.
- Gething, Peter W. et al. 2011. "A New World Malaria Map: Plasmodium Falciparum Endemicity in 2010." *Malaria Journal* 10(1): 378.
- Gething, Peter W et al. 2012. "A Long Neglected World Malaria Map: Plasmodium Vivax Endemicity in 2010." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(9).
- Giovannini, Donatella et al. 2011. "Independent Roles of Apical Membrane Antigen 1 and Rhoptry Neck Proteins during Host Cell Invasion by Apicomplexa." *Cell host & microbe* 10(6): 591–602.
- Godfray, H. Charles J. 2013. "Mosquito Ecology and Control of Malaria." *Journal of Animal Ecology* 82(1): 15–25.
- Goldberg, J et al. 1995. "Three-Dimensional Structure of the Catalytic Subunit of Protein Serine/threonine Phosphatase-1." *Nature* 376(6543): 745–53.
- Gong, J. P. et al. 2005. "Mouse Brain Localization of the Protein Kinase C-Enhanced Phosphatase 1 Inhibitor KEPI (Kinase C-Enhanced PP1 Inhibitor)." *Neuroscience* 132(3): 713–27.
- Gozani, O, J G Patton, and R Reed. 1994. "A Novel Set of Spliceosome-Associated Proteins and the Essential Splicing Factor PSF Bind Stably to Pre-mRNA prior to Catalytic Step II of the Splicing Reaction." *The EMBO journal* 13(14): 3356–67.
- Graves, P, and H Gelband. 2006. "Vaccines for Preventing Malaria (SPf66)." *Cochrane database of systematic reviews (Online)* (2): CD005966.
- Green, Judith L. et al. 2008. "The Motor Complex of Plasmodium Falciparum: Phosphorylation by a Calcium-Dependent Protein Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 283(45): 30980–89.
- Greengard, Paul, Patrick B. Allen, and Angus C. Nairn. 1999. "Beyond the Dopamine Receptor: The DARPP-32/protein Phosphatase-1 Cascade." *Neuron* 23(3): 435–47.
- Grusche, Felix a et al. 2009. "Sds22, a PP1 Phosphatase Regulatory Subunit, Regulates Epithelial Cell Polarity and Shape [Sds22 in Epithelial Morphology]." *BMC developmental biology* 9: 14.
- Guergnon, Julien et al. 2006. "Use of Penetrating Peptides Interacting with PP1/PP2A Proteins as a General Approach for a Drug Phosphatase Technology." *Molecular pharmacology* 69(4): 1115–24.
- Gunawardena, Shanaka R. et al. 2008. "NOM1 Targets Protein Phosphatase I to the Nucleolus." *Journal of Biological Chemistry* 283(1): 398–404.
- Guo, Chang Y., David L. Brautigan, and James M. Larner. 2002. "Ionizing Radiation Activates Nuclear Protein Phosphatase-1 by ATM-Dependent Dephosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 277(44): 41756–61.
- Guo, Changyue, Jun Mi, David L. Brautigan, and James M. Larner. 2007. "ATM Regulates Ionizing Radiation-Induced Disruption of HDAC1:PP1:Rb Complexes." *Cellular Signalling* 19(3): 504–10.
- Guttery, David S. et al. 2014. "Genome-Wide Functional Analysis of Plasmodium Protein Phosphatases Reveals Key Regulators of Parasite Development and Differentiation." *Cell Host and Microbe* 16(1): 128–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.020>.

## H

- Hakki, Morgan, and Adam P Geballe. 2008. "Cellular Serine/threonine Phosphatase Activity during Human Cytomegalovirus Infection." *Virology* 380(2): 255–63.

## Bibliographie

- Hall, Kelly Umstott et al. 1999. "Phosphorylation-Dependent Inhibition of Protein Phosphatase-1 by G-Substrate." *274*(6): 3485–95.
- Hall, N et al. 2002. "Sequence of Plasmodium Falciparum Chromosomes 1, 3-9 and 13." *Nature* 419(6906): 527–31.
- Haneda, Masataka et al. 2004. "Protein Phosphatase 1, but Not Protein Phosphatase 2A, Dephosphorylates DNA-Damaging Stress-Induced Phospho-Serine 15 of p53." *FEBS Letters* 567(2-3): 171–74.
- Hannig, E M, A M Cigan, B A Freeman, and T G Kinzy. 1993. "GCD11, a Negative Regulator of GCN4 Expression, Encodes the Gamma Subunit of eIF-2 in Saccharomyces Cerevisiae." *Molecular and cellular biology* 13(1): 506–20.
- Harding, H P, Y Zhang, and D Ron. 1999. "Protein Translation and Folding Are Coupled by an Endoplasmic-Reticulum-Resident Kinase." *Nature* 397(6716): 271–74.
- Harding, Heather P et al. 2009. "Ppp1r15 Gene Knockout Reveals an Essential Role for Translation Initiation Factor 2 Alpha (eIF2alpha) Dephosphorylation in Mammalian Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(6): 1832–37.
- Hawass, Zahi et al. 2010. "Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family." *JAMA* 303(7): 638–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159872> (July 1, 2015).
- He, B, M Gross, and B Roizman. 1997. "The gamma(1)34.5 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Complexes with Protein Phosphatase 1alpha to Dephosphorylate the Alpha Subunit of the Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 and Preclude the Shutoff of Protein Synthesis by Double-Stranded RNA-Activa." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(3): 843–48.
- He, B et al. 1998. "The gamma134.5 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Has the Structural and Functional Attributes of a Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit and Is Present in a High Molecular Weight Complex with the Enzyme in Infected Cells." *The Journal of biological chemistry* 273(33): 20737–43.
- Heaney, Jason D. et al. 2009. "Deletion of eIF2beta Suppresses Testicular Cancer Incidence and Causes Recessive Lethality in Agouti-Yellow Mice." *Human Molecular Genetics* 18(8): 1395–1404.
- Helps, N R, H M Barker, S J Elledge, and P T Cohen. 1995. "Protein Phosphatase 1 Interacts with p53BP2, a Protein Which Binds to the Tumour Suppressor p53." *FEBS letters* 377(3): 295–300.
- Helps, N R, X Luo, H M Barker, and P T Cohen. 2000. "NIMA-Related Kinase 2 (Nek2), a Cell-Cycle-Regulated Protein Kinase Localized to Centrosomes, Is Complexed to Protein Phosphatase 1." *The Biochemical journal* 349(Pt 2): 509–18.
- Hemmings, H C, P Greengard, H Y Tung, and P Cohen. "DARPP-32, a Dopamine-Regulated Neuronal Phosphoprotein, Is a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase-1." *Nature* 310(5977): 503–5.
- Hemmings, H. C., K. R. Williams, W. H. Konigsberg, and P. Greengard. 1984. "DARPP-32, a Dopamine- and Adenosine 3':5'-Monophosphate-Regulated Neuronal Phosphoprotein. I. Amino Acid Sequence around the Phosphorylated Threonine." *Journal of Biological Chemistry* 259(23): 14486–90.
- Hendrickx, Annick et al. 2009. "Docking Motif-Guided Mapping of the Interactome of Protein Phosphatase-1." *Chemistry and Biology* 16(4): 365–71.
- Henkhaus, Rebecca S et al. 2008. "Caveolin-1-Mediated Expression and Secretion of Kallikrein 6 in Colon Cancer Cells." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 10(2): 140–48.
- Hermanson, Ola, Kristen Jepsen, and Michael G Rosenfeld. 2002. "N-CoR Controls Differentiation of Neural Stem Cells into Astrocytes." *Nature* 419(6910): 934–39.
- Heroes, Ewald et al. 2013. "The PP1 Binding Code: A Molecular-Lego Strategy That Governs Specificity." *FEBS Journal* 280(2): 584–95.
- Van der Heyde, Henri C. et al. 2006. "A Unified Hypothesis for the Genesis of Cerebral Malaria: Sequestration, Inflammation and Hemostasis Leading to Microcirculatory Dysfunction." *Trends in Parasitology* 22(11): 503–8.

## Bibliographie

- Hilioti, Zoe, and Kyle W. Cunningham. 2003. "The RCN Family of Calcineurin Regulators." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311(4): 1089–93.
- Hirano, K., M. Ito, and D. J. Hartshorne. 1995. "Interaction of the Ribosomal Protein, L5, with Protein Phosphatase Type 1." *Journal of Biological Chemistry* 270(34): 19786–90.
- Hisamoto, N, K Sugimoto, and K Matsumoto. 1994. "The Glc7 Type 1 Protein Phosphatase of *Saccharomyces Cerevisiae* Is Required for Cell Cycle Progression in G2/M." *Molecular and cellular biology* 14(5): 3158–65.
- Holm, Liisa, and Päivi Rosenström. 2010. "Dali Server: Conservation Mapping in 3D." *Nucleic Acids Research* 38(SUPPL. 2): 545–49.
- Hsu, J Y et al. 2000. "Mitotic Phosphorylation of Histone H3 Is Governed by Ipl1/aurora Kinase and Glc7/PP1 Phosphatase in Budding Yeast and Nematodes." *Cell* 102(3): 279–91.
- Huang, Ching Jung, Zhaohua Tang, Ren Jang Lin, and Philip W. Tucker. 2007. "Phosphorylation by SR Kinases Regulates the Binding of PTB-Associated Splicing Factor (PSF) to the Pre-mRNA Polypyrimidine Tract." *FEBS Letters* 581(2): 223–32.
- Huang, F L, and W Glinmann. 1976. "A Second Heat-Stable Protein Inhibitor of Phosphorylase Phosphatase from Rabbit Muscle." *FEBS letters* 62(3): 326–29.
- Huang, Fang et al. 2015. "A Single Mutation in K13 Predominates in Southern China and Is Associated with Delayed Clearance of *Plasmodium Falciparum* Following Artemisinin Treatment." *The Journal of infectious diseases*.
- Huang, Freesia L, and Walter H Glinmann. 1976. "Separation and Characterization of Two Phosphorylase Phosphatase Inhibitors from Rabbit Skeletal Muscle." *European journal of biochemistry / FEBS* 70(2): 419–26.
- Huang, H B et al. 1999. "Characterization of the Inhibition of Protein Phosphatase-1 by DARPP- 32 and Inhibitor-2." *Journal of Biological Chemistry* 274(12): 7870–78.
- Huang, H B et al. 2000. "Backbone 1H, 15N, and 13C Resonance Assignments of Inhibitor-2 -- a Protein Inhibitor of Protein Phosphatase-1." *Journal of biomolecular NMR* 17(4): 359–60.
- Huang, Hua Shan et al. 2005. "Protein Phosphatase-1 Inhibitor-3 Is Co-Localized to the Nucleoli and Centrosomes with PP1 $\gamma$ 1 and PP1 $\alpha$ , Respectively." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 443(1-2): 33–44.
- Huang, Zaohua, Kimberley Myers, Balwant Khatra, and Srinivasan Vijayaraghavan. 2004. "Protein 14-3-3zeta Binds to Protein Phosphatase PP1 $\gamma$ 2 in Bovine Epididymal Spermatozoa." *Biology of reproduction* 71(1): 177–84.
- Hubbard, Michael J., and Philip Cohen. 1993. "On Target with a New Mechanism for the Regulation of Protein Phosphorylation." *Trends in Biochemical Sciences* 18(5): 172–77.
- Huchon, D, R Ozon, and J G Demaille. 1981. "Protein Phosphatase-1 Is Involved in *Xenopus* Oocyte Maturation." *Nature* 294(5839): 358–59.
- Hurley, Thomas D et al. 2007. "Structural Basis for Regulation of Protein Phosphatase 1 by Inhibitor-2." *The Journal of biological chemistry*.
- Hyman, Richard W et al. 2002. "Sequence of *Plasmodium Falciparum* Chromosome 12." *Nature* 419(6906): 534–37.

### !

- Iakoucheva, Lilia M. et al. 2002. "Intrinsic Disorder in Cell-Signaling and Cancer-Associated Proteins." *Journal of Molecular Biology* 323(3): 573–84.
- Imwong, Mallika et al. 2003. "Novel Point Mutations in the Dihydrofolate Reductase Gene of *Plasmodium Vivax* : Evidence for Sequential Selection by Drug Pressure Novel Point Mutations in the Dihydrofolate Reductase Gene of *Plasmodium Vivax* : Evidence for Sequential Selection by Drug Pr." 47(5): 1514–21.
- Ingebritsen, T S, J G Foulkes, and P Cohen. 1980. "The Broad Specificity Protein Phosphatase from Mammalian Liver. Separation of the Mr35000 Catalytic Subunit into Two Distinct Enzymes." *FEBS Lett.* 119(1): 9–15.

## Bibliographie

- Ishino, Tomoko, Yuki Orito, Yasuo Chinzei, and Masao Yuda. 2006. "A Calcium-Dependent Protein Kinase Regulates Plasmodium Ookinete Access to the Midgut Epithelial Cell." *Molecular Microbiology* 59(4): 1175–84.
- Isozumi, Rie et al. 2015. "Novel Mutations in K13 Propeller Gene of Artemisinin-Resistant Plasmodium Falciparum." *Emerging infectious diseases* 21(3): 490–92.
- Issinger, O G, R Benne, J W Hershey, and R R Traut. 1976. "Phosphorylation in Vitro of Eukaryotic Initiation Factors IF-E2 and IF-E3 by Protein Kinases." *The Journal of biological chemistry* 251(20): 6471–74.
- Izumiyama, Shinji et al. 2009. "Plasmodium Falciparum: Development and Validation of a Measure of Intraerythrocytic Growth Using SYBR Green I in a Flow Cytometer." *Experimental parasitology* 121(2): 144–50.

## J

- "J. Biol. Chem.-1995-Takenaka-5405-11.pdf."
- Jagiello, I et al. 1997. "NIPP-1, a Nuclear Inhibitory Subunit of Protein Phosphatase-1, Has RNA-Binding Properties." *The Journal of biological chemistry* 272(35): 22067–71.
- Jagiello, I et al. 2000. "Nuclear and Subnuclear Targeting Sequences of the Protein Phosphatase-1 Regulator NIPP1." *Journal of cell science* 113 Pt 21: 3761–68.
- Janssens, V, and J Goris. 2001. "Phosphatases Implicated in Cell Growth and Signalling." *Society* 439(Pt 3): 417–39.
- Janssens, Veerle, Sari Longin, and Jozef Goris. 2008. "PP2A Holoenzyme Assembly: In Cauda Venenum (the Sting Is in the Tail)." *Trends in biochemical sciences* 33(3): 113–21.
- Jaumot, M, and J F Hancock. 2001. "Protein Phosphatases 1 and 2A Promote Raf-1 Activation by Regulating 14-3-3 Interactions." *Oncogene* 20(30): 3949–58.
- Jiang, Y, W Luo, and P H Howe. 2009. "Dab2 Stabilizes Axin and Attenuates Wnt/beta-Catenin Signaling by Preventing Protein Phosphatase 1 (PP1)-Axin Interactions." *Oncogene* 28(33): 2999–3007.
- John, Chandy C et al. 2008. "Cerebral Malaria in Children Is Associated with Long-Term Cognitive Impairment." *Pediatrics* 122(1): e92–99.
- Johnson, D F et al. 1996. "Identification of Protein-Phosphatase-1-Binding Domains on the Glycogen and Myofibrillar Targetting Subunits." *European journal of biochemistry / FEBS* 239(2): 317–25.
- Johnston, Stephanie P et al. 2006. "PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria." *J. Clin. Microbiol* 44(3): 1087–89.
- Jomaa, H et al. 1999. "Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs." *Science (New York, N.Y.)* 285(5433): 1573–76.
- Jousse, Céline et al. 2003. "Inhibition of a Constitutive Translation Initiation Factor 2 $\alpha$  Phosphatase, CREP, Promotes Survival of Stressed Cells." *Journal of Cell Biology* 163(4): 767–75.

## K

- Kantele, Anu, and T. Sakari Jokiranta. 2011. "Review of Cases with the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, Plasmodium Knowlesi." *Clinical Infectious Diseases* 52(11): 1356–62.
- Kao, Shu Chen et al. 2007. "Identification of Phostensin, a PP1 F-Actin Cytoskeleton Targeting Subunit." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356(3): 594–98.
- Katayama, Hiroshi et al. 2001. "Interaction and Feedback Regulation between STK15/BTAK/Aurora-A Kinase and Protein Phosphatase 1 through Mitotic Cell Division Cycle." *Journal of Biological Chemistry* 276(49): 46219–24.

## Bibliographie

- Katayose, Y et al. 2000. "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* 275(13): 9209–14.
- Kato, Nobutaka et al. 2008. "Gene Expression Signatures and Small-Molecule Compounds Link a Protein Kinase to Plasmodium Falciparum Motility." *Nature chemical biology* 4(6): 347–56.
- Katoh, Kazutaka, and Daron M. Standley. 2013. "MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability." *Molecular Biology and Evolution* 30(4): 772–80.
- Keeling, Patrick J. 2009. "Chromalveolates and the Evolution of Plastids by Secondary Endosymbiosis." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56(1): 1–8.
- Kelker, Matthew S. et al. 2007. "Structural Basis for Spinophilin-Neurabin Receptor Interaction." *Biochemistry* 46(9): 2333–44.
- Kepp, Oliver et al. 2009. "Disruption of the PP1/GADD34 Complex Induces Calreticulin Exposure." *Cell Cycle* 8(23): 3971–77.
- Kester, Kent E et al. 2009. "Randomized, Double-Blind, Phase 2a Trial of Falciparum Malaria Vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in Malaria-Naive Adults: Safety, Efficacy, and Immunologic Associates of Protection." *The Journal of infectious diseases* 200(3): 337–46.
- Kester, Kent E. et al. 2008. "Phase 2a Trial of 0, 1, and 3 Month and 0, 7, and 28 Day Immunization Schedules of Malaria Vaccine RTS,S/AS02 in Malaria-Naive Adults at the Walter Reed Army Institute of Research." *Vaccine* 26(18): 2191–2202.
- Kim, Kwanghee et al. 2005. "The Protein Phosphatase-1 Targeting Subunit TIMAP Regulates LAMR1 Phosphorylation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(3): 1327–34.
- Kim, Myoung H. 2008. "Protein Phosphatase 1 Activation and Alternative Splicing of Bcl-X and Mcl-1 by EGCG + Ibuprofen." *Journal of Cellular Biochemistry* 104(4): 1491–99.
- Kim, Tae Hee, Jessica Goodman, Kathryn V. Anderson, and Lee Niswander. 2007. "Phactr4 Regulates Neural Tube and Optic Fissure Closure by Controlling PP1-, Rb-, and E2F1-Regulated Cell-Cycle Progression." *Developmental Cell* 13(1): 87–102.
- Kim, Young Mi et al. 2003. "PNUTS, a Protein Phosphatase 1 (PP1) Nuclear Targeting Subunit: Characterization of Its PP1 and RNA-Binding Domains and Regulation by Phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 278(16): 13819–28.
- Koshibu, Kyoko et al. 2009. "Protein Phosphatase 1 Regulates the Histone Code for Long-Term Memory." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29(41): 13079–89.
- Kreivi, Jan Peter et al. 1997. "Purification and Characterisation of p99, a Nuclear Modulator of Protein Phosphatase 1 Activity." *FEBS Letters* 420(1): 57–62.
- Krishna, Sanjeev et al. 2006. "Re-Evaluation of How Artemisinins Work in Light of Emerging Evidence of in Vitro Resistance." *Trends in Molecular Medicine* 12(5): 200–205.
- Kumar, Rajinder et al. 2002a. "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* 1: 5.
- Kumar, Rajinder et al. 2002b. "Phosphatase ( PfPP1 ) from the Malaria Parasite , Plasmodium Interference." *Malaria Journal* 11: 1–11.
- Kwiek, Nicole C. et al. 2006. "PITK, a PP1 Targeting Subunit That Modulates the Phosphorylation of the Transcriptional Regulator hnRNP K." *Cellular Signalling* 18(10): 1769–78.
- Kwiek, Nicole C., Drew F. Thacker, and Timothy a J Haystead. 2007. "Dual Kinase-Mediated Regulation of PITK by CaMKII and GSK3." *Cellular Signalling* 19(3): 593–99.
- Kyaw, Myat P. et al. 2013. "Reduced Susceptibility of Plasmodium Falciparum to Artesunate in Southern Myanmar." *PLoS ONE* 8(3).

## Bibliographie

### L

- Landsverk, Helga B et al. 2005. "PNUTS Enhances in Vitro Chromosome Decondensation in a PP1-Dependent Manner." *The Biochemical journal* 390(Pt 3): 709–17.
- Laveran, C L. 1982. "Classics in Infectious Diseases: A Newly Discovered Parasite in the Blood of Patients Suffering from Malaria. Parasitic Etiology of Attacks of Malaria: Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922)." *Reviews of infectious diseases* 4(4): 908–11.
- Lee, Shin Jeong et al. 2009. "Langerhans Cell Protein 1 (LCP1) Binds to PNUTS in the Nucleus: Implications for This Complex in Transcriptional Regulation." *Experimental & molecular medicine* 41(3): 189–200.
- Lee, S-J et al. 2007. "Protein Phosphatase 1 Nuclear Targeting Subunit Is a Hypoxia Inducible Gene: Its Role in Post-Translational Modification of p53 and MDM2." *Cell death and differentiation* 14(6): 1106–16.
- Leroux-Roels, Geert et al. 2014. "Evaluation of the Immune Response to RTS,S/AS01 and RTS,S/AS02 Adjuvanted Vaccines: Randomized, Double-Blind Study in Malaria-Naïve Adults." *Human vaccines & immunotherapeutics* 10(8): 2211–19.
- Lesage, Bart et al. 2007. "A Complex of Catalytically Inactive Protein Phosphatase-1 Sandwiched between Sds22 and Inhibitor-3." *Biochemistry* 46(31): 8909–19.
- Lewis, Ian a. et al. 2014. "Metabolic QTL Analysis Links Chloroquine Resistance in Plasmodium Falciparum to Impaired Hemoglobin Catabolism." *PLoS Genetics* 10(1).
- Li, D W-C et al. 2006. "Protein Serine/threonine Phosphatase-1 Dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to Modulate Its Transcriptional and Apoptotic Activities." *Oncogene* 25(21): 3006–22.
- Li, Hui-Yan et al. 2008. "Deactivation of the Kinase IKK by CUEDC2 through Recruitment of the Phosphatase PP1." *Nature immunology* 9(5): 533–41.
- Li, Mingguang et al. 2006. "Phosphorylation of the Pro-X-Thr-Pro Site in Phosphatase Inhibitor-2 by Cyclin-Dependent Protein Kinase during M-Phase of the Cell Cycle." *Cellular Signalling* 18(8): 1318–26.
- Li, Mingguang, David L. Satinover, and David L. Brautigan. 2007. "Phosphorylation and Functions of Inhibitor-2 Family of Proteins." *Biochemistry* 46(9): 2380–89.
- Li, Tong, Lorraine E Chalifour, and Hemant K Paudel. 2007. "Phosphorylation of Protein Phosphatase 1 by Cyclin-Dependent Protein Kinase 5 during Nerve Growth Factor-Induced PC12 Cell Differentiation." *The Journal of biological chemistry* 282(9): 6619–28.
- Liao, H, Y Li, D L Brautigan, and G G Gundersen. 1998. "Protein Phosphatase 1 Is Targeted to Microtubules by the Microtubule-Associated Protein Tau." *The Journal of biological chemistry* 273(34): 21901–8.
- Liu, Qing Rong et al. 2002. "KEPI, a PKC-Dependent Protein Phosphatase 1 Inhibitor Regulated by Morphine." *Journal of Biological Chemistry* 277(15): 13312–20.
- Liu, Qing-Rong et al. 2004. "GBPI, a Novel Gastrointestinal- and Brain-Specific PP1-Inhibitory Protein, Is Activated by PKC and Inactivated by PKA." *The Biochemical journal* 377(Pt 1): 171–81.
- Liu, Ying, David M Virshup, and Raymond L White. 2002. "Regulation of BRCA1 Phosphorylation by Interaction with Protein Phosphatase 1 A Regulation of BRCA1 Phosphorylation by Interaction with Protein Phosphatase 1." : 6357–61.
- Liu, Ze Jun, Xin Lu, and Shan Zhong. 2005. "ASPP - Apoptotic Specific Regulator of p53." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1756(1): 77–80.
- Llanos, Susana et al. 2011. "Inhibitory Member of the Apoptosis-Stimulating Proteins of the p53 Family (iASPP) Interacts with Protein Phosphatase 1 via a Noncanonical Binding Motif." *Journal of Biological Chemistry* 286(50): 43039–44.
- Llorens, Franc et al. 2003. "Eukaryotic Translation-Initiation Factor eIF2beta Binds to Protein Kinase CK2: Effects on CK2alpha Activity." *The Biochemical journal* 375(Pt 3): 623–31.
- Llorens, Franc et al. 2005. "Cross Talk between Protein Kinase CK2 and Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF2β Subunit." *Mol. Cell. Biochem.* 274(1-2): 53–61.

## Bibliographie

- Llorens, Franc et al. 2006. "The N-Terminal Domain of the Human eIF2beta Subunit and the CK2 Phosphorylation Sites Are Required for Its Function." *The Biochemical journal* 394(Pt 1): 227–36.
- Llorian, Miriam et al. 2004. "SIPP1, a Novel Pre-mRNA Splicing Factor and Interactor of Protein Phosphatase-1." *The Biochemical journal* 378(Pt 1): 229–38.
- Llorian, Miriam et al. 2005. "Nucleocytoplasmic Shuttling of the Splicing Factor SIPP1." *Journal of Biological Chemistry* 280(46): 38862–69.
- Lou, Yang et al. 2004. "Nek2A Specifies the Centrosomal Localization of Erk2." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321(2): 495–501.
- Luo, Wen et al. 2007. "Protein Phosphatase 1 Regulates Assembly and Function of the Beta-Catenin Degradation Complex." *The EMBO journal* 26(6): 1511–21.

## M

- MacMillan, Leigh B. et al. 1999. "Brain Actin-Associated Protein Phosphatase 1 Holoenzymes Containing Spinophilin, Neurabin, and Selected Catalytic Subunit Isoforms." *Journal of Biological Chemistry* 274(50): 35845–54.
- Mamoun, C B, D J Sullivan, R Banerjee, and D E Goldberg. 1998. "Identification and Characterization of an Unusual Double Serine/threonine Protein Phosphatase 2C in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *The Journal of biological chemistry* 273(18): 11241–47.
- Marchler-Bauer, Aron et al. 2011. "CDD: A Conserved Domain Database for the Functional Annotation of Proteins." *Nucleic Acids Research* 39(SUPPL. 1): 225–29.
- Margolis, Seth S et al. 2006. "A Role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-Mediated Positive Feedback Activation of Cdc25." *Molecular biology of the cell* 17(4): 1779–89.
- Margolis, Seth S. et al. 2003. "PP1 Control of M Phase Entry Exerted through 14-3-3-Regulated Cdc25 Dephosphorylation." *EMBO Journal* 22(21): 5734–45.
- Margolis, Seth S., and Sally Kornbluth. 2004. "When the Checkpoints Have Gone: Insights into Cdc25 Functional Activation." *Cell Cycle* 3(4): 425–28.
- Martins, Yuri Chaves, and Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro. 2013. "A New Hypothesis on the Manifestation of Cerebral Malaria: The Secret Is in the Liver." *Medical Hypotheses* 81(5): 777–83.
- Martinsen, Ellen S., Susan L. Perkins, and Jos J. Schall. 2008. "A Three-Genome Phylogeny of Malaria Parasites (Plasmodium and Closely Related Genera): Evolution of Life-History Traits and Host Switches." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47(1): 261–73.
- Marx, S O et al. 2000. "PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts." *Cell* 101(4): 365–76.
- Maubert, B et al. 2000. "Cytoadherence of Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes in the Human Placenta." *Parasite immunology* 22(4): 191–99.
- Mi, Jun, Changyue Guo, David L. Brautigan, and James M. Larner. 2007. "Protein Phosphatase-1?? Regulates Centrosome Splitting through Nek2." *Cancer Research* 67(3): 1082–89.
- Miller, R L et al. 1994. "Diagnosis of Plasmodium Falciparum Infections in Mummies Using the Rapid Manual ParaSight-F Test." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88(1): 31–32.
- Mishra, S K, S Mohanty, S K Satpathy, and D N Mohapatra. 2007. "Cerebral Malaria in Adults -- a Description of 526 Cases Admitted to Ispat General Hospital in Rourkela, India." *Annals of tropical medicine and parasitology* 101(3): 187–93.
- Mishra, Sanjay, Payaningal R Somanath, Zaohua Huang, and Srinivasan Vijayaraghavan. 2003. "Binding and Inactivation of the Germ Cell-Specific Protein Phosphatase PP1gamma2 by sds22 during Epididymal Sperm Maturation." *Biology of reproduction* 69(5): 1572–79.
- Misik, Angelika J., Kathleen Perreault, Charles F B Holmes, and Larry Fliegel. 2005. "Protein Phosphatase Regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Isoform I." *Biochemistry* 44(15): 5842–52.

## Bibliographie

- Mitsuhashi, Shinya et al. 2003. "Usage of Tautomycetin, a Novel Inhibitor of Protein Phosphatase 1 (PP1), Reveals That PP1 Is a Positive Regulator of Raf-1 in Vivo." *Journal of Biological Chemistry* 278(1): 82–88.
- Miura, Kazutoyo et al. 2014. "Effect of Ingested Human Antibodies Induced by RTS, S/AS01 Malaria Vaccination in Children on Plasmodium Falciparum Oocyst Formation and Sporogony in Mosquitoes." *Malaria journal* 13(1): 263.
- Monick, Martha M et al. 2006. "Active ERK Contributes to Protein Translation by Preventing JNK-Dependent Inhibition of Protein Phosphatase 1." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177(3): 1636–45.
- Monshausen, Michaela, Monika Rehbein, Dietmar Richter, and Stefan Kindler. 2002. "The RNA-Binding Protein Staufen from Rat Brain Interacts with Protein Phosphatase-1." *Journal of Neurochemistry* 81(3): 557–64.
- Montori-Grau, Marta et al. 2007. "Expression and Glycogenic Effect of Glycogen-Targeting Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit GL in Cultured Human Muscle." *The Biochemical journal* 405(1): 107–13.
- Moorhead, Greg B G, Laura Trinkle-Mulcahy, and Annegret Ulke-Lemée. 2007. "Emerging Roles of Nuclear Protein Phosphatases." *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(3): 234–44.
- Moorhead, Greg, Deborah Johnson, Nick Morrice, and Philip Cohen. 1998. "The Major Myosin Phosphatase in Skeletal Muscle Is a Complex between the  $\gamma$ -Isoform of Protein Phosphatase 1 and the MYPT2 Gene Product." *FEBS Letters* 438(3): 141–44.
- Moorhead, Greg, Carol MacKintosh, Nick Morrice, and Philip Cohen. 1995. "Purification of the Hepatic Glycogen-Associated Form of Protein Phosphatase-1 by Microcystin-Sepharose Affinity Chromatography." *FEBS Letters* 362(2): 101–5.
- Morimoto, Hiroyuki et al. 2007. "Differential Expression of Protein Phosphatase Type 1 Isoforms and Nucleolin during Cell Cycle Arrest." *Cell Biochemistry and Function* 25(4): 369–75.
- Mukherji, Mridul et al. 2006. "Genome-Wide Functional Analysis of Human Cell-Cycle Regulators." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(40): 14819–24.
- Munro, Shonagh et al. 2005. "A Novel Glycogen-Targeting Subunit of Protein Phosphatase 1 That Is Regulated by Insulin and Shows Differential Tissue Distribution in Humans and Rodents." *FEBS Journal* 272(6): 1478–89.
- Murphy, S. C., and J. G. Breman. 2001. "GAPS in the Childhood Malaria Burden in Africa: Cerebral Malaria, Neurological Sequelae, Anemia, Respiratory Distress, Hypoglycemia, and Complications of Pregnancy." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64(1-2 SUPPL.): 57–67.
- Mutz, Diana et al. 2006. "Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 Interacts with I1PP2A/lanp and Phosphatase PP1." *Journal of neuroscience research* 84(8): 1759–70.
- Myung, Joon Mo, Patricia Marshall, and Photini Sinnis. 2004. "The Plasmodium Circumsporozoite Protein Is Involved in Mosquito Salivary Gland Invasion by Sporozoites." *Molecular and Biochemical Parasitology* 133(1): 53–59.

## N

- Nagaraj, Viswanathan Arun, Rajavel Arumugam, et al. 2009. "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*.
- Nagaraj, Viswanathan Arun, Dasari Prasad, Pundi N. Rangarajan, and Govindarajan Padmanaban. 2009. "Mitochondrial Localization of Functional Ferrochelatase from Plasmodium Falciparum." *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Nakielnny, S, D G Campbell, and P Cohen. 1991. "The Molecular Mechanism by Which Adrenalin Inhibits Glycogen Synthesis." *European journal of biochemistry / FEBS* 199(3): 713–22.

## Bibliographie

- Nekhai, Sergei, Marina Jerebtsova, Angela Jackson, and William Southerland. 2007. "Regulation of HIV-1 Transcription by Protein Phosphatase 1." *Current HIV research* 5(1): 3–9.
- Nicolaou, Persoulla, Roger J. Hajjar, and Evangelia G. Kranias. 2009. "Role of Protein Phosphatase-1 Inhibitor-1 in Cardiac Physiology and Pathophysiology." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47(3): 365–71.
- Noedl, Harald et al. 2008. "Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia." *The New England journal of medicine* 359(24): 2619–20.
- Nunes, Marta C. et al. 2010. "Plasmodium Falciparum Fick Kinase Members Target Distinct Components of the Erythrocyte Membrane." *PLoS ONE* 5(7): 1–8.
- Nunes, Marta C., J. P Dean Goldring, Christian Doerig, and Artur Scherf. 2007. "A Novel Protein Kinase Family in Plasmodium Falciparum Is Differentially Transcribed and Secreted to Various Cellular Compartments of the Host Cell." *Molecular Microbiology* 63(2): 391–403.
- Nutt, Leta K et al. 2009. "Metabolic Control of Oocyte Apoptosis Mediated by 14-3-3zeta-Regulated Dephosphorylation of Caspase-2." *Developmental cell* 16(6): 856–66.

## O

- O'Connell, Nichole et al. 2012. "The Molecular Basis for Substrate Specificity of the Nuclear NIPP1:PP1 Holoenzyme." *Structure* 20(10): 1746–56.
- Ohashi, S et al. 2006. "Phospho-Regulation of Human Protein Kinase Aurora-A: Analysis Using Anti-Phospho-Thr288 Monoclonal Antibodies." *Oncogene* 25(59): 7691–7702.
- Ohkura, H, and M Yanagida. 1991. "S. Pombe Gene sds22+ Essential for a Midmitotic Transition Encodes a Leucine-Rich Repeat Protein That Positively Modulates Protein Phosphatase-1." *Cell* 64(1): 149–57.
- Okamoto, Ryuji et al. 2006. "Characterization and Function of MYPT2, a Target Subunit of Myosin Phosphatase in Heart." *Cellular Signalling* 18(9): 1408–16.
- Onwuamaegbu, M E, M Henein, and a J Coats. 2004. "Cachexia in Malaria and Heart Failure: Therapeutic Considerations in Clinical Practice." *Postgraduate medical journal* 80(949): 642–49.
- Osawa, Y et al. 1996. "Identification and Characterization of Three Isoforms of Protein Phosphatase Inhibitor-2 and Their Expression Profiles during Testis Maturation in Rats." *European journal of biochemistry / FEBS* 242(3): 793–98.
- Ouattara, Amed et al. 2015. "Polymorphisms in the K13-Propeller Gene in Artemisinin-Susceptible Plasmodium Falciparum Parasites from Bougoula-Hameau and Bandiagara, Mali." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 92(6): 1202–6.

## P

- Pandey, Rajan et al. 2014. "Genome Wide in Silico Analysis of Plasmodium Falciparum Phosphatome." : 1–22.
- Parija, S C, and I Praharaj. "Drug Resistance in Malaria." *Indian journal of medical microbiology* 29(3): 243–48.
- Park, In Kyung, and Anna a. DePaoli-Roach. 1994. "Domains of Phosphatase Inhibitor-2 Involved in the Control of the ATP-Mg-Dependent Protein Phosphatase." *Journal of Biological Chemistry* 269(46): 28919–28.
- Partnership, S Clinical Trials. 2015. "Efficacy and Safety of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine with or without a Booster Dose in Infants and Children in Africa: Final Results of a Phase 3, Individually Randomised, Controlled Trial." *The Lancet* 6736(15).
- Pasder, O et al. 2006. "Downregulation of Fer Induces PP1 Activation and Cell-Cycle Arrest in Malignant Cells." *Oncogene* 25(30): 4194–4206.
- Patel, K G, C Liu, P L Cameron, and R S Cameron. 2001. "Myr 8, a Novel Unconventional Myosin Expressed during Brain Development Associates with the Protein Phosphatase Catalytic

## Bibliographie

- Subunits 1alpha and 1gamma1." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(20): 7954–68.
- Patton, James G et al. 1993. "Cloning and Characterization of PSF , a Novel Pre-mRNA Splicing Factor." 35: 393–406.
- Pedelini, Leda et al. 2007. "YPI1 and SDS22 Proteins Regulate the Nuclear Localization and Function of Yeast Type 1 Phosphatase Glc7." *Journal of Biological Chemistry* 282(5): 3282–92.
- Peggie, Mark W et al. 2002. "Essential Functions of Sds22p in Chromosome Stability and Nuclear Localization of PP1." *Journal of cell science* 115(Pt 1): 195–206.
- Perry, R L S et al. 2009. "Direct Interaction between Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) and Protein Phosphatase 1alpha Represses MEF2-Dependent Gene Expression." *Molecular and cellular biology* 29(12): 3355–66.
- Peti, Wolfgang, Angus C Nairn, and Rebecca Page. 2012. "Folding of Intrinsically Disordered Protein Phosphatase 1 Regulatory Proteins." *Current physical chemistry* 2(1): 107–14.
- Peti, Wolfgang, Angus C. Nairn, and Rebecca Page. 2013. "Structural Basis for Protein Phosphatase 1 Regulation and Specificity." *FEBS Journal* 280(2): 596–611.
- Peti, Wolfgang, and Rebecca Page. 2015. "Strategies to Make Protein Serine/Threonine (PP1, Calcineurin) and Tyrosine Phosphatases (PTP1B) Druggable: Achieving Specificity by Targeting Substrate and Regulatory Protein Interaction Sites." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23(12): 2781–85.
- Philip, Nisha, Heli J. Vaikkinen, Laurence Tetley, and Andrew P. Waters. 2012. "A Unique Kelch Domain Phosphatase in Plasmodium Regulates ookinete Morphology, Motility and Invasion." *PLoS ONE* 7(9).
- Phyo, Aung Pyae et al. 2012. "Emergence of Artemisinin-Resistant Malaria on the Western Border of Thailand: A Longitudinal Study." *The Lancet*.
- Pihan, Emilie et al. 2015. "Computational and Biophysical Approaches to Protein-Protein Interaction Inhibition of Plasmodium Falciparum AMA1/RON2 Complex." *Journal of computer-aided molecular design* 29(6): 525–39.
- Pino, Paco et al. 2012a. "A Tetracycline-Repressible Transactivator System to Study Essential Genes in Malaria Parasites." *Cell Host & Microbe* 12(6): 824–34.
- Pinsky, B. A. et al. 2006. "Glc7/Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunits Can Oppose the Ipl1/Aurora Protein Kinase by Redistributing Glc7." *Molecular and Cellular Biology* 26(7): 2648–60.
- Polanowska-Grabowska, R et al. 1997. "Platelet Adhesion to Collagen under Flow Causes Dissociation of a Phosphoprotein Complex of Heat-Shock Proteins and Protein Phosphatase 1." *Blood* 90(4): 1516–26.
- Posch, Markus et al. 2010. "Sds22 Regulates Aurora B Activity and Microtubule-Kinetochores Interactions at Mitosis." *Journal of Cell Biology* 191(1): 61–74.
- Pp, Phosphatases et al. 2003. "Caveolin-1 Maintains Activated Akt in Prostate Cancer Cells through Scaffolding Domain Binding Site Interactions with and Inhibition of Serine / Threonine Protein Kinase." *Society* 23(24): 9389–9404.
- Printen, J a, M J Brady, and a R Saltiel. 1997. "PTG, a Protein Phosphatase 1-Binding Protein with a Role in Glycogen Metabolism." *Science (New York, N.Y.)* 275(5305): 1475–78.
- Puri, Pawan, Kimberley Myers, Douglas Kline, and Srinivasan Vijayaraghavan. 2008. "Proteomic Analysis of Bovine Sperm YWHA Binding Partners Identify Proteins Involved in Signaling and Metabolism." *Biology of reproduction* 79(6): 1183–91.

## Q

- Quevedo, Celia, Matilde Salinas, and Alberto Alcázar. 2003. "Initiation Factor 2B Activity Is Regulated by Protein Phosphatase 1, Which Is Activated by the Mitogen-Activated Protein Kinase-

## Bibliographie

Dependent Pathway in Insulin-like Growth Factor 1-Stimulated Neuronal Cells." *The Journal of biological chemistry* 278(19): 16579–86.

### R

- Radel, C, and V Rizzo. 2005. "Integrin Mechanotransduction Stimulates Caveolin-1 Phosphorylation and Recruitment of Csk to Mediate Actin Reorganization." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288(2): H936–45.
- Rao, Radhakrishna. 2009. "Occludin Phosphorylation in Regulation of Epithelial Tight Junctions." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165: 62–68.
- Reininger, Luc et al. 2011. "An Essential Aurora-Related Kinase Transiently Associates with Spindle Pole Bodies during Plasmodium Falciparum Erythrocytic Schizogony." *Molecular Microbiology* 79(1): 205–21.
- Riedmann, Eva M. 2014. "Human Vaccines & Immunotherapeutics: News." *Human vaccines & immunotherapeutics* 10(5): 1139–42. Riz, Irene, and Robert G Hawley. 2005. "G1/S Transcriptional Networks Modulated by the HOX11/TLX1 Oncogene of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Oncogene* 24(36): 5561–75.
- Rodriguez, Patricia, Bryan Mitton, Jason R. Waggoner, and Evangelia G. Kranias. 2006. "Identification of a Novel Phosphorylation Site in Protein Phosphatase Inhibitor-1 as a Negative Regulator of Cardiac Function." *Journal of Biological Chemistry* 281(50): 38599–608.
- Rodriguez-Viciano, Pablo et al. 2006. "A Phosphatase Holoenzyme Comprised of Shoc2/Sur8 and the Catalytic Subunit of PP1 Functions as an M-Ras Effector to Modulate Raf Activity." *Molecular Cell* 22(2): 217–30.
- Rogers, William O et al. 2009. "Failure of Artesunate-Mefloquine Combination Therapy for Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria in Southern Cambodia." *Malaria journal* 8: 10.
- Rogerson, Stephen J. et al. 2007. "Malaria in Pregnancy: Pathogenesis and Immunity." *Lancet Infectious Diseases* 7(2): 105–17.
- Rojas, Margarito, Anne-Claude Gingras, and Thomas E. Dever. 2014. "Protein Phosphatase PP1/GLC7 Interaction Domain in Yeast eIF2 $\gamma$  Bypasses Targeting Subunit Requirement for eIF2 $\alpha$  Dephosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(14): E1344–53..
- Rojas-Rivero, L et al. 1992. "Mefloquine-Halofantrine Cross-Resistance in Plasmodium Falciparum Induced by Intermittent Mefloquine Pressure." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 47(3): 372–77.
- Rose, Melanie et al. 2008. "PNUTS Forms a Trimeric Protein Complex with GABAC Receptors and Protein Phosphatase 1." *Molecular and Cellular Neuroscience* 37(4): 808–19.

### S

- Sá, Juliana Martha et al. 2009. "Geographic Patterns of Plasmodium Falciparum Drug Resistance Distinguished by Differential Responses to Amodiaquine and Chloroquine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(45): 18883–89.
- Sacarlal, Jahit et al. 2009. "Long-Term Safety and Efficacy of the RTS,S/AS02A Malaria Vaccine in Mozambican Children." *The Journal of infectious diseases* 200(3): 329–36.
- Sagara, Junji et al. 2003. "Scapinin, a Putative Protein Phosphatase-1 Regulatory Subunit Associated with the Nuclear Nonchromatin Structure." *Journal of Biological Chemistry* 278(46): 45611–19.
- Sagara, Junji, Toshiaki Arata, and Shunichiro Taniguchi. 2009. "Scapinin, the Protein Phosphatase 1 Binding Protein, Enhances Cell Spreading and Motility by Interacting with the Actin Cytoskeleton." *PLoS ONE* 4(1).
- Sangrador, A et al. 1998. "Growth Arrest of Schizosaccharomyces Pombe Following Overexpression of Mouse Type 1 Protein Phosphatases." *Molecular & general genetics : MGG* 259(5): 449–56.

## Bibliographie

- Sankaran, Satish, Donna E. Crone, Robert E. Palazzo, and Jeffrey D. Parvin. 2007a. "Aurora-A Kinase Regulates Breast Cancer-Associated Gene 1 Inhibition of Centrosome-Dependent Microtubule Nucleation." *Cancer Research* 67(23): 11186–94.
- Sankaran et al. 2007b. "BRCA1 Regulates  $\Gamma$ -Tubulin Binding to Centrosomes." *Cancer Biology and Therapy* 6(12): 1853–57.
- Santra, Manoranjan et al. 2009. "NIH Public Access." *October* 108(1): 231–45.
- Sarrouilhe, D., a. di Tommaso, T. Métoyé, and V. Ladeveze. 2006. "Spinophilin: From Partners to Functions." *Biochimie* 88(9): 1099–1113.
- Satinover, David L, Craig a Leach, P Todd Stukenberg, and David L Brautigan. 2004. "Activation of Aurora-A Kinase by Protein Phosphatase Inhibitor-2, a Bifunctional Signaling Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(23): 8625–30.
- Satinover, David L., David L. Brautigan, and P. Todd Stukenberg. 2006. "Aurora-A Kinase and Inhibitor-2 Regulate the Cyclin Threshold for Mitotic Entry in Xenopus Early Embryonic Cell Cycles." *Cell Cycle* 5(19): 2268–74.
- Sato, Ko et al. 2007. "Regulation of Membrane Association and Kinase Activity of Cdk5-p35 by Phosphorylation of p35." *Journal of neuroscience research* 85(14): 3071–78.
- Sato, Shigeharu. 2011. "The Apicomplexan Plastid and Its Evolution." *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(8): 1285–96.
- Schillace, Robynn V., and John D. Scott. 1999. "Association of the Type 1 Protein Phosphatase PP1 with the A-Kinase Anchoring Protein AKAP220." *Current Biology* 9(6): 321–24.
- Schneider, Achim G, and Odile Mercereau-Puijalon. 2005. "A New Apicomplexa-Specific Protein Kinase Family: Multiple Members in Plasmodium Falciparum, All with an Export Signature." *BMC genomics* 6: 30.
- Seth, Ankur, Parimal Sheth, Bertha C. Elias, and Radhakrishna Rao. 2007. "Protein Phosphatases 2A and 1 Interact with Occludin and Negatively Regulate the Assembly of Tight Junctions in the CACO-2 Cell Monolayer." *Journal of Biological Chemistry* 282(15): 11487–98.
- Shi, Weibin et al. 2004. "GADD34-PP1c Recruited by Smad7 Dephosphorylates TGF $\beta$  Type I Receptor." *Journal of Cell Biology* 164(2): 291–300.
- Shi, Weibin et al. 2007. "Endofin Acts as a Smad Anchor for Receptor Activation in BMP Signaling." *Journal of cell science* 120(Pt 7): 1216–24.
- Shi, Yongsheng, and James L. Manley. 2007. "A Complex Signaling Pathway Regulates SRp38 Phosphorylation and Pre-mRNA Splicing in Response to Heat Shock." *Molecular Cell* 28(1): 79–90.
- Shima, H et al. 1993. "Identification of PP1 Catalytic Subunit Isoforms PP1 Gamma 1, PP1 Delta and PP1 Alpha in Various Rat Tissues." *Biochemical and biophysical research communications* 192(3): 1289–96.
- Shirato, H. et al. 2000. "Identification and Characterization of a Novel Protein Inhibitor of Type 1 Protein Phosphatase." *Biochemistry* 39(45): 13848–55.
- Shmueli, Anat et al. 2006. "Site-Specific Dephosphorylation of Doublecortin (DCX) by Protein Phosphatase 1 (PP1)." *Molecular and Cellular Neuroscience* 32(1-2): 15–26.
- Siden-Kiamos, Inga et al. 2006. "Plasmodium Berghei Calcium-Dependent Protein Kinase 3 Is Required for Ookinete Gliding Motility and Mosquito Midgut Invasion." *Molecular Microbiology* 60(6): 1355–63.
- Sidhu, Amar Bir Singh, Stephanie Gaw Valderramos, and David a. Fidock. 2005. "pfmdr1 Mutations Contribute to Quinine Resistance and Enhance Mefloquine and Artemisinin Sensitivity in Plasmodium Falciparum." *Molecular Microbiology* 57(4): 913–26.
- Singh, Balbir et al. 2004. "A Large Focus of Naturally Acquired Plasmodium Knowlesi Infections in Human Beings." *Lancet* 363(9414): 1017–24.
- Sinha, Shweta, Bikash Medhi, and Rakesh Sehgal. 2014. "Challenges of Drug-Resistant Malaria." *Parasite* 21: 61.
- Skinner, Jeffrey a, and Alan R Saltiel. 2001. "Subunit of Protein Phosphatase 1." 267: 257–67.

## Bibliographie

- Slater, a F. 1993. "Chloroquine: Mechanism of Drug Action and Resistance in Plasmodium Falciparum." *Pharmacology & therapeutics* 57(2-3): 203–35.
- Snounou, G, S Viriyakosol, X P Zhu, et al. 1993. "High Sensitivity of Detection of Human Malaria Parasites by the Use of Nested Polymerase Chain Reaction." *Molecular and biochemical parasitology* 61(2): 315–20.
- Snounou, G, S Viriyakosol, W Jarra, et al. 1993. "Identification of the Four Human Malaria Parasite Species in Field Samples by the Polymerase Chain Reaction and Detection of a High Prevalence of Mixed Infections." *Molecular and biochemical parasitology* 58(2): 283–92.
- Snow, Robert W., Eline L. Korenromp, and Eleanor Gouws. 2004. "Pediatric Mortality in Africa: Plasmodium Falciparum Malaria as a Cause or Risk?" *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71(2 SUPPL.): 16–24.
- Sokabe, Masaaki et al. 2006. "Structure of Archaeal Translational Initiation Factor 2 Betagamma-GDP Reveals Significant Conformational Change of the Beta-Subunit and Switch 1 Region." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(35): 13016–21.
- Solyakov, Lev et al. 2011. "Global Kinomic and Phospho-Proteomic Analyses of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Nature Communications* 2: 565.
- Srinivasan, Prakash et al. 2011. "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* 108(32): 13275–80.
- Steen, R L, and P Collas. 2001. "Mistargeting of B-Type Lamins at the End of Mitosis: Implications on Cell Survival and Regulation of Lamins A/C Expression." *The Journal of cell biology* 153(3): 621–26.
- Steen, Rikke L et al. 2003. "AKAP149 Is a Novel PP1 Specifier Required to Maintain Nuclear Envelope Integrity in G1 Phase." *Journal of cell science* 116(Pt 11): 2237–46.
- Steen, Rikke L., Sandra B. Martins, Kjetil Taskén, and Philippe Collas. 2000. "Recruitment of Protein Phosphatase 1 to the Nuclear Envelope by A-Kinase Anchoring Protein AKAP149 Is a Prerequisite for Nuclear Lamina Assembly." *Journal of Cell Biology* 150(6): 1251–61.
- Stone, E M, H Yamano, N Kinoshita, and M Yanagida. 1993. "Mitotic Regulation of Protein Phosphatases by the Fission Yeast sds22 Protein." *Current biology : CB* 3(1): 13–26.
- Sueyoshi, Tatsuya, Rick Moore, Junko Sugatani, and Yonehiro Matsumura. 2008. "PPP1R16A , The Membrane Subunit of Protein Phosphatase 1<sup>α</sup> , Signals Nuclear Translocation of the Nuclear Receptor Constitutive Active / Androstane Receptor." 73(4): 1113–21.
- Sugiyama et al. 2002. "Aurora-B Associated Protein Phosphatases as Negative Regulators of Kinase Activation." *Oncogene* 21(20): 3103–11.
- Sullivan, a, and X Lu. 2007. "ASPP: A New Family of Oncogenes and Tumour Suppressor Genes." *British journal of cancer* 96(2): 196–200.
- Suzuki, Yoichi et al. 2001. "Insulin Control of Glycogen Metabolism in Knockout Mice Lacking the Muscle-Specific Protein Phosphatase PP1G / R GL." *Society* 21(8): 2683–94.
- Svenningsson, Per et al. 2004. "DARPP-32: An Integrator of Neurotransmission." *Annual review of pharmacology and toxicology* 44: 269–96.
- Svenningsson, Per, Angus C Nairn, and Paul Greengard. 2005. "DARPP-32 Mediates the Actions of Multiple Drugs of Abuse." *The AAPS journal* 7(2): E353–60.

## I

- Takahashi, Mikiko et al. 1999. "Characterization of a Novel Giant Scaffolding Protein, CG-NAP, That Anchors Multiple Signaling Enzymes to Centrosome and the Golgi Apparatus." *Journal of Biological Chemistry* 274(24): 17267–74.
- Takala-Harrison, S. et al. 2014. "Independent Emergence of Artemisinin Resistance Mutations Among Plasmodium Falciparum in Southeast Asia." *Journal of Infectious Diseases* 211.

## Bibliographie

- Takemiya, Atsushi, Chie Ariyoshi, and Ken-Ichiro Shimazaki. 2009. "Identification and Functional Characterization of Inhibitor-3, a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 in Plants." *Plant physiology* 150(1): 144–56.
- Talevich, Eric, Amar Mirza, and Natarajan Kannan. 2011. "Structural and Evolutionary Divergence of Eukaryotic Protein Kinases in Apicomplexa." *BMC Evolutionary Biology* 11(1): 321.
- Talman, Arthur M et al. 2004. "Gametocytogenesis: The Puberty of Plasmodium Falciparum." *Malaria journal* 3: 24.
- Tamrakar, S, and J W Ludlow. 2000. "The Carboxyl-Terminal Region of the Retinoblastoma Protein Binds Non-Competitively to Protein Phosphatase Type 1alpha and Inhibits Catalytic Activity." *The Journal of biological chemistry* 275(36): 27784–89.
- Tamura, Koichiro et al. 2013. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0." *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–29.
- Tan, I, C H Ng, L Lim, and T Leung. 2001. "Phosphorylation of a Novel Myosin Binding Subunit of Protein Phosphatase 1 Reveals a Conserved Mechanism in the Regulation of Actin Cytoskeleton." *The Journal of biological chemistry* 276(24): 21209–16.
- Tan, Seng Lai et al. 2002. "The Direct Binding of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 1 to the PKR Protein Kinase Is Necessary but Not Sufficient for Inactivation and Disruption of Enzyme Dimer Formation." *Journal of Biological Chemistry* 277(39): 36109–17.
- Tang, Xi et al. 2008. "A Novel ATM-Dependent Pathway Regulates Protein Phosphatase 1 in Response to DNA Damage." *Molecular and cellular biology* 28(8): 2559–66.
- Tanji, Chie et al. 2002. "A-Kinase Anchoring Protein AKAP220 Binds to Glycogen Synthase Kinase-3β (GSK-3β) and Mediates Protein Kinase A-Dependent Inhibition of GSK-3β." *Journal of Biological Chemistry* 277(40): 36955–61.
- Tanuma, Nobuhiro et al. 2008. "Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase-1 (NIPP1) Directs Protein Phosphatase-1 (PP1) to Dephosphorylate the U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle (snRNP) Component, Spliceosome-Associated Protein 155 (Sap155)." *Journal of Biological Chemistry* 283(51): 35805–14.
- Terentyev, Dmitry et al. 2003. "Protein Phosphatases Decrease Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content by Stimulating Calcium Release in Cardiac Myocytes." *The Journal of physiology* 552(Pt 1): 109–18.
- Terrak, Mohammed et al. 2004. "Structural Basis of Protein Phosphatase 1 Regulation." *Nature* 429(6993): 780–84.
- Terry-Lorenzo, Ryan T. et al. 2000. "Neurofilament-L Is a Protein Phosphatase-1-Binding Protein Associated with Neuronal Plasma Membrane and Post-Synaptic Density." *Journal of Biological Chemistry* 275(4): 2439–46.
- Terry-Lorenzo, Ryan T., Elizabeth Elliot, et al. 2002. "Neurabins Recruit Protein Phosphatase-1 and Inhibitor-2 to the Actin Cytoskeleton." *Journal of Biological Chemistry* 277(48): 46535–43.
- Terry-Lorenzo, Ryan T., Leigh C. Carmody, et al. 2002. "The Neuronal Actin-Binding Proteins, Neurabin I and Neurabin II, Recruit Specific Isoforms of Protein Phosphatase-1 Catalytic Subunits." *Journal of Biological Chemistry* 277(31): 27716–24.
- Tewari, Rita et al. 2010. "The Systematic Functional Analysis of Plasmodium Protein Kinases Identifies Essential Regulators of Mosquito Transmission." *Cell Host and Microbe* 8(4): 377–87.
- Thompson, Larry J, Mathieu Bollen, P Fields, and Alan P Fields. 1997. "Identification of Protein Phosphatase 1 as a Mitotic Lamin Phosphatase Identification of Protein Phosphatase 1 as a Mitotic Lamin Phosphatase \*." *The Journal of Biological Chemistry* 272(47): 29693–97.
- Ting, N S et al. 1998. "DNA-Dependent Protein Kinase Interacts with Antigen Receptor Response Element Binding Proteins NF90 and NF45." *The Journal of biological chemistry* 273(4): 2136–45.
- Toole, Barry J., and Patricia T W Cohen. 2007. "The Skeletal Muscle-Specific Glycogen-Targeted Protein Phosphatase 1 Plays a Major Role in the Regulation of Glycogen Metabolism by Adrenaline in Vivo." *Cellular Signalling* 19(5): 1044–55.

## Bibliographie

- Tountas, Nikolaos a., James W. Mandell, Allen D. Everett, and David L. Brautigan. 2004. "Juxtamembrane Localization of the Protein Phosphatase-1 Inhibitor Protein PHI-1 in Smooth Muscle Cells." *Histochemistry and Cell Biology* 121(4): 343–50.
- Trager, W, and J B Jensen. 1976. "Human Malaria Parasites in Continuous Culture." *Science (New York, N.Y.)* 193(4254): 673–75.
- Trager, William. 2005. "What Triggers the Gametocyte Pathway in Plasmodium Falciparum? [1]." *Trends in Parasitology*.
- Tran, Hue T et al. 2004. "Proteomic Characterization of Protein Phosphatase Complexes of the Mammalian Nucleus." *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3(3): 257–65.
- Traweger, Andreas et al. 2008. "Protein Phosphatase 1 Regulates the Phosphorylation State of the Polarity Scaffold Par-3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(30): 10402–7.
- Treeck, Moritz, John L. Sanders, Joshua E. Elias, and John C. Boothroyd. 2011. "The Phosphoproteomes of Plasmodium Falciparum and Toxoplasma Gondii Reveal Unusual Adaptations within and beyond the Parasites' Boundaries." *Cell Host and Microbe* 10(4): 410–19.
- Trinkle-Mulcahy, L et al. 1999. "Nuclear Organisation of NIPP1, a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 That Associates with Pre-mRNA Splicing Factors." *Journal of cell science* 112 ( Pt 2: 157–68.
- Trinkle-Mulcahy, Laura et al. 2006. "Repo-Man Recruits PP1?? To Chromatin and Is Essential for Cell Viability." *Journal of Cell Biology* 172(5): 679–92.
- Tsaytler, Pavel, Heather P Harding, David Ron, and Anne Bertolotti. 2011. "Selective Inhibition of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Restores Proteostasis." *Science (New York, N.Y.)* 332(6025): 91–94.
- Tung, H Y, W Wang, and C S Chan. 1995. "Regulation of Chromosome Segregation by Glc8p, a Structural Homolog of Mammalian Inhibitor 2 That Functions as Both an Activator and an Inhibitor of Yeast Protein Phosphatase 1." *Molecular and cellular biology* 15(11): 6064–74.
- Tuteja, Renu. 2007. "Malaria - An Overview." *FEBS Journal* 274(18): 4670–79.

## U

- Udho, Eshwar, Vivienne C. Tedesco, Adam Zygmunt, and Nancy a. Krucher. 2002. "PNUTS (phosphatase Nuclear Targeting Subunit) Inhibits Retinoblastoma-Directed PP1 Activity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297(3): 463–67.
- Ulke-Lemée, Annegret et al. 2007. "The Nuclear PP1 Interacting Protein ZAP3 (ZAP) Is a Putative Nucleoside Kinase That Complexes with SAM68, CIA, NF110/45, and HNRNP-G." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1774(10): 1339–50.
- Umlas, J, and J N Fallon. 1971. "New Thick-Film Technique for Malaria Diagnosis. Use of Saponin Stromatolytic Solution for Lysis." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 20(4): 527–29.

## V

- Vagnarelli, Paola et al. 2009. "UKPMC Funders Group Chromosome Architecture during Mitosis." *Cell* 8(10): 1133–42.
- Vandomme, Audrey et al. 2014. "PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator of Plasmodium Falciparum: Identification of Its Residues Involved in Binding to and Activation of PP2A." *International Journal of Molecular Sciences* 15(2): 2431–53.
- Vaucel, M, and Y Féron. "[Introduction into the French Language of the Word 'Paludisme']." *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales* 61(4): 585–96.

## Bibliographie

- Vereshchagina, Natalia et al. 2004. "The Essential Role of PP1beta in Drosophila Is to Regulate Nonmuscle Myosin." *Molecular biology of the cell* 15(10): 4395–4405.
- Vernes, A et al. 1984. "Plasmodium Falciparum Strain-Specific Human Antibody Inhibits Merozoite Invasion of Erythrocytes." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 33(2): 197–203.
- Vicogne, Jerome et al. 2004. "Conservation of Epidermal Growth Factor Receptor Function in the Human Parasitic Helminth Schistosoma Mansoni." *The Journal of biological chemistry* 279(36): 37407–14.
- Vietri, Michele et al. 2006. "Direct Interaction between the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 1 and pRb." *Cancer cell international* 6: 3.
- Vulliez-Le Normand, Brigitte et al. 2012. "Structural and Functional Insights into the Malaria Parasite Moving Junction Complex." *PLoS Pathogens* 8(6).

## W

- Wakula, Paulina et al. 2003. "Degeneracy and Function of the Ubiquitous RVXF Motif That Mediates Binding to Protein Phosphatase-1." *Journal of Biological Chemistry* 278(21): 18817–23.
- Wakula, Paulina et al. 2006. "The Translation Initiation Factor eIF2beta Is an Interactor of Protein Phosphatase-1." *The Biochemical journal* 400(2): 377–83.
- Waller, R F et al. 1998. "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* 95(21): 12352–57.
- Wang, Geqing et al. 2014. "Molecular Insights into the Interaction between Plasmodium Falciparum Apical Membrane Antigen 1 and an Invasion-Inhibitory Peptide." *PloS one* 9(10): e109674.
- Wang, Hong, and David L. Brautigan. 2002. "A Novel Transmembrane Ser/Thr Kinase Complexes with Protein Phosphatase-1 and Inhibitor-2." *Journal of Biological Chemistry* 277(51): 49605–12.
- Wang, Rong, Aseem Kaul, and Ann O Sperry. 2010. "TLRR (Irrc67) Interacts with PP1 and Is Associated with a Cytoskeletal Complex in the Testis." *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 102(3): 173–89.
- Wang, Rong, and Ann O Sperry. 2008. "Identification of a Novel Leucine-Rich Repeat Protein and Candidate PP1 Regulatory Subunit Expressed in Developing Spermatids." *BMC cell biology* 9: 9.
- Wang, Weiping, Claire Cronmiller, and David L. Brautigan. 2008. "Maternal Phosphatase Inhibitor-2 Is Required for Proper Chromosome Segregation and Mitotic Synchrony during Drosophila Embryogenesis." *Genetics* 179(4): 1823–33.
- Wang, Weiping, P Todd Stukenberg, and David L Brautigan. 2008. "Phosphatase Inhibitor-2 Balances Protein Phosphatase 1 and Aurora B Kinase for Chromosome Segregation and Cytokinesis in Human Retinal Epithelial Cells." *Molecular biology of the cell* 19(11): 4852–62.
- Wang, Xiaojian et al. 2008. "IPP5, a Novel Protein Inhibitor of Protein Phosphatase 1, Promotes G1/S Progression in a Thr-40-Dependent Manner." *The Journal of biological chemistry* 283(18): 12076–84.
- Ward, Pauline, Leila Equinet, Jeremy Packer, and Christian Doerig. 2004. "Protein Kinases of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum: The Kinome of a Divergent Eukaryote." *BMC genomics* 5: 79.
- Watanabe, Ryosuke et al. 2007. "GADD34 Inhibits Mammalian Target of Rapamycin Signaling via Tuberous Sclerosis Complex and Controls Cell Survival under Bioenergetic Stress." *International journal of molecular medicine* 19(3): 475–83. .
- "Welsh, 1994.pdf."
- Westphal, R S et al. 1999. "Regulation of NMDA Receptors by an Associated Phosphatase-Kinase Signaling Complex." *Science (New York, N.Y.)* 285(5424): 93–96.
- White, Nicholas J. 2004a. "Antimalarial Drug Resistance." *The Journal of clinical investigation* 113(8): 1084–92.

## Bibliographie

- White, Nicholas J et al. 2009. "Hyperparasitaemia and Low Dosing Are an Important Source of Anti-Malarial Drug Resistance." *Malaria journal* 8: 253.
- White, Nicholas J, Gareth D H Turner, Nicholas P J Day, and Arjen M Dondorp. 2013. "Lethal Malaria: Marchiafava and Bignami Were Right." *The Journal of infectious diseases* 208(2): 192–98.
- Wilkes, Jonathan M, and Christian Doerig. 2008. "The Protein-Phosphatome of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *BMC genomics* 9: 412.
- Wongsrichanalai, Chansuda, Amy L Pickard, Walther H Wernsdorfer, and Steven R Meshnick. 2002. "Epidemiology of Drug-Resistant Malaria." *The Lancet. Infectious diseases* 2(4): 209–18.
- Woodrow, C J, and S Krishna. 2006. "Antimalarial Drugs: Recent Advances in Molecular Determinants of Resistance and Their Clinical Significance." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63(14): 1586–96.
- World Health Organization. 2013. "Malaria."
- World Health Organization. 2014. "Malaria." : 165–76.
- Wu, Daniel Y., Douglas C. Tkachuck, Rachel S. Roberson, and William H. Schubach. 2002. "The Human SNF5/INI1 Protein Facilitates the Function of the Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein (GADD34) and Modulates GADD34-Bound Protein Phosphatase-1 Activity." *Journal of Biological Chemistry* 277(31): 27706–15.
- Wu, Wenjuan et al. 2007. "Alternative Splicing Controls Nuclear Translocation of the Cell Cycle-Regulated Nek2 Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 282(36): 26431–40.

## Y

- Yamauchi Lucy M., L. M., Alida Coppi, Georges Snounou, and Photini Sinnis. 2007. "Plasmodium Sporozoites Trickle out of the Injection Site." *Cellular Microbiology* 9(5): 1215–22.
- Yanagihori, Satoko et al. 2006. "Protein Phosphatase Regulation by PRIP, a PLC-Related Catalytically Inactive Protein-Implications in the Phospho-Modulation of the GABAA Receptor." *Advances in Enzyme Regulation* 46(1): 203–22.
- Yang, Heping et al. 2004. "S-Adenosylmethionine and Its Metabolite Induce Apoptosis in HepG2 Cells: Role of Protein Phosphatase 1 and Bcl-x(S)." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 40(1): 221–31.
- Yatime, Laure, Yves Mechulam, Sylvain Blanquet, and Emmanuelle Schmitt. 2007. "Structure of an Archaeal Heterotrimeric Initiation Factor 2 Reveals a Nucleotide State between the GTP and the GDP States." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(47): 18445–50.
- Yokoyama, D et al. 1998. "Modulation of the Growth of *Plasmodium Falciparum* in Vitro by Protein Serine/threonine Phosphatase Inhibitors." *Biochemical and biophysical research communications* 247(1): 18–23.
- Yoshida, Kenichi et al. 1999. "BH-Protocadherin-C, a Member of the Cadherin Superfamily, Interacts with Protein Phosphatase 1 Alpha through Its Intracellular Domain." *FEBS Letters* 460(1): 93–98.
- Yoshimura, Kenji et al. 2001. "Interaction of p130 With, and Consequent Inhibition Of, the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 1 $\alpha$ ." *Journal of Biological Chemistry* 276(21): 17908–13.
- Yu, Young M. et al. 2008. "A PP1-Binding Motif Present in BRCA1 Plays a Role in Its DNA Repair Function." *International Journal of Biological Sciences* 4(6): 352–61.
- Yuda, Masao, and Tomoko Ishino. 2004. "Liver Invasion by Malarial Parasites - How Do Malarial Parasites Break through the Host Barrier?" *Cellular Microbiology* 6(12): 1119–25.

## Z

- Zeng, Qiyang et al. 2009. "Effect of IPP5, a Novel Inhibitor of PP1, on Apoptosis and the Underlying Mechanisms Involved." *Biotechnology and applied biochemistry* 54(4): 231–38.
- Zhang, Cuizhu et al. 2008. "A Conserved Domain of Herpes Simplex Virus ICP34.5 Regulates Protein Phosphatase Complex in Mammalian Cells." *FEBS Letters* 582(2): 171–76.

## Bibliographie

- Zhang, J, L Zhang, S Zhao, and E Y Lee. 1998. "Identification and Characterization of the Human HCG V Gene Product as a Novel Inhibitor of Protein Phosphatase-1." *Biochemistry* 37(47): 16728–34.
- Zhang, Lifang, Zhiqing Qi, Yan Gao, and E. Y C Lee. 2008a. "Identification of the Interaction Sites of Inhibitor-3 for Protein Phosphatase-1." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377(2): 710–13.
- Zhang, Lifang, Zhiqing Qi, Yan Gao, and Ernest Y C Lee. 2008b. "Identification of the Interaction Sites of Inhibitor-3 for Protein Phosphatase-1." *Biochemical and biophysical research communications* 377(2): 710–13.
- Zhang, Min et al. 2010. "The Plasmodium Eukaryotic Initiation Factor-2alpha Kinase IK2 Controls the Latency of Sporozoites in the Mosquito Salivary Glands." *The Journal of experimental medicine* 207(7): 1465–74.
- Zhao, S, N R Brandt, a H Caswell, and E Y Lee. 1998. "Binding of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase-1 to the Ryanodine-Sensitive Calcium Release Channel Protein." *Biochemistry* 37(51): 18102–9.
- Zhao, Sumin, and Ernest Y C Lee. 1997. "Targeting of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase-1 to the Glycolytic Enzyme Phosphofructokinase." *Biochemistry* 36(27): 8318–24.

