



**HAL**  
open science

# Métacaspases : cibles thérapeutiques contre le paludisme

Fatimata Sow

► **To cite this version:**

Fatimata Sow. Métacaspases : cibles thérapeutiques contre le paludisme. Parasitologie. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1275 . tel-01497431

**HAL Id: tel-01497431**

**<https://theses.hal.science/tel-01497431>**

Submitted on 28 Mar 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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1275

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale** N° accréditation  
**ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE**

**Spécialité de doctorat** : Micro-organismes, interactions, infections  
**Discipline** : Parasitologie

Soutenance publique le 09/12/2016  
Par

**Fatimata SOW**

---

# **Métacaspases : Cibles thérapeutiques contre le Paludisme**

---

Devant le jury composé de :

CARLO Severini, Research Director Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italie	Rapporteur
BASCO Leonardo, HDR, Faculté de Médecine la Timone, Marseille, France	Rapporteur
DREYFUSS Gilles, Professeur, Faculté de Médecine, Limoges, France	Rapporteur
DARDE Marie-Laure, Professeur, Faculté de Médecine, Limoges, France	Examinatrice
NUSHIN Aghajari, HDR, IBCP, Lyon, France	Examinatrice
BALLUT Lionel, Maitre de conférences, HDR, IBCP, Lyon, France	Examinateur
BIENVENU Anne-Lise, PharmD, PhD, UCBL, Lyon, France	Examinatrice
PICOT Stéphane, HDR, PhD, UCBL, Lyon, France	Directeur de thèse

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	M. le Professeur Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

### COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G. RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

### COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E. PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

## RESUME

Le paludisme reste une des principales causes de mortalité infantile dans le monde tropical. L'émergence continue des résistances du parasite aux anti-paludiques constitue un sérieux problème de santé publique. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, basée sur une connaissance plus approfondie des mécanismes moléculaires de la vie du parasite, est une nécessité permanente dans un paradigme de « reine rouge » qui s'applique parfaitement à la capacité d'adaptation du parasite. La découverte récente d'une métacaspase de *Plasmodium falciparum* (PfMCA1) et la mise en évidence de son rôle potentiel dans l'apoptose du parasite, fait qu'elle est une cible thérapeutique contre le paludisme. Dans le but de mieux approfondir les connaissances sur cette protéine cible, nous avons voulu, dans un premier temps, déterminer la structure tridimensionnelle de PfMCA1, afin de confirmer les différentes structures prédites *in silico*, et chercher de nouvelles molécules candidates par le docking moléculaire. Cependant cet objectif n'a pas pu être atteint, à cause d'un phénomène d'autoclivage de la protéine suite à son expression, ce qui fait que nous n'avons pas réussi à récupérer la protéine. Dans un second temps, nous avons étudié la métacaspase de *Plasmodium vivax* (PvMCA1) en comparaison avec PfMCA1, et nous avons montré que les résidus histidine et cystéine dans la dyade catalytique sont bien conservés. Nous avons identifié un deuxième site potentiel dans le domaine catalytique de PvMCA1. A partir d'échantillons collectés en Mauritanie, au Soudan et à Oman, nous avons montré que les résidus histidine et cystéine, ainsi que les résidus du second site du domaine catalytique de PvMCA1 sont très variables. Les mutations de ces résidus doivent faire l'objet d'une étude approfondie de leurs effets sur la fonction de la protéine PvMCA1. Ce polymorphisme trouvé dans les résidus catalytiques de PvMCA1 doit être évalué comme marqueur moléculaire de résistance.

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie le bon Dieu de m'avoir donné la santé, la patience, le courage et la motivation d'achever ce travail dans de bonnes conditions.

Je remercie mes parents, ma tendre et douce mère Ada Amadou Sow et mon père, Abdoulaye Sow pour leurs soutiens continus dans mes études. Et toute ma famille, pour leurs contributions, leur soutien moral et leurs encouragements.

### **Je remercie d'avance mes rapporteurs et le jury de ma thèse de leur accord**

M. Carlo SEVERINI

M. Leonardo BASCO

M. Gilles DREYFUSS

Mme Marie-Laure DARDE

M. Aghajari NUSHIN

M. Lionel BALLUT

Mme Anne-Lise BIENVENU

Je remercie tous mes professeurs de Limoges, qui m'ont accepté dans cette passionnante formation de Neuroépidémiologie et Parasitologie Tropicale et qui m'ont permis de poursuivre cette passionnante recherche sur le paludisme.

### **A monsieur le Professeur Gilles Dreyfus**

Mes sincères remerciements à mon professeur Gilles Dreyfuss, de son aide à me mettre en contact avec le Professeur Stéphane Picot lors de la recherche du stage en master 2.

### **Mon histoire avec le paludisme, est une longue histoire, mais je vais en raconter un peu.**

Je suis originaire de Rosso Mauritanie, une ville située au Sud de la capitale du pays (Nouakchott), où les moustiques sont toujours présents. Nous étions habitués à des piqûres de moustiques dès le coucher du soleil, on se plaignait souvent des maux de tête, qu'on attribuait au paludisme. Ayant grandi dans cet environnement, où je voyais que cette maladie constituait un problème majeur de santé publique, c'est là où le souhait et le désir de poursuivre mes études sur la thématique du paludisme grandissaient et de pouvoir apporter une contribution dans la lutte contre cette maladie. Lorsque j'ai eu l'opportunité d'aller poursuivre mes études

en France, j'avais toujours ce souhait en esprit. Ce qui fait que j'étais très contente de faire la formation de Neuroépidémiologie et Parasitologie Tropicale à Limoges, où j'ai dit « j'ai enfin trouvé mon chemin », je ne peux pas décrire ma joie à cet instant-là.

Je suis allée voir le Professeur Gilles Dreyfuss, pour lui expliquer, mon souhait de vouloir travailler sur le paludisme, pour le stage du Master 2. C'est là qu'il m'a parlé de l'équipe du Professeur Stéphane Picot à Lyon.

### **A mon Monsieur le Professeur Stéphane Picot**

Je remercie infiniment mon directeur de thèse, Stéphane Picot, d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire pour le stage du Master 2 et de la poursuite en thèse. Je ne peux exprimer par mot les qualités humaines que vous avez. Mais, j'ai appris de vous le sens de la patience et de l'indulgence. Tout au long de cette thèse, votre clairvoyance, votre rigueur scientifique, vos précieux conseils et de votre constante disponibilité m'ont permis d'atteindre ce niveau. Sans oublier la confiance que vous m'avez accordée durant tous mes travaux au sein du laboratoire. Merci également de votre précieuse aide pour la mission de recherche en Mauritanie. Et, bien-sûr le sens de l'humour et de la taquinerie. Je remercie beaucoup Madame Anne-Lise Bienvenu de sa gentillesse et de ses invitations à partager des repas.

### **J'adresse mes remerciements :**

A Adeline Lavoignat, et à Guillaume Bonnot, de l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé à mon arrivée au laboratoire, et de m'avoir formée sur les diverses techniques. Un grand merci également à Adeline Lavoignat de m'avoir aidée dans la mise en forme du mémoire et pour ses conseils. Je remercie Régine Ferreira de bien s'occuper de toutes les démarches administratives et pour ses encouragements. A Benoit Meslin et Karim Traoré pour leurs encouragements.

### **Un grand merci à l'équipe IBCP**

Je remercie M. Lionel Ballut et Loïc Carrique pour leur collaboration dans le projet de la métacaspase de *Plasmodium falciparum*.

Je remercie beaucoup Sally Soumaré pour la relecture du mémoire et de ses corrections, ainsi que Souleymane Sow.

### **J'adresse aussi mes vifs remerciements**

A mes compatriotes qui m'ont bien accueillie dans les différents hôpitaux lors de la mission de recherche en Mauritanie. Je tiens d'abord à remercier Fatimata Diagana, de m'avoir mise en contact avec les personnels de santé à Nouakchott. Aux personnels des différents hôpitaux qui ont aidé à la collecte des échantillons :

A Dr Hachim Kebe d'avoir aidé à rencontrer les personnels à l'hôpital Cheikh Zayed.

A Dr Sidi Mohamed Diagana, le chef du laboratoire de l'hôpital Cheikh Zayed, pour ses conseils et son aide.

A M. Bilal Rabah pour sa disponibilité dans l'aide de la collecte des échantillons.

A Mohamedou Koita, de nous avoir donné le méthanol pour réaliser les frottis sanguins.

A Fatou Gaye, au Centre Santé de Teyarett, d'avoir beaucoup aidé dans la collecte des échantillons.

A Dr. Moussa Camara, d'avoir aidé de la collecte des échantillons à l'hôpital de Rosso Mauritanie.

A Mamadou Dieye, Chef du laboratoire au centre de santé de Rosso, pour son soutien et sa disponibilité pour la collecte des échantillons.

A Malado Ba, de sa précieuse aide dans le besoin des matériaux nécessaires pour le stage.

A ma cousine Binta Sow, de m'avoir accompagnée dans les différents hôpitaux à Nouakchott.

A ma sœur Binta Sow aussi de m'avoir aidée dans la collecte des échantillons à l'hôpital de Rosso.

**Je tiens également à remercier** particulièrement mon oncle Mamadou Bachir Sow, mes tantes Aminata Hawa Sow, Ramata Billa Sow et Coumba Sow pour leur soutien financier et moral durant mes études en France. A ma copine Hadidja Mbae, Habibatou Mamadou Sow et son mari Bakri Kane. A Yero Sow, Abou Bakri Ba, Abdoul Dia, Yacoub Diallo, pour leurs encouragements. A mes cousines et cousins, Fatou Sow, Mamy Sall, Bébé Sow, Gogou Sall, Amadou Sow, Abdoulaye Sow, Mohamed Sow. A mes amis de Lyon, Fatimata Diagana, Mariem Fade, Djeinaba Corera, Mamy Camara, Zeina Diakité, Fatima Touré, Macina Diagne, Babacar Thiombane, Ahmed Maguèye Guèye, Abdel, Yacoub Diagana, Ngagne, Demba Diop.

Enfin, je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## TABLE DES MATIERES

<b>RESUME.....</b>	<b>3</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....</b>	<b>14</b>
<b>I. Epidémiologie du paludisme à travers le monde .....</b>	<b>17</b>
<b>II. Données bibliographiques sur le paludisme .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Agents du paludisme .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Vecteurs du paludisme.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3. Biologie .....</b>	<b>24</b>
2.3.1. Le cycle de développement des <i>Plasmodium</i> .....	24
2.3.1.1. Chez L'homme (hôte intermédiaire) .....	24
a. Schizogonie pré-érythrocytaire.....	24
b. Schizogonie érythrocytaire.....	24
2.3.1.2 Chez le moustique (hôte définitif).....	25
<b>2.4. Phylum Apicomplexa des <i>Plasmodium</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5. Physiopathologie du paludisme à <i>P. falciparum</i>.....</b>	<b>28</b>
2.5.1. Anémie paludéenne sévère .....	28
2.5.2. Neuropaludisme.....	28
2.5.3. Détresse respiratoire .....	29
<b>2.6. Traitements du paludisme .....</b>	<b>30</b>
<b>III. Chimiorésistance de <i>P. falciparum</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Les anciens antipaludiques .....</b>	<b>32</b>
3.1.1. Mode d'actions des anti-paludiques .....	33
a. Schizonticides sanguins.....	33
b. Mécanisme de résistance et marqueurs moléculaires des amino-4 quinoléines.....	34
c. Mécanisme d'action de l'artémisinine .....	35
d. Les inhibiteurs de la synthèse des métabolites.....	35

<b>3.2. Artémisinine et ses dérivés dans le traitement du paludisme .....</b>	<b>36</b>
3.2.1. Emergence de la résistance des parasites aux ACTs .....	37
3.2.2. Les marqueurs moléculaires de la résistance aux ACTs .....	38
<b>IV. Découverte de l'apoptose chez les organismes unicellulaires .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Mort cellulaire et classification .....</b>	<b>41</b>
4.1.1. Apoptose.....	42
4.1.1.1. La voie extrinsèque de l'apoptose .....	43
4.1.1.2. La voie intrinsèque de l'apoptose.....	44
<b>4.2. Les caspases .....</b>	<b>46</b>
4.2.1. La structure des caspases.....	47
4.2.2. Activation protéolytique des caspases.....	48
<b>4.3. Les orthologues des caspases .....</b>	<b>50</b>
<b>V. Génome de <i>Plasmodium falciparum</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1. Transcriptomes de <i>P. falciparum</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2. Protéome de <i>P. falciparum</i> .....</b>	<b>55</b>
5.2.1. Protéases à cystéine de <i>P. falciparum</i> .....	58
5.2.1.1. Les inhibiteurs des protéases à cystéine .....	59
<b>5.2.2. Les métacaspases .....</b>	<b>61</b>
5.2.2.1. La structure des métacaspases.....	62
5.2.2.2. Identification de Métacaspases chez certains organismes unicellulaires .....	63
5.2.2.2.1. Métacaspase 1 de <i>S. cerevisiae</i> (Yca1).....	63
5.2.2.2.2. Métacaspases chez la plante <i>A. thaliana</i> .....	64
5.2.2.2.3. Métacaspase chez <i>T. brucei</i> .....	64
5.2.2.2.4. Métacaspase chez <i>Leishmania major</i> .....	65
5.2.2.2.5. Métacaspase de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	65
5.2.2.2.6. Métacaspases des <i>Plasmodium</i> .....	65
5.2.2.2.6.1. Métacaspase 1 de <i>Plasmodium falciparum</i> (PfMCA1) cible thérapeutique contre le paludisme .....	67

<b>VI. Docking Moléculaire et Criblage à Grande Echelle (VHTS : Virtual High Throughput Screening)</b> .....	<b>68</b>
<b>6.1. MMV (Medicines for Malaria Venture)</b> .....	<b>68</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>69</b>
<b>Partie I</b> .....	<b>69</b>
<b>1. Recherche de nouveaux anti-paludiques en vue de l'étude de leur mécanisme d'action</b> ..	<b>69</b>
1.1. Modélisation virtuelle de la structure 3D de la PfMCA1 de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	69
1.1.1. Matériels .....	69
1.1.2. Méthodes .....	71
1.1.2.1. Culture <i>in vitro</i> des clones de <i>P. falciparum</i> .....	71
1.1.2.2 Tests <i>in vitro</i> de sensibilité .....	71
Résultats .....	72
<b>2. Déterminer la structure tridimensionnelle (3D) de la métacaspase 1 de <i>Plasmodium falciparum</i> (PfMCA1)</b> .....	<b>73</b>
2.1. Matériels.....	73
2.2. Méthodes .....	73
2.2.1. Extraction de l'ADN génomique (ADNg) de <i>P. falciparum</i> .....	73
2.2.2. Amplification du gène PfMCA1 par la PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) .....	73
2.2.3. Clonage du gène PfMCA1 dans le vecteur pET-Duet-1 .....	74
2.2.3.1. Double digestion de PfMCA1 et du vecteur pET-Duet-1 .....	74
2.2.3.2. Ligation de l'insert (PfMCA1) dans le vecteur (pET-Duet-1) .....	74
2.2.4. Transformation des bactéries Top 10 avec le produit de ligation.....	74
2.2.5. Purification des vecteurs par mini-prep ou maxi-prep .....	74
2.2.6. Transformation des bactéries Rosetta2 avec le vecteur recombinant (pET-Duet-1).....	75
2.2.7. Production de la protéine PfMCA1 chez les bactéries Rosetta2 .....	75
2.2.8. Optimisation du gène PfMCA1 .....	75
2.2.9. Surexpression de la protéine PfMCA1 optimisé .....	75
2.2.9.1. Détermination de la solubilité de la protéine de PfMCA1 .....	76
2.2.9.2. Analyse par SDS-PAGE.....	76

2.2.9.3. Analyse par Western-blot .....	76
Résultats .....	77
<b>Article 1 de revue : <i>Plasmodium falciparum</i> meurt-il par apoptose ? .....</b>	<b>79</b>
<b>Partie II .....</b>	<b>86</b>
<b>Article 2 .....</b>	<b>88</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>1. Etude de l'activité antipaludique des molécules candidates .....</b>	<b>98</b>
<b>2. Difficulté dans la détermination de la structure tridimensionnelle de PfMCA1 .....</b>	<b>98</b>
<b>3. Mission de recherche en Mauritanie.....</b>	<b>100</b>
3.1. Etude de la conservation du gène de la métacaspase entre différents isolats de <i>P. falciparum</i> ..	100
3.2. Etude du domaine catalytique du gène de la métacaspase entre différentes espèces de <i>Plasmodium</i> .....	101
<b>4. Etude du domaine catalytique de la métacaspase 1 de <i>P. vivax</i> .....</b>	<b>101</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>103</b>
<b>Stage de recherche en Mauritanie .....</b>	<b>103</b>
Questionnaire de recueil d'informations des patients impaludés .....	103
Rapport de mission de recherche.....	103
<b>Présentation d'un poster lors de la 21<sup>ème</sup> Journée Scientifique de L'EDISS.....</b>	<b>103</b>
<b>Etude d'un cas clinique de Mycétome chez une patiente Mauritanienne .....</b>	<b>103</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>121</b>

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

### FIGURES

1.	Répartition du paludisme dans le monde	19
2.	Cycle de vie des <i>Plasmodium</i>	26
3.	Structure d'un mérozoïte	27
4.	Observation d'un gamétoocyte femelle du clone 3D7 de <i>P. falciparum</i>	27
5.	Formation des rosettes entre les globules rouges parasités et les globules rouges non-parasités	30
6.	Distribution géographique de la résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques	39
7.	Différents types de mort cellulaire selon la classification de NCCD	42
8.	Voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose à caspase dépendante	44
9.	Structure de la famille des caspases	47
10.	Structure primaire d'une procaspase	48
11.	Topologie et structure d'un dimère de la caspase 7	48
12.	Représentation schématique des caractéristiques structurales des caspases de mammifère, et le processus de la maturation des caspases	49
13.	Structure de la poche S1 de l'enzyme (caspase 7)	50
14.	Organisation synthétique des gènes de métacaspase de <i>Plasmodium</i>	54
15.	Niveau d'expression des gènes de différents stades du cycle de vie du clone 3D7 de <i>P. falciparum</i>	55
16.	Profil des protéines exprimées durant les différents stades du cycle de <i>P. falciparum</i>	56
17.	Représentation architecturale des domaines protéiques de <i>Plasmodium</i>	58
18.	Différents clans et familles des protéases à cystéine	59
19.	Représentation schématique des propriétés structurales des caspases, métacaspases et paracaspases	63
20.	Représentation schématique des protéines de PxMC1, PxMC2, et PxMC3 des <i>Plasmodium</i> ( <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. berghei</i> )	66

### TABLEAUX

1.	Classification taxonomique des espèces de <i>Plasmodium</i>	22
2.	Classification taxonomique des moustiques	23
3.	Médicaments anti-paludiques dans le traitement du paludisme sévère et non-complicé à <i>P. falciparum</i>	31
4.	Résumé des différents types de mort cellulaire	45
5.	Protéome des différents stades de cycle de vie de <i>P. falciparum</i>	57
6.	Résultats des tests in-vitro de sensibilité	72
7.	Nombre d'échantillons de paludisme collectés en Mauritanie	87

## LISTE DES ABBREVIATIONS

ACD : Mort Cellulaire Accidentelle	IGF1R: Insulin-like growth factor 1 receptor
ACT: Artemisinin-based combination therapy	IPTG: isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
ADN: Acide désoxyribonucléique	LC3: Light Chain 3 from microtubule associated protein
AIP1: Atrophin-Interacting protein 1	MAPK: Mitogen-activated protein Kinase
ART: Artémisinine	Mb: Mégabase
Atg: Autophagocytose gene	MCA: Métacaspase
BET: Bromure d'éthidium	MEC: Matrice Extra-Cellulaire
BID: Domain Death Agonist	MIM: Membrane Interne de la mitochondrie
Caspases (C)	MR4: Malaria Research and Reference Reagent
CED-3: Cell Death gene-3	MMV: Medicines for Malaria Venture
CI <sub>50</sub> : Concentration inhibitrice à 50%	NCCD: Nomenclature Committee on Cell Death
CQ: Chloroquine	OMD: Objectifs du Millénaire pour le Développement
c-FLIP proteins: cellular FLICE-inhibitory proteins	OMS: Organisation Mondiale de la Santé
CARD: Caspase Recruitment Domain	<i>P</i> : <i>Paracaspase</i>
CLAG: Cytoadherence-linked asexual gene family	<i>P. falciparum</i> : <i>Plasmodium falciparum</i>
DD: Death Domain	<i>P. vivax</i> : <i>Plasmodium vivax</i>
DED: Death Effector Domain	<i>P. ovale</i> : <i>Plasmodium ovale</i>
DISC : Complexe de Signalisation Induisant la Mort	<i>P. malariae</i> : <i>Plasmodium malariae</i>
DR: Death Receptor	<i>P. knowlesi</i> : <i>Plasmodium knowlesi</i>
FPN: Faible poids à la naissance	<i>P. reichenowi</i> : <i>Plasmodium reichenowi</i>
Fr: France	<i>P. yoelii</i> : <i>Plasmodium yoelii</i>
GMCSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor	Pb: Paire de base
GR: Globule rouge	PC: Paracaspase
HGT : Transfère horizontal de gène	PS : Phosphatidylsérines
IAPs: Inhibitor of apoptosis	PCD : « Programmed cell death »
ICE: Interleukin-1 $\beta$ Converting Enzyme	

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PS : Phosphatidylsérine

TBE : Tris-borate-EDTA

RCD : Mort Cellulaire Régulée

RIP1: Receptor interacting protein 1

Rpm: Rotation per minute

ROS: Reactive Oxygen Species

SERA: Serine-rich antigen

SDS- PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide

TBE: Tris, Borate, EDTA

TbMCA2: Métacaspase 2 de *Trypanosoma brucei*

TG: Triglycérides

TLR: Toll-Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor1

UV: Ultra-violet

YCA1 : Métacaspase de la levure *Saccaromyces cerevisiae*

## INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le paludisme est classé quatrième cause de mortalité infantile dans le monde tropical. Et, ce malgré la diminution de l'impact du paludisme dans les pays endémiques, pendant ces dernières années, par les Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD), le taux de mortalité reste toujours élevé en Afrique Sub-saharienne. En effet, 90% des cas de décès sont dus à l'espèce la plus mortelle (*Plasmodium falciparum*). Les enfants de moins de cinq ans (5 ans) et les femmes enceintes sont les plus vulnérables et paient le lourd tribut à cette infection. Cette maladie parasitaire liée à la pauvreté est un problème majeur de santé publique, qui menace de milliers de personnes dans le monde et elle est à l'origine d'un handicap majeur mesuré en nombre d'années perdues et souvent en échec scolaire des enfants.

La résistance des parasites aux anti-paludiques et la résistance des moustiques (anophèles) aux insecticides constituent un grand défi dans la lutte pour l'élimination du paludisme. L'artémisinine et ses dérivés sont les antipaludiques phares pour traiter efficacement le paludisme. Cependant, ces médicaments récemment découverts commencent à perdre leur efficacité du fait de l'émergence de la résistance apparue dans le continent Asiatique, et une propagation de cette résistance est à craindre dans le continent Africain, comme cela s'était produit pour la résistance aux anciens antipaludiques (amino-4-quinoléines). La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, basée sur une connaissance plus approfondie des mécanismes moléculaires de la vie du parasite, est une nécessité permanente dans un paradigme de « reine rouge » qui s'applique parfaitement à la capacité d'adaptation du parasite, pour lutter efficacement contre cette maladie.

### **Etude de la métacaspase 1 de *Plasmodium falciparum*, une nouvelle cible thérapeutique contre le paludisme**

Il y a de cela environ deux décennies, Picot et ses co-équipiers ICBMS-UMR5246, CNRS-INSA-CPE, Malaria Research Unit, exploitaient de nouvelles pistes à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'espèce *P. falciparum* (l'espèce la plus dangereuse). C'est dans cette optique qu'ils ont mis en évidence pour la première fois une mort cellulaire par apoptose des parasites suite à une pression médicamenteuse à la chloroquine. Ces découvertes ont permis de mener des études dans la perspective de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la mort du parasite à l'intérieur des érythrocytes, ainsi visant à traiter la maladie en agissant sur ces mécanismes de mort intrinsèque du parasite.

Quelques années plus tard, après la mise en évidence de l'existence d'une forme de mort cellulaire chez *P. falciparum*, des orthologues des caspases (protéines caspase-like) ont été découverts chez les champignons, les plantes et les protozoaires. Ces protéines caspase-like ont été nommées « métacaspases ». Des récents travaux ont décrit la première réelle métacaspase de *P. falciparum* (PfMCA1) et son rôle dans l'apoptose a été démontré notamment dans la Thèse de Benoit Meslin, « Etude de la voie des métacaspases, une étape vers la compréhension de l'apoptose de *Plasmodium falciparum* », Thèse de doctorat en Parasitologie, sous la direction du Professeur Stéphane Picot, Etude doctorale de l'Université Claude Bernard Lyon, 2010, 314 p.

### **Objectifs**

Les objectifs de nos travaux sont une continuité de ces recherches, dans le but d'approfondir les connaissances sur cette protéine cible (PfMCA1) déjà décrite.

**L'objectif premier de cette thèse est de tenter de déterminer la structure tridimensionnelle (3D) de la métacaspase 1 de *P. falciparum* (PfMCA1).**

L. Aravind a décrit pour la première fois des orthologues des caspases en 1999 (Aravind et al., 1999), ainsi ouvrant la voie à Uren et ses collègues en 2000, à classer les paracaspases chez les animaux et les myxomycètes et les métacaspases chez les plantes, les champignons et les protozoaires (Uren et al., 2000a). L'annotation du génome de *P. falciparum* a permis de mettre en évidence trois gènes codant les métacaspases, PfMCA1 (PF13\_0289), PfMCA2 (PF14\_0363) et PfMCA3 (PF14\_0160). Parmi ces trois enzymes, seule PfMCA1 présente les résidus cystéine et histidine au niveau de la dyade catalytique à l'instar des caspases (Le Chat et al., 2007; Meslin et al., 2007). Des études phylogénétiques ont révélé que la structure et l'organisation des métacaspases étaient très proches des caspases, permettant ainsi de les associer à la famille C14 et clan CD (Mottram et al., 2003). Une étude d'alignement multiple entre les caspases et les métacaspases a révélé une séquence putative CARD (Caspase recruitment domain) dans le prodomaine des métacaspases et les sous-unités P20 et P10 à l'instar des caspases initiatrices de l'apoptose (Meslin et al., 2007). Ainsi, nous avons voulu dans un premier temps, déterminer la structure de PfMCA1, dans le but de confirmer les différentes structures prédites *in silico*. La connaissance de cette structure permettrait d'effectuer des recherches dans les bases de données, des ligands susceptibles d'interagir avec cette cible. Et les molécules sélectionnées pourront être testées *in vitro* pour l'étude de leur activité anti-paludique en vue de potentielles drogues thérapeutiques.

**Test *in-vitro* des molécules cible de la métacaspase 1 de *P. falciparum* (PfMCA1)**

Sachant la longue durée que peuvent prendre les études d'expression des gènes de *P. falciparum* dans un système hétérologue, nous avons décidé de tester en parallèle l'activité antipaludique des molécules sélectionnées à partir d'un modèle de PfMCA1 construit virtuellement *in silico* grâce au docking moléculaire et au criblage virtuel à grande échelle (VHTS) et étudier leurs mécanismes d'action pour leurs potentielles inductions de l'apoptose.

**Le second objectif de cette thèse est d'étudier si le gène codant la métacaspase est conservé entre différentes espèces de *Plasmodium***

Etant donné que PfMCA1 est une cible thérapeutique contre le paludisme, il s'est avéré nécessaire d'étudier si cette dernière est bien conservée entre les différentes espèces de *Plasmodium*. Si tel est le cas, les molécules candidates sélectionnées à partir de cette cible pourraient être testées sur les autres espèces. Afin de réaliser cette étude, nous avons besoin d'un nombre important d'échantillons de chaque espèce. Et compte tenu des faibles cas d'importations de paludisme à l'hôpital de la Croix Rousse de Lyon et de la fréquence du diagnostic de l'espèce *P. falciparum*, nous avons effectué une mission de recherche en Mauritanie, pendant trois mois, durant la période estivale (Juillet-Septembre 2015). Les objectifs de cette mission de recherche étaient d'une part, de collecter des échantillons de paludisme et d'autre part établir des contacts pour d'éventuelles collaborations entre « l'unité de recherche sur le paludisme à Nouakchott (Mauritanie) » et « Malaria Research Unit de Lyon » sur les diverses thématiques portant sur le paludisme.

Dans un premier plan, nous présenterons l'épidémiologie du paludisme dans le monde.

Ensuite une revue bibliographique sur le paludisme et la résistance des parasites aux antipaludiques. Puis, la découverte de l'apoptose chez les organismes unicellulaires et la nouvelle famille caspase-like les « métacaspases ».

Et, dans un second plan, nous présenterons la démarche expérimentale et les résultats obtenus. Nous expliquerons, ensuite, les raisons qui ont fait que le premier objectif de cette thèse n'a pas pu être atteint, et par conséquent, ces travaux n'ont pas fait l'objet d'une publication. Le premier article de revue portera sur une interrogation sur la vie ou de la mort de *P. falciparum*. Un deuxième article portera sur la diversité génétique de la métacaspase 1 de *Plasmodium vivax* et le gène multidrug-resistant 1 de *P. vivax* (*pvmdr1*) à partir des isolats de *P. vivax* provenant de la Mauritanie, du Soudan et d'Oman, et les raisons qui nous ont conduite à nous intéresser à la métacaspase 1 de *P. vivax*.

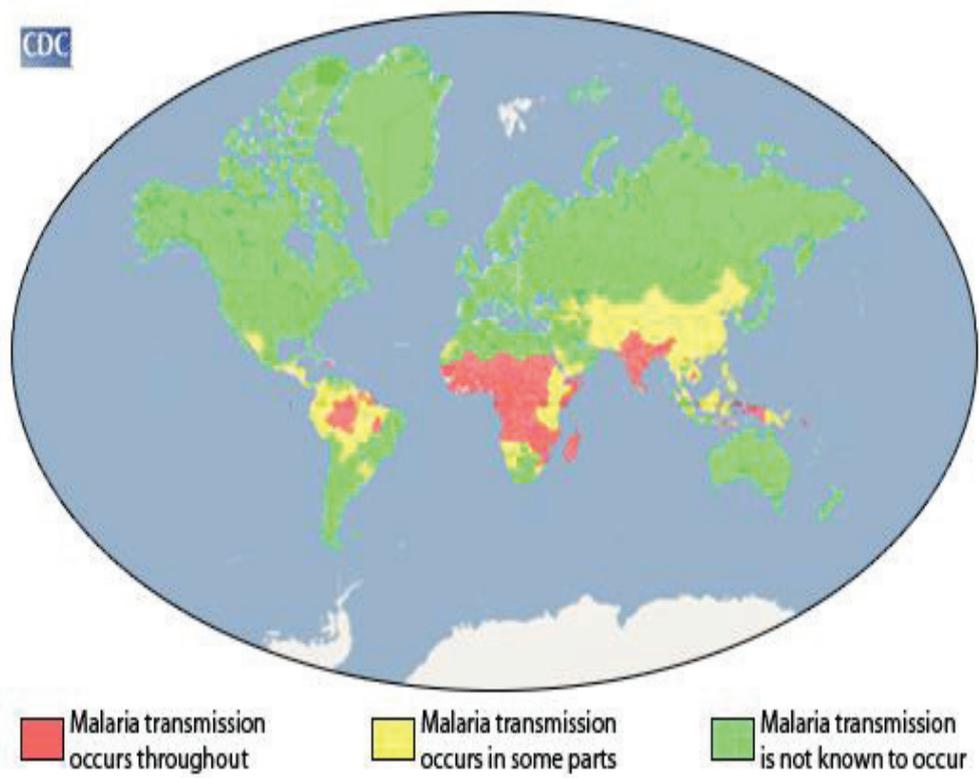
## I. Epidémiologie du paludisme à travers le monde

Le paludisme reste une des principales causes de mortalité infantile dans le monde tropical et subtropical. Selon le rapport sur le paludisme dans le monde en 2015, le nombre de cas de paludisme a été estimé à 214 millions et le nombre de cas de décès a été de 438000 (Cibulskis et al., 2016 ; Klein et al., 2016). Malgré les efforts menés pour diminuer le taux de mortalité et de morbidité, 90 % des cas de décès surviennent dans le continent africain, dont les enfants de moins de 5 ans, qui sont les plus vulnérables (Cibulskis et al., 2016 ; Sauboin et al., 2015). Selon l'étude du Global Burden of Disease, le paludisme est la seconde cause d'un handicap mesuré en nombre d'année perdues (disability-adjusted life-years) en Afrique Sub-Saharienne (Sauboin et al., 2015). Historiquement, le paludisme a été éradiqué de l'Europe dans les années 1974, suite à la déclaration de l'OMS. Cependant des cas de réémergence du paludisme ont été rapportés dans le sud de l'Europe, plus particulièrement en Grèce, comme cela a été rapporté également à Singapour et en République de Corée. Et les facteurs de cette réapparition du paludisme en Grèce ont été supposés être dus soit au réchauffement climatique, soit à la présence des vecteurs et à l'augmentation des immigrants provenant des pays endémiques (Spanakos et al., 2013).

L'année 2015 marque la fin d'une mission visée par les objectifs du millénaire pour le développement (OMD 2000-2015), qui étaient de réduire le taux d'incidence et de mortalité dû au paludisme partout dans le monde. En effet, ces dernières années, une diminution de manière considérable de l'impact du paludisme dans les zones endémiques a été atteinte avec une réduction de l'incidence estimée à 37% entre 2000 et 2015 (Cibulskis et al., 2016), **Figure 1**. Parmi les moyens mis à disposition pour atteindre ces objectifs, il y a l'utilisation des antipaludiques efficaces, l'artémisinine et ses dérivés dans le traitement du paludisme, la mise à disposition des tests de diagnostic rapide, la pulvérisation d'insecticides pour réduire la transmission vectorielle, la distribution et la recommandation de l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides pour les personnes à risque (femmes enceintes, enfants de moins de cinq ans) et la prophylaxie pour les voyageurs séjournant dans les pays endémiques (Cibulskis et al., 2016 ; Klein et al., 2016). C'est avec un tel succès dans la lutte contre le paludisme, que le prix Nobel de médecine, pour la découverte de l'artémisinine dans le traitement du paludisme a été attribué à la chercheuse en Pharmacie Tu Youyou en 2015 (Benelli and Mehlhorn, 2016). Par ailleurs, une étude entomologique réalisée dans la région de Kilifi au Kenya, a montré une diminution considérable de la densité vectorielle de *An.*

*gambiae* sur la période de 1990 à 2010, grâce au traitement par insecticides (O'Loughlin et al., 2016). Actuellement le seul vaccin candidat le plus avancé en termes d'essai clinique est le vaccin « RTS,S/AS01 (RTS,S) » appelé Mosquirix®. Ce vaccin a été développé en partenariat public-privé soutenu par la fondation Bill et Melinda Gates pour l'espèce la plus virulente et mortelle (*P. falciparum*). Ce vaccin a reçu un avis favorable sur le rapport bénéfice/risque par l'Agence Européenne de Médicament (AEM). Et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a donné l'autorisation pour son utilisation dans des projets pilotes en Afrique Subsaharienne en vue d'un outil complémentaire de lutte contre le paludisme. Mais les essais cliniques réalisés sur les enfants en phase III ont estimé l'efficacité de ce vaccin entre 18 et 36 %, avec une protection modérée, et des effets secondaires ont été également rapportés tels que des méningites, des convulsions fébriles et un taux de mortalité élevé observé uniquement chez les filles (Klein et al., 2016). Un autre vaccin (VMP001/AS01<sub>B</sub>) candidat est également en cours d'essai clinique pour l'espèce *P. vivax* et d'après les premiers essais de la phase 1/2a, des données sur la sécurité, l'immunogénicité et l'efficacité de ce vaccin ont été montrées positives. De plus, selon l'avis des chercheurs, ce vaccin présenterait un double avantage, du fait qu'il sera non seulement utilisé pour la prévention de l'infection mais aussi pour prévenir les formes dormantes dans le foie (hypnozoïtes) (Bennett et al., 2016).

Mais, malgré ces efforts, le projet d'éradication du paludisme fait face à de nombreux défis, notamment la résistance des anophèles aux insecticides, l'émergence et la propagation de la résistance des parasites aux antipaludiques (Vestergaard and Ringwald, 2007). Récemment de nombreuses études ont rapporté l'émergence de la résistance des parasites aux artémisinines, dans cinq pays de l'Asie du sud-est et une crainte de la propagation de cette résistance dans le continent africain soulève un sujet très alarmant. De plus, actuellement, l'artémisinine et ses dérivés sont les seuls médicaments efficaces et disponibles pour traiter le paludisme (Ashley et al., 2014 ; Klonis et al., 2011 ; Takala-Harrison et al., 2013). Ainsi, face à cette apparition récurrente de la résistance, la découverte de nouveaux anti-paludiques efficaces capables de retarder l'émergence de la résistance est une nécessité très urgente (Picot et al., 2014). C'est pourquoi cette maladie parasitaire reste un problème majeur de santé publique, qui menace des milliers de personnes dans le monde. De ce fait, des efforts sont sans cesse déployés dans l'espoir de trouver de nouveaux médicaments moins propices à l'apparition de résistance pour mieux lutter contre ce fléau.



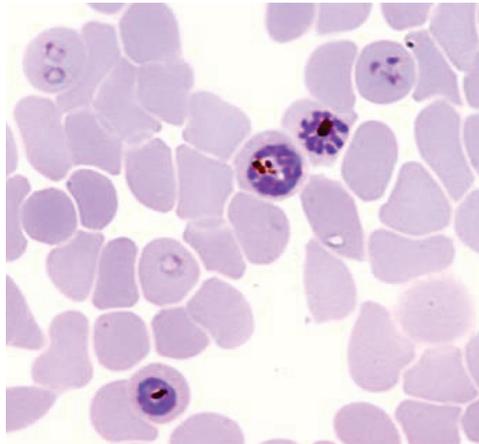
**Figure 1. Répartition du paludisme dans le monde**

Source: [http://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/impact.html](http://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html)

## II. Données bibliographiques sur le paludisme



**Anophèle**



**Globules rouges parasités**



**Recherche anti-paludiques**

## 2.1. Agents du paludisme

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par des hématozoaires du genre *Plasmodium*. Les *Plasmodium* sont transmis à l'homme par piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles* lors de son repas sanguin (Gayathri et al., 2007). Les femelles de moustiques ont besoin d'un repas sanguin pour pouvoir pondre, après avoir été fécondées. Il y a plus de 140 espèces de *Plasmodium*, qui infectent diverses espèces animales. Parmi ces espèces, cinq sont connues pour infecter l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *Plasmodium ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi* (Jeremiah et al., 2014 ; Krungkrai and Krungkrai, 2016a). Pour l'espèce *P. ovale*, deux sous espèces ont été récemment identifiées et nommées respectivement *P. ovale curtisii* et *P. ovale wallikeri* (van Schalkwyk et al., 2013). Ces cinq espèces sont différentes par leurs critères biologiques et cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux anti-paludiques. De plus, l'infection à certaines de ces espèces est également fonction du génotype de l'homme (certains groupes sanguins ou anomalies de l'hémoglobine sont moins favorables à la multiplication du parasite) et à l'adaptation concomitante au biotope de l'homme et du vecteur (Picot, 2006). La classification taxonomique des espèces de *Plasmodium* est décrite dans le **Tableau 1**.

*Plasmodium falciparum* est l'agent le plus virulent et le plus mortel, il est présent majoritairement en Afrique sub-saharienne, en Asie du sud-est et en Amérique du sud, où il est responsable des cas sévères de la maladie et du taux élevé de mortalité (Greenwood et al., 2005). De plus, *P. falciparum* pose de graves problèmes de résistance aux anti-paludiques. C'est la raison pour laquelle c'est l'espèce la plus étudiée (Cornejo and Escalante, 2006). *P. vivax* est la deuxième espèce, largement répandue dans le monde. En effet, elle est présente dans toute l'Asie, en Amérique du sud et centrale, en Océanie et ainsi que dans les foyers méditerranéens. Le dogme de l'absence de *P. vivax* en Afrique a été remis en question ces dernières années, du fait des rapports de cas de paludisme dus à *P. vivax* chez les peuples berbéroïdes (Touaregs et Maures) autour du Sahara, et chez les éthiopiens d'origine yéménite et ainsi que chez les bushmen d'Afrique de l'est (Kalahari, Tanzanie) (Picot, 2006). De plus, des études récentes ont révélé la présence de *P. vivax* en Afrique sub-saharienne, notamment à Nouakchott, Mauritanie (Ba et al., 2016 ; Howes et al., 2015 ; Ould Ahmedou Salem et al., 2015a ; Wurtz et al., 2011). Des cas de *P. vivax* ont également été rapportés dans le sud-est du Sénégal (Kedougou), un pays voisin de la Mauritanie (Niang et al., 2015). Il existe une thèse selon laquelle l'absence de l'espèce *P. vivax* en Afrique serait due au fait que la majorité des Africains sont connus porteurs du groupe sanguin Duffy négatif (Duffy antigen/chemokine

receptor, DARC), dont le parasite a besoin pour infecter les hématies. En revanche, en Ethiopie, la prévalence élevée de cas de *P. vivax* est supposée être due au grand nombre d'individus ayant le groupe Duffy positif (Getachew et al., 2015b). Cependant, malgré la vaste répartition de *P. vivax* dans le monde, ce parasite reste négligé et son infection était considérée comme bénigne. Mais, des cas graves liés à l'infection à *P. vivax* ont été rapportés (Shaw-Saliba et al., 2016). D'autres part, de nombreuses études ont rapporté des cas de résistance de *P. vivax* à la chloroquine (Barnadas et al., 2015 ; Getachew et al., 2015a ; Marfurt et al., 2008). Cette espèce constitue aussi une menace sérieuse pour des milliers de personnes partout dans le monde. *Plasmodium ovale* et *Plasmodium. malariae* sont les espèces les moins pathogènes et sont présentes majoritairement en Afrique sub-saharienne (Mueller et al., 2007). *Plasmodium knowlesi* est la cinquième espèce récemment découverte, d'origine simienne et elle est uniquement présente en Asie (Singh and Daneshvar, 2010). Tandis que *P. falciparum* et *P. vivax* sont les espèces les plus responsables des taux élevés de morbidité et de mortalité liés au paludisme partout dans le monde (Cornejo and Escalante, 2006).

**Tableau 1 : Classification taxonomique des espèces de *Plasmodium***

<b>Super-règne</b>	Eucaryote
<b>Règne</b>	Chromalveolata
<b>Super-phylum</b>	Alveolata
<b>Phylum</b>	Apicomplexa
<b>Classe</b>	Aconoidasida
<b>Sous-classe</b>	Hematozoa
<b>Ordre</b>	Haemosporida
<b>Sous-ordre</b>	Haemosporidiidea
<b>Famille</b>	Plasmodiidae
<b>Genre</b>	Plasmodia
<b>Sous-genre</b>	<i>Plasmodium</i> <i>Laverania</i>
<b>Espèces</b>	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> <i>P. ovale</i> <i>P. malariae</i> <i>P. knowlesi</i>

(D'après Antinori et al., 2012)

## 2.2. Vecteurs du paludisme

Les moustiques du genre *Anopheles* sont les vecteurs du paludisme et on estime qu'il existe environ 400 espèces d'anophèles dont 25 sont connues par leurs critères vectoriels (Gayathri et al., 2007 ; White et al., 2014). Les principales caractéristiques de ces vecteurs sont : d'abord, une durée de vie longue, ensuite, une résistance au changement environnemental et enfin un tropisme pour l'homme. *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* sont les vecteurs majoritairement retrouvés dans les zones humides, tandis que *Anopheles arabiensis* est le vecteur le plus dominant dans les zones sèches (ou arides). La variation de l'intensité de la transmission du paludisme en Afrique sub-saharienne dépend de l'abondance de ces espèces dans ces zones (Kibret et al., 2016). *Anopheles gambiae* est le vecteur de l'espèce *P. falciparum* en Afrique sub-saharienne (Hoffman et al., 2002). Des études entomologiques réalisées sur le territoire mauritanien ont répertorié 12 espèces et sous-espèces d'anophèles: *Anopheles funestus*, *An. gambiae* s.l, *Anopheles pharoensis*, *Anopheles rufipes*, *Anopheles melas*, *Anopheles dhtali*, *Anopheles rhodesiensis*, *Anopheles coustani*, *Anopheles ziemanni*, *Anopheles pretoriensis*, *Anopheles squamosus*, et *Anopheles demilloni*. Parmi toutes ces espèces, *An. gambiae* est l'espèce la plus dominante (92%) suivi de *An. pharoensis* (5%) et *An. funestus* (3%) (Dia et al., 2009). La classification taxonomique des moustiques est détaillée dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Classification taxonomique des moustiques**

<b>Embranchement</b>	Arthropoda			
<b>Classe</b>	Insecta			
<b>Sous-classe</b>	Pterygota			
<b>Ordre</b>	Diptera			
<b>Sous-Ordre</b>	Nematocera			
<b>Famille</b>	Culicidae			
<b>Sous-famille</b>	Anophelinae			
<b>Tribu</b>	Anophelini			
<b>Genre</b>	<i>Anopheles</i>			
<b>Sous-genres</b>	<i>Anopheles</i>	<i>Myzomyia</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	<i>Kerteszia</i>
<b>Espèces</b>	<i>maculipennis</i>	<i>gambiae</i>	<i>albimanus</i>	<i>bellator</i>

Adapté du Livre Essential Malariology (ISBN 0 433 045205)

## **2.3. Biologie**

### **2.3.1. Le cycle de développement des *Plasmodium***

Le cycle de développement parasitaire est pratiquement identique pour toutes les espèces de *Plasmodium* qui infectent l'homme. *Plasmodium* présente un cycle hétéroxène, c'est-à-dire que le cycle de vie se déroule chez deux hôtes : l'hôte intermédiaire (l'homme), où se déroule la reproduction asexuée (schizogonie) et l'hôte définitif (femelle de moustique), où se déroule la reproduction sexuée (sporogonie). Chez l'homme le cycle est divisé en deux phases : une phase hépatique (exo-érythrocytaire) correspondant à une période d'incubation cliniquement asymptomatique et une phase sanguine (érythrocytaire), la phase symptomatique (Cowman and Crabb, 2002 ; White et al., 2014). Le cycle de vie des *Plasmodium* est décrit dans la **Figure 2**.

#### **2.3.1.1. Chez L'homme (hôte intermédiaire)**

##### **a. Schizogonie pré-érythrocytaire**

La transmission du paludisme se fait par inoculation d'une forme parasitaire (sporozoïte) par l'anophèle femelle infesté lors de son repas de sang. Après une courte durée dans le sang, certains sporozoïtes parviennent à gagner le foie et à se multiplier dans les cellules hépatiques. Après multiplication, les parasites se transforment en schizontes pré-érythrocytaires (formes multinucléées). Après quelques jours de maturation, les cellules hépatiques vont éclater et libérer des milliers de mérozoïtes uninucléés dans le sang (10 000 à 30 000 mérozoïtes). Pour *P. vivax* et *P. ovale*, certains parasites restent en phase dormante dans le foie (hypnozoïtes) et sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée qui va entraîner une libération des mérozoïtes plusieurs semaines, mois ou années plus tard après l'infection. Les hypnozoïtes sont à l'origine des reviviscences tardives observées.

##### **b. Schizogonie érythrocytaire**

Très rapidement, les mérozoïtes libérés dans la circulation sanguine pénètrent dans les globules rouges par l'interaction ligand-récepteur. Le cycle érythrocytaire se caractérise par une schizogonie, qui permet le passage du stade ring en trophozoïte (forme en anneau), puis en schizonte (division nucléaire et la formation de plusieurs noyaux). Durant la phase de la croissance intraérythrocytaire, le parasite consomme l'hémoglobine de l'hôte et modifie la membrane cellulaire du globule rouge pour créer des passages d'importation des nutriments. La digestion de l'hémoglobine (Hb) libère l'hème et fournit au parasite des acides aminés nécessaires pour sa croissance. L'hème est un produit toxique pour le parasite. Pour se

protéger des effets toxiques de ce produit, le parasite le cristallise en « hémozoïne ». L'hémozoïne (sous forme de cristaux) est le pigment malarique visible à l'intérieur de la vacuole digestive du parasite, sous forme de granules sombres et la vision de ce pigment est plus marquée dans les dernières étapes de développement. Le schizonte, une fois mature, entraîne l'éclatement des hématies et la libération de 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. Ces mérozoïtes vont envahir de nouveaux globules rouges et un nouveau cycle de schizogonie ainsi se poursuit en boucle. C'est la phase symptomatique de la maladie, la parasitémie s'élève, la personne atteinte devient fébrile, c'est l'accès palustre. Quand la densité parasitaire atteint environ 50 parasites/ $\mu$ L dans le sang (environ 100 millions de parasites dans le sang d'une personne adulte), les parasites peuvent être détectés soit par lecture microscopique ou par le test de diagnostic rapide (White et al., 2014). En absence de traitement, tous les parasites vont évoluer progressivement au même rythme, tous les schizontes érythrocytaires arrivent à maturation au même moment, entraînant ainsi la destruction d'un grand nombre de globules rouges de manière périodique (cycle synchrone), toutes les 24 heures (fièvre quotidienne pour *P. knowlesi*), 48 heures (fièvre tierce pour *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. ovale*) ou toutes les 72 heures (fièvre quarte de *P. malariae*). Cette phase érythrocytaire est la principale cible des antipaludiques. Après quelques cycles érythrocytaires, certains trophozoïtes subissent une maturation d'une dizaine de jours, sans division nucléaire, accompagnée d'une différenciation sexuée. Ainsi, se forment les gamétocytes à potentiel mâle ou femelle, qui vont rester en circulation dans le sang pendant 10 à 15 jours.

### **2.3.1.2. Chez le moustique (hôte définitif)**

Lors de la prise du repas sanguin chez une personne infectée, l'anophèle aspire éventuellement les gamétocytes. Le gamète mâle et le gamète femelle fusionnent en un œuf libre dans l'estomac du moustique, mobile, dénommé ookinète. Cet ookinète quitte la lumière du tube digestif et se fixe ensuite à la paroi externe de l'estomac et se transforme en oocyste. Les cellules parasitaires se multiplient à l'intérieur de cet oocyste, et produisent des centaines de sporozoïtes qui migrent ensuite vers les glandes salivaires du moustique. Ces sporozoïtes sont les formes infectantes dans la salive du moustique, prêtes à être inoculées lors d'un nouveau repas sanguin sur un hôte vertébré. La durée du développement sporogonique des *Plasmodium* varie en fonction des conditions climatiques. Les formes sexuées du parasite (gamétocytes) peuvent apparaître au décours d'une crise de paludisme ou après le traitement. Ces formes ne sont pas pathogènes mais sont reprises par le moustique lors d'une piqûre, et sont responsables de la transmission et du maintien du cycle de vie du parasite.

## Life Cycle:

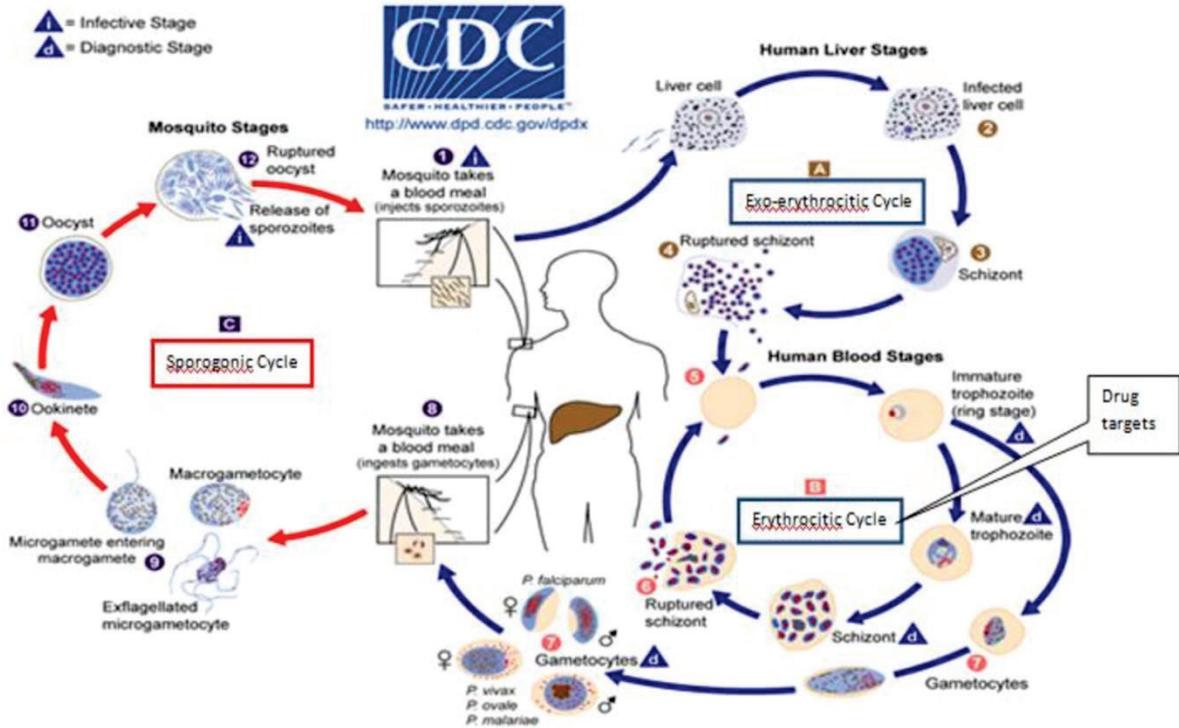
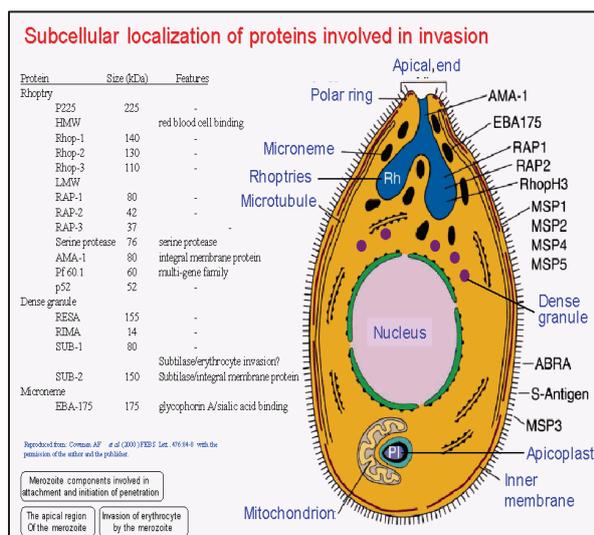


Figure 2. Cycle de vie des *Plasmodium*

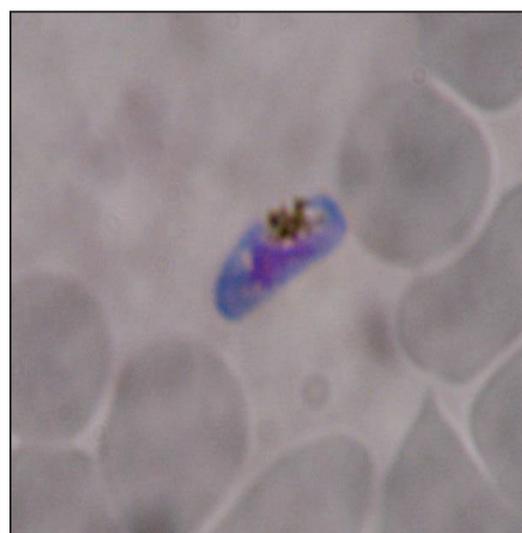
La femelle de moustique injecte des sporozoïtes chez l'homme lors de prise de son repas sanguin (1). Certains sporozoïtes arrivent à gagner le foie et à se multiplier (2) et deviennent mature sous forme schizontes (3). Les cellules hépatiques vont éclater et libérer les mérozoïtes dans la circulation sanguine (4). Pour les espèces *P. vivax* et *P. ovale*, les parasites peuvent rester sous forme dormante dans le foie (hypnozoïtes), dont le réveil peut se déclencher des semaines, mois ou années plus tard, et qui sont à l'origine des rechutes. Les mérozoïtes infectent les globules rouges (5), et se multiplient en différents stades (ring, trophozoïte et schizonte). La maturation des schizontes entraîne l'éclatement des hématies et la libération des mérozoïtes et c'est un cycle répétitif (B). Après plusieurs multiplications asexuées, certains parasites vont se différencier en gamétocytes (7). Les gamètes mâles et femelles sont pris par le moustique chez une personne infectée (8). Ces derniers fusionnent dans l'estomac du moustique et forment le zygote (reproduction sexuée) (9). Le zygote mature devient mobile (ookinète) (10), et migre vers la paroi intestinale en se transformant en oocystes (11). Les oocystes se développent et se transforment en sporozoïtes (12), qui regagnent les glandes salivaires du moustique, c'est la forme infectante prête à être inoculée par le moustique chez l'homme pour un nouveau cycle. (D'après, CDC: Centers for Disease Control and Prevention).



**Figure 3. Structure d'un mérozoïte et des protéines impliquées dans l'invasion du globule rouge**

Les rhoptries, les micronèmes et les granules denses sont les acteurs majeurs durant la phase de l'invasion du globule rouge par un mérozoïte.

M2 Neuroparasitologie (Limoges, France)



**Figure 4. Observation d'un gamétoocyte femelle de *P. falciparum*, dans une culture du clone 3D7**  
Malaria Research Unit (Lyon, France)

## 2.4. Phylum Apicomplexa des *Plasmodium*

La relation phylogénétique par parcimonie entre différentes espèces de *Plasmodium* a révélé que les *Plasmodium* possèdent un plaste dont la présence serait l'une des raisons de leurs classifications dans le Phylum Apicomplexa et, de plus, du fait de l'organisation de leur pôle apical (Cowman and Crabb, 2002). Des études phylogénétiques ont également tenté d'expliquer l'origine de ce plaste et ont émis l'hypothèse que ce plaste serait le reste du génome d'une algue, dont l'origine pourrait être due à une endosymbiose secondaire entre *Plasmodium* et une algue (Rathore et al., 2001). Ainsi, l'apicoplaste est considéré comme un reliquat d'un ancien chloroplaste, où plusieurs processus cellulaires et voies de synthèse se produisent, tels que i) la réplication de l'ADN, la transcription et la translocation (Cowman and Crabb, 2002). Il a été mis en évidence que l'apicoplaste joue un rôle essentiel pour la survie du parasite et qu'il est impliqué dans la synthèse anabolique des acides gras, isoprénoïdes et dans le métabolisme de l'hème (Gardner et al., 2002). Des études d'analyse de similarité de séquences basées sur la sous-unité ribosomale d'ARN, utilisant la méthode cladistique (recherche de lien parenté entre différentes espèces) ont révélé que *P. falciparum* est plus proche de *P. reichenowi*, un parasite du chimpanzé (Gardner, 1999 ; Thompson et al., 2001).

## 2.5. Physiopathologie du paludisme à *P. falciparum*

Le paludisme sévère est un syndrome complexe, qui peut toucher plusieurs organes, tels que les reins (insuffisance rénale), le cerveau (neuropaludisme), les poumons (œdème pulmonaire), le sang (coagulation intravasculaire disséminée), des défaillances multiviscérales, une hépatomégalie (augmentation de la taille du foie) et une splénomégalie (augmentation du volume de la rate).

### 2.5.1. Anémie paludéenne sévère

L'envahissement des hématies par les mérozoïtes et la multiplication des parasites induisent une lyse progressive des globules rouges. L'éclatement des globules rouges parasités lors de la libération des mérozoïtes et la destruction des globules rouges non-parasités par la réponse du système immunitaire sont des phénomènes à l'origine de l'anémie sévère (Greenwood et al., 2005).

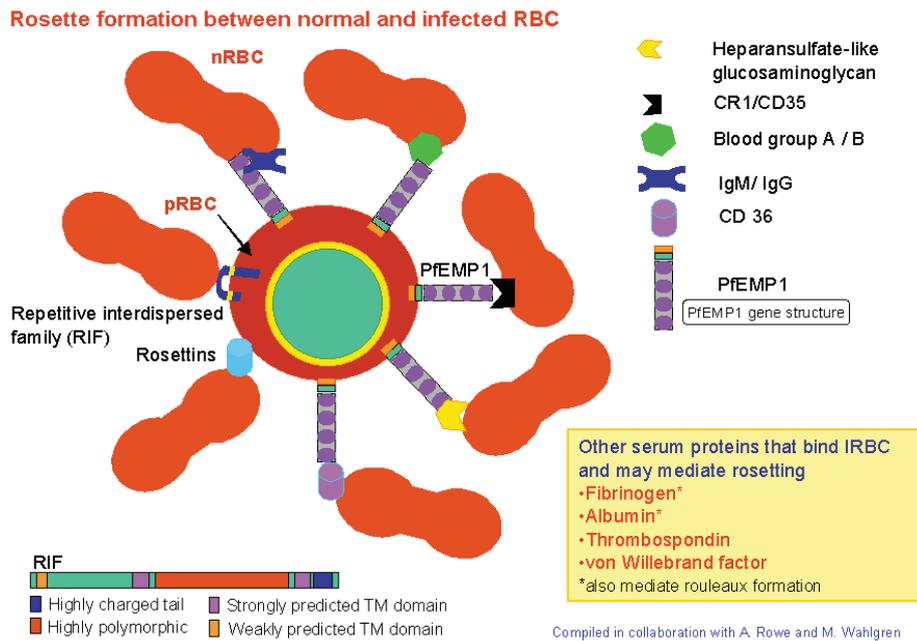
### 2.5.2. Neuropaludisme

C'est un accès grave du paludisme qui se caractérise par une atteinte du système nerveux central. Au cours de la phase intra-érythrocytaire, les hématies parasitées par les trophozoïtes et les schizontes adhèrent à l'endothélium par l'intermédiaire des protubérances appelées « knobs » exprimées à la surface des globules rouges. La protéine PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) est l'une des protéines impliquées dans cette physiopathologie. Cette cyto-adhérence entraîne une séquestration, puis le tassement des globules rouges parasités dans les vaisseaux et dont les résultats sont : une réaction inflammatoire locale, une surproduction des cytokines et une obstruction du flux sanguin, qui est à l'origine du coma. Le développement progressif du coma est souvent accompagné d'un état épileptique (convulsions généralisées ou focales). C'est la raison pour laquelle les trophozoïtes et les schizontes sont rarement observés dans la circulation sanguine chez des patients impaludés à cause de leur adhérence avec les cellules endothéliales précédemment décrite (Dogovski et al., 2015). Cette obstruction capillaire est aggravée par des phénomènes complexes où interviennent la diminution de la plasticité du globule rouge, la formation des rosettes par adhésion des globules rouges parasités aux globules rouges sains, **Figure 5**. Ces événements entraînent la mort par apoptose des cellules endothéliales, puis des micro-hémorragies périvasculaires, et une souffrance des neurones, ainsi conduisant aux dommages neuronaux. Ces troubles neurologiques se manifestent par des déficits cognitifs, sensitifs ou moteurs. Cette forme grave de l'infection peut conduire directement à la mort dans les 24h

après l'hospitalisation du patient si aucun traitement efficace n'est administré dans les meilleurs délais. D'ailleurs, des études ont rapporté qu'en Afrique, chez certains enfants admis à l'hôpital pour paludisme sévère, la mort survient dans les 24 premières heures (Idro et al., 2010 ; Rao et al., 2010). Des études *post-mortem* sur des personnes atteintes du neuropaludisme ont mis en évidence le rôle majeur de la cytoadhérence des globules rouges infectés sur les cellules endothéliales à l'origine de l'hypertension intracrânienne, de l'œdème cérébral et d'une hypoglycémie. (Greenwood et al., 2005). L'infection palustre pendant la grossesse est un danger pour le fœtus surtout pour les primipares (première grossesse de la femme). La séquestration d'hématies parasitées dans le placenta et l'aggravation de l'anémie gravidique favorisent la survenue des nouveaux nés de faible poids (<2,5 kg). Le paludisme est responsable également d'avortements et de l'augmentation de la mortalité (White et al., 2014).

### **2.5.3. Détresse respiratoire**

Elle se caractérise par un œdème causé non seulement par des lésions périvasculaires dans la paroi des alvéoles pulmonaires mais également par une baisse de la ventilation d'origine centrale (Picot et al., 2009).



**Figure 5. Formation des rosettes entre les globules rouges parasités (PRBC) et les globules rouges non parasités (nRBC)**

Les protéines impliquées dans cette physiopathologie sont représentées sous différentes formes, dont la protéine *PfEMP1* (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein), acteur majeur dans le phénomène de cyto-adhérence.

M2 Neuroparasitologie (Limoges, France)

## 2.6. Traitements du paludisme

Selon les directives de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les bi-thérapies à base d'artémisinine (artemisinin-based combination therapy, ACTs) sont les anti-paludiques recommandés dans le traitement du paludisme non-complicé dû à *P. falciparum*, en première intention chez les enfants et les adultes (Win et al., 2016 ; Woodrow et al., 2005). De nombreux travaux ont montré l'efficacité thérapeutique des ACTs dans le traitement du paludisme non-complicé, dans les zones où la résistance à la chloroquine ou la polychimiorésistance est déclarée. Le choix de l'ACT d'un pays à l'autre va dépendre du degré de résistance vis-à-vis du médicament associé. Cependant l'artémisinine et ses dérivés ne doivent pas être utilisés en monothérapie pour le paludisme non compliqué. L'association sulfadoxine et pyriméthamine (S/P) possède plusieurs noms commerciaux et le plus connu est le Fansidar®. Elle était largement utilisée comme second médicament contre les parasites chloroquino-résistants (Eberl et al., 2001). Cet antipaludique continue d'être utilisé comme traitement préventif intermittent chez les enfants et les femmes enceintes en Afrique (Alifrangis et al., 2014 ; Picot et al., 2009). La primaquine (amino-8-quinoléine) est utilisée pour tuer les gamétocytes matures de *P. falciparum* et les hypnozoïtes de *P. vivax* ou *P. ovale*.

Cependant l'utilisation de la primaquine est limitée, du fait du risque d'hémolyse chez les personnes présentant un déficit en G6PD (Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase) (Eziefula et al., 2014 ; Picot, 2006 ; Vale et al., 2009). Pour des cas de *P. vivax* résistant à la chloroquine, l'OMS recommande l'utilisation des ACT (sauf une combinaison comportant la SP) (Duparc et al., 2013). Depuis 2012, l'OMS préconise, pour les pays dans la phase d'élimination du paludisme à *P. falciparum* et dans les pays où sévissent des souches résistantes à l'artémisinine, l'ajout d'une seule dose faible de primaquine au traitement des ACTs dans le but de réduire le portage des gamétocytes afin de limiter la transmission vectorielle (Ashley et al., 2014). Les ACTs sont résumés dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3 : Médicaments anti-paludiques dans le traitement du paludisme sévère et non-complicé à *P. falciparum***

Paludisme	Médicaments anti-paludiques	Références
Paludisme sévère	- Quinine	(Picot et al., 2014 ;
	- Artésunate ou artéméther	Woodrow et al., 2005)
Paludisme non-complicé	- Artémether-luméfantrine	(Duparc et al., 2013;
	-Dihydroartémisinine-pipéraquline	Ouldabdallahi et al.,
	-Pyronaridine-artésunate	2014; Tun et al., 2016;
	-Artésunate-amodiaquine	World Health
	-Artésunate-méfloquine	Organization, 2015;
	-Artésunate-Sulfadoxine-Pyriméthamine	Zongo et al., 2007)
	- Primaquine avec ACT	(Eziefula et al., 2014 ;
		Vale et al., 2009)

### III. Chimiorésistance de *P. falciparum*

#### 3.1. Les anciens antipaludiques

Le paludisme est une maladie connue de très longue date, dont l'estimation pourrait être des siècles ou des millénaires. C'est une maladie qui se caractérise par une forte fièvre et des maux de tête, des douleurs articulaires et musculaires, souvent accompagnés de diarrhée et vomissement (Cowman and Crabb, 2002 ; Gayathri et al., 2007). La quinine est un alcaloïde naturel extrait d'une écorce d'arbre *Cinchona* spp. (arbuste originaire d'Amérique du sud). Cette écorce était utilisée par les Amérindiens pour traiter la fièvre et elle était connue en Europe depuis le XVI<sup>ème</sup> siècle. Ainsi en 1820, Pierre-Joseph Pelletier et Joseph Caventou ont isolé les alcaloïdes de l'écorce, quinine et cinchonine. Ainsi, la quinine fut le premier antipaludique utilisé dans le traitement du paludisme en Europe et elle est toujours utilisée (Dondorp et al., 2005). C'est au XX<sup>ème</sup> siècle que plusieurs médicaments synthétiques de type quinoléine (molécules ayant le noyau quinoléine), tels que les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine), les amino-8-quinoléines (primaquine), les aryl-amino-alcools (quinine, méfloquine, halofantrine), les antifolates (pyriméthamine, proguanil et sulfadoxine) et les naphthoquinones (atovaquone) ont été commercialisés et largement utilisés dans les pays endémiques pendant des décennies (Hyde, 2007 ; Weissbuch and Leiserowitz, 2008 ; Witkowski et al., 2010). En outre, certains antibiotiques sont couramment utilisés, soit en monosubstance pour la chimioprophylaxie (doxycycline), soit en association (clindamycine) avec la quinine ou l'artésunate pour le traitement.

Parmi ces antipaludiques, la chloroquine fut le médicament de choix à cause de son excellente efficacité clinique, sa faible toxicité, sa sécurité chez les femmes enceintes et chez les nourrissons et son faible coût. Cependant, son utilisation massive et répandue a entraîné l'apparition des souches résistantes de *P. falciparum* (chloroquino-résistantes). Cette résistance est apparue presque simultanément et indépendamment en Amérique du Sud et en Asie du sud-est (Thaïlande) vers la fin des années 1950. En Afrique, la résistance à la chloroquine a été détectée la première fois en Tanzanie à la fin des années 1970 et a atteint la quasi-totalité de l'Afrique sub-saharienne dès 1988 (Hyde, 2007 ; Vestergaard and Ringwald, 2007). Cette propagation de la résistance a entraîné une extension de la chimiorésistance dont la conséquence a été l'augmentation du taux de la mortalité et de la morbidité dans les pays endémiques (Witkowski et al., 2010).

### 3.1.1. Mode d'actions des anti-paludiques

La majorité des anti-paludiques cible le cycle érythrocytaire du parasite, et cela depuis le succès du maintien en culture continue *in vitro* de *P. falciparum*, selon le protocole de Trager et Jensen en 1976, qui permet la mise en œuvre du criblage d'antipaludiques. Environ 60 années de recherches se sont focalisées sur le cycle érythrocytaire du parasite dans le but d'approfondir les connaissances biochimiques afin de comprendre les mécanismes d'action des antipaludiques (Krungkrai and Krungkrai, 2016b). Ainsi les antipaludiques sont classés en deux catégories selon leurs modes d'action :

- Les schizonticides sanguins
- Les inhibiteurs de la synthèse des métabolites.

#### a. Schizonticides sanguins

Les schizonticides sont les antipaludiques qui possèdent un noyau quinoléine ou endoperoxyde.

- Amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine, pipéraquline),
- Aminoalcools (quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine),
- Artémisinine et ses dérivés.

Ces anti-paludiques ciblent l'hème, le produit de dégradation de l'hémoglobine dans la vacuole digestive du parasite (Sullivan et al., 1996). Depuis l'apparition de la résistance de *P. falciparum* à ces antipaludiques, des recherches ont été menées dans le but de comprendre le mécanisme d'action de la famille des amino-4-quinoléines. La chloroquine fut la plus étudiée, bien que son mécanisme d'action ne soit pas complètement élucidé. De plus, elle est une molécule de référence pour les tests *in vitro* de sensibilité des clones chloroquino-sensibles (Picot et al., 2014). La chloroquine est une base faible qui a la capacité de traverser les différentes membranes de l'érythrocyte et du parasite, afin de s'accumuler dans la vacuole digestive acide (pH 4,5-5) du parasite, suivant un gradient de pH. A l'intérieur de cette vacuole, la chloroquine est protonée et prise au piège, et exerce son action létale sur le parasite. Durant la croissance du parasite à l'intérieur du globule rouge, *P. falciparum* consomme l'hémoglobine. La digestion de l'hémoglobine (Hb) libère un produit toxique, l'hème (Ferriprotoporphyrine IX). Pour se protéger des effets toxiques de l'hème, le parasite la cristallise en hémozoïne. Des études ont montré que la chloroquine agirait en formant un complexe avec l'hématine (l'hème oxydée) avec des liaisons électrostatiques et ainsi inhiberait la cristallisation de l'hème en hémozoïne. Ce complexe chloroquine-hématine aurait des effets toxiques sur les parasites (Bray et al., 2005 ; Egan et al., 1994; Egan, 2008 ; Pisciotta and Sullivan, 2008 ; Sullivan, 2002). La chloroquine a été démontrée efficace et

active sur les formes rings âgées (jeunes trophozoïtes), les trophozoïtes et les stades précoces de gamétocytes. Par contre, les stades tardifs de gamétocytes, le ring précoce et les schizontes âgés sont naturellement résistants à la concentration des quinoléines.

#### **b. Mécanisme de résistance et marqueurs moléculaires des amino-4 quinoléines**

Depuis l'apparition des souches chloroquino-résistantes, de nombreuses études ont été menées dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires de la résistance aux antipaludiques.

Un phénomène d'efflux de la chloroquine à l'extérieur de la vacuole digestive du parasite a été rapporté être l'une des raisons qui conduisent à une diminution de la sensibilité des souches de *P. falciparum* à la chloroquine (Cowman, 2001). La résistance aux quinoléines a été décrite comme étant multigénique et épistatique (Ferreira et al., 2011 ; Mu et al., 2003 ; Picot et al., 2009). Par ailleurs, deux protéines (*Pfmdr1* and *Pfcrt*) de transport localisées dans la vacuole digestive du parasite ayant des caractéristiques de flux directionnel opposées ont été montrées être impliquées dans le mécanisme de résistance (Ferreira et al., 2011). La protéine Pgh est un membre de la superfamille des ABC (ATP-binding cassette) protéines, et c'est un homologue de P-glycoprotéine (Pgp-1) humaine. Cette protéine (Pgp-1) a été initialement découverte chez les cellules cancéreuses de mammifères et est impliquée dans les résistances aux anti-cancéreux. Cette protéine est codée par *Pfmdr1* (*Plasmodium falciparum* multidrug-resistance 1), le gène impliqué dans la multi-chimiorésistance (multidrug resistance ou mdr) aux antipaludiques et de plus, cette protéine a été considérée comme étant impliquée dans le transport d'importation vers la vacuole digestive du parasite. La mutation du codon N86Y du gène *Pfmdr1* est la plus étudiée. Des échecs thérapeutiques à la chloroquine et à l'amodiaquine ont été rapportés liés à cette mutation. Cependant cette mutation n'est pas hautement corrélée à la chloroquine resistance (Picot et al., 2009). La seconde protéine membranaire de transport de la vacuole digestive du parasite est la *Pfcrt* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter), qui a été impliquée dans le mécanisme d'efflux de la chloroquine. En effet, cette protéine est supposée jouer le rôle d'exportateur des métabolites hors de la vacuole digestive (Bray et al., 2005 ; Ferreira et al., 2011 ; Mu et al., 2003 ; Zhang et al., 2004). Une forte liaison entre la résistance à la chloroquine et une seule mutation du gène *pfcrt* à la position K76T a été mise en évidence *in vitro* sur des clones chloroquino-résistants et cette mutation consiste en un remplacement d'un acide aminé lysine par une thréonine au niveau du codon 76 de la protéine (Bray et al., 2005 ; Imwong et al., 2010). Des études ont également montré que les mutations au niveau des gènes codant ces protéines, N86Y et K76T, sont fortement associées à la résistance (Picot et al., 2009).

### **c. Mécanisme d'action de l'artémisinine**

Le mécanisme d'action de l'artémisinine fait l'objet de nombreux débats dans la communauté scientifique. Il a été largement rapporté que l'artémisinine et ses dérivés sont des pro-drogues, et sont administrés sous forme inactive (Dogovski et al., 2015). En présence du fer organique ( $Fe^{2+}$ ), le pont endoperoxyde de l'artémisinine est clivé. Ce clivage entraîne l'activation de l'artémisinine et la libération des radicaux libres aux propriétés toxiques directes sur le parasite en développement (Dogovski et al., 2015 ; O'Neill et al., 2010 ; Woodrow et al., 2005). De plus, l'artémisinine aurait une activité d'inhibition de l'ATPase calcium (sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA) et l'inhibition des protéases à cystéine telles que falcipaines et papaines (O'Neill et al., 2010 ; Woodrow et al., 2005). Il a été également démontré que le mode d'action de l'artémisinine est similaire à celui de la chloroquine, sur le fait de se lier à l'hème et d'inhiber la cristallisation de ce dernier en hémozoïne. Par ailleurs, il a été rapporté que l'artémisinine se lie à l'hème par alkylation et le complexe « adduit hème-artémisinine » inhibe la cristallisation de l'hémozoïne et libère des produits toxiques mortels pour les parasites (Li and Zhou, 2010).

### **d. Les inhibiteurs de la synthèse des métabolites**

Les principaux antipaludiques inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques du parasite sont les antifoliques (sulfamides et sulfones) et les antifoliniques (proguanil, pyriméthamine). Durant la phase de développement intra-érythrocytaire, *P. falciparum* utilise une voie de synthèse nucléotidique dite *de novo* pour synthétiser ses acides nucléiques. Et ce processus de synthèse *de novo* a été mis en évidence lors de la phase érythrocytaire de la culture *in vitro* du parasite par une incorporation radioactive du bicarbonate ( $HCO_3^-$ ) en base pyrimidine de l'ADN ou de l'ARN (Krungkrai and Krungkrai, 2016b). Ainsi, *P. falciparum* synthétise ses acides nucléiques par la voie des folates. Les antifoliques et les antifoliniques inhibent cette voie métabolique de synthèse de l'acide folique du parasite (Cowman, 2001). L'enzyme dihydrofolate reductase (PfDHFR), qui catalyse la réaction NADPH-dépendante de 7,8-dihydrofolate en 5,6,7,8-tetrahydrofolate, est une cible de la pyriméthamine. Une seconde enzyme impliquée dans la voie de synthèse des folates, est la dihydroptéroate synthase (PfDHPS). Cette enzyme est la cible de la sulfadoxine. Trois mutations sur le gène *Pfdhfr* aux positions 51, 59 et 108 ont été associées à un risque d'échec thérapeutique. Et une double mutation sur le gène *Pfdhps* (A437G et K540E) a été rapportée être associée à un échec thérapeutique. Ainsi la résistance des parasites aux antifolates est due à une accumulation de

mutations sur les deux gènes codant les enzymes cibles (PfDHFR, PfDHPS) impliquées dans le métabolisme (Picot et al., 2009).

### **3.2. Artémisinine et ses dérivés dans le traitement du paludisme**

L'artémisinine ou « qinghao » est un ancien remède herbal chinois, extrait à partir d'une plante, l'armoise *Artemisia annua*. Elle était utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour soigner la fièvre, depuis plus de 20 siècles (Klayman, 1985 ; Witkowski et al., 2010 ; Woodrow et al., 2005) . D'ailleurs, le Prix Nobel de médecine pour la découverte de l'artémisinine dans le traitement du paludisme a été attribué à Youyou Tu (Benelli and Mehlhorn, 2016). En effet, l'artémisinine et ses dérivés i) possèdent une activité antiparasitaire rapide et d'une excellente efficacité contre toutes les souches de *P. falciparum* résistantes aux anciens antipaludiques (amino-4-quinoléines), ii) inhibent de manière rapide le métabolisme parasitaire, iii) réduisent également la cyto-adhérence des hématies parasitées dans la physiopathologie du paludisme et iv) ont peu d'effets secondaires (Mok et al., 2011). Cependant, le seul inconvénient de l'artémisinine est sa durée de vie très courte dans le sang, ce qui explique leur utilisation en combinaison avec d'autres anti-paludiques (Dogovski et al., 2015 ; Woodrow et al., 2005). De plus, son utilisation en monothérapie est déconseillée pour prévenir le risque d'apparition de la résistance. Ainsi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande l'utilisation de l'artémisinine et ses dérivés en bi-thérapies (Artemisinin-based combination therapy, ACTs) (Witkowski et al., 2010; World Health Organization, 2015). Historiquement, la combinaison thérapeutique à base d'artémisinine a été introduite au milieu des années 1990, à la période où la résistance à tous les anciens antipaludiques disponibles était déclarée partout dans les pays endémiques (Ashley et al., 2014). C'est dans cette optique que l'OMS en 2001 a recommandé l'utilisation de la combinaison thérapeutique à base d'artémisinine pour traiter le paludisme à *P. falciparum* non compliqué en première intention partout dans les pays endémiques (Mok et al., 2011 ; Noedl, 2005 ; Takala-Harrison et al., 2013). L'intérêt d'une telle recommandation de l'association médicamenteuse est d'une part de retarder l'émergence de la résistance et d'autre part de prolonger la durée de vie de l'artémisinine. De plus, cette combinaison thérapeutique permet également d'avoir une cinétique complémentaire, afin de réduire la posologie de certains médicaments pour minimiser les effets secondaires (Hastings, 2011). La découverte de l'efficacité thérapeutique de l'artémisinine et ses dérivés dans le traitement du paludisme a largement contribué à la réduction de l'impact du paludisme dans les zones endémiques (Witkowski et al., 2012). Ces médicaments utilisés en bithérapie (artémisinine à base de combinaison thérapie) sont

devenus les pierres angulaires dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué (Imwong et al., 2010 ; Witkowski et al., 2010).

### **3.2.1. Emergence de la résistance des parasites aux ACTs**

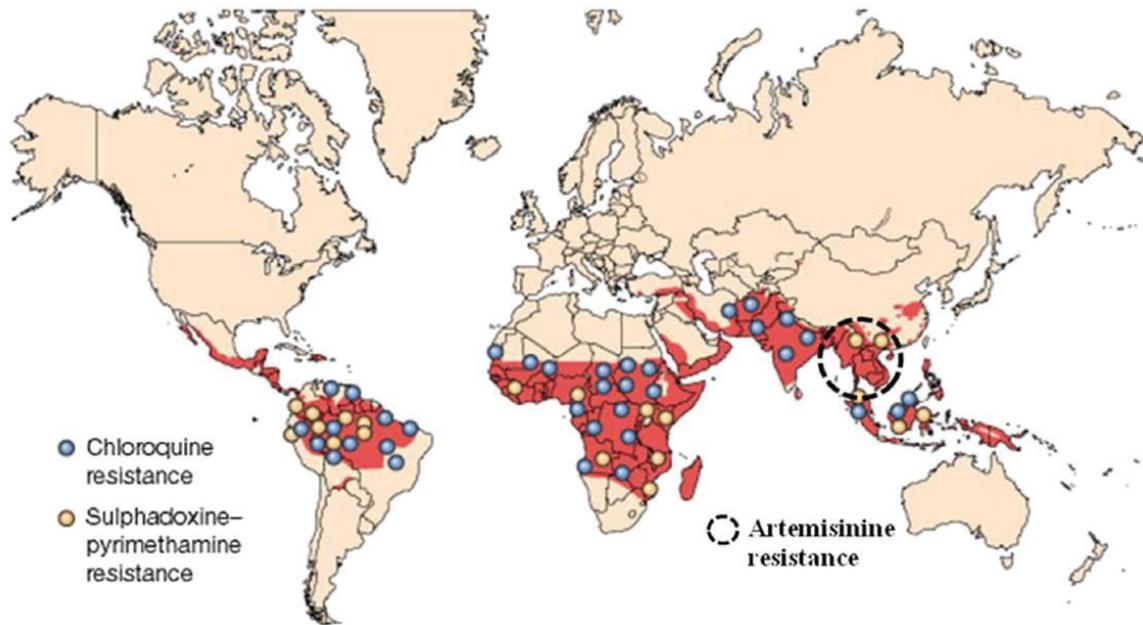
Le problème récurrent dans le traitement du paludisme est l'apparition rapide de la résistance aux anti-paludiques. Le terme « résistance » pour les artémisinines et ses dérivés n'implique pas que le traitement est en échec mais plutôt que le temps nécessaire pour une clairance complète des parasites dans l'organisme des patients atteints est allongé (une baisse de la sensibilité des parasites aux ACTs), (Alker et al., 2007 ; Dondorp et al., 2009 ; Imwong et al., 2010 ; Witkowski et al., 2010). En effet, les premiers cas d'émergence de la résistance aux ACT ont été rapportés à l'ouest du Cambodge par une diminution de la vitesse de la clairance parasitaire (Ashley et al., 2014 ; Klonis et al., 2011 ; Takala-Harrison et al., 2013). Historiquement, l'ouest du Cambodge est connu pour être un lieu d'émergence des premiers cas de résistance (épicerie) des souches de *P. falciparum*, comme cela a été également le cas pour de nombreux antipaludiques : chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine, l'artémisinine et la pipéraquline (Dwivedi et al., 2016 ; Tripura et al., 2016). Par ailleurs, un nouveau mécanisme d'adaptation de *P. falciparum* soumis à des doses élevées d'artémisinine a été rapporté, comme étant un mécanisme de « quiescence » temporaire, qui permet aux parasites de survivre malgré l'administration de médicament, et un arrêt de leur cycle cellulaire au stade « ring ». Cependant, ce mécanisme de « quiescence » ou de l'arrêt du développement cellulaire est une caractéristique physiologique qui a été rapportée chez d'autres espèces de *Plasmodium*, tels que *P. vivax* et *P. ovale* durant leurs stades hépatocytaires mais qui n'a jamais été décrite chez *P. falciparum*. Ainsi la protéine HSP70 est supposée jouer un rôle important dans l'adaptation des parasites durant les différentes phases environnementales (Witkowski et al., 2010). Mok et ses collègues ont rapporté des phénomènes préalables du mécanisme de quiescence, caractérisés par un ralentissement de l'activité métabolique (métabolisme énergétique et synthèse nucléotidique) aux stades « ring » et « trophozoïte » pour résister à la pression médicamenteuse (Mok et al., 2011). Ce phénomène d'adaptation montre de plus que *P. falciparum* s'adapte en permanence, et il arrive à contourner les cibles des anti-paludiques en développant de nouveaux mécanismes de résistance. Face à ce défi récurrent de l'émergence rapide de la résistance, une mise en place d'un programme de surveillance est une grande nécessité dans les mesures de contrôle de la propagation de la résistance. C'est dans cet objectif que le réseau de surveillance de la résistance à l'artémisinine a été créé en 2011 « Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration

(TRAC) » pour surveiller et fournir des outils afin de pouvoir ralentir la propagation de la résistance (Ashley et al., 2014 ; Kamau et al., 2015). Ainsi parmi les outils qui sont utilisés dans les mesures de surveillance de la résistance des ACT, il y a une évaluation de l'efficacité thérapeutique par des tests de chimiorésistance et des recherches de marqueurs moléculaires liés à la diminution de la clearance parasitaire. Toutes ces mesures visent à contrecarrer la propagation de la résistance du sud-est d'Asie vers le continent Africain, pour éviter que l'histoire de la propagation de la résistance ne se répète. Un tel cas de propagation serait une grande menace dans le programme de lutte contre le paludisme.

### **3.2.2. Les marqueurs moléculaires de la résistance aux ACTs**

La résistance de *P. falciparum* aux ACTs est décrite par un test « ring-stage survival assay (RSA<sub>0\_3h</sub>) » qui permet de détecter des phénotypes *in vitro* des souches de *P. falciparum* résistantes aux ACTs (Kamau et al., 2015; Tun et al., 2016). En effet, de nombreuses études réalisées en Asie du sud-est (du sud du Vietnam jusqu'au centre de Myanmar) ont récemment rapporté une association entre la résistance aux ACTs et une mutation d'une protéine nommée « Kelch » (K13). Le gène (F3D7\_1343700) codant cette protéine est localisée dans le chromosome 13 (Dogovski et al., 2015 ; Dwivedi et al., 2016 ; Tun et al., 2016 ; Win et al., 2016). De plus, les mutations Y493H, R539T, I543T et C580Y sur la protéine K13 ont été également rapportées dans ces zones, par leur lien étroit avec la résistance *in vitro* à l'artémisinine. Parmi ces mutations, C580Y a été rapportée être la plus dominante (Ashley et al., 2014 ; Dwivedi et al., 2016 ; Kamau et al., 2015). Par ailleurs, la mutation F446I sur le gène K13 a été rapportée liée à une diminution de la clairance parasitaire, et elle constitue la mutation la plus fréquemment retrouvée à la frontière entre le Myanmar et la Chine (Tun et al., 2016 ; Win et al., 2016). Le gène K13 est considéré comme étant un marqueur de résistance à l'artémisinine. Une récente étude réalisée en Afrique sub-saharienne a rapporté la présence de 7 mutations non synonymes mais ces mutations ne sont pas associées à la résistance aux ACTs, comme celles décrites en Asie du sud-est. Cependant, deux de ces mutations (A578S et V566I) nécessitent une attention particulière, pour le programme de surveillance de la propagation de la résistance en Afrique, du fait que ces deux mutations sont très proches de la mutation C580Y, en terme de proximité génétique (Kamau et al., 2015 ; Torrentino-Madamet et al., 2014). De plus, la mutation A578S a été largement retrouvée dans 5 pays (Kenya, République Démocratique du Congo, Gabon, Ghana et Mali). Face à cette situation de crainte de la propagation de la résistance des ACTs dans le continent Africain et de compromettre le programme de lutte contre le paludisme, de nouvelles cibles sont sans

cesse explorées dans l'espoir de trouver de nouveaux médicaments pour vaincre la résistance et bloquer la transmission de la maladie.



**Figure 6. Distribution géographique de la résistance de *P. falciparum* aux anti-paludiques**

Les résistances à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine, deux antipaludiques largement utilisés dans le monde, sont représentées en cercle bleu et jaune, respectivement. L'émergence de la résistance à l'artémisinine est limitée dans le territoire du sud-est de l'Asie, du Vietnam jusqu'au Myanmar, représentée en cercle discontinu (D'après Krungkrai and Krungkrai, 2016b).

#### **IV. Découverte de l'apoptose chez les organismes unicellulaires**

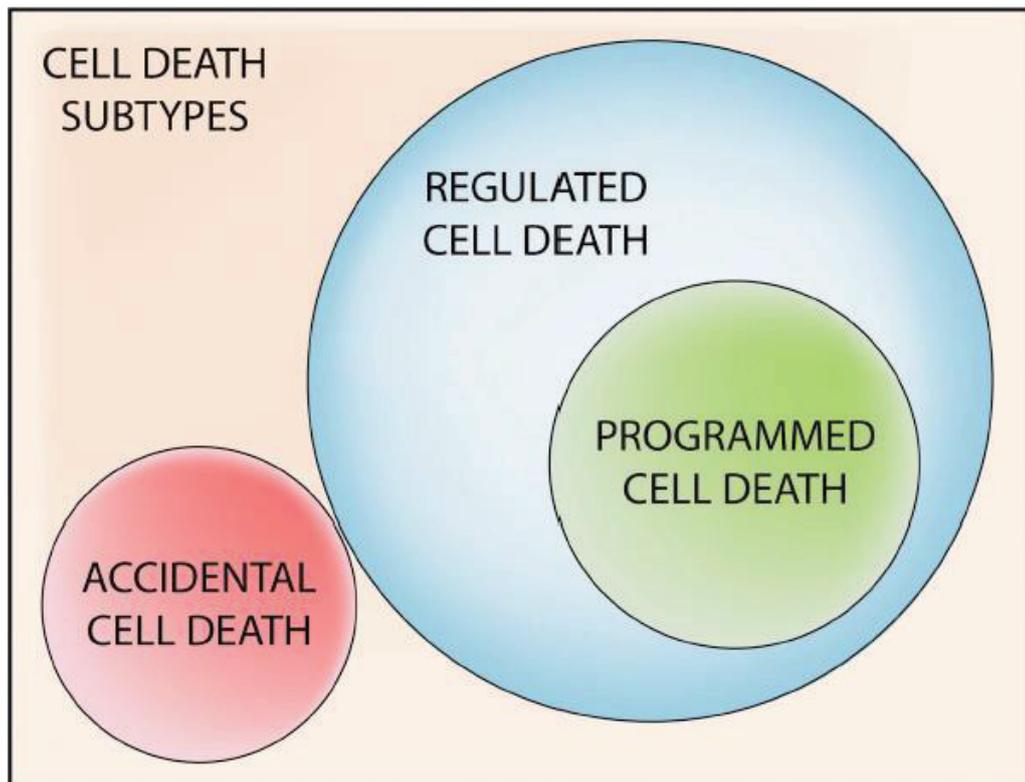
La « mort cellulaire programmée (programmed cell death, PCD) » ou « apoptose » était supposée être limitée uniquement aux métazoaires. Mais, depuis quelques années, le dogme de la restriction de l'apoptose aux organismes pluricellulaires semble être remis en question, suite à la mise en évidence des caractéristiques de type d'apoptose chez plusieurs organismes unicellulaires (Al-Olayan et al., 2002 ; Bruchhaus et al., 2007 ; Madeo et al., 1997 ; Picot et al., 1997 ; Zangger et al., 2002). En effet, cette mort cellulaire de type apoptotique a été rapportée pour la première fois en 1997 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez *Trypanosoma brucei* ssp, le parasite responsable de la maladie du sommeil (Madeo et al., 1997 ; Picot et al., 1997 ; Wong et al., 2012). Ces caractéristiques de PCD rapportées chez *S. cerevisiae* étaient une exposition des phosphatidylsérines (PS) à la surface de la membrane plasmique, une fragmentation d'ADN, une condensation de la chromatine et une morphologie anormale des cellules semblable aux corps apoptotiques (Madeo et al., 1997). Il y a environ deux décennies, Picot et al. furent les pionniers sur la découverte des caractéristiques de type apoptose chez *P. falciparum*, de type de fragmentation d'ADN, suite à une pression médicamenteuse (chloroquine). De plus, une forme progressive de mort du parasite a été observée et nommée « forme pycnotique » (moribonde), ou également connue sous le nom de « forme de crise ». De manière surprenante, seuls les parasites sensibles à la chloroquine (chloroquino-sensibles) présentaient cette forme d'apoptose, contrairement aux clones résistants (chloroquino-résistants). Ce défaut d'apoptose pour les clones résistants était à l'instar des cellules cancéreuses résistantes au traitement anti-cancéreux (Picot et al., 1997). Par ailleurs, chez *P. berghei* (le parasite responsable du paludisme chez les rongeurs), plusieurs caractéristiques de type apoptose ont été mises en évidence, telles que i) la condensation de la chromatine, ii) la fragmentation de l'ADN, iii) une externalisation des phosphatidylsérines à la surface de la membrane plasmique et iv) une éventuelle formation des corps apoptotiques dans l'étape des ookinètes (forme présente chez le moustique) (Al-Olayan et al., 2002). Chez les leishmanies, la mort cellulaire a été mise en évidence pour la première fois, suite à une privation du sérum dans le milieu de culture parasitaire. Et cette absence du sérum a entraîné une situation de stress, caractérisée par une fragmentation de l'ADN (Zangger et al., 2002). De manière intéressante, l'apoptose semble jouer un rôle important à plusieurs étapes du cycle parasitaire en sélectionnant les clones parasitaires aptes à maintenir la transmission et en limitant la prolifération du parasite afin de favoriser la survie de l'hôte en établissant un équilibre entre les parasites et l'hôte. Et comme cela a été décrit par

le biologiste britannique William dans sa théorie, le comportement altruiste permet aux parasites de contrôler la charge parasitaire (self-limitation) et le maintien d'une condition optimale, qui semble être essentielle pour le développement du reste de la population et de leur transmission (Al-Olayan et al., 2002 ; Bruchhaus et al., 2007). Il a été également supposé que le rôle de l'apoptose permettrait d'améliorer la « fitness » de la population clonale (Matthews et al., 2012). Ainsi toutes ces découvertes mettent en évidence l'existence d'une machinerie basique fonctionnelle d'apoptose chez les eucaryotes inférieurs. Ainsi, afin de comprendre la voie de mort cellulaire programmée chez les organismes unicellulaires, la levure a été utilisée comme un modèle génétique, du fait de sa simplicité d'utilisation (Madeo et al., 1997). Cependant, des débats restent très controversés, quant à la nature exacte du type de mort cellulaire mise en évidence (Engelbrecht and Coetzer, 2013 ; Totino et al., 2008).

#### **4.1. Mort cellulaire et classification**

Le biologiste Américain Richard A. Lockshin fut le premier à décrire la mort cellulaire dans les cellules du muscle de papillon à soie, ainsi contribuant à la compréhension de la « mort cellulaire programmée ». Quelques années plus tard, en 1972, l'Australien John F Kerr et ses collègues ont inventé le mot « Apoptose » (du grec signifiant tomber de) pour décrire une forme de mort cellulaire caractérisée par une morphologie et une biochimie spécifique chez les mammifères (Galluzzi et al., 2015 ; Kroemer et al., 2009 ; Riedl and Shi, 2004). Selon la classification du type de mort cellulaire, la Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) a réparti cette forme de mort en deux catégories, i) une mort cellulaire accidentelle (ACD : Accidental Cell Death) et ii) une mort cellulaire régulée (RCD : Regulated Cell Death). La classification du NCCD a défini la mort cellulaire accidentelle (ACD), comme étant une mort cellulaire causée par une exposition à des conditions physicochimiques et mécaniques extrêmes, qui seraient à l'origine d'une mort cellulaire de façon incontrôlable. Tandis que la mort cellulaire régulée (RCD) fait intervenir la machinerie moléculaire pour une réponse adaptée, afin de rétablir l'homéostasie cellulaire. Cette dernière forme de mort cellulaire a été classée en trois types :

- i) Type I est une forme de mort cellulaire de type « apoptose »
- ii) Type II est une forme de mort cellulaire par la voie « autophagique » (autophagie)
- iii) Type III est une forme de mort cellulaire « nécrotique ». Pour ce type de mort, les cellules ne présentent ni les caractéristiques apoptotiques, ni autophagiques (Galluzzi et al., 2015).



**Figure 7. Différents types de mort cellulaire selon la classification de NCCD**  
 Accidental Cell Death (ACD), une mort cellulaire causée par une exposition à des conditions physicochimiques et mécaniques extrêmes. Regulated Cell Death (RCD), une mort cellulaire causée par des mécanismes pharmacologiques ou génétiques spécifiques. Programmed Cell Death (PCD), la mort cellulaire programmée est incluse dans RCD, c'est une mort cellulaire qui se produit lors du développement pour maintenir l'homéostasie de l'organisme. (D'après Galluzzi et al., 2015).

#### 4.1.1. Apoptose

L'apoptose est un processus normal de RCD (Regulated Cell Death), qui se produit au cours du développement embryonnaire et c'est aussi un moyen par lequel les cellules endommagées, infectées ou usées sont éliminées. Ce mécanisme de mort permet également le maintien de l'homéostasie de l'organisme, car une dérégulation de l'apoptose conduit à de nombreuses pathologies, notamment le cancer, les maladies auto-immunes et les maladies neurodégénératives (Nicholson, 1999 ; Philchenkov, 2004 ; Riedl and Shi, 2004). Selon la NCCD, la mort cellulaire programmée n'est pas synonyme de l'apoptose mais elle fait plutôt partie de la mort cellulaire régulée (RCD). L'activation de l'apoptose est dépendante d'une famille d'enzymes à protéase de cystéine, les caspases. L'apoptose est caractérisée par une condensation de la chromatine, une externalisation des phosphatidylsérines (PS) à la membrane plasmique, une fragmentation de l'ADN, un rétrécissement cytoplasmique et la formation des corps apoptotiques (Hu and Kavanagh, 2003). Ainsi, PS et la fragmentation de l'ADN sont utilisées comme marqueurs de l'apoptose et l'activité des caspases peut être

détectée par des inhibiteurs peptidiques fluorogéniques synthétiques, tels que le Z-VAD-fmk pour bloquer ou atténuer le processus d'apoptose (Vercammen et al., 2007). Le processus d'apoptose est initié par deux voies : une voie extrinsèque dépendant de l'activation des récepteurs de mort et une voie intrinsèque dépendant de nombreux facteurs qui sont à l'origine de la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Elmore, 2007 ; Galluzzi et al., 2015).

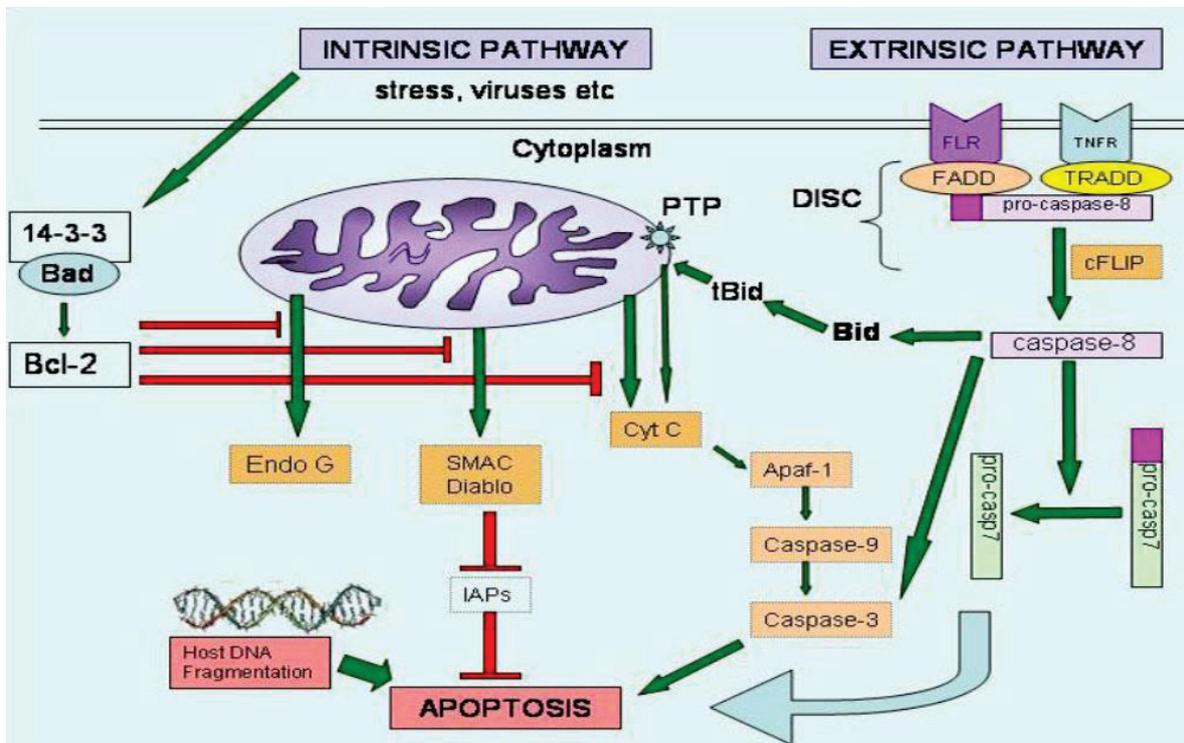
#### **4.1.1.1. La voie extrinsèque de l'apoptose**

La voie extrinsèque de l'apoptose est déclenchée par la fixation d'un ligand de mort à leur récepteur, suite à l'exposition aux signaux extracellulaires, tels que le stress extérieur. Les récepteurs de mort font partie de la superfamille des récepteurs de tumor necrosis factor (TNF) (TNFR1, CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3, DR6). Ces récepteurs possèdent 4 domaines riches en cystéine dans leur partie extracellulaire et un domaine de mort DD (Death Domain) dans leur région cytoplasmique. Ce domaine est un domaine de recrutement qui contient des molécules adaptatrices FADD/MORT1 (fas-associated death domain). Ainsi la fixation des ligands de mort à leurs récepteurs déclenche des cascades de signalisation variées, conduisant à la formation d'un complexe de signalisation induisant la mort (DISC). Mais la voie dépendant de récepteurs de mort est subdivisée en deux voies de signalisation selon le niveau de la formation du complexe DISC : une voie de signalisation cellulaire de type I, qui est caractérisée par un niveau élevé de formation de DISC, qui va activer la caspase-8. La caspase 8 va directement activer les caspases effectrices (caspase-3,- 6 et -7) qui conduisent à la mort cellulaire. En revanche, la voie de signalisation cellulaire du type II présente un niveau très faible de formation de DISC. Ce dernier active faiblement la caspase-8, mais une amplification du signal de mort est nécessaire ; ainsi la caspase-8 clive un domaine de mort agoniste BID en tBID. Et le clivage de cette protéine de la famille de Bcl-2 va entraîner le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol. Ainsi le cytochrome c libéré entraîne la formation du complexe apoptosome et ce dernier va activer la caspase-9, qui à son tour va activer les caspases effectrices (caspase-3,-6 et 7) qui mènent à la mort cellulaire. A chacune de ces étapes, des mécanismes de régulation interviennent pour limiter ou favoriser le processus d'apoptose (Chowdhury et al., 2008 ; Galluzzi et al., 2012 ; Lavrik et al., 2005 ; Riedl and Shi, 2004).

#### 4.1.1.2. La voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque de l'apoptose est déclenchée par de nombreux facteurs, tels que l'exposition à des radiations, le stress cytotoxique ou le stress oxydatif, le manque de facteur de croissance. Ainsi, ces stimuli entraînent une perméabilité de la membrane mitochondriale et une libération de plusieurs protéines, dont le cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol. Le cytochrome c se lie à d'autres protéines pour former le complexe de l'apoptosome. Et le complexe apoptosome active la caspase 9, et la caspase 9 à son tour active les caspases effectrices de caspase 3, 6 et 7 qui initient la cascade de mort. Des protéines de la famille de bcl-2 et IAP (inhibitor of apoptosis proteins) sont des inhibiteurs de l'apoptose, qui peuvent être activés pour bloquer la cascade de signalisation de la mort en cas de nécessité. Le tableau ci-dessous résume les différents types de mort cellulaire définie par la NCCD

D'après (Galluzzi et al., 2012, 2015 ; Riedl and Shi, 2004).



**Figure 8. Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose à caspase dépendante**

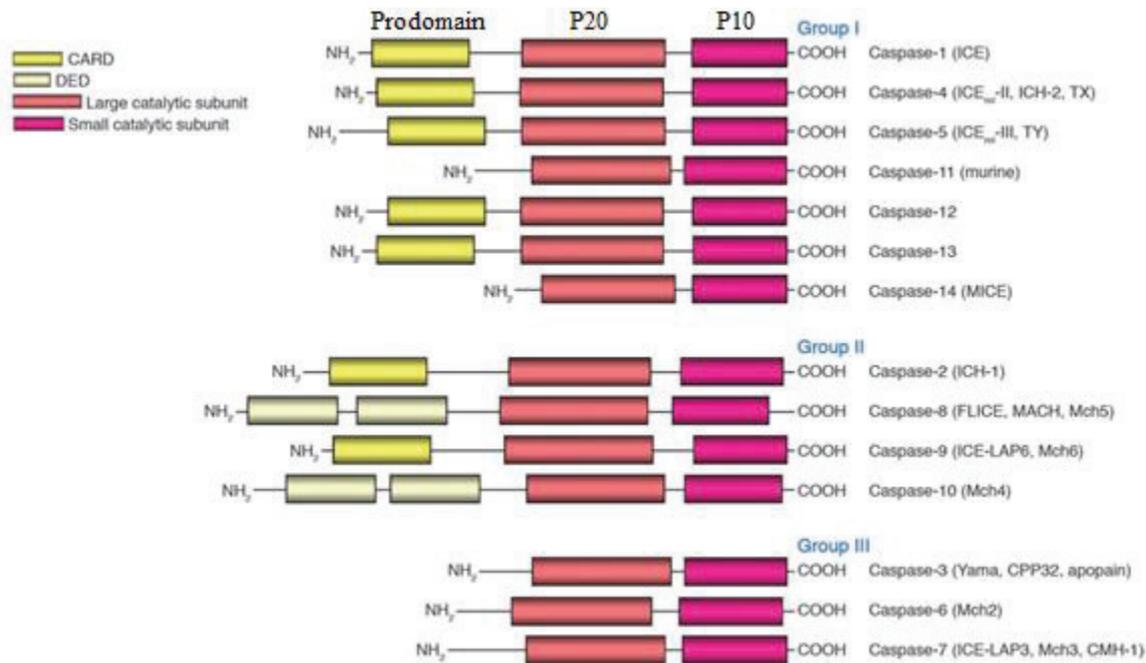
L'activation des caspases peut être modulée à plusieurs niveaux. La formation du complexe DISC est inhibée par la protéine c-FLIP. L'activation des caspases effectrices est inhibée par IAPs (inhibitor of apoptosis). (D'après Riedl and Shi, 2004).

**Tableau 4 : Résumé des différents types de mort cellulaire**

Types de mort cellulaire	Caractéristiques	Références
<b>Apoptose</b>	Elle est caractérisée par plusieurs morphologies cellulaires : - Rétrécissement cytoplasmique, - Condensation de la chromatine (pycnose) - Exposition de la phosphatidylsérine à la surface de la membrane plasmique - Fragmentation de l'ADN (caryorrhexie) - Formation des corps apoptotiques	NCCD, 2009 NCCD, 2015
<b>Autophagie</b>	Processus de renouvellement des constituants cellulaires - Vacuolisation autophagique massive du cytoplasme - Formation des vésicules intracellulaires connues sous le nom d'autophagosome	NCCD 2009 NCCD 2012 Durant et al., 2008
<b>Nécrose</b>	- Augmentation du volume cellulaire (oncose) - Gonflement des organes - Rupture de la membrane plasmique - Perte des contenus cellulaires	NCCD, 2009 NCCD, 2012
<b>Cornification</b>	Mort cellulaire qui se produit dans l'épiderme - elle est limitée au niveau des kératinocytes - impliquée dans la maturation des cellules anucléées, les globules rouges et les cellules de l'épithélium	NCCD, 2009
<b>Catastrophe mitotique</b>	Mort cellulaire qui se produit durant la phase de mitose - Altération nucléaire suite à une mitose anormale - Ce type d'aberration nucléaire pourrait conduire à une sénescence cellulaire	NCCD, 2012
<b>Pyroptose</b>	Mort cellulaire induite par une infection bactérienne. - Elle est caspase 1-dépendante - Les cellules pyroptiques peuvent présenter des caractéristiques typiques de l'apoptose ou la nécrose.	Brennan et al, 2000 NCCD, 2012

## 4.2. Les caspases

Les caspases constituent une famille de Cystéine-Aspartate-Spécifique-Protéases, qui ont une préférence spécifique pour les substrats ayant un résidu acide aspartique au niveau de la position P1 (McLuskey and Mottram, 2015). Le premier membre connu de la famille des caspases est la caspase-1, anciennement connue sous le nom d'interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE), et sa structure tridimensionnelle a été résolue en 1994. Cependant, le rôle de la caspase 1 dans l'apoptose n'a pu être mis en évidence qu'après la découverte du gène homologue codant la protéine CDE-3 de *Caenorhabditis elegans*. Le rôle de CDE-3 dans la mort cellulaire a été mis en évidence lors du développement de l'hermaphrodite. Ainsi CDE-3/ ICE ont été identifiés comme des protéases qui jouent un rôle clé dans l'apoptose (Chowdhury et al., 2008 ; Nicholson, 1999 ; Philchenkov, 2004). Chez les mammifères, 14 caspases ont été identifiées, dont 11 chez l'homme (caspase 1-10 et caspase 14), (McLuskey and Mottram, 2015 ; Riedl and Shi, 2004). Les caspases ont été divisées en trois groupes, selon la structure de leurs prodomaines et de leurs fonctions. Le groupe I (caspases inflammatoires) est caractérisé par un long prodomaine, qui joue un rôle important dans la maturation des cytokines et les réponses inflammatoires. Le groupe II (caspases initiatrices) présente également un long prodomaine, contenant soit le domaine effecteur de mort (DED : Death Effector Domain) ou le domaine de recrutement des caspases (CARD : Death Effector Domain). Le groupe III (caspases effectrices) se caractérise par un court prodomaine de 20 à 30 acides aminés. Le domaine de mort (DD : Death Domain) présent dans le prodomaine est un membre de la famille des récepteurs de TNF et il est subdivisé en deux sous-domaines, le domaine effecteur de mort (DED) et le domaine de recrutement des caspases (CARD). Les domaines DD et CARD se lient par des interactions électrostatiques et permettent le recrutement des caspases initiatrices pour initier un complexe de signalisation soit inflammatoire, soit apoptotique. Les caspases sont des régulatrices majeures du processus d'apoptose, durant la prolifération des cellules et lors de l'activation du système immunitaire (inflammation), (Chowdhury et al., 2008 ; Lavrik et al., 2005 ; McLuskey and Mottram, 2015).



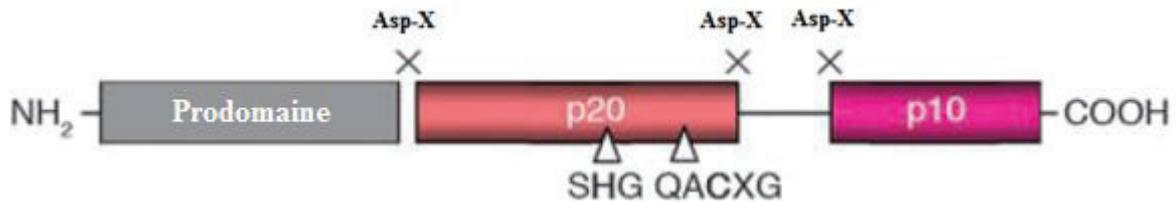
**Figure 9. Structure de la famille des caspases**

Le Groupe I comprend les caspases inflammatoires, le groupe II les caspases initiatrices de l'apoptose et le groupe III les caspases effectrices de l'apoptose. Les domaines CARD (Death Effector Domain) et DED (Death Effector Domain) sont présents dans le prodomaine. (Adapté d'après Lavrik et al., 2005)

#### 4.2.1. La structure des caspases

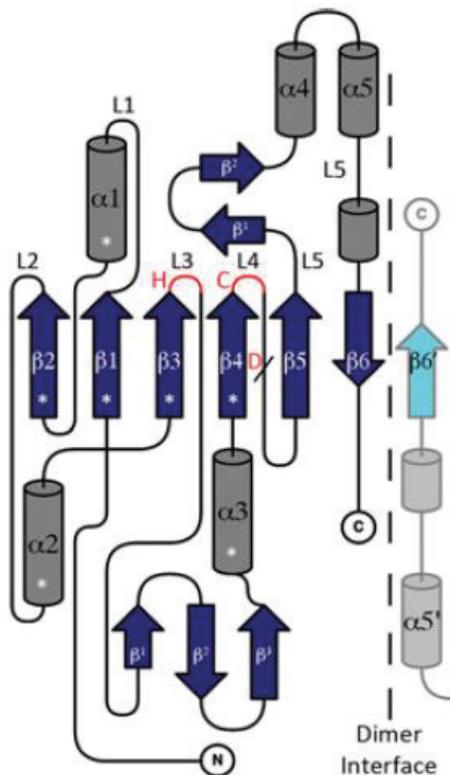
Les caspases sont produites sous formes inactives (procaspases ou zymogènes) et présentent une structure primaire très conservée. En effet, la chaîne polypeptidique possède une taille variable de 32 à 55 kDa et elle est composée de 3 domaines (tripartites) communs. Un prodomaine en N-terminal (3-24 kDa), une grande sous-unité P20 (17-21 kDa), qui contient le domaine catalytique (site actif) et une petite sous-unité P10 (10-13 kDa), en C-terminal. De manière générale, la grande sous-unité P20 est séparée de la petite sous-unité P10 par une petite séquence appelée « linker ». La dyade catalytique histidine-cystéine est un site actif pentapeptide conservé « QACXG » (ou le X peut être un R, Q ou un D), où se trouve les deux sites de clivage (résidus acide aspartique) pour l'activité catalytique (Chowdhury et al., 2008)

**Figure 10.** La structure tridimensionnelle (3D) des caspases a été résolue sous forme homodimère, le premier fut la caspase 1 en 1994 (Chowdhury et al., 2008). La structure des caspases est formée par six feuillets au centre ( $\beta 1$ - $\beta 6$ ), reliés par cinq fragments parallèles et un fragment  $\beta$  antiparallèle. Le feuillet central est entouré de cinq hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 5$ ), contenant trois petits feuillets  $\beta$  entre ( $\beta 3$ - $\alpha 3$ ) et les résidus de la dyade catalytique histidine et cystéine sont localisés dans l'extrémité C-terminal des feuillets  $\beta 3$  et  $\beta 4$  (McLuskey and Mottram, 2015), **Figure 11.**



**Figure 10. Structure primaire d'une procaspase.**

N-terminal, le prodomaine, la grande sous-unité P20 et la petite sous-unité P10 en C-terminal. Asp-X sont des sites de clivage lors de la maturation de la procaspase en caspase. (Adapté d'après Lavrik et al., 2005)



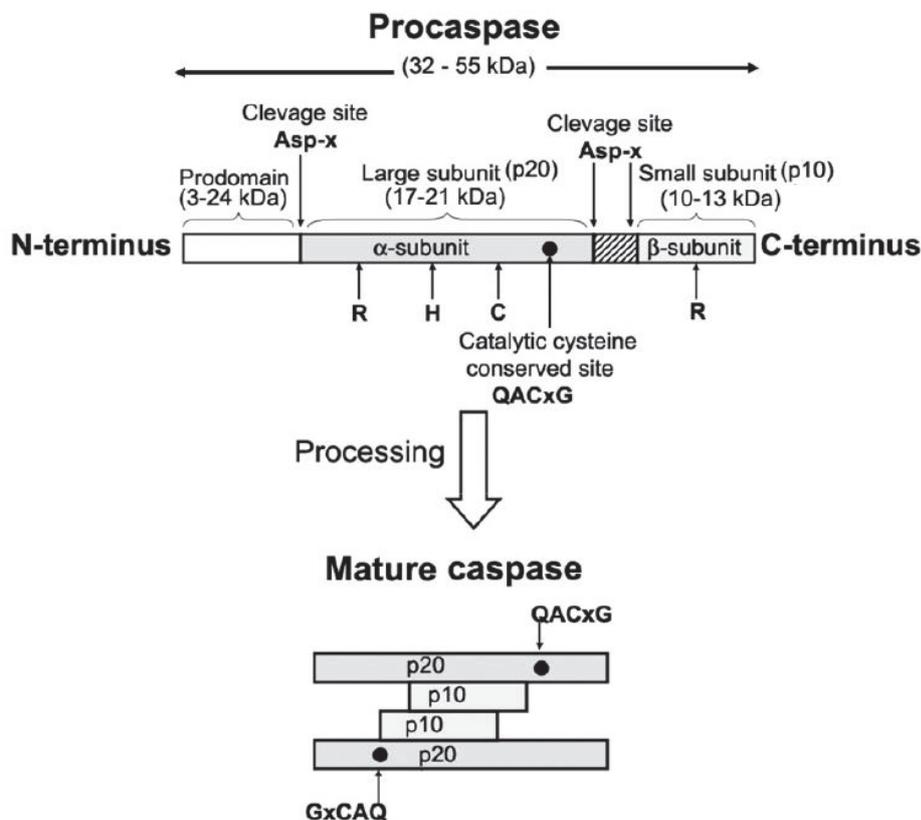
**Figure 11. Topologie et structure d'un dimère de la caspase 7**

Le dimère comprend six feuillets  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 6$ ) et cinq hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 5$ ), ainsi que de 5 boucles (L1-L5) qui sont reliées aux feuillets- $\beta$ , les résidus histidine et cystéine de la dyade catalytique sont situés dans les boucles L3 et L4. (D'après McLuskey and Mottram, 2015)

#### 4.2.2. Activation protéolytique des caspases

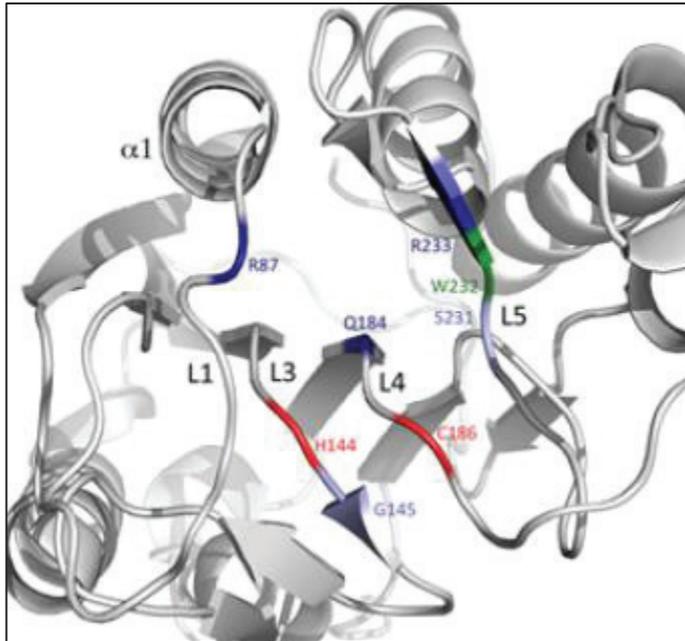
Les caspases sont des monomères qui se plient en 6 feuillets centraux dont le site de clivage est hautement conservé. La dimérisation est cruciale pour la stabilité et la formation d'une caspase mature. Les caspases inflammatoires et initiatrices sont présentes dans les cellules sous forme monomères et sont activées par dimérisation, alors que les caspases effectrices sont présentes dans les cellules sous forme dimères (zymogènes) et sont activées par clivage intermoléculaire par les caspases initiatrices (McLuskey and Mottram, 2015). La dimérisation se produit par clivage protéolytique au niveau de deux sites de clivage des résidus acide aspartique [Asp(P1)-X(P1)], pour générer une protéase active hétérotétramérique ( $P20_2$ - $P10_2$ ) constituée de deux sous-unités identiques de la grande et de la petite sous-unité et une

libération du prodomaine **Figure 12**, (Chowdhury et al., 2008 ; Vercammen et al., 2007). Le prodomaine est une région dans l'enzyme qui doit être clivée pour l'activité protéolytique. Cependant il a été démontré pour la caspase 6 que le clivage du prodomaine n'a pas d'effet sur son activité, et ce même constat a été rapporté pour les peptidases du clan CA, que le clivage du prodomaine n'est pas nécessaire pour activer l'enzyme. La structure de la forme active des caspases a été mise en évidence par cristallographie aux rayons X en interaction avec leurs inhibiteurs (Uren et al., 2000). Par ailleurs, l'analyse de l'interaction des inhibiteurs peptidiques sur le site actif de la caspase 7 a révélé des interactions hydrogène et hydrophobiques. Ainsi cinq résidus de l'enzyme (Arg<sup>87</sup>, Gly<sup>145</sup>, Ser<sup>231</sup>, Arg<sup>233</sup>) se lient avec l'inhibiteur (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde) à la position P1 de l'acide aspartique par des liaisons hydrogène. Ce complexe est localisé dans les boucles L1, L3 L4 et L5 où se trouve la dyade catalytique histidine/cystéine (L3 et L4). Il a été démontré que les trois résidus (Arg<sup>87</sup>, Gly<sup>145</sup> et Arg<sup>233</sup>) interagissent avec la chaîne carboxylique au niveau de la position P1 de l'acide aspartique suggérant que ces trois résidus sont responsables de la spécificité de liaison au niveau de la poche S1, **Figure 13**, (McLuskey and Mottram, 2015).



**Figure 12.** Représentation schématique des caractéristiques structurales des caspases de mammifère et processus de la maturation des caspases.

Le clivage protéolytique d'une procaspase entraîne la libération du prodomaine, et la formation d'un hétérotétramère constitué de deux sous-unités P20 et de deux sous-unités P10. (D'après Chowdhury et al., 2008)



**Figure 13. Structure de la poche S<sub>1</sub> de l'enzyme (caspase 7).**

La dyade catalytique (histidine et cystéine) est représentée en rouge, les résidus (Arg<sup>87</sup>, Gly<sup>145</sup>, Ser<sup>231</sup>, Arg<sup>233</sup>) de l'enzyme qui forment des liaisons hydrogène avec l'inhibiteur (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde) sont indiqués en bleu.

(D'après McLuskey and Mottram, 2015)

#### 4.3. Les orthologues des caspases

Alors que les débats étaient en plein essor sur l'existence d'une machinerie basique fonctionnelle capable de réguler la mort cellulaire chez les organismes unicellulaires, vient s'ajouter une découverte intéressante, celle de l'existence d'une famille de caspases-like chez les eucaryotes inférieurs. En effet, L. Aravind est le premier à découvrir les orthologues des caspases en 1999 (Aravind et al., 1999). Ainsi, cette découverte a ouvert la voie à Uren et ses collègues en 2000 pour classer les caspases chez les métazoaires, les paracaspases chez les animaux et les myxomycètes, et les métacaspases chez les plantes, les champignons et les protozoaires. Et cela, grâce à des études de prédiction d'homologie de séquence utilisant le domaine catalytique des caspases (*in silico*), (Uren et al., 2000). Cette analyse phylogénétique de proximité entre les caspases et les métacaspases a fait que les métacaspases ont été décrites comme étant les orthologues des caspases. De plus, l'absence des métacaspases chez les métazoaires et la présence uniquement des caspases chez ces derniers semblent être en faveur de la théorie de l'évolution des espèces, où les métacaspases seraient l'ancêtre commun, et les caspases auraient divergé via l'évolution (Uren et al., 2000 ; Vercammen et al., 2007). Dans le système de classification des peptidases dans la banque de donnée MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), les protéases à cystéine sont classées en clans et en familles. La famille est considérée comme une origine évolutive commune, qui rassemble des protéines présentant des similarités structurales. Le clan regroupe un ensemble de familles ; le nom d'un clan consiste en deux lettres, la première désigne le type de résidu catalytique en utilisant le

code à une lettre des acides aminés (Marco and Coterón, 2012 ; Rawlings and Barrett, 1993). Des analyses *in silico* ont révélé que la structure et l'organisation des métacaspases étaient très proches des caspases, permettant ainsi de les associer à la famille C14 et au clan CD et cela malgré certains désaccords dans le comité scientifique (Tsiatsiani et al., 2011a ; Vercammen et al., 2007). La famille C14 présente des résidus histidine et cystéine dans la dyade catalytique et une conservation de ces résidus (histidine-cystéine) entre les caspases, paracaspases et les métacaspases a été démontrée *in silico* (Uren et al., 2000). Le clan CD des protéases se caractérise par la spécificité pour leurs substrats ayant un acide aspartique au niveau de la position P1 (Vercammen et al., 2007). Ainsi, la seule différence connue entre les caspases et les métacaspases réside dans la spécificité de leurs substrats. En effet, les métacaspases présentent une poche S1 riche en résidus acides entraînant une forte spécificité pour les acides aminés basiques tels que lysine ou arginine au niveau de la position P1 (Vercammen et al., 2007). D'ailleurs, cette spécificité basique pour les métacaspases a été mise en évidence pour la métacaspase 2 de *Trypanosoma brucei* et plus tard chez la métacaspase 1 de *P. falciparum* (PfMCA1) (Meslin et al., 2011a ; Moss et al., 2007). Récemment, la famille C14 a été subdivisée en deux sous-familles, la sous-famille C14A pour les caspases et la sous-famille C14B qui regroupe les métacaspases et les paracaspases, considérant ainsi que les métacaspases sont structurellement différentes des caspases et de ce fait elles ne doivent pas être regroupées dans la même famille (McLuskey and Mottram, 2015).

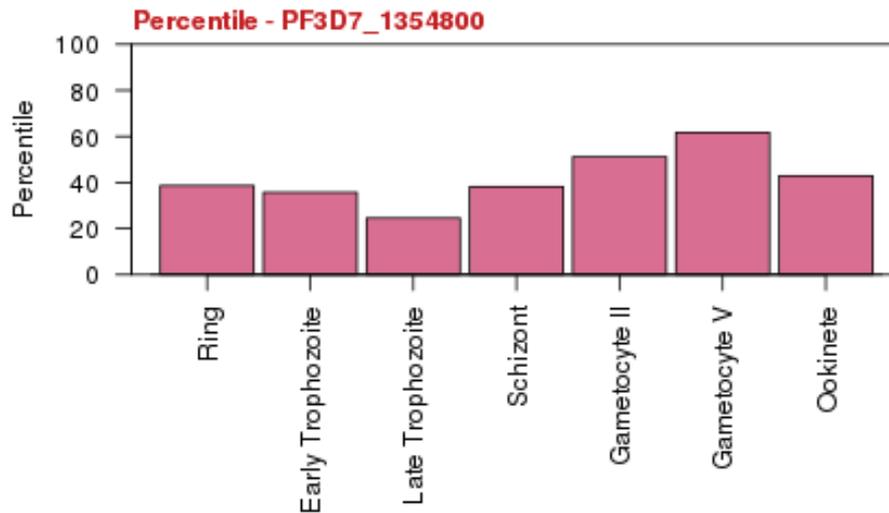
## V. Génome de *Plasmodium falciparum*

Malgré les efforts menés pour contrôler et éradiquer le paludisme, la lutte reste invaincue. De ce fait, un consortium international (Institute for Genomic Research and Naval Medical Research Center (TIGR/NMRC), Sanger Institute and Stanford University) a été lancé en 1996, pour séquencer le génome entier de *P. falciparum* en vue d'approfondir les connaissances sur la biologie moléculaire de ce parasite et dans l'espoir de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et d'éventuelles cibles pour un vaccin efficace contre le paludisme. C'est ainsi que le génome du clone de référence 3D7 du MR4 (Malaria Research and Reference Reagent Source Center) a été entièrement séquencé en 2002 (Gardner et al., 2002 ; Hoffman et al., 2002). Le génome nucléaire de *P. falciparum* a une taille d'environ 22,8 mégabases (Mb), réparties dans 14 chromosomes, avec une richesse en A+T extrêmement élevée (80,6%), comparée à celui du génome humain 59% (A + T) et de celui du génome de la bactérie *Escherichia coli* 49% (A + T) (Hoffman et al., 2002). Cette richesse en AT du génome rend difficile l'expression hétérologue des gènes de *P. falciparum*, notamment chez *E. coli*, du fait de l'instabilité des grands fragments d'ADN ayant une taille de plus de 5 kb (Dame et al., 1996 ; Hoffman et al., 2002). Par ailleurs, les travaux récents de séquençage du génome entier de *P. vivax* de la souche Sal-1/Salvador montrent que la taille du génome de ce dernier (26,8 Mb) est supérieure à celui du *P. falciparum*, de même que le contenu en GC qui était de 42,3% (*P. vivax*), par rapport au contenu GC de 19,4% chez *P. falciparum*. D'ailleurs, il a été rapporté que la taille du génome des cinq espèces de *Plasmodium* humaines est pratiquement uniforme allant de 23 à 27 Mb réparties dans les 14 chromosomes, avec environ 5500 gènes dont 51% présentent un seul intron (Antinori et al., 2012 ; Krungkrai and Krungkrai, 2016b). Outre le génome nucléaire, *P. falciparum* possède un petit génome mitochondrial de 6-kilobase (kb) et un ADN circulaire de 35-kb logé dans un apicoplaste. Ainsi, des ARNs de transfert et plusieurs sous-unités ribosomiques 18S-5.8S-28S sont répartis dans les différents chromosomes (Gardner et al., 2002). D'ailleurs, la sous-unité 18S est utilisée pour identifier le genre et les espèces de *Plasmodium* dans la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (de Monbrison et al., 2006). Des études comparatives entre *Plasmodium* humains et murins ont montré l'existence d'une synténie des gènes entre ces différentes espèces, c'est-à-dire que la disposition des gènes homologues sur les chromosomes est similaire (Carlton et al., 2002 ; Gardner, 1999 ; Thompson et al., 2001). C'est ainsi que le chromosome 13 de *P. falciparum*, porteur du gène de la métacaspase 1 (PF3D7\_1354800), révèle cette disposition synthétique du gène de la métacaspase 1 entre *Plasmodium* humain et

murin **Figure 14**. Une telle similitude remarquablement conservée montre l'importance de l'utilisation des modèles murins, particulièrement, *P. yoelii* et *P. berghei* pour l'étude de la physiopathologie des *Plasmodium* humains et des recherches sur de nouvelles cibles thérapeutiques (Matz and Kooij, 2015), notamment, i) des études préliminaires sur l'efficacité *in vivo* des candidats molécules antipaludiques (Bienvenu et al., 2008 ; Marijon et al., 2014) et ii) des études des vaccins candidats pour une réponse immunitaire (Carlton et al., 2002) ainsi que iii) l'étude des gènes impliqués dans la virulence, tels que les gènes *var* codant une protéine PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* érythrocyte membrane protein-1), rifin, stevor, et des gènes clag (Cytoadherence-linked asexual gene family), qui sont localisés dans les régions subtélomériques des chromosomes (Figueiredo et al., 2000). Ces protéines sont en partie responsables de la physiopathogénicité de *P. falciparum*. Chaque parasite contient environ 40 copies du gène *var* par génome haploïde, qui sont réparties dans les 14 chromosomes (Horrocks et al., 1998). De plus, ces gènes se sont avérés être impliqués dans l'invasion aussi bien pendant la phase érythrocytaire que durant le stade de l'infection (sporozoïte) du parasite (Florens et al., 2002a).



quantifié soit en pourcentage, soit en kilobases du modèle exon lu en million de lectures (RPKM), (PlasmoBD : [http:// plasmodb.org](http://plasmodb.org)).



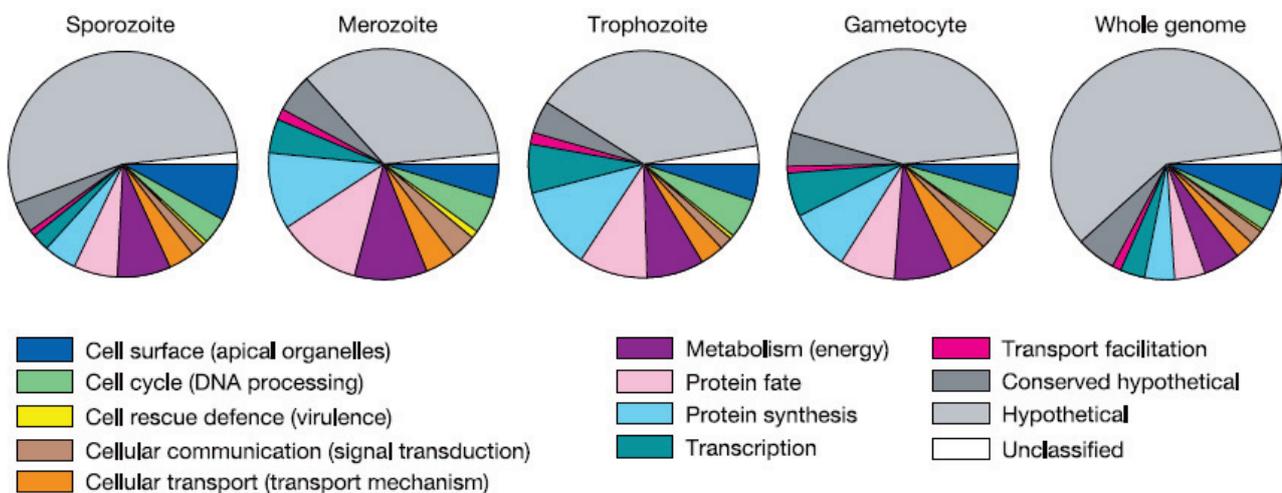
**Figure 15. Niveau d'expression des gènes de différents stades du cycle de vie du clone 3D7 de *P. falciparum***

La culture continue du clone 3D7 a été récupérée aux différents stades du cycle aux temps 8, 19, 30 et 42 h après multiplication des parasites correspondant aux stades ring, jeune trophozoïte, trophozoïte âgé et schizonte. Les gamétocytes étaient produits au bout de 8 jours à partir des formes asexuées (gamétocytes stade II) et 10 jours (gamétocyte du stade V). Et les ookinètes étaient obtenus à partir de l'intestin du moustique après 24h de prise du repas sanguin. La méthode « Illumina-based sequencing » est utilisée pour quantifier le niveau d'expression des gènes. (PlasmoDB : [http://: plasmodb.org](http:// plasmodb.org))

## 5.2. Protéome de *P. falciparum*

*Plasmodium falciparum* possède environ 5268 protéines prédites, dont 60% (3 208) sont des protéines hypothétiques (Gardner et al., 2002). Une analyse protéomique globale utilisant la technique d'identification multidimensionnelle des protéines (MudPIT) et la spectrométrie de masse a permis d'identifier les protéines exprimées dans les différents stades du cycle parasitaire. Ainsi l'analyse de quatre stades du cycle (sporozoïte, mérozoïte, trophozoïte et gamétocyte) a permis d'identifier 152 protéines (6%) présentes dans ces quatre stades, **Figure 16**. Ces protéines communes sont des protéines ribosomiques, des facteurs de transcription, des histones et des protéines du cytosquelette. Au stade sporozoïte environ 49 % des protéines ont été identifiés spécifiques à ce stade. De même, aux stades mérozoïtes, trophozoïtes et gamétocytes sont présentes environ 20 à 33% des protéines spécifiques. Cette étude a démontré que les protéines les plus largement exprimées sont les protéines de surface (MSPs, GPI, ABRA, SERA), (Florens et al., 2002).

Le **Tableau 5** résume les protéomes des différents stades parasitaires. Dans les études de diversité génétique, les protéines de surface (MSPs) sont largement utilisées comme marqueur moléculaire dans la détermination génétique de la population parasitaire (Imwong et al., 2005). En plus de ces protéines de surface, les familles variées de protéines codées par le gène *var* situé dans les régions subtélomériques, PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* érythrocyte membrane protein-1), rifin, stevor et des gènes clag (Cytoadherence-linked asexual gene family) sont impliquées dans la pathogénicité de la maladie. Ces protéines constituent des cibles pour le développement des vaccins. La famille des protéases à cystéine constitue également des cibles thérapeutiques très attractives du fait de leur implication dans plusieurs processus cellulaires, notamment les métacaspases, qui sont uniquement retrouvées chez les eucaryotes inférieurs. De plus, ces récents travaux ont démontré leur implication dans le processus d'apoptose, leur attribuant ainsi le privilège d'être des cibles thérapeutiques pour de nouveaux antipaludiques actifs et efficaces. La **Figure 17** montre l'architecture des domaines protéiques de *Plasmodium* (Hoffman et al., 2002).

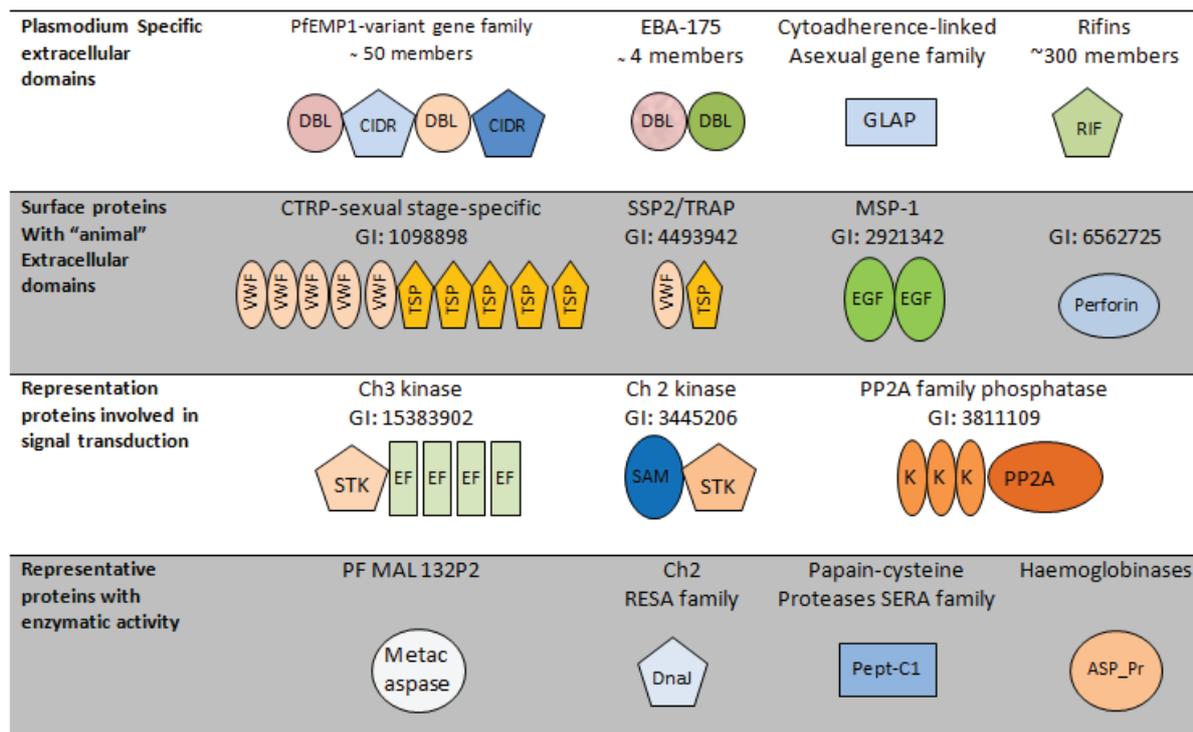


**Figure 16. Profil des protéines exprimées durant les différents stades du cycle de *P. falciparum*** Ces protéines ont été identifiées et triées par Munich Information Centre for Protein Sequences (MIPS) (D'après Florens et al., 2002).

**Tableau 5 : Protéome des différents stades du cycle de vie de *P. falciparum***

Protéome du mérozoïte	Protéome du trophozoïte	Protéome du gamétocyte
<b>MCPI</b> (mérozoïte cap protein 1)	<b>KAHRP</b> (Knob-associated histidine-rich protein)	Facteurs de transcription (RNA-binding proteins)
<b>MSPs</b> mérozoïte surface proteins)	<b>EMP2 et 3</b> (erythrocyte membrane proteins)	<b>RNPs</b> (ribonucleoproteins)
<b>GPI</b> (glycosylphosphatidyl)	<b>EXP1 et EXP2</b> (exported proteins)	
<b>ABRA</b> (acidic basic repeat antigen)	<b>Plasmepsin family</b> (aspartic proteinases)	
<b>SERA</b> (serine repeat antigen)	<b>Falcipain family</b> (cysteine proteinases)	
<b>AMA1</b> (apical membrane antigen 1)	<b>Falcilysin</b> (metallopeptidase)	
<b>EBA</b> (erythrocyte binding antigens)		
<b>RESA</b> (erythrocyte surface antigen)		
<b>CLAG</b> (cyto-adherence linked asexual gene family)		

(D'après Florens et al., 2002)



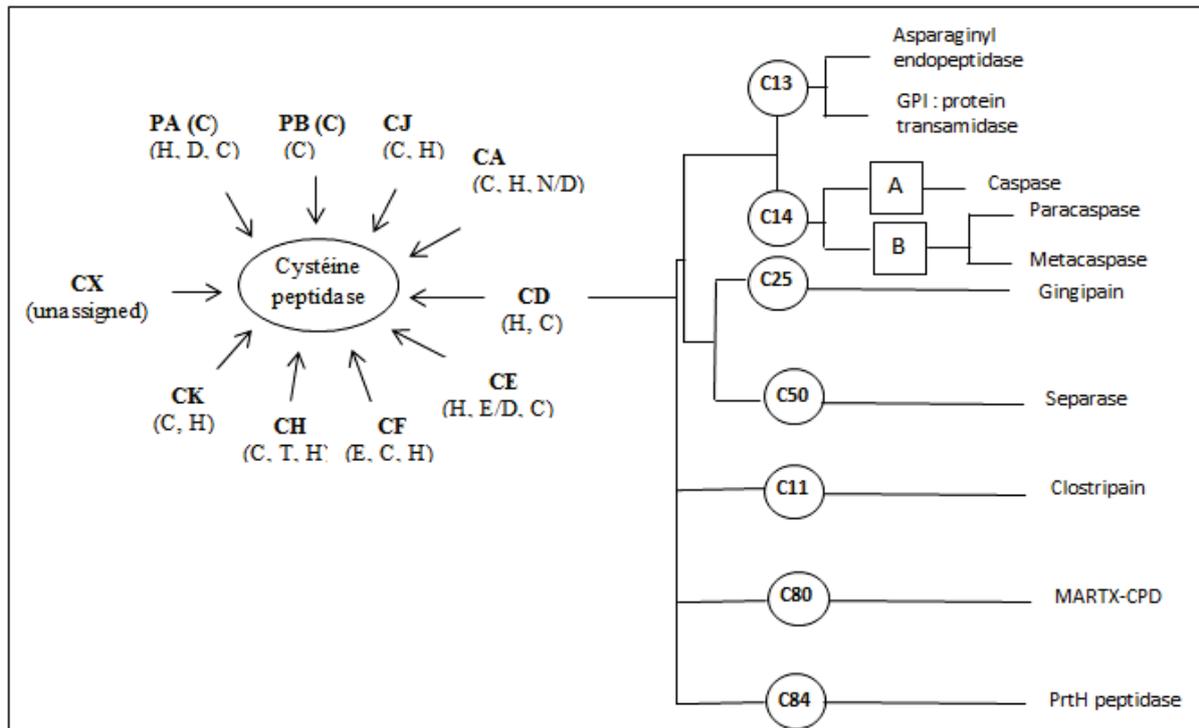
**Figure 17. Représentation architecturale des domaines protéiques de *Plasmodium***

DBL (Duffy-binding-like), CIDR (cysteine-rich interdomain region), CLAG (cytoadherence-linked asexual gene), RIF (Rifins), VWF (von-Willebrand factor A), TSP (thrombospondin), EGF (epidermal growth factor-like), perforin (membrane-activated complex perforin), STK (serine/threonine kinase), EF (calcium-binding EF-hand), SAM (sterile alpha-motif), K (kelch repeat), PP2A (phosphatase), DnaJ (DnaJ family of chaperones), Pept\_C1 (papain cysteine protease), Asp\_Pr (aspartyl protease) (Adapté, selon Hoffman et al., 2002).

### 5.2.1. Protéases à cystéine de *P. falciparum*

Le génome de *P. falciparum* contient plusieurs protéases, qui sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques, notamment dans l'invasion de la cellule hôte, dans l'évasion du système immunitaire, dans la pathogénicité et la virulence (Mottram et al., 2003b ; Marco and Coterón, 2012 ; Francis et al., 1996). Les protéases à cystéine sont des enzymes thiol-dépendantes qui partagent une fonctionnalité, qui est celle d'utiliser la cystéine pour hydrolyser les liaisons peptidiques. Ces protéases sont par ailleurs structurellement subdivisées en trois groupes dont i) la famille de papaine du clan CA comprend les cathepsines, les falcipaines et les calpaines, ii) la famille ICE-like du clan CD qui regroupe les caspases et les gingipaines et iii) la famille picornain-like du clan PA (C), qui comprend les protéases du rhinovirus humain. Les falcipaines sont les enzymes de *P. falciparum* les plus étudiées du fait de leur implication dans plusieurs processus cellulaires. En effet, leurs rôles ont été bien définis dans trois fonctions, i) l'invasion de l'érythrocyte par les mérozoïtes, ii) la digestion de l'hémoglobine et iii) la rupture de la membrane de l'érythrocyte pour la libération des mérozoïtes (Gomes et al., 2015 ; Marco and Coterón, 2012). Ainsi, les falcipaines font l'objet

de plusieurs recherches pour de nouveaux antipaludiques. Les différents clans et familles des protéases à cystéine sont résumés dans la **Figure 18**.



**Figure 18. Différents clans et familles des protéases à cystéine**

Les clans sont indiqués par les flèches et les résidus acides aminés entre parenthèses. En plus des résidus cystéines et histidines, certains clans possèdent d'autres résidus acides aminés qui jouent un rôle important dans l'activité protéolytique (Adapté selon Mottram et al., 2003).

#### 5.2.1.1. Les inhibiteurs des protéases à cystéine

Les protéases sont impliquées dans plusieurs fonctionnements et dysfonctionnements biologiques des cellules. Elles sont régulatrices de plusieurs processus biochimiques et physiologiques pour prévenir certaines maladies, pour contrôler la synthèse des protéines et pour hydrolyser des chaînes polypeptidiques sur des substrats spécifiques. Elles sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, les pathologies inflammatoires et neurologiques, virales et immunologiques, les maladies cancéreuses, et les désordres du système nerveux central (Marco and Coterón, 2012 ; Zhang, 2004). Les peptides étaient traditionnellement utilisés comme sonde, du fait de leur lien spécifique avec les protéases à cystéine. Cette approche a permis de concevoir l'idée de développer de nouveaux peptides inhibiteurs de ces enzymes à des fins thérapeutiques. Ainsi ces nouveaux inhibiteurs peptidiques doivent répondre à des propriétés « drug-like » suivantes :

Caractère minimal du peptide

Une haute perméabilité de la membrane

- Une demi-vie longue dans le plasma
- Une élimination lente
- Une haute sélectivité pour les protéases ciblées
- Une bonne absorption par voie orale pour usage prophylactique.

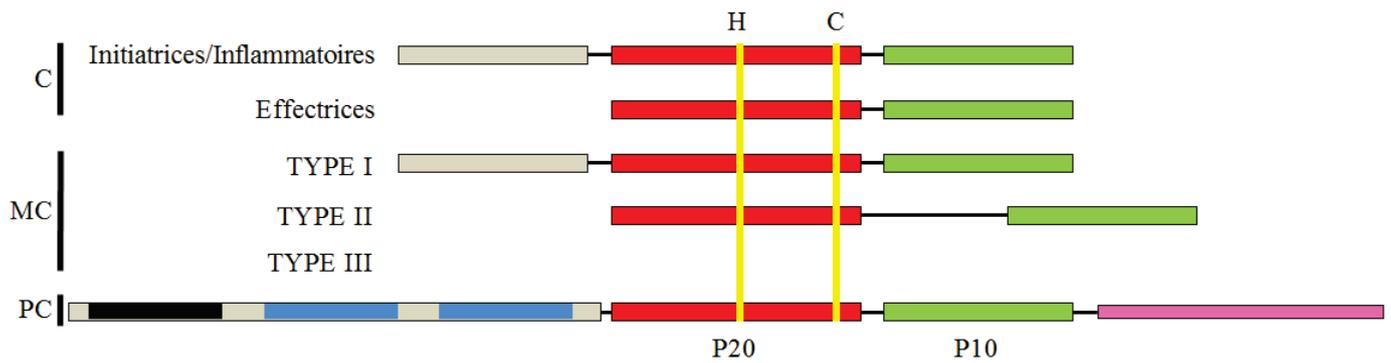
Cependant, l'utilisation de ces inhibiteurs reste limitée du fait de plusieurs inconvénients, tels qu'une faible biodisponibilité orale, qui appauvrit leurs profils pharmacologiques. Le premier inhibiteur de synthèse ciblant les protéases à cystéine était le IDN-6556, connu sous le nom d'Orphan Drug, Médicament orphelin, donné par l'administration U.S Food and Drug. Ce pan caspase inhibiteur (IDN-6556) était utilisé pour traiter des patients en cours de transplantation d'organe, y compris le foie, et son mode d'action consiste à bloquer l'apoptose (Leung-Toung et al., 2006). Depuis la découverte des protéases à cystéine chez les protozoaires et leur implication dans plusieurs processus cellulaires, elles sont devenues des cibles thérapeutiques. Ainsi la recherche des inhibiteurs de ces protéases à cystéine est largement exploitée (Spinks et al., 2011 ; Berg et al., 2010). Chez *P. falciparum*, les premiers inhibiteurs de falcipaines étudiés sont les peptides fluoromethyl ketones et les vinyl sulfones. Ces études sur les peptides fluoromethyl ketones (benzyloxycarbonyl (Z)-Phe-Arg-CH<sub>2</sub>F) ont montré que ces inhibiteurs bloquent la dégradation de l'hémoglobine et la croissance parasitaire. Cependant, ces inhibiteurs présentaient certains inconvénients comme une demi-vie très courte dans le sang, et qui nécessitaient des fortes doses pour leur activité antipaludique (Francis et al., 1996 ; Marco and Coterón, 2012).

### 5.2.2. Les métacaspases

Des études *in silico* basées sur la prédiction des protéomes des organismes ont largement contribué à l'identification des gènes orthologues entre différentes espèces, grâce à l'utilisation des outils qui permettent de détecter des similarités de séquences et leur évaluation statistique. Parmi ces méthodes de recherche de similarité de séquence, le PSI-BLAST (« position specific iterated-basic local alignment search tool ») est un puissant outil, qui est caractérisé par sa sensibilité et sa rapidité (Aravind and Subramanian, 1999). Ces recherches ont abouti à la découverte de deux nouvelles familles dont les peptidases à caspase-like, les métacaspases retrouvées chez les plantes, les champignons et les protozoaires, et les paracaspases présentes chez les animaux et les myxomycètes, précédemment décrites. Ces deux familles appartiennent à une classe de protéase à thiol (Uren et al., 2000). Les métacaspases appartiennent à la famille C14B et au clan CD (McLuskey and Mottram, 2015). Depuis l'identification des métacaspases chez les organismes unicellulaires, d'intenses recherches ont été menées pour élucider leurs rôles dans la mort cellulaire programmée. Ainsi, chez la levure (*S. cerevisiae*), de nombreux stimuli ont été rapportés être des déclencheurs de la mort cellulaire, parmi lesquels on dénombre le stress oxydant, le stress hyperosmotique, le traitement à l'acide acétique et la privation en inositol. Une métacaspase 1 (Yca1) a été démontrée pour jouer un rôle fondamental lors de l'apoptose, en tant que processus adaptatif pour la survie des colonies, faisant de cet organisme un paradigme pour la compréhension de ce phénomène (Khan et al., 2005 ; Madeo et al., 1997, 2002a, 2002b, 2002a). Plus tard, l'implication des métacaspases dans l'apoptose a été rapportée chez de nombreux protozoaires parasites tels que *T. brucei* ssp., *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp. et *Toxoplasma gondii*, et chez les plantes, notamment *Arabidopsis thaliana*. Ces recherches ont été d'un grand succès dans l'avancée des connaissances sur les eucaryotes inférieurs. Cependant, ces études ont largement porté sur les facteurs induisant l'apoptose et le phénotype de la mort cellulaire résultant. En revanche, les composantes de la machinerie apoptotique de ces organismes comme les initiateurs et les effecteurs de l'apoptose restent très peu connues (Durand and Coetzer, 2008). De plus, le rôle des métacaspases a été rapporté pour être non seulement limité dans le processus de mort cellulaire, mais également dans de nombreux processus cellulaires variés, notamment lors de la progression du cycle cellulaire, lors de la prolifération, de la clairance des agrégats insolubles et dans la virulence (Li et al., 2015 ; McLuskey and Mottram, 2015 ; Shrestha and Megeney, 2012).

### 5.2.2.1. La structure des métacaspases

Des études *in silico* ont révélé que la structure des métacaspases était très proche des caspases. Les métacaspases possèdent un prodomaine en N-terminal, une grande sous-unité P20, où se trouve la dyade catalytique histidine et cystéine, et une petite sous-unité P10 en C-terminal à l'instar des caspases (Uren et al., 2000). Ainsi, les métacaspases ont été classées en trois catégories en fonction de la présence ou de l'absence du prodomaine. Les métacaspases de type I présentent un prodomaine en N-terminal riche en motifs proline répétés et en zinc et sont retrouvées chez les champignons, chez les protozoaires et chez les plantes. Les métacaspases de type II se caractérisent par l'absence du prodomaine, mais présentent tout de même une petite séquence appelée « séquence linker » qui relie la grande sous-unité et la petite sous-unité, et sont présentes chez les plantes, particulièrement chez les plantes vertes, les glaucophytes et les rhodophytes, en plus du type 1 des métacaspases (Tsiatsiani et al., 2011 ; Uren et al., 2000). Récemment, un troisième type (métacaspase type III) a été identifié chez les algues photosynthétiques et les bactéries, qui se caractérise par un échange du domaine putatif P20/P10 (McLuskey and Mottram, 2015). Les métacaspases ont une préférence pour les substrats contenant des résidus basiques lysine et arginine dont l'activité est calcium dépendante, comme cela a été démontré dans de nombreuses études (Meslin et al., 2011a ; Moss et al., 2007). Des études phylogénétiques ont tenté de retracer l'histoire commune de ces protéases. Elles ont émis l'hypothèse que les métacaspases, les paracaspases et les caspases ont co-évolué à partir d'un gène ancestral, dont l'origine serait le Transfert Horizontal de Gènes (HGT) entre un endosymbiote mitochondrial, les protobactéries- $\alpha$  et les premiers eucaryotes. De plus, les caspases, les paracaspases et les métacaspases de type I proviendraient d'un ancêtre commun dont l'origine serait un transfert horizontal de gènes entre les endosymbiotes et un hôte eucaryote. Les métacaspases de type II proviendraient d'un second transfert horizontal de gènes d'un plaste à partir d'une cyanobactérie par endosymbiose (Chowdhury et al., 2008 ; Vercammen et al., 2007). Une comparaison entre les caspases, les paracaspases et les métacaspases est montrée dans la **Figure 19**.



**Figure 19. Représentation schématique des propriétés structurales des caspases, métacaspases et paracaspases**

Les prodomaines des caspases initiatrices/inflammatoires et les métacaspases de type I sont représentés en couleur gris clair. Le domaine N-terminal des paracaspases contient un domaine de mort (en noir), un ou deux domaines d'immunoglobuline (représenté en bleu). La position des résidus catalytiques Histidine et Cystéine est indiquée par les barres en jaune, au niveau de la grande sous-unité P20 (en rouge). La petite sous-unité est représentée en vert, la région C-terminale des paracaspases impliquée dans l'ubiquitination (représentée en rose) (Adaptés selon Vercammen et al., 2007).

### 5.2.2.2. Identification de Métacaspases chez certains organismes unicellulaires

#### 5.2.2.2.1. Métacaspase 1 de *S. cerevisiae* (Yca1)

La levure *S. cerevisiae* a été largement utilisée par beaucoup d'équipes de recherche comme modèle idéal pour étudier le mécanisme de mort cellulaire chez les organismes unicellulaires. L'activité protéolytique de Yca1 a été mise en évidence suite à des réponses aux conditions de stress et cette forme de mort cellulaire était révélée par des marqueurs apoptotiques (Madeo et al., 2002a). Plus tard, la structure de Yca1 a pu être résolue par cristallographie (Yca1, GenBank : 854372). Il a été démontré que la surexpression de Yca1 chez la bactérie présentait des phénomènes d'auto-clivage calcium-dépendant et que Yca1 clive ses substrats au niveau des résidus arginine/cystéine, contrairement aux caspases (Wong et al., 2012). Ainsi, Yca1 a été supposé jouer le rôle de régulateur de l'apoptose déclenché par des stimuli tels que les stress oxydants (Watanabe and Lam, 2005). Par ailleurs, des métacaspases de plusieurs protozoaires ont été exprimées chez la levure, notamment la métacaspase 1 de *P. falciparum* (PfMCA1) dans le but d'élucider son activité protéolytique et d'identifier les acteurs majeurs impliqués dans cette voie de mort cellulaire (Meslin et al., 2011a). Egalement, dans le génome du champignon pathogène filamentueux, *Aspergillus fumigatus*, deux métacaspases (CasA et Cas B) ont été identifiées. L'activité de ces deux métacaspases a été démontrée comme nécessaire à la virulence du champignon. De plus, ces deux métacaspases ont été démontrées

jouer également un rôle plutôt dans la survie cellulaire que dans le processus de mort cellulaire (Richie et al., 2007).

#### **5.2.2.2. Métacaspases chez la plante *A. thaliana***

Dans le génome d'*A. thaliana*, 9 métacaspases (*Atmc1- Atmc9*) ont été identifiées. Parmi ces métacaspases, trois (*Atmc1-Atmc3*) ont été classées dans la catégorie du type « I » et six (*Atmc4-Atmc9*) dans le type « II » des métacaspases. Dans le but d'étudier l'activité enzymatique, ces deux types de métacaspase ont été surexprimées chez la bactérie. Un phénomène d'auto-clivage cystéine-dépendante a été rapporté pour les métacaspases de type II, contrairement au type I. Il a été également rapporté que les métacaspases de type I présentent des similarités avec celles des caspases initiatrices, qui nécessiteraient une oligomérisation de la plateforme d'activation pour être actives. Ces enzymes ont été démontrées cliver leurs substrats au niveau des résidus arginine/lysine à la position P1 (Vercammen et al., 2004 ; Watanabe and Lam, 2005).

#### **5.2.2.3. Métacaspase chez *T. brucei***

Dans le génome de *T. brucei*, l'agent responsable de la trypanosomose africaine, cinq métacaspases ont été identifiées (MCA1-MCA5). Parmi ces métacaspases trois possèdent les résidus histidine-cystéine conservés dans la dyade catalytique (MCA2, MCA3 et MCA5), (Moss et al., 2007). Une mutation de la métacaspase 2 de *T. brucei* (MCA2) a été montrée sans effet, mettant en évidence une éventuelle redondance entre les trois métacaspases (MCA2, MCA3 et MCA5). La surexpression de la métacaspase 4 de *T. brucei* chez la levure a montré un phénotype de déficit respiratoire diminué de moitié, lié à un dysfonctionnement du système mitochondrial, et une inhibition de la croissance cellulaire. Ainsi ces observations ont permis de supposer que MCA4 pourrait jouer le rôle du contrôle de la prolifération cellulaire. Cependant aucune activité protéolytique n'a été observée après sa surexpression chez la bactérie et chez la levure (Szallies et al., 2002). Récemment, la MCA2 a été résolue par cristallographie, et son activité protéolytique a été démontrée être calcium-dépendante, dont la spécificité des substrats est arginine-lysine (McLuskey et al., 2012 ; Moss et al., 2007).

#### **5.2.2.2.4. Métacaspase chez *Leishmania major***

Dans le génome de *L. major*, une seule métacaspase (*LmjF35.1580*) a été identifiée. L'activité protéolytique de cette métacaspase a été mise en évidence suite à sa surexpression chez la levure. Elle clive ses substrats sur des résidus arginine/lysine dans la position P1 de leurs substrats, mettant ainsi en évidence une préférence basique des métacaspases (Zalila et al., 2011).

#### **5.2.2.2.5. Métacaspase de *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* est l'agent de la toxoplasmose, qui est à l'origine d'une infection asymptomatique chez les personnes immunocompétentes, mais qui peut devenir pathogène chez les personnes immunodéprimées. Dans le génome de ce parasite, trois gènes codant des protéines à caspases-like ont été mis en évidence (TGGT1\_206490, TGGT1\_278975 et TGGT1\_243298). Seule la métacaspase (TGGT1\_206490) présente la dyade catalytique histidine et cystéine conservée à l'instar du gène de la métacaspase 1 de *P. falciparum* (PfMCA1). Des études d'expression hétérologue de TGGT1\_206490 de *T. gondii* chez la bactérie ont démontré que cette protéine s'autoclive suite à son expression, comme cela a été précédemment décrit dans une étude d'expression du domaine catalytique de PfMCA1 chez les levures (Meslin et al., 2011a). De plus, une mutation complète du gène (knockout) de TGGT1\_206490 n'a pas montré d'effet sur la croissance parasitaire et sur la virulence du parasite. L'utilisation des inhibiteurs de caspases E64 et Z-VAD-fmk sur la culture parasitaire soumise à une pression médicamenteuse, restaure la prolifération cellulaire et inhibe l'activité apoptotique, mettant en évidence la voie apoptotique dépendant des caspases (Li et al., 2015).

#### **5.2.2.2.6. Métacaspases des *Plasmodium***

L'annotation du génome des *Plasmodium* humains (*P. falciparum* et *P. vivax*) et le *Plasmodium* murin (*P. berghei*) révèlent chacun la présence des trois gènes codant les métacaspases : dans le génome de *P. falciparum* (PfMCA1 (PF\_0289), PfMCA2 (PF14\_0363) et PfMCA3 (PF14\_0160) et dans le génome de *P. vivax* (PvMC1 (Pv114725), PvMC2 (Pv118575) et PvMC3 (Pv08564), et dans le génome de *P. berghei* (PbMC1(PB001074), PbMC2 (PB000485) et PbMC3 (PB000564). Des études d'alignements de séquences ont révélé que seuls PfMCA1, PvMC1 et PbMC1 possèdent les résidus histidine et cystéine dans la dyade catalytique **Figure 20** (Le Chat et al., 2007). Parmi ces trois enzymes, seule la PfMCA1 appartenant au type I des métacaspases est la plus étudiée et son rôle dans l'apoptose a été démontré (Meslin et al., 2007, 2011a). Une étude sur l'activité

protéolytique de PfMCA1 chez la levure a mis en évidence une activité apoptotique du domaine catalytique de PfMCA1 par une mort cellulaire des levures. De plus, un phénomène d'auto-clivage de la protéine après son expression a été rapporté et cette activité était calcium-dépendante (Meslin et al., 2011a).

Cependant, le rôle des métacaspases dans la mort cellulaire programmée chez ces organismes unicellulaires fait l'objet des débats controversés. Ces métacaspases ont été démontrées non seulement jouer un rôle dans la mort cellulaire programmée (PCD), mais également dans le processus de contrôle de la prolifération cellulaire, la biogénèse mitochondriale démontrée par l'expression hétérologue de la métacaspase 4 de *T. brucei* chez *S. cerevisiae* et d'autre part la prolifération cellulaire chez *L. major* (Wanderley and Barcinski, 2010). Mais de manière intéressante, ces métacaspases sont absentes chez les métazoaires. De ce fait, elles peuvent être des bonnes cibles thérapeutiques pour de nombreuses pathologies parasitaires telles que les trypanosomoses, les leishmanioses et le paludisme.

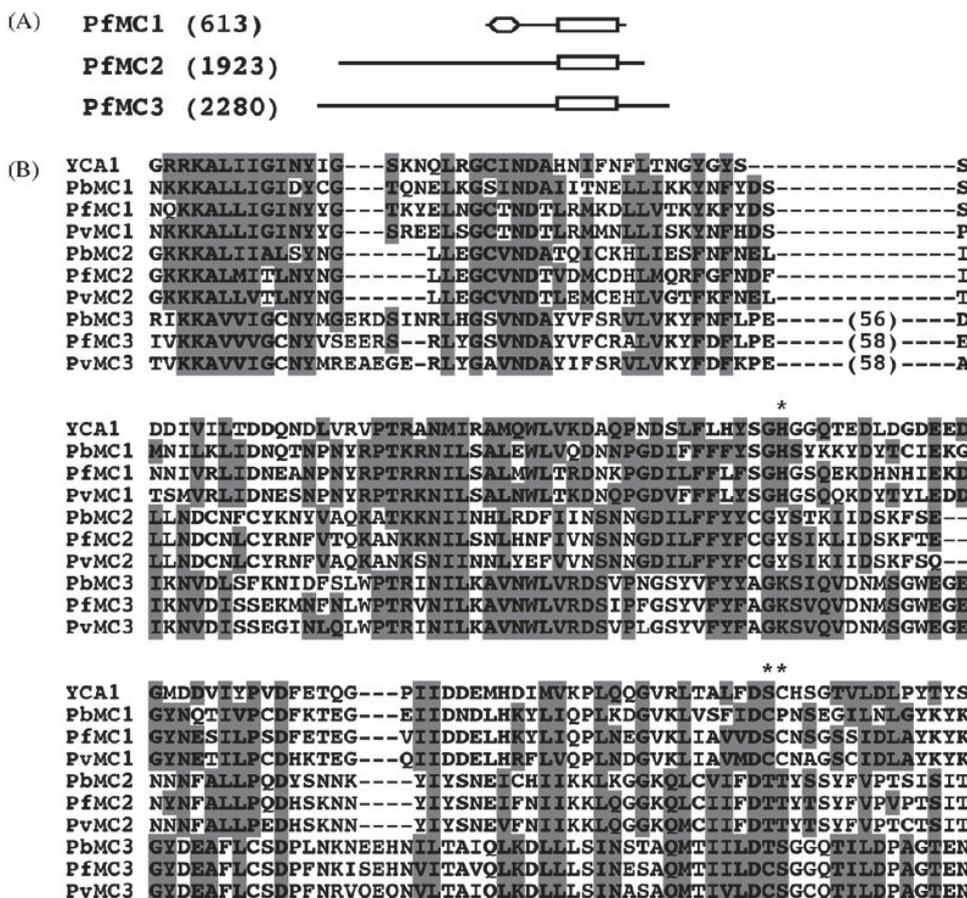


Figure 20. Représentation schématique des protéines de PxMC1, PxMC2, et PxMC3 des *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. berghei*)

A) Les trois métacaspases de *P. falciparum* : le rectangle indique le domaine C14 peptidase conservé et le losange le domaine C2 (calcium).

B) Alignement multiple (Clustal W) du domaine C14 peptidase conservé entre PxMC1, PxMC2, et PxMC3 des *Plasmodium* et la métacaspase 1 de levure *S. cerevisiae* (Yca1). Les astérisques indiquent la position des résidus histidine et cystéine de la dyade catalytique. (D'après Le Chat et al., 2007).

#### **5.2.2.2.6.1. Métacaspase 1 de *Plasmodium falciparum* (PfMCA1) cible thérapeutique contre le paludisme**

Le gène de la métacaspase 1 de *P. falciparum* (PfMCA1) est long de 1 842 paires de bases et code une protéine de 613 acides aminés avec une masse prédite à 71,6 kDa (Plasmodb.org, Meslin et al., 2007). Pour les *Plasmodium*, aucune structure des métacaspases n'a encore été déterminée. Toutefois, les précédents travaux ont été basés sur des modèles moléculaires *in silico* pour prédire les différentes structures de PfMCA1. Cependant des études d'expression hétérologues de PfMCA1 chez les bactéries, les levures et les cellules COS7 (cellules de singes) ont démontré le rôle de PfMCA1 dans l'apoptose et une activité protéolytique à l'instar des caspases (Meslin et al., 2007, 2011a). Ainsi, ces récents travaux ont mis en évidence le rôle essentiel de l'apoptose dans le développement des parasites unicellulaires, même si des controverses persistent sur la réelle nature de cette mort (Engelbrecht and Coetzer, 2013 ; Totino et al., 2008). La connaissance des régulateurs de cette protéine, ainsi que le détail des mécanismes par lesquels PfMCA1 induit la mort cellulaire, permettrait de traiter la maladie en agissant sur ces mécanismes de mort intrinsèque du parasite. Par ailleurs, le mécanisme d'auto-clivage des métacaspases suite à leur expression a largement été rapporté chez plusieurs protozoaires (*T. brucei*, *L. major* et *P. falciparum*) (Meslin et al., 2007 ; Moss et al., 2007 ; Zalila et al., 2011). Ce phénomène d'auto-clivage complexe reste encore très peu élucidé et rend difficile les études de détermination de structure de PfMCA1, afin de réaliser le docking moléculaire à la recherche des nouvelles molécules candidates thérapeutiques.

## VI. Docking Moléculaire et Criblage à Grande Echelle (VHTS : Virtual High Throughput Screening)

Actuellement, une nouvelle approche de chimie dynamique combinatoire est en plein essor pour permettre la découverte de nouvelles molécules actives. En effet, cette nouvelle technique utilise un criblage virtuel à haut-débit en exploitant la molécule de la cible biologique comme un modèle (template) pour désigner son propre inhibiteur grâce à un auto-assemblage de son site actif. Souvent l'identification de ces molécules candidates est basée soit sur une structure tridimensionnelle (3D), soit sur la structure des enzymes (rayons X, Résonance magnétique nucléaire (RMN) qui sont des outils largement utilisés (Leung-Toung et al., 2006). D'ailleurs, c'est une technique très utilisée par l'industrie pharmaceutique pour développer de nouveaux médicaments. Ainsi, cette technologie est issue de la combinaison de plusieurs disciplines, notamment les progrès de la biologie moléculaire et de l'informatique. Ce criblage est dit à haut débit du fait de l'analyse des dizaines, voire des milliers de molécules de manière rapide. Des bases de données sont disponibles et permettent de retrouver certaines molécules sélectionnées comme la base de données [Zinc.docking.org](http://Zinc.docking.org). Ainsi les propriétés (**Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion** : AMDE) de ces molécules candidates peuvent être étudiées par des tests *in vitro* (sur culture parasitaire) et *in vivo* (modèles animaux).

### 6.1. MMV (Medicines for Malaria Venture)

Le développement des médicaments contre le paludisme coûte cher et le rendement est faible. C'est une des raisons majeures qui expliquent le manque d'intérêt de l'industrie pharmaceutique à investir dans ce domaine. Pour pallier les difficultés financières qui entravent le développement des antipaludiques, un partenariat public-privé à but non lucratif a été créé en 1999 en Suisse sous le nom de MMV. Le but de cette fondation collaborative est de réduire le fardeau du paludisme dans les pays endémiques en découvrant, développant et fournissant des nouveaux antipaludiques à des coûts abordables. Ainsi pour valider les molécules candidates en vue de potentiels traitements du paludisme, MMV propose un ensemble de critères de sélection auxquels ces molécules doivent répondre pour rentrer dans le pipeline de MMV (<http://www.mmv.org/research-development>).

## RESULTATS

### Partie I

#### 1. Recherche de nouveaux anti-paludiques en vue de l'étude de leur mécanisme d'action

J'ai débuté mes travaux au laboratoire à la recherche de nouvelles molécules actives. Un modèle de PfMCA1 a été déjà construit virtuellement *in silico* grâce au docking moléculaire et au criblage virtuel à grande échelle (VHTS) par un stagiaire de master 2 de l'INSA de Lyon (Tsinda Claire RUKWAVU). A partir de ce modèle, dix molécules cibles de PfMCA1 ont été sélectionnées dans la base de données **Zinc.docking.org**. L'objectif était de tester l'activité antipaludique de ces molécules *in vitro* sur des cultures de différents clones de *P. falciparum* et d'étudier leur potentielle induction de l'apoptose.

##### 1.1. Modélisation virtuelle de la structure 3D de la PfMCA1 de *Plasmodium falciparum*

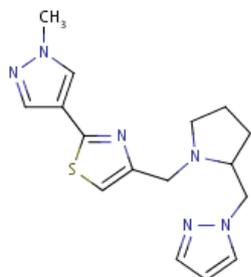
Le modèle de PfMCA1 a été construit *in silico* basé sur la structure de la métacaspase 2 de *T. brucei* résolue par cristallographie, grâce au docking moléculaire et au criblage virtuel à grande échelle (VHTS) utilisant le serveur Autodock4. Ce modèle présente 28,86% d'identité au niveau du site catalytique, comparé à la métacaspase 2 du *T. brucei*. Ainsi dix molécules cibles de PfMCA1 ont été sélectionnées selon leur énergie de liaison avec ce modèle PfMCA1 construit. Parmi ces dix molécules, 5 ont été retrouvées dans la base de données **Zinc.docking.org** grâce à leurs numéros d'identification. Ces molécules candidates ont été testées sur la culture *in vitro* des clones de *P. falciparum* (3D7 et W2).

##### 1.1.1. Matériels

Deux clones de *P. falciparum*, 3D7 (chloroquino-sensible, origine inconnue) et W2 (chloroquino-résistant, Indochine) ont été obtenus du réseau WWARN (World Wide Antimalarial Resistance Network). Les molécules (2,5,8 et 10) ont été achetées chez la société Enamine (Ukraine) : Molécule 2 (**M2**), ID : **69626884** ([2-\(1-methylpyrazol-4-yl\)-4-\[\[2S\]-2-\(pyrazol-1-ylmethyl\)pyrrolidin-1-yl\]methyl\]thiazole](#)), Molécule 5 (**M5**), ID : **69667914** ([3-\[2-\[\(2S\)-2-\[\(2R\)-1-methylpyrrolidin-2-yl\]pyrrolidin-1-yl\]-2-oxo-ethyl\]-1,2,3-benzotriazin-4-one](#)), Molécule 8 (**M8**), ID : **69570357** ([3-\[5-\[\(1R,2S\)-2-methylcyclopropyl\]-2-furyl\]-1-\[\(2R\)-2-\[\(2S\)-1-methylpyrrolidin-2-yl\]pyrrolidin-1-yl\]](#)) et Molécule 10 (**M10**), ID : **69581907** ([\(2S\)-2-\(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl\)-1-\[\(2R\)-2-\[\(2S\)-1-methylpyrrolidin-2-yl\]pyrrolidin-1-yl\]pr](#)). La molécule 3 nous a été fournie par le laboratoire de chimie (CPE : Ecole supérieure

de Chimie, Physique, Electronique) de Lyon: (M3), ID :36031797 ([1-\[benzyl-\[\(2-methoxyphenyl\)methyl\]amino\]-2-methyl-propan-2-ol](#)).

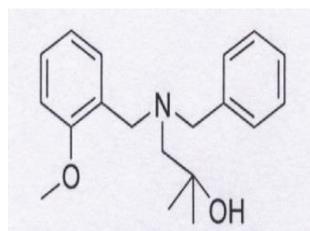
### **La structure chimique des cinq molécules testées**



**M2.** [2-\(1-methylpyrazol-4-yl\)-4-\[\[2-\(pyrazol-1-ylmethyl\)pyrrolidin-1-yl\]methyl\]thiazole](#)

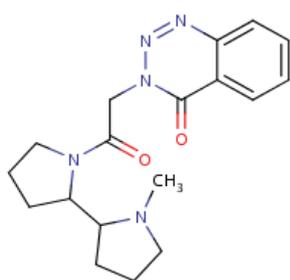
Formule chimique: C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>S

Poids moléculaire: 328,4 g/mol



**M3.** Formule chimique: C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>

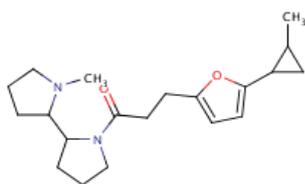
Poids moléculaire: 299,4 g/mol



**M5.** [3-\[2-\[\(2S\)-2-\[\(2R\)-1-methylpyrrolidin-2-yl\]pyrrolidin-1-yl\]-2-oxo-ethyl\]-1,2,3-benzotriazin-4-one](#)

Formule chimique: C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

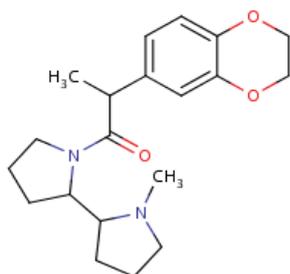
Poids moléculaire : 341,4 g/mol



**M8. 3-[5-[(1R,2S)-2-methylcyclopropyl]-2-furyl]-1-[(2R)-2-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]pyrrolidin-1-yl]**

Formule chimique: C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Poids moléculaire: 330,5 g/mol



**M10. (2S)-2-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-1-[(2R)-2-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]pyrrolidin-1-yl]pr**

Formule chimique: C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Poids moléculaire: 344,4 g/mol

## 1.1.2. Méthodes

### 1.1.2.1. Culture *in vitro* des clones de *P. falciparum*

Les clones 3D7 et W2 du WWARN sont maintenus en culture dans une étuve à 37°C, en atmosphère humide, à 5% de CO<sub>2</sub>. Les parasites sont cultivés sur des globules rouges humains O<sup>+</sup> (EFS Lyon), à 5 % d'hématocrite dans un milieu complet RPMI (RPMI : milieu RPMI 1640 complété avec 25 mM Hepes, 50 µg/mL gentamicine, 0,1 mM hypoxanthine, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> et 0,5 % d'AlbuMax II) dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Trager and Jensen, 1976). Le changement de milieu de culture se fait toutes les 24 h. Des frottis sanguins sont réalisés sur des lames, puis colorés au Giemsa dilué 1/10 dans du PBS, après incubation pendant 20 min. Les lames sont observées et lues sous microscope optique pour déterminer la parasitémie.

### 1.1.2.2. Tests *in vitro* de sensibilité

Le test *in vitro* consiste à évaluer l'activité anti-plasmodiale d'une gamme de concentrations de drogues. Ces molécules ont été testées sur des clones de *P. falciparum* 3D7 et W2 en

culture continue selon la méthode de K. Rieckmann, dont la méthode a été initiée par Bass en 1922, dans des plaques de 96 puits (Basco, 2007). L'activité antipaludique de ces molécules a été évaluée par la détermination de la concentration inhibitrice à 50% (CI<sub>50</sub>) de la croissance parasitaire. D'abord l'hématocrite est ramené à 1,5% et la parasitémie à 0,5% et le volume final par puits est de 200 µL. Après l'ajout des drogues dans les puits, les plaques ont été incubées pendant 72 h à l'étuve. Ensuite, les plaques ont été congelées avant lecture. Après décongélation des plaques, les globules rouges étaient dilués dans du tampon de lyse. La concentration inhibitrice (CI<sub>50</sub>) de la croissance parasitaire était déterminée par lecture au fluorimètre (SYBR Green). Les résultats ont été analysés avec le logiciel HN- Non Lin V1.1. Ces expériences ont été répétées trois fois et à chaque expérience une gamme de concentration de 156,25nM à 10µM a été testée en triplicata.

## Résultats

**Tableau 6 : Résultats des tests *in vitro* des molécules**

Clones/Molécules	CQ	M2	M3	M5	M8	M10
3D7	26 nM	8 µM	18 µM	>10 µM	14 µM	>10 µM
W2	320 nM	9 µM	14 µM	>10 µM	5 µM	8 µM

Compte tenu des valeurs de CI<sub>50</sub> élevées, ces résultats n'ont pas pu aboutir à une publication.

## **2. Déterminer la structure tridimensionnelle (3D) de la métacaspase 1 de *Plasmodium falciparum* (PfMCA1)**

Pour étudier la structure tridimensionnelle de PfMCA1 de *P. falciparum*, nous avons décidé dans un premier temps de sur-exprimer la protéine chez les bactéries, ensuite, la purifier en vue de déterminer sa structure par cristallographie.

### **2.1. Matériels**

Le clone 3D7 de *P. falciparum* a été utilisé dans ces expériences. Le vecteur pET-Duet-1 utilisé pour le clonage a pour référence: 71146-3 (Merck, France). Des types de bactéries ont été utilisés dans cette étude : les bactéries Top 10 : référence C4040-10 (Invitrogen, France) et les bactéries Rosetta2 : référence 71402-4 (Merck, France).

### **2.2. Méthodes**

#### **2.2.1. Extraction de l'ADN génomique (ADNg) de *P. falciparum***

A partir d'une culture continue du clone 3D7 à une parasitémie de 7,5 %, la culture était centrifugée à 350 g pendant 5 min, puis le culot parasitaire était récupéré pour extraire l'ADNg avec le QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, France). La concentration de l'ADNg extrait était estimée par lecture au spectrophotomètre par la formule suivante :  $DO_{260} * 50(ADN) * \text{facteur de dilution}$ .

#### **2.2.2. Amplification du gène PfMCA1 par la PCR (Réaction de polymérisation en chaîne)**

La PCR a été effectuée dans un volume final de 50 µL. La réaction de mix comprend les dNTPs (Roti MIX PCR 4 à 10mM, ROTH, France), les deux amorces spécifiques, amorces sens, 5'-GAATTCGAAAAAATATACGTC-3' et l'amorce anti-sens, 5'- CTCGAGAAAAAATAA ATTTTAAAG-3' à 10µM (TIB Mol Biol, France), (les sites de restriction *Eco* RI et *Xho* I sont soulignés), le tampon supplémenté de MgCl<sub>2</sub> à 1x et la *Taq* DNA polymérase à 2,5 unités (Kit Expand High Fidelity PCR System, Roche, France). Cinq µL d'ADNg étaient ajoutés au mélange, puis la PCR était effectuée dans un thermocycler avec le programme suivant : 94°C, afin de dénaturer l'ADN, puis 40 cycles de dénaturation (94°C), hybridation des amorces sur l'ADN à 47°C et élongation à 68°C. L'amplification du gène était vérifiée par un dépôt d'un aliquot sur un gel d'agarose à 1,5% puis électrophorèse. Le fragment amplifié était observé sous un transilluminateur à UV, puis purifié à partir du gel par le kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, France).

### **2.2.3. Clonage du gène PfmCA1 dans le vecteur pET-Duet-1**

#### **2.2.3.1. Double digestion de PfmCA1 et du vecteur pET-Duet-1**

Le vecteur, PET-Duet et l'insert, PfmCA1 étaient simultanément digérés par deux enzymes de restriction *Eco* RI (20U/mL, BioLabs, France) et *Xho* I (40U/μL, Roche, France), dans du tampon H (5 \* 1 mL, Roche, France), pendant 2 h à 37°C. Puis, les enzymes étaient inactivées pendant 20 min à 65°C. Les produits de digestion étaient vérifiés sur gel d'agarose (1,5%) par dépôt d'un aliquot puis électrophorèse. Le vecteur digéré était ensuite déphosphorylé par le Kit TSAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Promega, France), pendant 15 min à 74°C et le vecteur digéré était purifié par le Kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, France). Le gène de PfmCA1 digéré était purifié par le Kit QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, France).

#### **2.2.3.2. Ligation de l'insert (PfmCA1) dans le vecteur (pET-Duet-1)**

Le gène PfmCA1 et le vecteur purifiés étaient ligués par l'enzyme T4 DNA ligase (100U, soit 1u/μL, Roche, France), dans du tampon de ligation 10x (1mL, Roche, France) dans un volume final de 10 μL, pendant une nuit à 16°C. Trois ratios de ligation ont été testés : 1/1, 1/2 et 1/3.

### **2.2.4. Transformation des bactéries Top 10 avec le produit de ligation**

Une transformation bactérienne a été réalisée par choc thermique (30 min dans la glace, puis 42°C pendant 30 sec) avec le produit de ligation. Les bactéries ainsi transformées étaient resuspendues rapidement dans du milieu SOC (2% tryptone, 0,5% yeast extract, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose), sous agitation, pendant 1 h à 37°C. Ensuite, les bactéries étaient étalées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LB-agar (1% tryptone, 0,5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2 mM NaOH, 2% agar, ROTH, France) et de l'ampicilline (100 μg/μL, ROTH, France). Les boîtes étaient mises dans l'étuve à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, les colonies qui avaient poussé ont été repiquées et remises en culture dans du milieu liquide LB Broth (Tryptone, 10g/L, Yeast extract 5g/L et NaCl 5g/L) pendant une nuit à 37°C sous agitation.

### **2.2.5. Purification des vecteurs par mini-prep ou maxi-prep**

Les vecteurs étaient purifiés à partir de la culture bactérienne incubée toute la nuit par le QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, France). Les vecteurs purifiés étaient doublement

digérés par les enzymes de restriction *Eco* RI et *Xho* I et les produits digérés étaient vérifiés sur gel d'agarose (1,5%) puis électrophorèse, pour vérifier si le clonage a bien fonctionné.

#### **2.2.6. Transformation des bactéries Rosetta2 avec le vecteur recombinant (pET-Duet-1)**

Les bactéries Rosetta2 BL21 (DE3) étaient transformées avec le vecteur recombinant pET-Duet-1\_PfMCA1 par choc thermique. Après transformation, les bactéries étaientensemencées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar, de l'ampicilline (100 µg/mL) et du chloramphénicol (34 µg/mL), puis incubés toute la nuit à 37°C.

#### **2.2.7. Production de la protéine PfMCA1 chez les bactéries Rosetta2**

Après la culture d'une nuit, les bactéries étaient repiquées dans du milieu liquide LB broth contenant 100 µg/mL ampicilline and 34 µg/mL chloramphénicol. La croissance bactérienne était suivie jusqu'à atteindre une densité optique (D.O<sub>600</sub>) entre 0.5-0.6, puis la production de la protéine était induite par l'ajout de l'IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside), jusqu'à une concentration finale de 1 mM. La vérification de l'expression de la protéine était réalisée par l'analyse du SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Cependant l'analyse du SDS-PAGE n'a pas révélé l'expression de la protéine de PfMCA1.

#### **2.2.8. Optimisation du gène PfMCA1**

La séquence du gène PfMCA1 a été optimisée par la société GenScrip dans le but d'améliorer son expression. Le gène ainsi optimisé était cloné avec succès dans le vecteur pET-Duet-1 et une transformation des bactéries Rosetta2 BL21 (DE3) a été réalisé comme précédemment décrit.

#### **2.2.9. Surexpression de la protéine PfMCA1 optimisé**

Une culture a été préparée d'un stock glycérol dans 10 mL de milieu de culture LB plus ampicilline 100 µg/mL et 34 µg/mL chloramphénicol à 37°C sous une agitation. Une fois que la valeur d'absorbance à 600 nm (Abs<sub>600nm</sub>) a atteint 0,6, la surexpression de la protéine a été induite par ajout de 1 mM d'IPTG sur la nuit à 37°C. A la fin de l'induction, les cellules ont été collectées par centrifugation à 6000 x g pendant 10 minutes à 4°C et les culots ont été congelés à -80°C.

### **2.2.9.1. Détermination de la solubilité de la protéine de PfmCA1**

Les culots cellulaires décongelés ont été repris dans 1 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl) puis lysées par trois sessions successives de 30 pulsations avec un sonicateur (Branson Sonifier 250). Le lysat cellulaire a été clarifié par centrifugation à 14000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Les culots restants ont été repris dans un même volume de tampon de lyse.

### **2.2.9.2. Analyse par SDS-PAGE**

10 µL de chaque fraction ont été mélangés à 10 µL de tampon de Laemmli concentré 2 fois (5% (v/v) β-mercaptoéthanol, 0,001% (v/v) bleu de bromophénol, 25% (v/v) glycérol, 2% (m/v) SDS et 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, BioRad). Le mélange a été dénaturé en chauffant 5 minutes à 96°C puis chargé sur un gel de polyacrylamide 10% (v/v) en présence d'un marqueur de masses moléculaires (Prestained Protein Ladder, Fermentas). La migration a été faite avec le tampon Tris-Glycine-SDS (0,25 M Tris-HCl pH 8,3, 1,92 M glycine et 1% (m/v) SDS, Euromedex) à 90 V pendant 10 minutes puis à 130 V jusqu'à ce que le front de migration soit à la limite d'exclusion du gel. Pour la révélation, le gel a été mis en contact avec la solution commerciale (PageBlue™ Protein Staining Solution #R0571, Fermentas) pendant 1 h avant d'être lavé avec 100 mL d'eau déionisée pour éliminer l'excès de colorant.

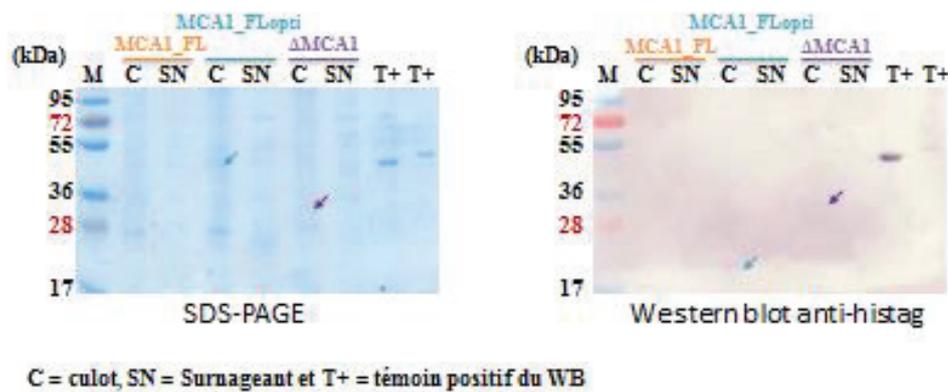
### **2.2.9.3. Analyse par Western-blot**

Après séparation des protéines par SDS-PAGE, un électro-transfert sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm (GE Healthcare, Amersham, Hybond ECL Nitrocellulose Membrane) est réalisé en milieu liquide. La migration est effectuée dans un tampon acide 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonique (CAPS)/Ethanol (10 mM CAPS pH 11, 10% (v/v) éthanol) sous un ampérage constant de 400 mA pendant 45 minutes. Après transfert, la membrane est saturée dans une solution de PBS/Tween®20/Lait (PBS 1X (solution 10X : NaCl 80 g, KCl pH 7,2-7,4 80 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, Euromedex), 0,1% (v/v) Tween®20, 5% (m/v) Lait) pendant 1 h à température ambiante afin de bloquer les sites de liaison non-spécifiques. La membrane est ensuite incubée 1 h à température ambiante dans une solution PBS/Tween®20/Lait contenant l'anticorps primaire, dirigé contre l'étiquette poly-histidines. L'anticorps en question est un anticorps monoclonal de souris (clone HIS-1, Sigma) dilué au 1/6000. Après trois lavages (3x5 minutes) avec une solution de PBS/Tween®20 (PBS 1X, 0,1% (v/v) Tween®20), la membrane est incubée 1 h à température ambiante avec une solution de PBS/ Tween®20 contenant l'anticorps secondaire, anti-souris

couplé à la phosphatase alcaline (Interchim), dilué au 1/10000. La membrane est une nouvelle fois rincée avec une solution de PBS/ Tween<sup>®</sup>20 (3x5 minutes) et un lavage avec une solution de PBS 1X pendant 5 minutes à température ambiante. La révélation est réalisée avec le substrat SIGMAFAST<sup>™</sup> pendant quelques minutes à température ambiante faisant apparaître un précipité violet.

## Résultats

Les résultats d'expression des trois types de gènes de PfmCA1 sur l'analyse de SDS-PAE et du Western-blot des fractions solubles et insolubles des chacune des formes.



- **MCA1\_FL** (gène PfmCA1 non-optimisé) : Nous n'avons pas observé l'expression de PfmCA1 sur l'analyse de SDS-PAGE.
- **MCA1\_FLopti** (gène PfmCA1 optimisé) : Pour l'expression du gène PfmCA1 optimisé, nous avons observé sur l'analyse de SDS-PAGE de la fraction insoluble deux bandes. Une faible bande environ 20 kDa et une bande au environ de 50 kDa qui pourrait correspondre à la protéine de PfmCA1 clivée, dont seule la bande 20 kDa est faiblement détecté sur WB. Tandis que la bande 50 kDa, n'a pas pu être détecté sur le WB, parce que cette partie qui correspond à la partie C-terminal porte le S-Tag, alors que la révélation sur WB a été réalisé avec le anti-histag.
- **ΔMCA1** (domaine catalytique de PfmCA1) : Pour l'expression du domaine catalytique seul, nous avons observé une faible bande environ 34 kDa dans la fraction insoluble et qui est faiblement révèle sur WB.

Ainsi, malgré de nombreuses tentatives de la surexpression de PfmCA1 chez les bactéries, nous n'avons pas réussi à récupérer la protéine entière, à cause d'un phénomène d'autoclavage

de cette dernière, qui se produit suite à son expression. Ainsi, cet objectif n'a pas pu être atteint, et par conséquent, n'a pas fait l'objet d'une publication.

**Article 1 de revue : *Plasmodium falciparum* meurt-il par apoptose ?**

Compte tenu des débats scientifiques concernant la nature de la mort cellulaire chez les organismes unicellulaires, plus particulièrement celle décrite chez *P. falciparum*, nous avons décidé de rédiger une revue à ce sujet avec les récentes découvertes. La mise à jour de la classification du NCCD sur le type de mort cellulaire est d'une grande importance pour mieux permettre la spécification du type de mort cellulaire. En effet, la spécification d'un type de mort pour les organismes unicellulaires est sujette à des controverses compte tenu de la difficulté à mettre en évidence tous les marqueurs de mort pour mieux spécifier le type de mort mis en évidence. A la lumière des récents travaux, nous nous sommes posé la question si *P. falciparum* possède sa propre machinerie apoptotique, qui lui permette de réguler soit sa survie soit sa mort.

## Wanted *Plasmodium falciparum*, dead or alive

Fatimata Sow<sup>1</sup>, Mary Nyonda<sup>1</sup>, Anne-Lise Bienvenu<sup>1,2</sup>, Stephane Picot<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> University Claude Bernard Lyon 1, Malaria Research Unit, SMITH, ICBMS, UMR 5246 CNRS-INSA-CPE-UCBL1, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France.

<sup>2</sup> Hospices Civils de Lyon, Institut de Parasitologie et de Mycologie Médicale (IP2M), Hôpital de la Croix-Rousse, 103 grande rue de la Croix-Rousse, 69317 Lyon cedex 04, France.

\* Corresponding Author: Stephane Picot, E-mail: stephane.picot@univ-lyon1.fr

**ABSTRACT** Mechanisms of cell death in unicellular parasites have been subjects of debate for the last decade, with studies demonstrating evidence of apoptosis or non-apoptosis like mechanisms, including necrosis, and autophagy. Recent clarifications on the definition of regulated or accidental cell death by The Nomenclature Committee on Cell Death provides an opportunity to reanalyze some data, re-evaluate conclusions in the light of parasite diversity, and to propose alternative arguments in the context of malaria drug resistance, considering lack of really new drugs in the pipeline. Deciphering the mechanisms of death may help in detection of new drug targets and the design of innovative drugs. However, classifications have been evolving rapidly since initial description of "programmed cell death", leading to some uncertainty as to whether *Plasmodium* cell death is accidental or regulated.

doi: 10.15698/mic2015.07.211

Received originally: 19.12.2014;

in revised form: 22.05.2015,

Accepted 25.05.2015

Published 06.07.2015.

**Keywords:** *Plasmodium*, malaria, apoptosis, autophagy, cell death.

**Abbreviations:**

CQ - chloroquine,

MOMP - membrane permeabilization,

NCCD - nomenclature committee on

cell death,

RCD - regulated cell death.

### INTRODUCTION

Eugene Blank wrote years ago to the Lancet a few words from "The rape of Lucrece" where Shakespeare anticipated the existence of apoptosis [1]:

...showing life's triumph in the map of death,  
And death's dim look in life mortality...

But the drama of malaria is far from literature and requires more attention to the mechanisms of parasite death. *Plasmodium falciparum* causes malaria in millions of people each year, killing thousands, and leading to poverty and neurological sequelae for an undetermined number of others [2]. Members of the *Plasmodium* genus are more than two hundred, but only five species infect humans: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* and *P. knowlesi*. Most of the knowledge accumulated over the centuries is on *P. falciparum*. Interest in *P. vivax* is mounting due to several factors, first, it plays a role in severe malaria, second, it develops drug resistance, and third, it has persistent dormant liver forms placing it as a public health problem today and tomorrow [3]. Few non-human species have been studied as models on specific aspects of this disease. *P. knowlesi* has been known to humans since 1930, but molecular methods showed more recently that its circulation among humans is more frequent than earlier suspected [4]. Extensive knowledge is available about the major steps of the malaria parasite cycle in the human and the

mosquito hosts, its biology, and the pathology it induces. On the contrary, very little is known about *Plasmodium* death, natural or induced by a physical, chemical or biological stress. Several mechanisms of cell death are known, including necrosis, apoptosis and autophagy, and these mechanisms have driven an increasing interest over the last two decades.

If a parasite has a "goal", it is that it be transmitted from host to host. Being responsible for morbidity or mortality is a collateral effect that precludes parasite transmission. High parasite virulence may lead to low transmissibility and sequentially low endemicity, for instance, killing its host before production of sexual forms which can be picked up by mosquitoes for continuity of the cycle, is a cost to parasite fitness. *P. falciparum*, is one of the most harmful of the malaria parasites. One could speculate that it has no inherent limitation to its transmission, leading to devastating disease in humans. On the other hand, one could reason that this unicellular parasite could be acting as a dispersed body within its vector and definitive host, either activating or not mechanisms that could regulate its virulence in terms of infectious burden. The most obvious of these potential mechanisms could be eliminating part of the parasite population in favour of host survival thus sustaining parasite transmission. Regulated cell death may be very well a cornerstone of this strategy.

### PLASMODIUM CELL DEATH

Crisis forms of the parasite were described in the early 20<sup>th</sup> century, but these punctuated and condensed parasites were not extensively studied per se (approximately thirty publications). They were mostly considered as degenerating forms of the parasite induced by the immune response and the "crisis form factor" [5, 6]. While examining with perplexity *Plasmodium* cultures decreasing in parasitemias under unknown reasons, we wondered whether these crisis forms were still alive. With regards to the first description of apoptosis in a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*) by Ameisen in 1995 [7], we explored the notion that there was more to these crisis forms than parasite corpses. In 1997, we described the apoptosis-like DNA fragmentation of *P. falciparum* parasite in response to chloroquine (CQ) [8]. We speculated that resistance to chloroquine was related to inhibition of apoptosis. This first description of apoptosis in *Plasmodium* parasite was not readily accepted by colleagues, and regulated *Plasmodium* death still remains a controversial subject. More than fifteen years later, the debate is still ongoing, and requires to be revisited in light of recent progresses and issues. Among the current issues, recent evidence of artemisinin drug resistance of malaria parasites is a huge matter of concern. Artemisinin and its derivatives may act in part through the induction of parasite cell death via a redox mechanism. A parallel was made decades ago between resistance to regulated cell death (RCD) of cancer cells and chloroquine-resistance. The same paradigm could be used again for artemisinin-resistant parasites, with several issues to be addressed before global spreading of malaria parasite resistance.

### "TO DIE, TO SLEEP — NO MORE..."

The Nomenclature committee on cell death (NCCD) is working to clearly delineate the boundaries between the various pathways leading to death of eukaryotic cells, this is in agreement with continuous progresses made on the mechanisms involved in metazoans [9, 10]. Their work is useful to better knowledge in eukaryotic parasite life or death decisions. NCCD recently defined cell death as "accidental" or "regulated" [10]. Accidental cell death is caused by severe physical, chemical or mechanical insults. It is immediate and without possibility of prevention or regulation by drugs or genetics. It leads to the release of large amounts of damage-associated molecular patterns (DAMP). DAMPs are key danger signals that initiate an immune response and a pro-inflammatory cascade by activating Toll-like receptors (TLR) [11]. These TLR activators can also contribute to the pathogenesis of inflammatory diseases and cancer [11]. This model of accidental cell death of parasites could be used to define the death of microfilariae when treatments with full doses of Diethyl-carbamazine or ivermectine are used to treat patients presenting a high numbers of parasites.

RCD is based on the activity of complex molecular machinery, giving time to a competitive interplay between mechanisms involved in survival and those involved in

death processes. Necrosis is neither the representative form for accidental cell death, nor apoptosis that for programmed cell death. The NCCD stressed the fact that RCD may present both apoptotic and necrotic traits, also that "autophagic cell death" should be used only from a functional perspective, and when RCD can be modulated by drugs or genetic intervention [12]. Features of autophagy are frequent during the different RCD processes, but their contribution to cellular demise seems to be limited [13, 14]. Apoptosis is defined as a caspase dependant variant of RCD, triggered by intrinsic or extrinsic events. Apoptosis relies on the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) which requires activity of one of the pro-apoptotic BCL2 family member genes, balanced by the activity of anti-apoptotic members of the same family, under the control of BH3-only proteins. Apoptosis is highly controlled, thus reversible, as demonstrated by the role of metabolic check-points in their attempt to re-establish homeostasis [15]. Bcl2-like proteins may operate as central checkpoints of a network of "firebreaks" leading to "the point-of-no-return". Necroptosis is defined as a caspase-independent RCD initiated by death receptors. Parthanatos (caspase-independent cell death involving hyperactivation of poly (ADP-ribose) polymerases and AIF release) and ferroptosis (cell death induced by iron-dependant ROS accumulation through depletion of the antioxidant glutathione in neurons and cancer cells) are other forms of specific mechanisms leading to RCD [10].

It became clearer that cell adaptation to stress is a long-standing mechanism, with the potential of successive initiation of pathways with balanced effects, leading to or not the execution of the death machinery. Interestingly, two exclusive models of cell stress adaptation have been proposed. The conversion model described the succession of RCD-inhibitory signals after the insult, followed by RCD-promoting signals without overlap. The competition model speculates that the pro- and anti-RCD machineries are acting at the same time to favour either cell survival or cell death. This second model seems to be the most reliable for various conditions. These concepts, recently formulated and suspected by many researchers, may explain the abundance of the debate on the "who kills the cell?" scientific question.

Is it expected that new definition will lead to closure on the debate on how *Plasmodium* dies: Is it by necrosis, apoptosis, autophagy or some unknown phenomena? Will the clarification provided recently by the NCCD help to define the protozoan, and more specially the *Plasmodium* cell death? Do all these really matter?

### PLASMODIUM CRIME SCENE: NECROSIS, APOPTOSIS, AUTOPHAGY?

In a recent opinion article, Proto and colleagues argued that protozoan cell death (including *Leishmania*, *Trypanosoma*, and *Plasmodium*) should only be considered as incidental cell death or unregulated necrosis [16]. Their opinion was mostly based on the fact that definitive evidence of machinery similar to eukaryotic cell is lacking in proto-

zoan parasites. They argued that regulated cell death could only be demonstrated if the death process can be delayed or abolished by targeting key signalling or execution pathways [16]. But they also suggested that executioners and/or regulators could be specific in parasitic protozoa. This opinion is driven by extensive evidence from experts and seems to be convincing. Nevertheless, since differences between higher eukaryotic cells and protozoan parasites are obvious, should we look for regulated cell death through the same lens and tools used in parasites as those in higher eukaryotes, including humans? Is it acceptable to consider that, during evolution, a unicellular organism has selected a restricted biological armament essential to transmit advantages, abandoning unnecessary, finely regulated pathways, which are required for a multicellular organism to adapt to a considerable variety of external stresses? Finally, should we affirm that a biological evidence of RCD can exist without an already identified biochemical pathway is nonsense?

### PLASMODIUM APOPTOSIS

The first description of *P. falciparum* apoptosis was made at a time when morphological features were the only markers of apoptosis [8]. *P. berghei* features of apoptosis including, condensation of chromatin, DNA fragmentation, and externalisation of phosphatidylserine were demonstrated a few years after that [17]. Evidence of *Plasmodium* apoptosis was obtained mostly in two different conditions. First, our primary description of apoptosis features in parasites subjected to chloroquine pressure opened the way to test the potential of other drugs to induce parasite apoptosis. Later on, Matthews and co-workers pointed out that the timing of exposure to drugs such as chloroquine has a major role for the detection of apoptosis markers [18]. It was also demonstrated that novel stilbene-chalcone hybrids cause stage-specific apoptosis-like death with MOMP in *P. falciparum* ring stages and trophozoites [19].

Second, the parasite cell death was considered by Hurd and co-workers as a response to within-host environmental factor during mosquito's stages of the parasite. Several papers have provided evidence for expression of "classical" apoptosis markers under "natural" conditions at a parasite population level inside the mosquito.

The apoptosis machinery began to be depicted with the first description of *P. falciparum* metacaspase 1 (PfMCA1) [20]. The caspase-like cell death was specific to a CQ sensitive clone. z-VAD-fmk can restore *P. falciparum* proliferation under CQ pressure and reduce the CQ sensitivity of the parasite. Fascinatingly the CQ resistant clone was insensitive to z-VAD-fmk indicating the CQ resistance level could be limited by other mechanisms. More recently, the metacaspase 1 gene was characterized in *P. vivax* isolates [21].

The expression of PfMCA1 C14 peptidase domain in *ycal* deficient *Saccharomyces cerevisiae* led to a growth retardation and a drastic yeast cell death [22]. Of significance, this phenotype could be blocked by the addition of

the pan caspase inhibitor z-VAD-fmk while PfMCA1 did not exhibit a caspase-like but an arginine protease activity, as reported for other protozoan MCAs [22]. PfMCA1 could play an initiator role leading to the activation of an aspartate protease effector. This hypothesis is in agreement with the description of PfMCA1 auto-processing leading to prodomain removal as it is typical of initiator caspases. PfMCA1 function seems to be finely regulated by two putative binding domains described: a C2 calcium-dependant membrane targeting domain and a CARD domain (Caspase Recruitment Domain) [20, 22, 23]. Authors suggested that the clan CA mediators are likely to be the proteases accounting for the cysteine protease activity [24].

Proteins with caspase-like activity were identified in the cytoplasm of the ookinete, and more than 50% of the mosquito midgut stages of the parasite die naturally by apoptosis before gut invasion. This phenomenon was prevented by a caspase inhibitor [17].

Following observations of pro- or contra- apoptosis evidences in *Plasmodium* parasites confirmed that the diversity is a cornerstone of cell death mechanism definition, and that different factors should be taken into consideration during the process of cell death characterization.

### ALL BUT APOPTOSIS!

Using F32 *P. falciparum* clone (CQ sensitive), Nyakeriga *et al.* obtained a disparity of features associated with death induced *in vitro* by treatment with chloroquine, atovaquone, etoposide and L-penicillamine, without a complete panel of apoptosis markers for all drugs [25]. They failed to detect DNA degradation and concluded that *Plasmodium* cell death "is not associated with typical feature of apoptosis after treatment, which are characteristic of vertebrate cells". Using CSC-A (Honduras) *P. falciparum* clone, Porter *et al.* failed to detect typical physiological hallmarks of what they called "classical" apoptosis [26]. They concluded that apoptosis could be eliminated as a mechanism of *Plasmodium* death, and they consider that data presented in the first demonstration of *P. falciparum* apoptosis [8] were due to white blood cell contamination of the medium.

While nothing could be excluded definitively 15 years after the experiments were conducted, fresh parasite cultures were newly tested with blood controlled for the absence of leucocytes. Same blood was used to simultaneously cultivate two different clones, and apoptosis hallmarks were only observed with the CQ sensitive clone. Examining blood smears twice a day for weeks would have revealed the suspected contamination by leucocytes. Returning to the raw data, parasitemias obtained during this period were as high as expected, leading to the hypothesis of the absence of leucocytes. Porter and colleagues then postulated that parasites were dying with signs of secondary necrosis, without a clear definition of these mechanism, and also stated that some form of programmed cell death could not be ruled out.

Using PSS1 (Brazil) *P. falciparum* clone (CQ resistant), Totino *et al.* failed to observe apoptosis after treatment

with chloroquine and staurosporine, in agreement with our demonstration that drug resistance to CQ may be linked to defect in apoptosis [27]. They observed a small percentage of TUNEL-positive parasites that they attributed to a small proportion of CQ sensitive parasite in the PSS1 resistance clone, but long-term cultivation could have selected a monoclonal culture. Finally they concluded that parasites were dying through an autophagic mechanism, on the basis of ultrastructural analysis that they considered a gold standard for identification of cell death procedure. Using *P. berghei* ANKA transgenic parasites (mCherry, GFP), Eickel et al. showed features of autophagy in liver-stage parasites [28].

#### PRO-APOPTOSIS CORNER

Using 3D7 and 7G8 CQ sensitive and resistant *P. falciparum* clones, Picot et al. highlighted the first evidence of DNA fragmentation (DNA ladders and TUNEL), MOMP, PS exposure in *P. falciparum* erythrocytic stages [8, 20]. The same team also described the *P. falciparum* metacaspase and its role in cell death [22]. Other studies using *P. berghei* ookinetes by Arambage et al. showed evidence of naturally occurring apoptosis in the mid gut of mosquitoes [29]. Muregi et al. also showed evidence of apoptosis by electron transmission microscopy and internucleosomal DNA fragmentation in parasites resistant to a thymidylate synthase inhibitor (5-fluoroorotate) [30]. In addition to these, using a 3D7 CQ sensitive *P. falciparum* clone, Rathore et al. elucidated features of apoptosis-like cell death (MOMP, caspase-like activity, dose dependant DNA fragmentation) by interfering with the ClpQY machinery [31]. Another study using Dd2 CQ sensitive *P. falciparum* clone by Mutai & Waitumbi showed evidence of DNA fragmentation, MOMP, expression and translation of metacaspase gene under the effect of increasing parasitemia, suggesting existence of a quorum-sensing like mechanism [32]. Finally Cheema et al. used NFS4 CQ sensitive *P. falciparum* clone to show evidence of MOMP, caspase activation and DNA fragmentation induced by Glaridin, a polyphenolic flavonoid [33].

#### PLASMODIUM DEATH MODE: A QUESTION OF TIME?

Recent work has demonstrated that among the erythrocytic stages of *P. falciparum*, response to heat will lead to apoptosis-like phenotype in the ring-stages, and an autophagy-like phenotype in late-stages of the parasite cycle. This provides more evidence that *Plasmodium* cell death is a fluctuant adaptation to stress, and that it will be difficult to clearly meet the definition criteria of regulated or accidental cell death [34]. The variability of the adaptive phenotypes of cell death in response to subtle changes of within-host environment was pointed out a few years ago [35]. In the absence of more detailed studies using a broad range of *Plasmodium* clones of different origins and with-

out the aim of demonstrating the relevance of one cell death mechanism compared to others, there are few chances to obtain a balanced evidence of regulated cell death of *Plasmodium* parasite. One of the variables to be tested is the kinetics of *Plasmodium* cell death. It has become clear that the delay between the death message and cell demise is crucial. The complexity of pathways potentially involved could lead to changes in the cellular and biochemical manifestations of parasite death. Depending on the time plan of the tests performed to decipher parasite death mechanisms, markers could be different.

William Shakespeare also wrote "...for there is nothing either good or bad, but thinking makes it so..." and was cited earlier by Lipton & Nakanishi [36]. The fantastic debates about mechanisms of *Plasmodium* death is of utmost importance for the development of future antimalarial drugs. Since scientific terminology is evolving rapidly, it could be counterproductive to reduce the mechanisms of death in *Plasmodium* parasite to a strict definition that will be outdated with increase in knowledge. The fight against malaria disease and its unacceptable toll of children and adults deaths requires a rapid development of innovative treatment to address the issues of increasing drug resistance. The Achilles' heel of the parasite could be its sensitivity to regulated cell death, providing new drug targets that we expected from the first observation of *Plasmodium* DNA fragmentation. There is probably a gap to fulfil between academic research needed to decipher the mechanisms of cell death in *Plasmodium* parasite, and clinical research needed to improve the outcome of malaria patients. Decades ago, Chloroquine and Quinine have been successfully used to treat patient without definitive knowledge on their mechanisms of action. It is tempting to speculate that there is enough evidence of regulated cell death for a translational research with the aim of designing new drugs to specifically kill parasites using the apoptosis-autophagy machinery.

#### CONFLICT OF INTEREST

All authors read and approved the final manuscript.

The authors declare that they have no competing interests.

#### COPYRIGHT

© 2015 Sow et al. This is an open-access article released under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) license, which allows the unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are acknowledged.

Please cite this article as: Fatimata Sow, Mary Nyonda, Anne-Lise Biennu, Stephane Picot (2015). Wanted *Plasmodium falciparum*, dead or alive. *Microbial Cell* 2(7): 219-224. doi: 10.15698/mic2015.07.211

## REFERENCES

- Blank E (1998). Shakespeare on apoptosis. *The Lancet* 351: 840.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, and Dondorp AM (2014). Malaria. *Lancet* 383(9918): 723–735.
- Shanks GD and White NJ (2013). The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 13(10): 900–906.
- Müller M and Schlagenhauf P (2014). Plasmodium knowlesi in travellers, update 2014. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 22: 55–64.
- Ockenhouse CF, Schulman S, and Shear HL (1984). Induction of crisis forms in the human malaria parasite Plasmodium falciparum by gamma-interferon-activated, monocyte-derived macrophages. *J Immunol Baltim Md* 1950 133(3): 1601–1608.
- Jensen JB, Boland MT, and Akood M (1982). Induction of crisis forms in cultured Plasmodium falciparum with human immune serum from Sudan. *Science* 216(4551): 1230–1233.
- Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, and Ouaiissi A (1995). Apoptosis in a unicellular eukaryote (Trypanosoma cruzi): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ* 2(4): 285–300.
- Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, and Ambroise-Thomas P (1997). Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91(5): 590–591.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovskiy B, Melino G, and Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16(1): 3–11.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon H-U, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovskiy B, Melino G, and Kroemer G (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19(1): 107–120.
- Łagiedo M, Sikora J, and Kaczmarek M (2015). Damage associated molecular patterns in the course of lung cancer - a review. *Scand J Immunol*.
- Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH, Bazan NG, Bertrand MJ, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Campanella M, Candi E, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin K-M, Di Daniele N, Dixit VM, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Fimia GM, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Gougeon M-L, Green DR, Gronemeyer H, Hajnóczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Joseph B, Jost PJ, Kaufmann T, Kepp O, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otin C, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine J-C, Martin SJ, Martinou J-C, Medema JP, Meier P, Melino S, Mizushima N, Moll U, Muñoz-Pinedo C, Nuñez G, Oberst A, Panaretakis T, Penninger JM, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Ravichandran KS, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Shi Y, Simon H-U, Stockwell BR, Szabadkai G, Tait SW, Tang HL, Tavernarakis N, Tsujimoto Y, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Villunger A, Wagner EF, Walczak H, White E, Wood WG, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovskiy B, Melino G, and Kroemer G (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 22(1): 58–73.
- Denton D, Aung-Htut MT, Lorenuhewa N, Nicolson S, Zhu W, Mills K, Cakouros D, Bergmann A, and Kumar S (2013). UTX coordinates steroid hormone-mediated autophagy and cell death. *Nat Commun* 4: 2916.
- Denton D, Aung-Htut MT, and Kumar S (2013). Developmentally programmed cell death in Drosophila. *Biochim Biophys Acta* 1833(12): 3499–3506.
- Green DR, Galluzzi L, and Kroemer G (2014). Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* 345(6203): 1250256.
- Proto WR, Coombs GH, and Mottram JC (2013). Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nat Rev Microbiol* 11(1): 58–66.
- Al-Olayan EM, Williams GT, and Hurd H (2002). Apoptosis in the malaria protozoan, Plasmodium berghei: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol* 32(9): 1133–1143.
- Matthews H, Ali M, Carter V, Underhill A, Hunt J, Szor H, and Hurd H (2012). Variation in apoptosis mechanisms employed by malaria parasites: the roles of inducers, dose dependence and parasite stages. *Malar J* 11: 297.
- Sharma N, Mohanakrishnan D, Sharda A, Sharma A, Saima null, Sirha AK, and Sahal D (2012). Stilbene-chalcone hybrids: design, synthesis, and evaluation as a new class of antimalarial scaffolds that trigger cell death through stage specific apoptosis. *J Med Chem* 55(1): 297–311.
- Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, De Monbrison F, Kaiser K, and Picot S (2007). Features of apoptosis in Plasmodium falciparum erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis* 195(12): 1852–1859.
- Rezanezhad H, Menegon M, Sarkari B, Hatam GR, and Severini C (2011). Characterization of the metacaspase 1 gene in Plasmodium vivax field isolates from southern Iran and Italian imported cases. *Acta Trop* 119(1): 57–60.
- Meslin B, Beavogui AH, Fasel N, and Picot S (2011). Plasmodium falciparum metacaspase PfMCA-1 triggers a z-VAD-fmk inhibitable protease to promote cell death. *PLoS One* 6(8): e23867.
- Le Chat L, Sinden RE, and Dessens JT (2007). The role of metacaspase 1 in Plasmodium berghei development and apoptosis. *Mol Biochem Parasitol* 153(1): 41–47.
- Ch'ng J-H, Kotturi SR, Chong AG-L, Lear MJ, and Tan KS-W (2010). A programmed cell death pathway in the malaria parasite Plasmodium falciparum has general features of mammalian apoptosis but is mediated by clan CA cysteine proteases. *Cell Death Dis* 1: e26.
- Nyakeriga AM, Perlmann H, Hagstedt M, Berzins K, Troye-Blomberg M, Zhivotovskiy B, Perlmann P, and Grandien A (2006). Drug-induced death of the asexual blood stages of Plasmodium falciparum occurs without typical signs of apoptosis. *Microbes Infect Inst Pasteur* 8(6): 1560–1568.
- Porter H, Gamette MJ, Cortes-Hernandez DG, and Jensen JB (2008). Asexual blood stages of Plasmodium falciparum exhibit signs of secondary necrosis, but not classical apoptosis after exposure to febrile temperature (40 C). *J Parasitol* 94(2): 473–480.

27. Totino PRR, Daniel-Ribeiro CT, Corte-Real S, and de Fátima Ferreira-da-Cruz M (2008). Plasmodium falciparum: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. *Exp Parasitol* 118(4): 478–486.
28. Eickel N, Kaiser G, Prado M, Burda P-C, Roelli M, Stanway RR, and Heussler VT (2013). Features of autophagic cell death in Plasmodium liver-stage parasites. *Autophagy* 9(4): 568–580.
29. Arambage SC, Grant KM, Pardo I, Ranford-Cartwright L, and Hurd H (2009). Malaria ookinetes exhibit multiple markers for apoptosis-like programmed cell death in vitro. *Parasit Vectors* 2(1): 32.
30. Muregi FW, Ohta I, Masato U, Kino H, and Ishih A (2011). Resistance of a rodent malaria parasite to a thymidylate synthase inhibitor induces an apoptotic parasite death and imposes a huge cost of fitness. *PLoS One* 6(6): e21251.
31. Rathore S, Jain S, Sinha D, Gupta M, Asad M, Srivastava A, Narayanan MS, Ramasamy G, Chauhan VS, Gupta D, and Mohammed A (2011). Disruption of a mitochondrial protease machinery in Plasmodium falciparum is an intrinsic signal for parasite cell death. *Cell Death Dis* 2: e231.
32. Mutai BK and Waitumbi JN (2010). Apoptosis stalks Plasmodium falciparum maintained in continuous culture condition. *Malar J* 9 Suppl 3: S6.
33. Cheema HS, Prakash O, Pal A, Khan F, Bawankule DU, and Darokar MP (2014). Glabridin induces oxidative stress mediated apoptosis like cell death of malaria parasite Plasmodium falciparum. *Parasitol Int* 63(2): 349–358.
34. Engelbrecht D and Coetzer TL (2013). Turning up the heat: heat stress induces markers of programmed cell death in Plasmodium falciparum in vitro. *Cell Death Dis* 4: e971.
35. Pollitt LC, Colegrave N, Khan SM, Sajid M, and Reece SE (2010). Investigating the evolution of apoptosis in malaria parasites: the importance of ecology. *Parasit Vectors* 3: 105.
36. Lipton SA and Nakanishi N (1999). Shakespeare in love—with NMDA receptors? *Nat Med* 5(3): 270–271.

## **Partie II**

**Le second objectif de cette thèse est d'étudier si le gène de la métacaspase est conservé entre différentes espèces de *Plasmodium***

Pour réaliser cette étude, nous avons effectué une mission de recherche en Mauritanie durant la période estivale pendant trois mois (juillet-septembre 2015) pour collecter des échantillons chez des patients impaludés. Cette mission a été effectuée dans deux villes en Mauritanie, à Nouakchott, la capitale du pays, et dans une ville située au sud de la Mauritanie (Rosso). A Nouakchott, l'étude a été réalisée dans trois centres hospitaliers différents : Hôpital Cheikh Zayed situé au nord-est de Nouakchott, au centre de santé de Teyarett et à l'hôpital Mère-Enfant localisé au nord de Nouakchott. Dans la ville de Rosso, la collecte d'échantillons a été effectuée au Centre Hospitalier de Rosso et au centre de santé de Rosso. Après avoir obtenu le consentement des patients et des tuteurs pour les enfants, un questionnaire de recueil d'information a été utilisé pour recueillir certaines données relatives aux patients (**questionnaire en annexe**). Les échantillons de sang étaient obtenus par piqûre au bout des doigts ou par du sang déjà prélevé sur des tubes. Des frottis sanguins et des gouttes épaisses ont été réalisés sur des lames, puis une à deux gouttes de sang ont été conservés sur du papier buvard. Le nombre total d'échantillon collectés durant cette étude est détaillé dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7: Nombre d'échantillons de paludisme collectés dans les deux villes en Mauritanie**

Villes	Hôpitaux	Cas positifs	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Infection mixte
<b>NOUAKCHOTT</b> (n=121)	Hôpital Cheikh Zayed (n=47)	21	9	8	4
	Centre de santé Teyarett (n=37)	15	3	10	2
	Hôpital Mère-Enfant (n=37)	4	2	2	0
<b>ROSSO</b> <i>MAURITANIE</i> (n=130)	Hôpital Rosso (n=88)	2	2	0	0
	Centre de santé de Rosso (n=42)	3	3	0	0
Total d'échantillons collectés dans les 2 villes	<b>251</b>				
<b>Total cas positifs/espèces</b>		<b>45</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>6</b>

Infection mixte = *P. falciparum* / *P. vivax*

## RESEARCH

## Open Access



# Genetic diversity of *Plasmodium vivax* metacaspase 1 and *Plasmodium vivax* multi-drug resistance 1 genes of field isolates from Mauritania, Sudan and Oman

Fatimata Sow<sup>1\*</sup>, Guillaume Bonnot<sup>1†</sup>, Bilal Rabah Ahmed<sup>2†</sup>, Sidi Mohamed Diagana<sup>2</sup>, Hachim Kebe<sup>3</sup>, Mohamedou Koita<sup>4</sup>, Ba Malado Samba<sup>5</sup>, Said K. Al-Mukhaini<sup>6,7</sup>, Majed Al-Zadjali<sup>6,7</sup>, Seif S. Al-Abri<sup>6,7</sup>, Osama A. M. Ali<sup>6,7</sup>, Abdallah M. Samy<sup>8,9</sup>, Muzamil Mahdi Abdel Hamid<sup>10</sup>, Musab M. Ali Albsheer<sup>10</sup>, Bruno Simon<sup>1,12</sup>, Anne-Lise Bienvenu<sup>1,12</sup>, Eskild Petersen<sup>6,7,11</sup> and Stéphane Picot<sup>1,12</sup>

## Abstract

**Background:** *Plasmodium vivax* is the second most important human malaria parasite, widely spread across the world. This parasite is associated with important issues in the process toward malaria elimination, including potential for relapse and increased resistance to chloroquine. *Plasmodium vivax* multi-drug resistant (*pvmdr1*) is suspected to be a marker of resistance although definitive evidence is lacking. Progress has been made in knowledge of biological factors affecting parasite growth, including mechanisms of regulated cell death and the suspected role of metacaspase. *Plasmodium vivax* metacaspase 1 (*PvMCA1-cd*) has been described with a catalytic domain composed of histidine (H372) and cysteine (C428) residues. The aim of this study was to test for a link between the conserved histidine and cysteine residues in *PvMCA1-cd*, and the polymorphism of the *P. vivax* multi-drug resistant gene (*pvmdr1*).

**Results:** Thirty *P. vivax* isolates were collected from Mauritania, Sudan, and Oman. Among the 28 *P. vivax* isolates successfully sequenced, only 4 samples showed the conserved His (372)–Cys (428) residues in *PvMCA1-cd*. Single nucleotide polymorphisms observed were H372T (46.4%), H372D (39.3%), and C428R (85.7%). A new polymorphic catalytic domain was observed at His (282)–Cys (305) residues. Sequences alignment analysis of *pvmdr1* showed SNP in the three codons 958, 976 and 1076. A single SNP was identified at the codon M958Y (60%), 2 SNPs were found at the position 976: Y976F (13%) and Y976V (57%), and 3 SNPs were identified at the position 1076: F1076L (40%), F1076T (53%) and F1076I (3%). Only one isolate was wildtype in all three codons (MYF), 27% were single MYL mutants, and 10% were double MFL mutants. Three new haplotypes were also identified: the triple mutant YVT was most prevalent (53.3%) distributed in the three countries, while triple YFL and YVI mutants (3%), were only found in samples from Sudan and Mauritania.

**Conclusions:** Triple or quadruple mutants for metacaspase genes and double or triple mutants for *Pvmdr1* were observed in 24/28 and 19/28 samples. There was no difference in the frequency of mutations between *PvMCA1-cd* and *Pvmdr1* ( $P > 0.2$ ). Histidine and cysteine residues in *PvMCA1-cd* are highly polymorphic and linkage

\*Correspondence: fatmata.sow@etu.univ-lyon1.fr

†Guillaume Bonnot and Bilal Rabah Ahmed contributed equally to this work

<sup>1</sup> Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (CBMS-UMR5246, CNRS-INSA-CPE, Malaria Research Unit, University Claude Bernard Lyon 1, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, Lyon 69622, Villeurbanne, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2017. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

disequilibrium with SNPs of *Pvmdr1* gene may be expected from these three areas with different patterns of *P. vivax* transmission.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, Metacaspases, PvMCA1-cd, *pvmdr1* gene, SNP, Drug resistance, Apoptose, Oman, Mauritania, Sudan

## Background

*Plasmodium vivax* has the broadest geographic distribution worldwide, and is a rising issue outside sub-Saharan Africa [1]. According to the World Health Organization (WHO), more than a third of the world's population, mostly in Asia and Latin America, is at risk of *P. vivax* malaria infection. In 2013, this parasite was responsible for more than one million cases in four countries (Ethiopia, India, Indonesia and Pakistan) [2, 3]. Several years ago, *P. vivax* was thought to be absent in sub-Saharan Africa based on the fact that this parasite uses the human Duffy antigen/chemokine receptor (DARC) to invade red blood cells and most African people rarely express this receptor. However in the Saharan area, Berber peoples (Moors, Tuareg, mostly Duffy-positive blood groups) were found infected by *P. vivax* [4, 5]. The presence of *P. vivax* malaria in Mauritania was reported first in 1948 [6], and recent studies have shown the predominance of *P. vivax* malaria in Nouakchott, Mauritania [7–10].

In Eastern Africa, cases of *P. vivax* malaria are mostly reported from Ethiopia and Eritrea, reports of *P. vivax* malaria in Sudan are few [11]. However, one of the characteristics of *P. vivax* infection is the low parasite densities, leading researchers to underestimate the real prevalence of *P. vivax* infection in endemic areas. The Sultanate of Oman has long been an area of vivax malaria transmission (33,000 cases in 1990), but was declared free from malaria transmission in 2004. However, a focus of local transmission was found in September 2007 and secondary cases occurred in 2010, in 2011 and in 2012. The local cases most probably reflect the high number of migrant workers from the Indian subcontinent living and visiting their home countries where malaria especially *P. vivax* is endemic. Recently, the Disease Surveillance and Control service at the Ministry of Health at Muscat was informed of vivax malaria cases in Maabaila in Seeb area, Muscat.

Chloroquine and primaquine have been used to treat *P. vivax* malaria infection for both asexual and liver stages [5, 12]. The first reports on chloroquine resistance in *P. vivax* were from Papua New Guinea (PNG) and Indonesia in 1989 and 1991, respectively. Subsequently, cases of chloroquine resistance have been reported in several areas [13–15].

No report yet exists of *P. vivax* chloroquine resistance in Sudan and Mauritania [12, 16], but *pvmdr1* mutations are emerging according to observations of imported

cases from these countries. Several studies have reported the link between drug resistance and polymorphisms in *pvmdr1* gene at codons Y976F and F1076L. *Pvmdr1* mutated codon 976F was linked to treatment failure in studies conducted in Southeast Asia and Ethiopia [17, 18]. However, still no consensus exists regarding the relationship between polymorphism at codons 976 and 1076 in the *pvmdr1* gene and drug resistance or clinical failures [19, 20].

Considering the emergence of drug resistance of *P. vivax* and the gaps of knowledge about its biology, studies of mechanisms of parasite death to seek new drug targets are much needed. About approximately two decades ago, the first evidence of *Plasmodium falciparum* parasite apoptosis by DNA fragmentation after drug pressure was reported [21]. Only chloroquine sensitive clones were reported to undergo apoptosis, while chloroquine resistant clones died by necrosis. These findings opened the door to a potential relationship between *Plasmodium* resistance and apoptosis, suggesting that resistance could be associated with default of apoptosis. Apoptosis is a regulated cell death, that is central to the development and homeostasis in metazoans [22]. Apoptosis was thought to be limited to multicellular organisms, but several studies have now provided evidence that apoptosis occurs in many unicellular organisms [21, 23–27].

Caspases are a family of proteases of cysteine that plays a key role in the execution of apoptosis [28]. A caspase-like family has been identified in plant, fungi and protozoa, and has been named "metacaspases" [29]. *In silico* studies have shown that metacaspases are structurally close to caspases and classified in C14 family, clan CD. The C14 family is characterized by histidine and cysteine residues in the catalytic dyad [29–31].

In the genome of *P. falciparum*, three metacaspases (MCA) were identified (PfMCA1-3), but only PfMCA1 was shown to possess histidine and cysteine residues required for the catalytic activity and to be involved in apoptosis of *P. falciparum* [32]. Likewise, in the *P. vivax* genome, three metacaspases have also been described and named PvMC1 (Pv114725), PvMC2 (Pv118575) and PvMC3 (Pv08564), respectively. Multiple alignment of the predicted caspase domains of the two human malaria parasites, *P. falciparum* (PfMCA1-3) and *P. vivax* (PvMCA1-3) and the murine malaria parasite *Plasmodium berghei* (PbMCA1-3) has shown that only PfMCA1,

PvMCA1 and PbmCA1 possess the dyad histidine–cysteine conserved in the catalytic domain [33]. The proteolytic activity of the catalytic domain of PfmCA1 was studied in *ycal* deficient *Saccharomyces cerevisiae*, and led to growth retardation and a drastic yeast cell death [34]. However, little is known about the involvement of PvMCA1 expression in the life and death of the *P. vivax* parasite.

Sequence alignment of PVX-114725 (Salvador 1 *P. vivax* metacaspase) with PF13-0289 (*P. falciparum* metacaspase 1) and isolates of *P. vivax* caspase-like from Mauritania (PVMG-03834), Brazil (PVBG-03488), India (PVIIG-01002) and North Korea (PVNG-00719) has shown a high similarity in the catalytic domain and a conserved histidine and cysteine residues. The catalytic histidine/cysteine dyad of PfmCA1 is found at positions 404 and 460 in the coding sequence, while in the PvMCA1-cd of *P. vivax* Sal 1 and *P. vivax* caspase like-isolates from the four endemic countries, these residues are found at positions 372 and 428. Interestingly, a new putative histidine/cysteine dyad was identified at positions 282 and 305. The objective of the present study was to investigate the relationship between the polymorphism found in histidine and cysteine residues of the catalytic domain of *P. vivax* (PvMCA1-cd) with the putative marker of drug resistance *pvmdr1* gene in samples collected from three geographically distant countries (Mauritania, Sudan and Oman).

## Methods

### Database accession of strains and isolates used in this study

Metacaspase sequences typical of distinct endemic areas were collected from Genbank: *P. vivax* metacaspase1 Salvador 1 (Sal-1, Central America, accession PlasmoDB: PVX\_114725); *P. vivax* caspase-like Mauritania I (West Africa, accession UniprotKB: PVMG-03834), *P. vivax* caspase-like Brazil I (South America, accession UniprotKB: PVBG-03488); *P. vivax* caspase-like India VII (Asia, accession UniprotKB: PVIIG-01002) and *P. vivax* caspase-like North Korean (Asia, accession UniprotKB: PVNG-00719), and used as references in alignment. *P. vivax* multidrug-resistant gene 1: *pvmdr1* (accession: GenBank: AY618622) was used for resistance marker analysis. *Plasmodium falciparum* metacaspase1 isolated from 3D7 clone (accession: PlasmoDB: PF13-0289) was used for comparison.

### Blood sample collection

Samples were collected from three malaria endemic or non-endemic countries: Mauritania, Sudan and Oman (Fig. 1). In Mauritania, the study was conducted in the summer period (July to September 2015) in three health centers located in Nouakchott: Hôpital Cheikh Zayed,

Centre Santé de Teyarett and Hôpital Mère-Enfant. After informed consent was obtained from all patients and/or guardians of children, questionnaires were used to record patient information (age, sex, body temperature, fever, histories of the illness and medical examination). Blood samples were collected by finger prick and were spotted on Whatman® filter papers, and dried and stored until use. Thick and thin smears were prepared and read by microscopy of Giemsa-stained blood films for malaria diagnostic and species of *Plasmodium* were recorded. Among the 20 *P. vivax* isolates collected during this study, 10 were chosen according to their highest parasite density. Samples from Sudan were provided by the Institute of Endemic Diseases, University of Khartoum, Khartoum, Sudan. These samples were collected from malaria patients in Whatman filter papers during 2013–2014. Samples from Oman were obtained from slides of Giemsa-stained thick blood film from patients of the Indian-subcontinental origin (India, Pakistan and Bangladesh) collected in Maabaila in the Seeb area, in Muscat, during the same period.

### DNA preparation from blood samples

DNA from Mauritania and Sudan samples was extracted from blood-spot samples on filter paper with Instagene Matrix Resin (Bio-Rad, France), according to the manufacturer's instructions. The identification of species was confirmed by real-time PCR using species-specific primers [35]. DNA from thick blood films (Oman) was extracted as described previously in the literature [36].

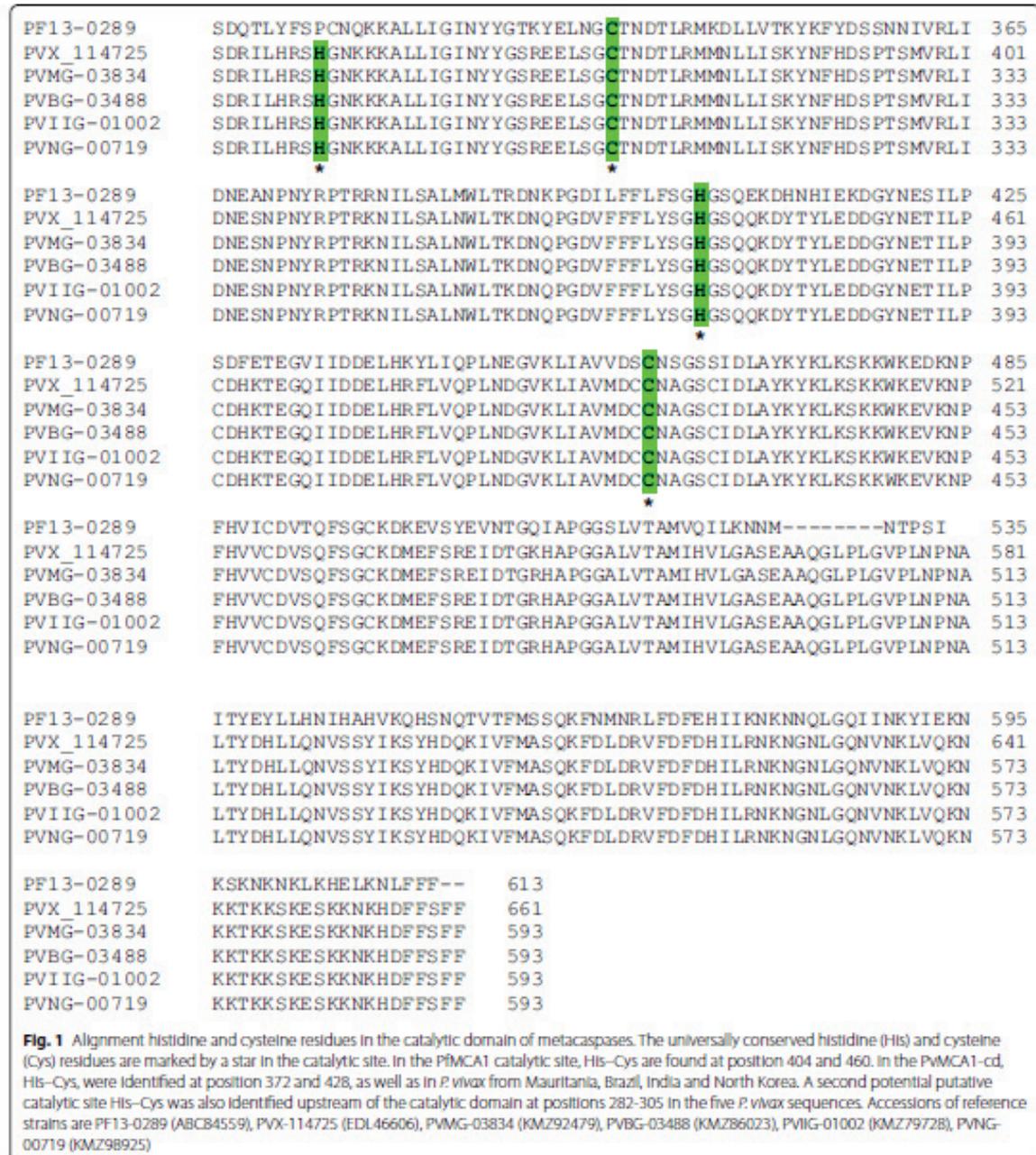
### PCR amplification of PvMCA1 gene and Pvmdr1 gene

Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using SYBR Green I dye binding specifically to double-stranded DNA. Two pairs primers were used to amplify PvMCA1-cd and *pvmdr1*. Primers were designed and synthesized by TIB Molbiol (France). Primers sequences and PCR program are presented in Table 1.

Real-time polymerase chain reactions were performed in a total volume of 20 µl containing 1 µmol/l of each primer, 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, and 2 µl of Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I buffer (Roche Molecular Biochemicals). Five microliters of genomic DNA were added to the PCR mixtures. Before sequencing, all PCR products were separated on agarose gel (1.5%), and expected sizes of PvMCA1-cd and *pvmdr1* genes were purified using Extraction Kit (Qiagen, France). Sequencing of PvMCA1-cd and *Pvmdr1* genes was carried out by the Biofidal Company (Biofidal, France).

### Pvcsp genotyping of *P. vivax* isolates

Extracted DNA was first submitted to PCR for *Plasmodium* genus and *Plasmodium* species detection, as



described previously [35]. Oligonucleotide primers and PCR conditions are described in Table 1.

All amplification reactions were carried out in a total volume of 20  $\mu$ l and the presence of 250 nM of each oligonucleotide primers for *Pvcsp* and 2.0  $\mu$ l of Light Cycler

Fast Start DNA Master SYBR Green 1 reaction mix. Primary amplification reactions were initiated with 5.0  $\mu$ l of the template genomic DNA, and 1.0  $\mu$ l of the product of these reactions was used to initiate the secondary amplification reactions. The cycling parameters for PCR

**Table 1** Primers used for the amplification of PvMCA1-cd, *pvmdr1*, and *Pvcsp* of *P. vivax* isolates

Genes	Primers	Sequences	PCR program
PvMCA1-cd	MCA1-F1	5'-CATGGAAACAAAAAAGG-3'	95 °C 10', 35 cycles 94 °C 30" 56 °C 30" 72 °C 2'
	MCA1-R1	5'-CGAAAACCTCCATATCTTTC-3'	
<i>pvmdr1</i>	mdr1-F1	5'-ATAGTCATGCCCCAGGATTG-3'	95 °C 10', 45 cycles 95 °C 10", 60 °C 10" and 72 °C 30"
	mdr1-R1	5'-ACGTTTGGTCTGGACAAGTAT-3'	
<i>Pvcsp</i>	VCSP-OF	5'-ATGTAGATCTGTCCAAGGCCATAAA-3'	Primary reaction
	VCSP-OR	5'-TAATTGAATAATGCTAGGACTAACAATATG-3'	95 °C 10', 40 cycles 95 °C 1', 58 °C 2' and 72 °C 2'
	VCSP-NF	5'-GCAGAACCAAAAAATCCACGTGAAAATAAG-3'	
	VCSP-NR	5'-CCAACGGTAGCTCTAACCTTATCTAGGTAT-3'	30 cycles 95 °C 1', 62 °C 2' and 72 °C 2'

PvMCA1-cd: catalytic domain of Metacaspase1's *P. vivax*

*Pvmdr1*: multidrug-resistant of *P. vivax*

*Pvcsp*: circumsporozoite surface protein gene of *P. vivax*

' : minute

" : second

°C: degree Celsius

were as follows: an initial denaturation step at 95 °C for 10 min preceded the cycles of annealing at a temperature defined for each primer pair (Table 1) for 2 min, extension step at 72 °C for 2 min, and a denaturation step at 95 °C for 1 min. After a final annealing step followed by 5 min of extension, reaction mixtures from each capillary were collected and stored at 4 °C until secondary PCR or sequencing analysis.

The sequences were determined directly from the PCR-purified templates using Qiagen DNA purification kit, according to the manufacturer's instructions. Direct sequencing of the full length of *pvcsp* was performed in both directions using a 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems). Sequences were confirmed by BLAST and nucleotide sequences were translated into amino acid sequences. BioEdit version 7.2.5 was used to analyze and control the DNA sequences. MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) was used for sequence alignment. MEGA 7, version 7.0.14, was used for phylogenetic analysis. Phylogenetic tree was performed using Maximum Likelihood method implemented in MEGA7.

## Results

### Analysis of *pvmdr1* gene polymorphisms

The *pvmdr1* gene was successfully sequenced in 30 *P. vivax* isolates. Sequence analysis of *pvmdr1* showed SNPs at codons 958, 976 and 1076 (Table 2). Haplotypes with a single mutation were identified at the codon position M958Y (60%), haplotypes with two mutations were found at the position 976: Y976F (13%) and Y976 V (57%) and three SNPs were identified at the position 1076: F1076L (40%), F1076T (53%) and F1076I (3%). Y976F and F1076I mutants were not identified in isolates from Oman. Only

one isolate showing a wild-type at all three codons (MYF) was from Mauritania.

The haplotypes YVT (triple mutant) was the most frequent (16/30, 53.3%), followed by MYL (single mutant) (8/30, 26.6%) and both were observed in the three countries. The MFL haplotypes (double mutant) were observed only in Sudan (3/30, 10%). YFL and YVI were only found once in Sudan and in Mauritania, respectively.

### Comparison of *P. vivax* caspase-like sequences of reference strains from different areas

Sequence alignment of *P. vivax* Sal-1 metacaspase 1 with caspase-like sequences of *P. vivax* isolates from Mauritania I (PVMG-03834), Brazil I (PBG-03488), India (PVIIG-01002), North Korea (PVNG-00719) and *P. falciparum* metacaspase 1 (PF13-0289) has shown the universally conserved histidine and cysteine residues in the catalytic dyad at the position 372 and 428. Interestingly, this analysis revealed a new second putative site of histidine/cysteine catalytic dyad at the position 282 and 305 (Fig. 1).

### Analysis of PvMCA1 catalytic domain

The catalytic domain of metacaspase 1 gene (PvMCA1-cd) was successfully sequenced in 28 *P. vivax* isolates. Sequences analysis of PvMCA1-cd showed SNPs in the catalytic domain (Table 3). Among the 28 *P. vivax* isolates, only four (one isolate from Mauritania and Oman and two from Sudan) showed conserved His (372)–Cys (428) residues in the catalytic domain and in the new putative site His (282)–Cys (305) (4/28, 14%). The two SNPs found in the H372 residue were H372T (13/28, 46.4%) and H372D (11/28, 39.3%). The only single SNP at position C428 was C428R (24/28, 85.7%).

**Table 2** Single nucleotide polymorphisms identified in the *pvmdr1* gene

Location/ID-Isolate	M958Y	Y976F/Y976V	F1076L/F1076I/F1076T
NCBI-AY618622 <sup>a</sup>	M	Y	F
MAURIT-61606	M	Y	F
MAURIT-00721	M	Y	L
SUDAN-KH-179	M	Y	L
SUDAN-KH-193	M	Y	L
OMAN-8	M	Y	L
OMAN-39	M	Y	L
OMAN-3	M	Y	L
OMAN-51	M	Y	L
OMAN-48	M	Y	L
SUDAN-KH-144	M	F	L
SUDAN-KH-142	M	F	L
SUDAN-KH047	M	F	L
SUDAN-KH-145	Y	F	L
MAURIT-06727	Y	V	I
MAURIT-Mou15	Y	V	T
MAURIT-06826	Y	V	T
MAURIT-Chi43	Y	V	T
MAURIT-Well30	Y	V	T
MAURIT-94241	Y	V	T
MAURIT-Jid34	Y	V	T
MAURIT-63933	Y	V	T
SUDAN-KH-130	Y	V	T
SUDAN-KH-173	Y	V	T
SUDAN-KH-103	Y	V	T
SUDAN-KH-195	Y	V	T
OMAN-52	Y	V	T
OMAN-36	Y	V	T
OMAN-13	Y	V	T
OMAN-17	Y	V	T
OMAN-47	Y	V	T

Residues that differ from the wild-type *P. vivax* Sal-I strain are indicated in bold type

Nonsynonymous substitutions: Y (Tyrosine), F (Phenylalanine), V (Valine), L (Leucine), I (Isoleucine), T (Threonine)

MAURIT Mauritania, ID identification

<sup>a</sup> GenBank accession no. AY618622 (wild-type strain)

At the second putative catalytic dyad, the SNPs identified at H282 and C305 residues were H282K (50%), H282M (8%) and C305R (50%), C305T (42%)

Therefore, the distribution of these mutations in the three different countries can be shown as following: at the 372–428 catalytic site, the TR double mutant was predominant (13/28; 31% from Mauritania and Oman and 38% from Sudan), followed by DR (11/28; 45% from Mauritania, 36% from Oman, 18% from Sudan) and wild type HC (4/28; 3% from Mauritania and Oman, 6% from

Sudan). Thus, wild type and double mutants of the His (372)–Cys (428) catalytic dyad were equally distributed in the three countries. Similar results were obtained for the His (282)–Cys (305) putative catalytic dyad, with single and double mutants H282K and C305R/T.

#### *Plasmodium vivax* CSP genotyping

Genotyping was successfully performed for *Pvcsp*. The phenotype VK210 was present in all samples with either VK210A (GDRADGQPA) or VK210B (GDRAAGQPA).

#### Discussion

This study is the first to look for a link between *Plasmodium* apoptosis and drug resistance through comparison of polymorphisms in metacaspase 1 gene of *P. vivax* and *Pvmdr1* as a marker of resistance. *Plasmodium vivax* isolates were collected in three endemic and non-endemic countries: Mauritania (West Africa), Sudan (northeastern Africa) and Oman (southwestern Asia).

The Nomenclature committee on cell death has defined cell death as “accidental” or “regulated” [37] to avoid misuse of the terms apoptosis, necrosis or autophagy. Accidental cell death is caused by severe physical, chemical or mechanical insults. Regulated cell death may present both apoptotic and necrotic traits that and can be modulated by drugs or genetic intervention [22]. Apoptosis is defined as a caspase dependant variant of regulated cell death, triggered by intrinsic or extrinsic events. Apoptosis is highly controlled, thus reversible, and has been clearly associated with mechanisms of drug resistance in cancer cells. Metacaspases are orthologs of caspases recently identified in protozoan parasites, including the two human malaria parasites, *P. falciparum* and *P. vivax*. The *P. falciparum* metacaspase 1 protein (PfMCA1) is the most studied and its involvement in apoptosis has been demonstrated previously [38]. It was demonstrated that cell death induced by PfMCA1 is aspartate-dependent protease activity. Interestingly, in vitro chloroquino-resistant clone of *P. falciparum* was reported to lack the aspartates dependent proteolytic activity [34].

Therefore, in this study, the polymorphisms found within the PvMCA1-cd gene was compared to the polymorphisms of *pvmdr1* gene associated with *P. vivax* drug resistance. Samples were collected from three different countries with a low suspected rate of documented treatment failures, to be able to detect mutations arising before fixation.

Analysis of *pvmdr1* sequences has shown SNPs at three codons 958, 976 and 1076 as previously described [6, 12, 15, 17, 19]. The substitution in the codon T958M is known as an allelic variant, of which T958 wild-type was identified in Ecuador and 958M is thought being

**Table 3** Single nucleotide polymorphisms found in PvMCA1-cd gene in comparison with *pvm-dr1* gene

Location/ID-isolate	H282M/H282K	C305T/C305R	H372D/H372T	C428R	<i>pvm-dr1</i>
PlasmoDB-PVX_114725 <sup>a</sup>	H	C	H	C	MYF
MAURIT-00721	H	C	H	C	MYL
SUDAN-KH-142	H	C	H	C	MFL
SUDAN-KH-193	H	C	H	C	MYL
OMAN-48	H	C	H	C	MYL
MAURIT-06727	H	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVI</b>
MAURIT-Jid34	H	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
MAURIT-63933	H	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
SUDAN-KH-195	H	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
OMAN-36	H	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
OMAN-13	H	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
OMAN-17	H	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
OMAN-51	ND	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	MYL
SUDAN-KH-103	ND	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
MAURIT-94241	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
MAURIT-Well30	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
MAURIT-Mou15	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
MAURIT-06826	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
MAURIT-61606	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	MYF
MAURIT-Chi43	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
SUDAN-KH-179	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	MYL
SUDAN-KH-144	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	MFL
SUDAN-KH-145	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	YFL
SUDAN-KH-130	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
SUDAN-KH-173	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
OMAN-52	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>YVT</b>
OMAN-8	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	MYL
OMAN-39	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	MYL
OMAN-3	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	MYL

Residues that differ from wild-type *P. vivax* Sal-1 strain are indicated in bold type

Nonsynonymous substitutions: **K** (Lysine), **M** (Methionine), **R** (Arginine), **T** (Threonine), **D** (Acide aspartique)

MAURIT Mauritania, ID identification, ND no-determined

<sup>a</sup> PVX\_114725: PlasmoDB annotation (wild-type strain Sal-1)

characteristic of Asia and Africa [12], while it has also been found in samples from Brazil [19]. The allelic form 958M was identified in samples from Africa and south western Asia tested here. Few isolates showed the single mutation Y976F (4/30), in agreement with the fact that the single 976F mutant is not very common worldwide [17, 19]. In contrast, many studies have reported a high prevalence of the Y976L and/or F1076L mutants associated with treatment failure [15, 18]. In Mauritania, mutations at codons Y976F and F1076L in the *pvm-dr1* gene have been reported but no study has established a relationship between these mutations and clinical responses of *P. vivax* to chloroquine [6].

A high prevalence of double and triple mutants was observed in samples from Mauritania, Sudan, and Oman.

Combined analysis of the three codons showed only one isolate from Mauritania with the wild-type MYF. Single MYL mutants (27%) were present in the 3 countries, while double MFL mutants (10%) were only identified in *P. vivax* isolates from Sudan. These results are in agreement with studies reporting the wildtype MYF in samples from Nepal, Ecuador, and Sri Lanka, the single MYL mutants in samples from Sudan, Nepal, Sri Lanka, Pakistan, Amazonas and Brazil. The double MFL mutants were mainly reported in Sri Lanka. Furthermore, three new nonsynonymous mutations were also identified (Y976V and F1076I/F1076T), and the triple YVT mutants were the most prevalent (53.3%) and distributed in the three countries while the triple YVI mutants (3%) were only found in Mauritania. These unexpected

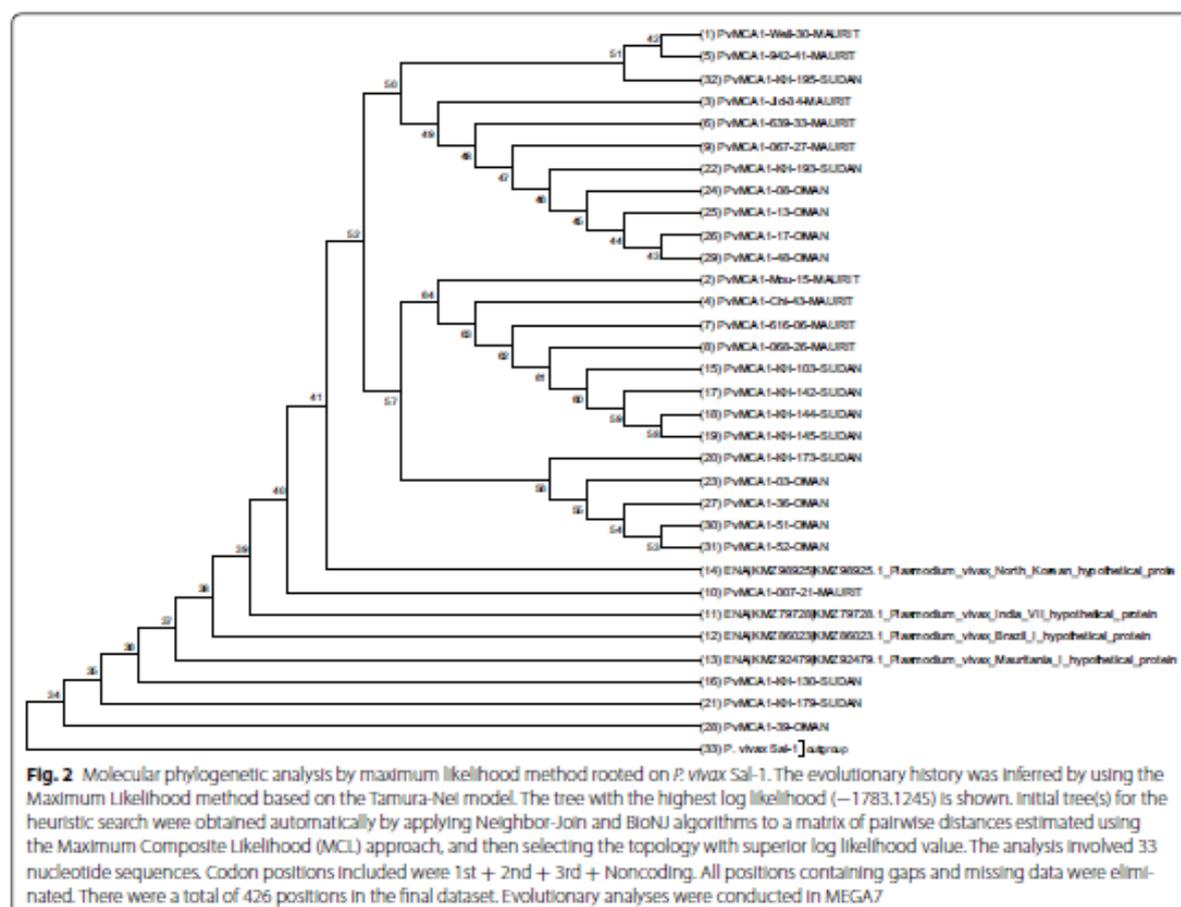
mutations were not described previously and their possible link with drug resistance is unknown.

The results obtained from PvMCA1-cd sequences were surprising since only few *P. vivax* isolates (14%) showed the conserved histidine and cysteine residues at position 372 and 428, while sequence analysis of reference strain *P. vivax* Sal-1 and published strains from Mauritania, Brazil, India and North-Korea showed a conserved catalytic dyad. Interestingly, a second potential putative site of histidine and cysteine residues was found at position 282 and 305, in which histidine and cysteine residues were also conserved in reference strains. The seven nonsynonymous mutations identified in both sites, and found in the three endemic countries, suggested that the catalytic domain is variable, in agreement with a study reporting a polymorphism in the full-length of *P. vivax* metacaspase1 [39].

Phylogenetic tree rooted on *P. vivax* Sal-1 was built using PvMCA1-cd sequences, which showed clearly three new taxa, suggesting a divergence occurred between the five *P. vivax* references strains (Salvador,

Mauritania, Brazil, India, North-Korea) and the isolates from Mauritania, Sudan and Oman (Fig. 2). But, the historical occurrence of these polymorphisms in these areas remains unknown.

To identify the reviviscence phenotype of this *P. vivax* parasite population circulating in the three countries, genotyping was done using the *Pvcsp* (circumsporozoite protein). The circumsporozoite protein gene of *P. vivax* comprises a central repetitive domain flanked by two conserved domains [40]. The repetitive domain is composed of a 27 bp element repeated a variable number of times. The VK 210 type (type I: GDRADGQPA) and the VK 247 type (type II: ANGAGNQP) are the most useful marker for *pvcsp* genotyping. All our samples displayed the VK210 type with different allelic associated with sequences repeated from 9 to 17 times. Surprisingly, all the isolates showed the VK210 pure genotype, demonstrating a temperate phenotype. Long latency *P. vivax* are known to be more widespread than generally thought, including in North Africa, the Horn of Africa, the Middle East and central India [41]. Determination of this



periodicity is of utmost importance to adapt the duration of the primaquine regimen for radical cure.

Isolates presenting both quadruple (PvMCA1-cd) and triple (*Pvmdr1*) mutations were observed in Mauritania (5/9), in Sudan (3/9) and in Oman (1/9), leading to the idea that there is no clear difference in the haplotypes from the three areas with the present sample size. While the number of samples is too low to draw conclusion, there is a trend for more mutation in Mauritania.

## Conclusion

The aim of this study was to look for a potential link between single nucleotide polymorphisms in the PvMCA1-cd and *Pvmdr1* genes, in order to test the hypothesis of a role for apoptosis or regulated cell death in *P. vivax* drug resistance. Triple or quadruple mutants for metacaspase genes and double or triple mutants for *Pvmdr1* were observed in most samples. There was no difference in the frequency of mutations between PvMCA1-cd and *Pvmdr1* ( $P > 0.2$ ). Most of the triple and quadruple mutants for H/C catalytic dyad were also double or triple mutants for *Pvmdr1* (18/24, 75%). Among the four isolates with the conserved histidine and cysteine at both catalytic sites, three were single mutants in the *pvmdr1* gene MYL, and one was double mutant MFL. These results showed that mutations in metacaspase gene appeared to evolve with a similar frequency than *Pvmdr1* gene.

The study was based on retrospective analysis of blood samples from patients and no information on treatment and follow-up were available. Thus, the exact link between apoptosis and drug resistance was not discernible. However, a trend for both mutants to be associated is suspected, which supports the interest for further investigations to explore the effects of mutations in the histidine and cysteine catalytic dyad of the PvMCA1 protein on *P. vivax* drug resistance.

## Authors' contributions

FS, GB performed the molecular biology method; FS, BAR, SMD, HK, MK, BMS collected samples in Mauritania; SAK, MAZ, SSAA, OAMA collected samples from Oman; AS, MMAH, MMAA collected samples from Sudan; BS, ALB, SP performed the data analysis; FS, ALB, EP & SP wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup> Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires ICBMS-UMR5246, CNRS-INSA-CPE, Malaria Research Unit, University Claude Bernard Lyon 1, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, Lyon 69622, Villeurbanne, France. <sup>2</sup> Laboratoire de Bactériologie et Parasitologie de l'Hôpital Cheikh Zayed, BP-5720 Nouakchott, Mauritania. <sup>3</sup> Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier National de Nouakchott, BP-612 Nouakchott, Mauritania. <sup>4</sup> Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie Médicale Institut National de Recherches en Santé Publique (INRSP), Avenue Jemal AbdeNasser, BP-695 Nouakchott, Mauritania. <sup>5</sup> Laboratoire Analyse de Biologie Médicale du Centre hospitalier de Rosso Mauritanie, BP-41 Rosso, Mauritania. <sup>6</sup> Department of Infectious Diseases, The Royal Hospital, Muscat, Oman. <sup>7</sup> Department of malaria, Ministry of Health, Muscat, Oman. <sup>8</sup> Entomology Department,

Faculty of Science, Ain Shams University, Abbassia, Cairo 11566, Egypt. <sup>9</sup> Biodiversity Institute, University of Kansas, Lawrence, KS 66045, USA. <sup>10</sup> Department of Parasitology and Medical Entomology, Institute of Endemic Diseases, Medical Campus, University of Khartoum, Qasr Street, P.O. BOX 102, Khartoum, Sudan. <sup>11</sup> Institute of Clinical Medicine, Faculty of Health Science, University of Aarhus, Aarhus, Denmark. <sup>12</sup> Institut of Parasitology and Medical Mycology, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

## Acknowledgements

We are grateful to the University Claude Bernard Lyon 1 (UCBL) for giving us the agreement to travel to Mauritania and the staff of the Hôpital de Cheikh Zayed, Centre de santé de Teyarett and Centre Hospitalier Mère-Enfant, for their aid in recruiting patients and the patients for their kind agreement for participating in this study. We thank Moussa Camara and Mamadou Djele for their support during the study in Rosso Mauritania. Thanks also go to the Sudanese American Medical association, which provided travel support for AMS to travel to Sudan for the purposes of the study. Special thanks to Henri Saenz, Science Manager of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Consent for publication

All authors have read and approved the content of the manuscript.

## Ethical approval

Ethical clearance was obtained from the Mauritanian National Ethics Committee, the Ministry of Health, sultanate of Oman, and the Institute of Endemic Diseases Research Ethics Committee, Sudan.

## Funding

This study was supported by a Grant from the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2016.

Received: 28 October 2016 Accepted: 10 January 2017

Published online: 02 February 2017

## References

1. Cornejo OE, Escalante AA. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol.* 2006;22:558–63.
2. WHO. *Confronting Plasmodium vivax malaria*. Geneva: World Health Organization; 2015. [http://www.searo.who.int/entity/malaria/confronting-plasmodium.pdf?ua=1].
3. Mizutani M, Fukumoto S, Soubelga AP, Soga A, Iyori M, Yoshida S. Development of a *Plasmodium berghei* transgenic parasite expressing the full-length *Plasmodium vivax* circumsporozoite VK247 protein for testing vaccine efficacy in a murine model. *Malar J.* 2016;15:251.
4. Howes RE, Reiner RC Jr, Battle KE, Longbottom J, Mappin B, Ordanowich D, et al. *Plasmodium vivax* transmission in Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0004222.
5. Pkocot S. Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria? *Med Mal Infect.* 2006;36:406–13.
6. Mint Lekweiry K, Boukhary ACMS, Galliard T, Wurtz N, Bogreau H, Haïd JE, et al. Molecular surveillance of drug-resistant *Plasmodium vivax* using pvdhfr, pvdhps and pvmdr1 markers in Nouakchott, Mauritania. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:367–74.
7. Ba H, Duffy CW, Ahouidi AD, Deh YB, Diallo MY, Tandia A, et al. Widespread distribution of *Plasmodium vivax* malaria in Mauritania on the interface of the Maghreb and West Africa. *Malar J.* 2016;15:80.
8. Ould Ahmedou Salem MS, Mint Lekweiry K, Mint Deïda J, Ould Emouh A, Ould Wedady M, Boukhary OMSA, et al. Increasing prevalence of *Plasmodium vivax* among febrile patients in Nouakchott, Mauritania. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92:537–40.
9. Ouldabdallahi Moukha M, Ba O, Ba H, Ould Khairy ML, Faye O, Bogreau H, et al. Malaria in three epidemiological strata in Mauritania. *Malar J.* 2016;15:204.

10. Ouldabdallahi Moukha M, Ba O, Ba H, Ould Khairy ML, Faye O, Bogreau H, et al. *Vvax* malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual. *Malar J*. 2011;10:336.
11. Tahia AA, Pirahmadi S, Mehrizi AA, Djadid ND, Nour BY, Zakeri S. Molecular genetic analysis of *Plasmodium vivax* isolates from Eastern and Central Sudan using *pvmsp* and *pvmsp-3a* genes as molecular markers. *Infect Genet Evol*. 2015;32:12–22.
12. Schousboe ML, Ranjitkar S, Rajakaruna RS, Amerasinghe PH, Morales F, Pearce R, et al. Multiple origins of mutations in the *mdr1* gene—a putative marker of chloroquine resistance in *P. vivax*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0004196.
13. Barnadas C, Timinao L, Javati S, Iga J, Malau E, Koepfli C, et al. Significant geographical differences in prevalence of mutations associated with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* resistance to armodiaquine from Papua New Guinea. *Malar J*. 2015;14:399.
14. Getachew S, Thiremer K, Auburn S, Abera A, Gadisa E, Aseffa A, Price RN, Petros B. Chloroquine efficacy for *Plasmodium vivax* malaria treatment in southern Ethiopia. *Malar J*. 2015;14:525.
15. Marlurt J, de Monbrison F, Brega S, Barboilat L, Müller I, Sie A, et al. Molecular markers of *in vivo* *Plasmodium vivax* resistance to armodiaquine plus sulfadoxine–pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvmdr1*. *J Infect Dis*. 2008;198:409–17.
16. Ould Ahmedou Salem MS, Mohamed Lemine YO, Deida JM, Lemrabott MA, Ouldabdallahi M, Ba MD, et al. Efficacy of chloroquine for the treatment of *Plasmodium vivax* in the Saharan zone in Mauritania. *Malar J*. 2015;14:39.
17. Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Gradoni L, Udonsangpetch R, et al. Identification of the *Plasmodium vivax* *mdr*-like gene (*pvmdr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J Infect Dis*. 2005;191:272–7.
18. Golassa L, Erko B, Baltraine FN, Aseffa A, Swedberg G. Polymorphisms in chloroquine resistance-associated genes in *Plasmodium vivax* in Ethiopia. *Malar J*. 2015;14:164.
19. Gomes LR, Almeida-de-Oliveira NK, de Lavigne AR, de Lima SR, de Pina-Costa A, Brasil P, et al. *Plasmodium vivax* *mdr1* genotypes in isolates from successfully cured patients living in endemic and non-endemic Brazilian areas. *Malar J*. 2016;15:96.
20. Rungshihunrat K, Muhamad P, Chaljaroenkul W, Kuesap J, Na-Bangchang K. *Plasmodium vivax* drug resistance genes: *Pvmdr1* and *Pvcr1-0* polymorphisms in relation to chloroquine sensitivity from a malaria endemic area of Thailand. *Korean J Parasitol*. 2015;53:43–9.
21. Rungshihunrat K, Muhamad P, Chaljaroenkul W, Kuesap J, Na-Bangchang K. Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91:590–1.
22. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*. 2015;22:58–73.
23. Al-Olayan EM, Williams GT, Hurd H. Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol*. 2002;32:1133–43.
24. Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol*. 2007;23:376–83.
25. Madeo F, Fröhlich E, Fröhlich KU. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;139:729–34.
26. Totino PR, Daniel-Ribeiro CT, Corte-Real S, de Fátima Ferreira-da-Cruz M. *Plasmodium falciparum*: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. *Exp Parasitol*. 2008;118:478–86.
27. Totino PR, Daniel-Ribeiro CT, Corte-Real S, de Fátima Ferreira-da-Cruz M. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *J Biol Chem*. 2012;287:29251–9.
28. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases—an update. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*. 2008;151:10–27.
29. Moltram JC, Helms MJ, Coombs GH, Sajid M, Cian CD. Cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends Parasitol*. 2003;19:182–7.
30. Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavlakov A, Lam E, Bozhkov PV. Metacaspases. *Cell Death Differ*. 2011;18:1279–88.
31. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*. 2000;6:961–7.
32. Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, De Monbrison F, Kaiser K, et al. Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PIMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis*. 2007;195:1852–9.
33. Le Chat L, Sinden RE, Dessens JT. The role of metacaspase 1 in *Plasmodium berghei* development and apoptosis. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;153:41–7.
34. Meslin B, Beavogul AH, Fasel N, Picot S. *Plasmodium falciparum* metacaspase PIMCA-1 triggers a z-VAD-fmk inhibitable protease to promote cell death. *PLoS ONE*. 2011;6:e23867.
35. de Monbrison F, Maitrejean M, Latour C, Bugnazet F, Peyron F, Barron D, Picot S. *In vitro* antimalarial activity of flavonoid derivatives dehydroxyflavin and 8-(1;1)-DMA-kaempferide. *Acta Trop*. 2006;97:102–7.
36. Cnops L, Van Esbroeck M, Bottieau E, Jacobs J. Giemsa-stained thick blood films as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR. *Malar J*. 2010;9:370.
37. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19:107–20.
38. Meslin B, Zalla H, Fasel N, Picot S, Bienvenu AL. Are protozoan metacaspases potential parasite killers? *Parasit Vectors*. 2011;4:26.
39. Rezaeezhad H, Menegon M, Sarkari B, Hatam GR, Severini C. Characterization of the metacaspase 1 gene in *Plasmodium vivax* field isolates from southern Iran and Italian imported cases. *Acta Trop*. 2011;119:57–60.
40. Imwong M, Pukrittayakamee S, Grüner AC, Rénia L, Letourneur F, Looareesuwan S, et al. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using *Pvcs* and *Pvmsp1*. *Malar J*. 2005;4:20.
41. Kim JR, Nandy A, Maji AK, Addy M, Dondorp AM, Day NP, et al. Genotyping of *Plasmodium vivax* reveals both short and long latency relapse patterns in Kolkata. *PLoS ONE*. 2012;7:e39645.
42. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95:15–34.
43. Mahgoub H, Gasim GI, Musa IR, Adam I. Severe *Plasmodium vivax* malaria among sudanese children at New Halfa Hospital, Eastern Sudan. *Parasit Vectors*. 2012;5:154.
44. Moreira CM, Abo-Shehadeh M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*. 2015;14:360.

## DISCUSSION

### 1. Etude de l'activité antipaludique des molécules candidates

Sachant la longue durée que peuvent prendre les études d'expressions des gènes de *P. falciparum* dans un système hétérologue, une solution alternative était de tenter de déterminer la structure de PfMCA1 par homologie de séquence à une structure d'une métacaspase résolue tridimensionnellement. C'est ainsi qu'un modèle de PfMCA1 a été construit par homologie à partir de la métacaspase de *T. brucei* résolue par cristallographie (McLuskey et al., 2012). La métacaspase 2 de *T. brucei* (TbMCA2) est la seule dont la structure tridimensionnelle a été déterminée et c'est un protozoaire, phylogéniquement plus proche de *Plasmodium* que les eucaryotes supérieurs. Il a été rapporté que la structure de TbMCA2 est similaire à celle de la caspase 7 avec 65% d'identité (McLuskey et al., 2012). Le modèle de PfMCA1 construit ne présente que la partie C-terminale de la protéine soit 45%, contenant le domaine catalytique, sur une protéine longue de 613 acides aminés. L'alignement du modèle de PfMCA1 avec le TbMCA2 présentait une identité de 35% sur une séquence de 45%. Ainsi les molécules sélectionnées selon leurs énergies de liaison avec le modèle ont été sélectionnées. Certaines de ces molécules étaient retrouvées dans la base de données [Zinc.docking.org](http://zinc.docking.org). Parmi les dix molécules sélectionnées, quatre seulement étaient disponibles chez la société Enamine (Ukraine). Une cinquième molécule nous a été fournie par le laboratoire de chimie (CPE). Les résultats des tests *in vitro* de sensibilité ont démontré que ces molécules présentaient des activités antipaludiques élevées de l'ordre de 8 à 20  $\mu\text{M}$ , comparées à la molécule de référence. Selon les critères de sélection de MMV pour les molécules candidates, qui pourraient être considérées comme les futurs traitements du paludisme, l'activité antipaludique doit être de  $< 1 \mu\text{M}$  (<http://www.mmv.org/research-development>). En conséquence, ces molécules n'ont pas répondu au critère de sélection en tant que bonnes candidates thérapeutiques, d'autant plus que leurs mécanismes d'action n'ont pas été étudiés. Mais, pour nous, nous estimons qu'il serait intéressant d'étudier la structure de ces molécules dans le but de voir si leur activité antipaludique pourrait être améliorée.

### 2. Difficulté dans la détermination de la structure tridimensionnelle de PfMCA1

L'un des objectifs de cette thèse était de produire la protéine PfMCA1 chez les bactéries. En effet, la production de cette protéine en grande quantité permettrait de déterminer sa structure tridimensionnelle par la cristallographie, afin de confirmer les différentes structures prédites *in silico*. Des études récentes ont mis en évidence le rôle potentiel de PfMCA1 dans

l'apoptose du parasite et une conservation des résidus histidine et cystéine dans la dyade catalytique (Le Chat et al., 2007 ; Meslin et al., 2007, 2011a). Cependant, l'expression des gènes de *P. falciparum* dans un système hétérologue présente de nombreuses difficultés du fait de la richesse de son génome en AT (80%) et de l'instabilité des grands fragments de gènes dans d'autres organismes (Dame et al., 1996 ; Hoffman et al., 2002 ; Zhang et al., 2004). Par ailleurs, l'étude de la caractérisation de la protéine calpaine de *P. falciparum* a révélé une difficulté de l'expression de la protéine entière (Gomes et al., 2015). La stratégie adoptée consistait d'abord à cloner le gène d'intérêt PfmCA1, qui fait environ 1842 pb et code une protéine de 613 acides aminés, dans un vecteur d'expression pET-Duet-1. La particularité de ce vecteur est qu'il possède deux Tag à son extrémité, une Tag-His en 5' et une Tag en 3', qui sont utiles pour l'étape de la purification de la protéine entière. Ensuite, nous avons réalisé l'expression de cette protéine chez les bactéries Rosetta2. La particularité de ces bactéries est qu'elles possèdent un plasmide répliquatif PRARE2, qui est porteur de codons rarement exprimés chez la bactérie. Cependant, les premiers essais n'ont pas démontré l'expression de la protéine PfmCA1. Ainsi, dans le but d'améliorer cette surexpression de la protéine, nous avons optimisé le gène PfmCA1 avec la société GenScript (Genscript.com-Synthetic-GenScript). Mais, malgré l'optimisation et de nombreuses tentatives pour obtenir la protéine entière exprimée chez les bactéries, nous n'avons pas réussi à la récupérer, sans doute à cause de la dégradation de la protéine suite à son expression, résultant des processus d'autoclivage de l'enzyme. Des résultats similaires ont été rapportés lors de l'expression de la caspase 8, et de la métacaspase 2 (MCA2) de *T. brucei* (McLuskey et al., 2012 ; Stennicke and Salvesen, 1999). Récemment, la MCA2 de *T. brucei* a été résolue par cristallographie, mais à cause des processus d'autoclivage de la protéine sauvage, c'est la structure de la forme mutée (inactive) de la protéine qui a pu être déterminée. Une mutation du résidu cystéine en glycine (MCA<sup>C213G</sup>) a été réalisé dans la dyade catalytique (McLuskey et al., 2012). Ce processus d'autoclivage des métacaspases a été largement rapporté être dépendant de la présence du calcium, qui en est l'élément déclencheur. En revanche, il n'est pas encore clairement établi comment le calcium déclenche ce phénomène d'autoclivage (Meslin et al., 2011a ; Moss et al., 2007 ; Wong et al., 2012). Dans nos travaux, nous avons utilisé un chélateur de calcium, l'éthylènediamine acetic acid (EDTA), pour limiter le processus d'autoclivage de PfmCA1, mais, sans succès. Nous avons également pensé muter les résidus histidine et cystéine dans la dyade catalytique, responsables de l'activité protéolytique. Mais il a été rapporté chez la levure *S. cerevisiae* que la mutation des résidus histidine et cystéine de sa métacaspase (Yca1) n'empêchait pas les processus d'autoclivage de la protéine (Wong et

al., 2012), contrairement à ce qui a été rapporté pour la métacaspase 2 de *T. brucei* (TbMCA2) (McLuskey et al., 2012). L'étude de la structure tridimensionnelle de PfMCA1 fait l'objet de nombreux défis, dont une expression faible de la protéine, malgré l'optimisation du gène. En outre, un phénomène d'autoclivage de la protéine suite à son expression, rend difficile l'obtention de la protéine pour déterminer sa structure. Des études plus approfondies sont ainsi nécessaires pour comprendre le processus d'autoclivage des métacaspases, afin de trouver des moyens pour la bloquer.

Il y a environ une décennie, les métacaspases ont été découvertes chez plusieurs organismes unicellulaires. C'est suite à cela que d'intenses recherches ont été menées dans le but de comprendre leurs implications dans la mort cellulaire régulée. C'est dans cette optique que la métacaspase de *P. falciparum* (PfMCA1) a été identifiée et caractérisée et son rôle potentiel dans l'apoptose a été mis en évidence. D'autre part, la détermination de sa structure est d'une grande importance pour faciliter la compréhension de leur mécanisme d'action et de leur régulation dans le processus de mort cellulaire régulée.

### **3. Mission de recherche en Mauritanie**

La mission de recherche en Mauritanie s'est bien passée dans les différents hôpitaux. Durant cette étude, j'ai eu l'occasion de rencontrer des personnes qui travaillent dans différents domaines de la santé et de la recherche sur le paludisme à Nouakchott, notamment le représentant de l'OMS en Mauritanie, le directeur de recherche scientifique à Nouakchott et le directeur adjoint de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP). Les contacts de ces personnes sont fournis dans le rapport de la mission (annexe). Durant ces rencontres des souhaits de collaborations ont été discutés entre l'unité de recherche sur le paludisme à Nouakchott et Malaria Research Unit à Lyon, avec le directeur de recherche scientifique et l'adjoint INRSP. Cependant, ce souhait de collaboration reste toujours un sujet de débat.

#### **3.1. Etude de la conservation du gène de la métacaspase entre différents isolats de *P. falciparum***

L'un des objectifs de cette étude était de tester si les séquences du gène qui code la métacaspase sont bien conservées entre les différents isolats de *P. falciparum*. A notre grande surprise, nous avons constaté que parmi les 19 échantillons de *P. falciparum* collectés, seulement 3 (3/19 :15,78%) échantillons ont donné des résultats positifs sur l'amplification du gène de la métacaspase. Et cela du fait de leurs fortes parasitemies comparés aux autres isolats

(Lim00053-01 : 2,40%, 02600050-01 : 3% et Eni00014-01 : 2,23%). Ainsi, nous avons supposé que la difficulté dans l'amplification du gène de la métacaspase pourrait être expliquée par la faible parasitémie des autres isolats (> 1%). De plus, il y a une différence qui réside entre l'extraction de l'ADNg à partir d'une culture continue et l'ADNg de *P. falciparum* mélangé avec l'ADN génomique humain dans un prélèvement sanguin des patients, dont certains facteurs (inhibiteurs de la PCR) peuvent influencer l'étape de l'amplification. Ainsi, tous ces facteurs pourraient expliquer la difficulté rencontrée dans l'étude de la conservation du gène de la métacaspase entre différents isolats de *P. falciparum*.

### **3.2. Etude du domaine catalytique du gène de la métacaspase entre différentes espèces de *Plasmodium***

Parmi les analyses de séquence entre PfmCA1 (PF13-0289) de *P. falciparum*, la métacaspase 1 de *P. vivax* (PVX\_114725) et la métacaspase 1 de *P. berghei* ont révélé une conservation des résidus histidine et cystéine dans la dyade catalytique. De plus, une forte similarité de séquences dans le domaine catalytique entre ces trois *Plasmodium* a été observée. De ce fait, nous avons voulu étudier si les résidus (histidine et cystéine) du domaine catalytique sont bien conservés entre les différentes espèces de *Plasmodium*. Dans cette étude, quatre espèces de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*) ont été testées. A la suite de cette étude, de manière étonnante, l'amplification du gène du domaine catalytique (735 pb) n'a fonctionné qu'avec les échantillons de *P. vivax*.

### **4. Etude du domaine catalytique de la métacaspase 1 de *P. vivax***

La PfmCA1 est la protéine la plus étudiée. C'est ainsi que son rôle dans la mort cellulaire a été récemment mis en évidence (Meslin et al., 2007, 2011a). Cependant l'implication de la métacaspase 1 de *P. vivax* dans la survie ou la mort cellulaire du parasite n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie. Dans cette étude, la métacaspase 1 de *P. vivax* (PvmCA1) a été décrite par comparaison de séquence avec la PfmCA1. Les résidus histidine et cystéine ont été identifiés et ils sont conservés dans la dyade catalytique de ces métacaspases. Nous avons voulu étudier si ces résidus (histidine et cystéine) du domaine catalytique de la métacaspase 1 de *P. vivax* (PvmCA1-cd) sont bien conservés. Des échantillons de *P. vivax* ont été collectés en Mauritanie, au Soudan et à Oman. PvmCA1 a été étudiée en comparaison avec un marqueur moléculaire de la résistance à la chloroquine, le gène *P. vivax* multidrug-resistant 1 (*pvm-dr1*). Les résultats ont montré que les résidus histidine et cystéine sont

hautement polymorphes dans les trois différents pays étudiés. De manière intéressante, PvMCA1-cd possède un deuxième site putatif histidine and cystéine (H272 –C305) en amont des résidus conservés (H372 –C428). Les résidus (H372 –C428) sont supposés être impliqués dans l'activité protéolytique à l'instar de PfMCA1, mais doivent faire l'objet d'étude sur la fonction de PvMCA1 et leur potentiel rôle dans l'apoptose du parasite. De plus, les nombreuses mutations identifiées dans les deux sites putatifs nécessitent des études plus approfondies, afin d'étudier leurs effets sur la fonction de PvMCA1. Par ailleurs, il a été rapporté que la métacaspase 9 d'*A. thaliana* possède deux cystéines (Cys<sup>147</sup> and Cys<sup>29</sup>) dans sa dyade catalytique. Des analyses de mutations ont démontré que la substitution de la Cys<sup>29</sup> par une alanine (Ala) conduit à une perte de l'activité protéolytique estimée à 99%. De plus, ces deux cystéines ont été démontrées nécessaires dans l'activité protéolytique de l'enzyme (Vercammen et al., 2007). A l'avenir, la métacaspase 1 de *P. vivax* à l'instar de PfMCA1 pourrait être une cible thérapeutique prometteuse dans la recherche de nouvelles drogues dans le traitement du paludisme à *P. vivax*, qui constitue la deuxième espèce la plus répandue dans le monde.

## **ANNEXE**

### **Stage de recherche en Mauritanie**

- Questionnaire de recueil d'informations des patients impaludés
- Rapport de mission de recherche

### **Présentation d'un poster lors de la 21<sup>ème</sup> Journée Scientifique de L'EDISS**

### **Etude d'un cas clinique de Mycétome chez une patiente Mauritanienne**

## Questionnaire de recueil d'informations des patients impaludés en Mauritanie

Numéro patient

Code sang

Fiche de renseignement

### Identification du patient

**Patient** : Nom : ..... Prénom : .....

Sexe : M  ou F  Date de naissance (**JJ/mois/année**) :...../...../..... Ou Age.....

Ethnie : Maure  Peulh  Soninké  Wolof  Autres

### Lieu d'habitat :

Centre-ville  Près du fleuve  champs  cours d'eau stagnante  Campagne  ou autres

### Histoire de la maladie :

Durée de la maladie : .....

Automédication  si oui, quel médicament : .....

Consultation  si oui, médecin généraliste  infirmier

Prise de sang pour diagnostic du paludisme : oui  non

Antécédents du patient : .....

Motif de consultation : .....

Sommeil sous moustiquaire imprégnée d'insecticides oui  non

### Traitement

Traitement antipaludique utilisé : .....

Durée de suivi du traitement : .....

Moyens de procuration du médicament : Pharmacie  Marché

### Maladie

#### Critère d'inclusion

Accord de participation à l'étude oui  Non

Age du patient : .....

### Signes de suspicion du paludisme

Fièvre  Vomissement  Diarrhée  Maux de tête  Autres signe

Hospitalisé : Oui  ou non

Poids : /...../

Taille : /...../

### Examen biologique du patient

NFS.....

Glycémie.....

Hémoculture.....

Urée.....

ECBU.....

Méningite.....

### Critères d'exclusion

Refus .....

Urgence vitale .....

### Résultats du diagnostic du paludisme

Nbre de prise de sang du patient	01	02	03	04	05
FS					
GE					
TDR					
Parasitémie					
Espèce Plasmodiale responsable					

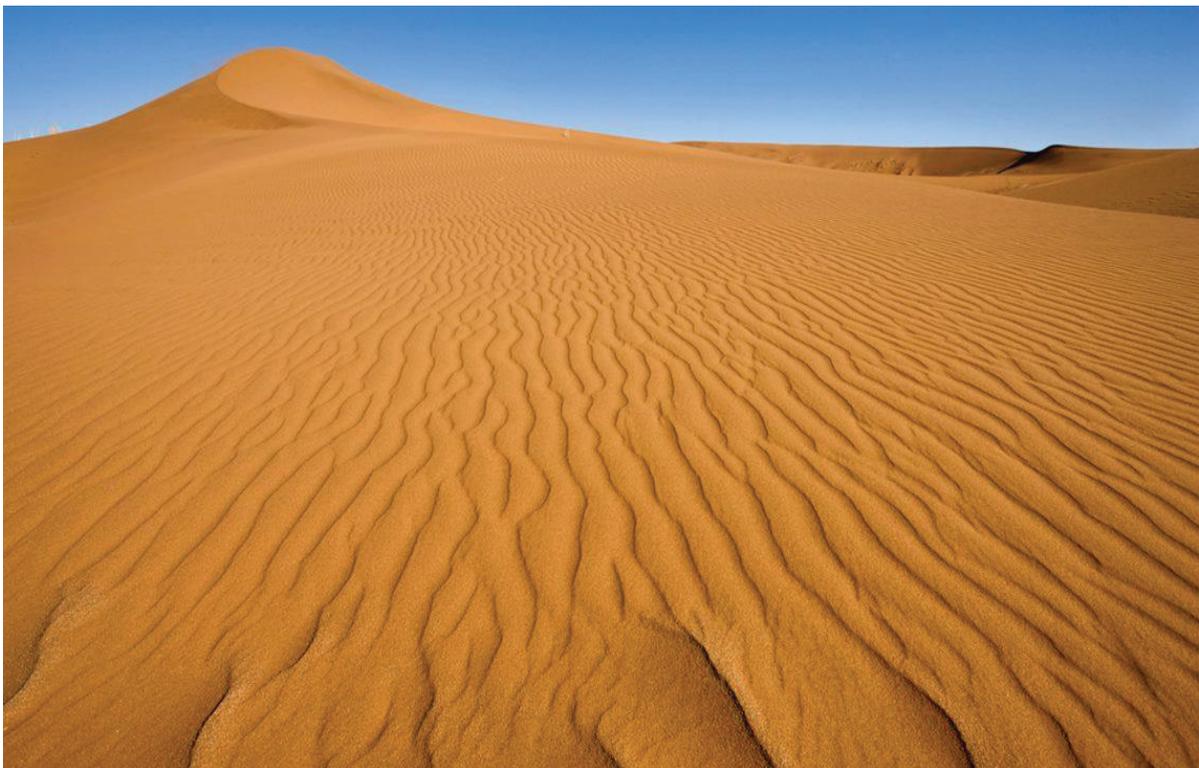
**FS** : Frottis sanguin ; **GE** : Goutte épaisse ; **TRD** : Test de diagnostic rapide ; Négatif : (-),

Positif : (+)

# RAPPORT DE MISSION EN MAURITANIE

Projet : Etude des marqueurs moléculaires de  
la résistance du Paludisme en Mauritanie

Du juillet à septembre 2015



Désert du Sahara en Mauritanie

Avec le soutien financier du contrat européen : EUROSTARS



# **SOMMAIRE**

## **Remerciements**

### **1. Introduction**

1.1. Contexte et objectif de la mission

### **2. Constat de l'état du paludisme dans le pays**

2.1. A Nouakchott (dans la capitale)

2.2. A Rosso Mauritanie

2.3. Automédication

### **3. Résultats de la mission**

### **4. Recommandation**

### **5. Conclusion**

## **Annexe**

## Remerciement

La mission a été soutenue grâce au financement européen (EUROSTARS). Sont vivement remerciés les personnels de l'administration de l'université Claude Bernard, de leur accord pour la réalisation de cette mission.

La mission exprime sa gratitude aux personnes qui ont aidé à son aboutissement.

- Au Professeur Stéphane Picot ([stephane.picot@univ-lyon1.fr](mailto:stephane.picot@univ-lyon1.fr)), pour son appui et ses conseils.
- Les personnels du laboratoire UMR5246, Adeline Lavoignat, Regine Ferreira et Guillaume Bonnot pour leurs aides sur les démarches administratives et les matériels de la mission.
- Dr Hachim Kebé ([hachimkebe@yahoo.fr](mailto:hachimkebe@yahoo.fr)), pour sa disponibilité et notamment pour avoir aidé la mission à obtenir des informations et des contacts à l'hôpital Cheikh Zayed (Nouakchott).
- Dr Mouhamed Sidi Diagana ([sidimohameddiagana@yahoo.fr](mailto:sidimohameddiagana@yahoo.fr)), le chef du laboratoire de l'hôpital Cheikh Zayed pour avoir accueilli la mission au sein de son laboratoire et ses précieux conseils.
- A M. Bilal Rabah Ahmed ([bilalrabahahmed@yahoo.fr](mailto:bilalrabahahmed@yahoo.fr)), le surveillant de l'hôpital Cheikh Zayed pour sa contribution et sa disponibilité.
- A Mouhamedou Koita ([mokoita@yahoo.fr](mailto:mokoita@yahoo.fr)), personnel à l'institut national de santé publique à Nouakchott pour sa contribution.
- Dr Moussa Camara (0022246409351), à l'hôpital de Rosso, pour sa disponibilité et avoir aidé la mission à obtenir des informations et des contacts à l'hôpital de Rosso.
- A M. Mamadou Dieye ([dieyealy@hotmail.com](mailto:dieyealy@hotmail.com)), chef du laboratoire du centre de santé de Rosso, de sa contribution et de sa disponibilité.
- Madame Malado Ba ([malado\\_ba@hotmail.com](mailto:malado_ba@hotmail.com)), technicienne du laboratoire de l'hôpital de Rosso, de son aide et de son accueil.

La mission remercie très sincèrement les directeurs des différents hôpitaux, de leur collaboration pour autoriser la mission à accéder à leurs locaux.

Enfin que tous ceux, ou celles qui ont contribué de loin ou de près au bon déroulement de la mission soient aussi sincèrement remerciés.

# 1. Introduction

## 1.1. Contexte et objectif de la mission



La Mauritanie est un pays du nord-ouest de l’Afrique, situé entre 15 et 27 degrés de latitude nord et 5 et 17 de longitude ouest. Elle est limitrophe de l’**Algérie**, du **Sahara occidental**, du **Mali** à l’est et du **Sénégal** au sud et la capitale du pays est Nouakchott. La superficie du pays est estimée à 1 030 700 km<sup>2</sup> et la population est environ 3 378 250 habitants et les deux tiers de la surface du pays sont occupés par le désert du Sahara. La Mauritanie est composée de plusieurs ethnies : les arabo-berbères (maures blancs, dits bidhans, les maures noirs, dits haratins) et de négro-Africains (Peuls, soninkés et wolofs).

Le paludisme est l’un des principaux problèmes de santé publique en Mauritanie. En effet des études réalisées dans différentes régions ont rapporté la présence de quatre espèces en Mauritanie : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium malariae*. Par ailleurs, La transmission est plus marquée durant la saison hivernale (juillet à septembre) dans certaines régions. Dans la capitale (Nouakchott), il a été rapporté que l’espèce dominante est *Plasmodium vivax*, suivi de *Plasmodium ovale* et *Plasmodium falciparum*. D’autre part, une ville située au sud du pays « **Rosso Mauritanie** » est connue par son transit commercial quotidien entre la population Mauritanienne et Sénégalaise. Et de son potentiel agricole, où *Plasmodium falciparum* est l’espèce la plus dominante avec quelques cas de *Plasmodium vivax* en saison sèche, dont la majorité des patients déclarent avoir effectué un séjour à Nouakchott avec une transmission pérenne. En 2006, le ministre de la santé recommande l’utilisation des ACT (Artemisinin combination therapy) pour le traitement du paludisme. Dont le traitement en première intention est Artesunate-Amodiaquine et Artemether-Lumefantrine ainsi que le traitement du paludisme non compliqué.

Actuellement, la résistance des parasites aux antipaludiques nouvellement découverte est devenue un sujet très préoccupant. De ce fait, des études sur la compréhension des acteurs impliqués dans ce mécanisme de résistance sont une grande nécessité.

L’objectif de cette mission consiste d’une part à collecter des échantillons de sang chez des patients impaludés, dans le but d’étudier les marqueurs moléculaires de la résistance du paludisme en Mauritanie. Et d’autre part de nouer des contacts avec les acteurs travaillant sur

cette thématique de recherche en Mauritanie, dans le but de réaliser des collaborations dans le futur.

## **2. Constat de l'état du paludisme à Nouakchott et à Rosso Mauritanie**

### **2.1. Nouakchott** (la capitale du pays)

Le stage de recherche a débuté au mois de juillet ; à cette période, les cas de paludisme étaient rares au sein de l'hôpital Cheikh Zayed. La saison hivernale n'avait pas encore débuté. Dans les laboratoires, les méthodes standard recommandées par OMS pour le diagnostic du paludisme, le « frottis sanguin » (FS) et la « goutte épaisse » (GE) ne sont plus effectuées. Ces derniers ont été remplacés par les TDR (Test diagnostic rapide). Et cela malgré la disponibilité des microscopes fonctionnels dans leurs locaux. Ainsi chez certains patients suspects de paludisme, dont les médecins demandent dans le dossier médical, le diagnostic de ce dernier, par la GE, uniquement les résultats de TDR sont rendus. Sachant qu'ils n'utilisent que des TDR qui sont spécifiques de l'espèce *Plasmodium falciparum*, les autres espèces ne sont pas identifiées. Si le résultat du diagnostic est positif pour une autre espèce que *Plasmodium falciparum*, le patient est soigné, sans connaissance de l'espèce en cause.

### **2.2. Rosso Mauritanie** (au sud de la Mauritanie)

Le laboratoire de l'hôpital de Rosso et celui du centre de santé, sont également équipés des microscopes fonctionnels. Malgré cela, le diagnostic du paludisme se fait uniquement par des TDR spécifiques de l'espèce de *Plasmodium falciparum*. Nous avons reçu beaucoup de patients qui viennent avec des signes suspects de paludisme (maux de tête, fièvre, vomissement et souvent des diarrhées, mais le diagnostic ne révèle que des résultats négatifs. J'ai été vraiment surprise, par la présence de beaucoup de moustiques : « Je me suis dit peut-être, la proportion des anophèles est très faible ». Malgré l'afflux des patients qui demandent le diagnostic du paludisme, durant une période de trois semaines, les cas positifs étaient très rares.

### **2.3. Automédication aux antipaludiques**

Certaines personnes déclarent que lorsqu'elles tombent malades elles pensent avoir les signes du paludisme (Maux de tête, fièvre et vomissement) : elles prennent la nivaquine ou le fansidar sans consultation médicale. Ainsi, elles disaient qu'elles guérissaient de leurs fièvres sans confirmation du paludisme. Cette déclaration a été entendue dans les deux villes.

### 3. Résultats

Tableau 1 : Nombre d'échantillons de paludisme collectés dans les deux villes

	<b>Nouakchott</b>			<b>Rosso Mauritanie</b>	
<b>Hôpitaux</b>	Hôpital Cheikh Zayed	Centre de santé de Teyarett	Hôpital-Mère-Enfant	Hôpital de Rosso	Centre de santé de Rosso
Nombre de cas positifs	<b>30</b>	<b>23</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Nombre de cas négatifs	45	14	26	86	39
<b>Total</b>	75	37	37	88	42
Total des cas collectés dans les deux villes					<b>279</b>

## **4. Recommandations**

Pour la période de la mission, nous nous sommes projetée pour la saison hivernale (de juillet jusqu'à septembre). Mais, l'été dernier la saison a pratiquement débuté en mois d'août, donc, la période d'août jusqu'à octobre serait mieux.

Pour le diagnostic du paludisme, il serait bien que les laboratoires pratiquent les méthodes standard, surtout le frottis sanguin pour l'identification de l'espèce en cause, afin de bien traiter les patients, et de cette manière, on diminuerait les problèmes de résistance médicamenteuse.

L'urgence vitale des patients suspects du paludisme n'est pas bien prise au sérieux, comparée aux pays industrialisés. Des bonnes pratiques et des bons diagnostics doivent être faits pour limiter la mortalité due au paludisme dans ce pays.

La sensibilisation sur l'automédication est également nécessaire. Pour limiter les échecs thérapeutiques dus à la résistance.

## **5. Conclusion**

Cette mission est soutenue par le financement européen Eurostars. L'objectif principal était de collecter des échantillons de sang chez des patients impaludés dans différents hôpitaux à Nouakchott (capitale du pays) et à Rosso (une ville au sud du pays), afin d'étudier les marqueurs moléculaires de la résistance du paludisme en Mauritanie. D'autre part, rencontrer les acteurs qui travaillent sur ces thématiques de recherches, dans le but de réaliser des projets collaboratifs entre deux pays sur la thématique de la « chimiorésistance du paludisme ».

Durant cette période de stage, la mission a eu l'occasion de rencontrer et d'échanger avec des personnes travaillant sur cette thématique, ainsi que des responsables de différents hôpitaux. En effet, des discussions constructives dans le but de collaborer ont été abordées, et nous espérons que cela puisse aboutir dans les meilleurs délais.

Cette mission s'est déroulée en période d'hivernage (juillet-août-septembre 2015). Au cours de ce stage, nous avons recueilli au total 279 échantillons, et 64 cas positifs au paludisme ont

été obtenus à Nouakchott (la capitale) et seulement 5 cas de paludisme positifs ont été obtenus à Rosso.

Malgré la présence massive de moustiques à Rosso, le nombre de cas de paludisme positif reste très faible, contrairement à ce qu'on croyait. Cependant la capitale du pays, (Nouakchott) est devenue une zone endémique, et les recherches sur cette thématique deviennent de plus en plus intéressantes du fait de la coexistence de différentes espèces de parasites. De plus, les acteurs de la recherche définissent également la Mauritanie comme étant un terrain vierge sur la recherche du paludisme.

Enfin, la mission de recherche s'est bien passée. Les objectifs de la mission ont été atteints, malgré le peu d'échantillons positifs obtenus par rapport à ce qui était prévu.

Nous espérons que cette mission réalisée en Mauritanie, et les différents acteurs rencontrés, mèneront à des collaborations fructueuses.

## **Annexes**

### **Agenda de la mission**

#### **Samedi 27 juin 2015**

Départ de Lyon Saint Exupery \_Arrivée à l'aéroport Casablanca MOHAMMED V.

Départ de l'aéroport Casablanca MOHAMMED V \_Arrivée à Nouakchott.

#### **Dimanche 28 juin 2015**

Prise de contact avec le docteur Hachim Kebe, pour rencontrer le directeur de l'hôpital Cheikh Zayed.

#### **Lundi 29 juin 2015**

Accompagné du docteur Hachim Kebé, nous sommes allés voir le directeur de l'hôpital Cheikh Zayed pour lui présenter le protocole de recherche, et lui demander l'accès aux patients impaludés. Le directeur a répondu favorablement à cette demande.

#### **Mardi 30 juin 2015**

Voyage à Rosso Mauritanie, à une distance de 204 km de la capitale (Nouakchott), pour voir ma famille, en attente de recevoir les matériels de mission pour commencer le stage.

#### **Jeudi 02 juillet 2015**

Prise de contact avec le docteur Moussa Camara, qui travaille à l'hôpital de Rosso, pour voir le directeur.

#### **Lundi 06 juillet 2015**

Je suis allée à l'hôpital de Rosso Mauritanie, avec le docteur Moussa Camara, pour présenter au directeur le protocole de recherche, et demander l'accès aux patients impaludés.

Le directeur a répondu favorablement à la demande. Après cette rencontre, le docteur Moussa Camara m'a conseillé d'aller voir le centre de santé de Rosso, près du centre-ville. Il m'a donné le contact du chef du laboratoire Mamadou Dièye, et le chef du service de ce centre a donné l'autorisation à la mission d'accéder à leurs locaux.

#### **Mercredi 08 juillet 2015**

Réception du colis du matériel de la mission.

### **Jeudi 09 juillet 2015**

Retour à Nouakchott.

### **Vendredi 10 juillet 2015**

D'abord, je suis allée à l'Institut de Santé Publique voir Mr Mohamedou Koita ; j'étais déjà en contact avec lui avant que je vienne en mission. Je lui avais demandé un produit chimique pour le stage, le « méthanol » ; il m'a remis le produit. Et j'ai commencé le stage à l'hôpital Cheikh Zayed.

### **Jeudi 16 juillet 2015**

Retour à Rosso Mauritanie pour fêter la fin du mois de Ramadan en famille, qui a eu lieu le Vendredi 17 juillet.

### **Lundi 20 juillet 2015**

Commencement du stage à l'hôpital de Rosso et au centre de santé de Rosso. Et j'y suis restée pendant une période de 3 semaines.

### **Dimanche 09 Août 2015**

Retour à Nouakchott pour poursuivre le stage à l'hôpital Cheikh Zayed.

### **Jeudi 14 Août 2015**

Je suis allée à l'hôpital Mère-Enfant, pour voir le directeur : ce dernier était en voyage. L'adjoint du directeur m'a reçu et je lui ai présenté le protocole de recherche et j'ai demandé l'accès aux patients impaludés. L'adjoint du directeur a répondu favorable à la demande et j'ai inclus l'hôpital dans l'étude. Un personnel de cet hôpital m'a conseillé d'aller au centre de santé du Teyarett, situé au nord du pays.

### **Lundi 24 Août 2015**

Je suis allée au Centre de Santé de Teyarett, je n'ai pas pu voir le directeur mais la chef du service m'a reçue et je lui ai parlé de la mission de recherche en lui présentant le protocole, et en lui demandant l'accès aux patients impaludés. Elle a répondu favorablement à la demande. Et j'ai également inclus ce centre dans l'étude.

### **Mardi 25 Août 2015**

Je suis allée au siège de l’OMS, voir le représentant, Dr Baptiste Jean Pierre ([baptistej@mr.afro.who.int](mailto:baptistej@mr.afro.who.int)). Il m’a reçu et je lui ai parlé de la mission. Il m’a orientée vers Mr Niang Saidou Doro ([niangs@who.it](mailto:niangs@who.it)). J’ai pris contact avec ce dernier et je suis allée le voir, en lui parlant de ma mission et je lui ai demandé des pistes sur les organismes qui travaillent sur ces thématiques en Mauritanie. Il m’a orienté vers l’adjoint de l’Institut de National de Santé Publique à Nouakchott, Mr Hampaté Ba ([hampateba2001@yahoo.fr](mailto:hampateba2001@yahoo.fr)).

### **Jeudi 27 Août 2015**

J’ai rencontré le directeur de la recherche scientifique Mr Ali Boukari ([alimedsalem@gmail.com](mailto:alimedsalem@gmail.com)). Il possède une équipe de recherche qui travaille sur le paludisme à Nouakchott. Je lui ai parlé de la mission et de la possibilité d’une éventuelle collaboration de son unité avec celle de l’UMR 5246.

### **Jeudi 3 septembre 2015**

Je suis allée à l’Institut National de Santé Publique voir le directeur ; ce dernier était en déplacement. J’ai vu l’adjoint du directeur Hampaté Ba ([hampateba2001@yahoo.fr](mailto:hampateba2001@yahoo.fr)), je lui ai parlé de la mission et il m’a informée qu’ils ont collecté des échantillons de sang impaludé dans différentes régions du pays. Ils souhaitent collaborer pour l’étude de certains marqueurs moléculaires de résistance. Mais comme le directeur était absent, il faut son accord. Donc, je suis en attente de la réponse au retour de leur directeur.

### **Vendredi 18 septembre 2015**

Fin du stage de la mission dans les 3 centres hospitaliers à Nouakchott.

### **Lundi 21 septembre 2015**

Je suis retournée à Rosso, pour dire au revoir aux personnels de l’hôpital de Rosso et ceux du centre de santé et ainsi qu’à ma famille.

### **Samedi 26 septembre 2015**

Je suis revenue à Nouakchott pour retourner à Lyon le lendemain.

### **Dimanche 27 septembre**

Aéroport de Nouakchott\_Aéroport Casablanca de MOHAMMED V

Aéroport Casablanca de MOHAMMED V\_Lyon Saint Exupery

# Genetic diversity of *Plasmodium vivax* metacaspase 1 and *Pvmdr1* gene of field isolates from Mauritania, Sudan and Oman.

Fatimata Sow<sup>1</sup>, Guillaume Bonnot<sup>1</sup>, Bilal Rabah Ahmed<sup>2</sup>, Sidi Ahmed Diagana<sup>2</sup>, Hachim Kebe<sup>2</sup>, Mohamedou Koita<sup>3</sup>, Ba Malalo Samba<sup>4</sup>, Saif Salem Al-Abr<sup>5</sup>, Abdallah Samy<sup>6</sup>, Muzamil Mahdi Abdel Hamid<sup>7</sup>, Musab M. Albsheer<sup>8</sup>, Bruno Simon<sup>1</sup>, Anne-Lise Bienvenu<sup>1,10</sup>, Eskild Petersen<sup>9</sup>, Stéphane Ploot<sup>1,10</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lyon, University Claude Bernard Lyon, Institut de Chimie de Biologie Médicale et Supramoléculaire, ICBS-UMR5246, CNRS-INSA-CRE, Malara Research Unit, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69632 Lyon, France. <sup>2</sup> Laboratoire de Bactériologie et Parasitologie de l'Hôpital Cheikh Zayed, BP- 5730, Nouakchott, Mauritanie. <sup>3</sup> Service des maladies infectieuses et Tropicales, BP- 612 Centre Hospitalier National de Nouakchott, Mauritanie. <sup>4</sup> Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Institut National de Recherches en Santé Publique (INRSP), Avenue Jemal Azdeh, BP- 695, Nouakchott, Mauritanie. <sup>5</sup> Laboratoire d'analyse de Biologie Médicale du Centre hospitalier de Rosso Mauritanie, BP-41, Rosso, Mauritanie. <sup>6</sup> Department of Infectious Diseases, The Royal Hospital, Muscat, Sultanate of Oman and Institute for Clinical Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Ahrhus, Denmark. <sup>7</sup> Entomology Department, Faculty of Science, Ain Shams University, Abo-Heli, Cairo 11566, Egypt. <sup>8</sup> Biodiversity Institute, University of Kansas, Lawrence, KS 66045, United States of America. <sup>9</sup> Dept of Parasitology and Medical Entomology, Institute of Entomology, Medical Campus, Dussel Street, University of Kharطوم, P.O. BOX 102, Khartoum Sudan. <sup>10</sup> Institut de Parasitologie et Médical Mycologie, Hôpital de la Croix-Rouge, Hôpitals Civils de Lyon, Lyon, France.

## Abstract

*Plasmodium vivax* (*P. vivax*) is the second most important human malaria parasite, widely spread across the world. The emergence of *P. vivax* strains resistant to drug treatment (chloroquine) is a threat to public health. The discovery of metacaspases in protozoans parasites, including *Plasmodium*, involved in cell death is a new promising therapeutic target against malaria.

## Introduction

Metacaspases are cysteine proteases, which belong to C14 B family and clan CD, structurally diverse from caspases and involved in programmed cell death. In the catalytic domain of metacaspase 1's *Plasmodium vivax* (PvMCA1-cd) is found the conserved histidine (H372) and cysteine (C428) residues, required for the proteolytic activity. *Plasmodium vivax* multi-drug resistant (*pvm-dr1*) is suspected to be a marker of resistance while definitive evidence is lacking. The main of this study was to explore whether there is a link between the conserved histidine and cysteine in PvMCA1-cd in comparison with the polymorphic gene *pvm-dr1* and drug resistance.

## Materials & Methods

Thirty *P. vivax* isolates were collected from three geographically distant countries, Mauritania (West Africa), Sudan (Northeastern Africa) and Oman (Southwest Asia). PvMCA1-cd and *Pvmdr1* were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). After sequencing, analysis were done by DNASTAR-Lasergene software. Genetic diversity of *P. vivax* population was determined by using the genetic markers CSP (circumsporozoite protein). Analysis sequences were done by the software Molecular Evolutionary Genetic analysis, version 7 (MEGA7).



## Results

Table 1 Single Nucleotide Polymorphisms identified in the *pvm-dr1* gene

Accession number	ISSET	YF09/Y01	NETAL/NETE/NETC
AF010182002	M	V	F
AF010182003	M	V	F
AF010182004	M	V	L
AF010182005	M	V	L
AF010182006	M	V	L
AF010182007	M	V	L
AF010182008	M	V	L
AF010182009	M	V	L
AF010182010	M	V	L
AF010182011	M	V	L
AF010182012	M	V	L
AF010182013	M	V	L
AF010182014	M	V	L
AF010182015	M	V	L
AF010182016	M	V	L
AF010182017	M	V	L
AF010182018	M	V	L
AF010182019	M	V	L
AF010182020	M	V	L
AF010182021	M	V	L
AF010182022	M	V	L
AF010182023	M	V	L
AF010182024	M	V	L
AF010182025	M	V	L
AF010182026	M	V	L
AF010182027	M	V	L
AF010182028	M	V	L
AF010182029	M	V	L
AF010182030	M	V	L
AF010182031	M	V	L
AF010182032	M	V	L
AF010182033	M	V	L
AF010182034	M	V	L
AF010182035	M	V	L
AF010182036	M	V	L
AF010182037	M	V	L
AF010182038	M	V	L
AF010182039	M	V	L
AF010182040	M	V	L
AF010182041	M	V	L
AF010182042	M	V	L
AF010182043	M	V	L
AF010182044	M	V	L
AF010182045	M	V	L
AF010182046	M	V	L
AF010182047	M	V	L
AF010182048	M	V	L
AF010182049	M	V	L
AF010182050	M	V	L
AF010182051	M	V	L
AF010182052	M	V	L
AF010182053	M	V	L
AF010182054	M	V	L
AF010182055	M	V	L
AF010182056	M	V	L
AF010182057	M	V	L
AF010182058	M	V	L
AF010182059	M	V	L
AF010182060	M	V	L
AF010182061	M	V	L
AF010182062	M	V	L
AF010182063	M	V	L
AF010182064	M	V	L
AF010182065	M	V	L
AF010182066	M	V	L
AF010182067	M	V	L
AF010182068	M	V	L
AF010182069	M	V	L
AF010182070	M	V	L
AF010182071	M	V	L
AF010182072	M	V	L
AF010182073	M	V	L
AF010182074	M	V	L
AF010182075	M	V	L
AF010182076	M	V	L
AF010182077	M	V	L
AF010182078	M	V	L
AF010182079	M	V	L
AF010182080	M	V	L
AF010182081	M	V	L
AF010182082	M	V	L
AF010182083	M	V	L
AF010182084	M	V	L
AF010182085	M	V	L
AF010182086	M	V	L
AF010182087	M	V	L
AF010182088	M	V	L
AF010182089	M	V	L
AF010182090	M	V	L
AF010182091	M	V	L
AF010182092	M	V	L
AF010182093	M	V	L
AF010182094	M	V	L
AF010182095	M	V	L
AF010182096	M	V	L
AF010182097	M	V	L
AF010182098	M	V	L
AF010182099	M	V	L
AF010182100	M	V	L

Note: Residues that differ from the wild-type *P. vivax* 36-1 strain are indicated in bold type. GenBank accession no. AF01018202 (wild-type strain) MAUKT, Mauritania; ID, Idrofodan; Non-synonymous substitutions: Y (Tyrosine), F (Phenylalanine), V (Valine), L (Leucine), I (Isoleucine), T (Threonine).

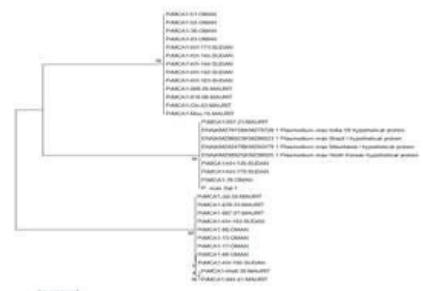
Table 2 Single Nucleotide Polymorphisms found in PvMCA1-cd gene in comparison with *pvm-dr1* gene

Accession number	ISSET	YF09/Y01	NETAL/NETE/NETC	ISSET	YF09/Y01	NETAL/NETE/NETC
AF010182022	M	V	L	H	C	H C
AF010182023	M	V	L	H	C	H C
AF010182024	M	V	L	H	C	H C
AF010182025	M	V	L	H	C	H C
AF010182026	M	V	L	H	C	H C
AF010182027	M	V	L	H	C	H C
AF010182028	M	V	L	H	C	H C
AF010182029	M	V	L	H	C	H C
AF010182030	M	V	L	H	C	H C
AF010182031	M	V	L	H	C	H C
AF010182032	M	V	L	H	C	H C
AF010182033	M	V	L	H	C	H C
AF010182034	M	V	L	H	C	H C
AF010182035	M	V	L	H	C	H C
AF010182036	M	V	L	H	C	H C
AF010182037	M	V	L	H	C	H C
AF010182038	M	V	L	H	C	H C
AF010182039	M	V	L	H	C	H C
AF010182040	M	V	L	H	C	H C
AF010182041	M	V	L	H	C	H C
AF010182042	M	V	L	H	C	H C
AF010182043	M	V	L	H	C	H C
AF010182044	M	V	L	H	C	H C
AF010182045	M	V	L	H	C	H C
AF010182046	M	V	L	H	C	H C
AF010182047	M	V	L	H	C	H C
AF010182048	M	V	L	H	C	H C
AF010182049	M	V	L	H	C	H C
AF010182050	M	V	L	H	C	H C
AF010182051	M	V	L	H	C	H C
AF010182052	M	V	L	H	C	H C
AF010182053	M	V	L	H	C	H C
AF010182054	M	V	L	H	C	H C
AF010182055	M	V	L	H	C	H C
AF010182056	M	V	L	H	C	H C
AF010182057	M	V	L	H	C	H C
AF010182058	M	V	L	H	C	H C
AF010182059	M	V	L	H	C	H C
AF010182060	M	V	L	H	C	H C
AF010182061	M	V	L	H	C	H C
AF010182062	M	V	L	H	C	H C
AF010182063	M	V	L	H	C	H C
AF010182064	M	V	L	H	C	H C
AF010182065	M	V	L	H	C	H C
AF010182066	M	V	L	H	C	H C
AF010182067	M	V	L	H	C	H C
AF010182068	M	V	L	H	C	H C
AF010182069	M	V	L	H	C	H C
AF010182070	M	V	L	H	C	H C
AF010182071	M	V	L	H	C	H C
AF010182072	M	V	L	H	C	H C
AF010182073	M	V	L	H	C	H C
AF010182074	M	V	L	H	C	H C
AF010182075	M	V	L	H	C	H C
AF010182076	M	V	L	H	C	H C
AF010182077	M	V	L	H	C	H C
AF010182078	M	V	L	H	C	H C
AF010182079	M	V	L	H	C	H C
AF010182080	M	V	L	H	C	H C
AF010182081	M	V	L	H	C	H C
AF010182082	M	V	L	H	C	H C
AF010182083	M	V	L	H	C	H C
AF010182084	M	V	L	H	C	H C
AF010182085	M	V	L	H	C	H C
AF010182086	M	V	L	H	C	H C
AF010182087	M	V	L	H	C	H C
AF010182088	M	V	L	H	C	H C
AF010182089	M	V	L	H	C	H C
AF010182090	M	V	L	H	C	H C
AF010182091	M	V	L	H	C	H C
AF010182092	M	V	L	H	C	H C
AF010182093	M	V	L	H	C	H C
AF010182094	M	V	L	H	C	H C
AF010182095	M	V	L	H	C	H C
AF010182096	M	V	L	H	C	H C
AF010182097	M	V	L	H	C	H C
AF010182098	M	V	L	H	C	H C
AF010182099	M	V	L	H	C	H C
AF010182100	M	V	L	H	C	H C

Note: Residues that differ from wild-type *P. vivax* 36-1 strain are indicated in bold type. PVX\_14725: Plasmodium falciparum (wild-type strain 36-1). MAUKT, Mauritania; ID, Idrofodan; NS, non-synonymous; Substitutions: K (Lysine), M (Methionine), R (Arginine), T (Threonine), D (Acidic amino acid).

PF13-0289 300CTVSPDQVQVALLDINVTYVLELDQVTEVAVVLLDLYKVFQSSNIVVW 385  
 PVX\_14725 50PLVHSDVDRKALVDVWYDQVDSQVDTLPTLPTVWVWLLDQVHPSQDPTVWV 403  
 PF13-0290 0162AVPVVPTVAVLSALVWVWVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 425  
 PVX\_14725 0162AVPVVPTVAVLSALVWVWVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 463  
 PF13-0291 30PFTDQV 485  
 PVX\_14725 0162AVPVVPTVAVLSALVWVWVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 523

The conserved histidine (His) - cysteine (Cys) residues in metacaspase 1 of *Plasmodium falciparum* (PF13-0289) and PvMCA1-od (PVX\_14725). In PF13-0289, His - Cys are at position 404 and 480. In PvMCA1-od, His - Cys are at position 372 and 428. A new putative His - Cys dyad was identified at positions 282 and 306.



Phylogenetic tree analysis showed that divergence has occurred between *P. vivax* reference strains and *P. vivax* isolates from these three geographically distant countries.

## Conclusion

Histidine and Cysteine residues in PvMCA1-od are highly polymorphics and that a linkage disequilibrium with polymorphisms of *Pvmdr1* gene can be suspected from these three countries with different pattern of *vivax* malaria transmission. A second potential putative His (282)-Cys(306) has been identified in PvMCA1-od. Further investigations are obviously needed to explore the real effect of mutations in the histidine and cysteine catalytic dyad of the PvMCA1 protein on *P. vivax* drug resistance. All the isolates showed the VK210 pure genotype, demonstrating a temperate phenotype.

## Acknowledgements

We are grateful to the University Claude Bernard Lyon1(UCBL) for giving us the permission to travel to Mauritania. Thanks to the staff of the Hôpital de Cheikh Zayed, Centre de santé de Teyarett, Centre Hospitalier Mère-Enfant and Centre hospitalier de Rosso Mauritanie, for their aid in recruiting patients and the patients for their kind agreement for participating in this study. Thanks also go to the Sudanese American Medical association which provided travel support for AMS to travel to Sudan.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>

## Le mycétome

Une femme mauritanienne, âgée de 40 ans, se présente en consultation car, depuis 5 ans, elle a des douleurs du pied droit, parfois associées à des écoulements liquidiens au niveau de volumineux bourgeonnements cutanés. À l'examen clinique du pied, de multiples nodules sous-cutanés inflammatoires bourgeonnants produisant des grains de couleur brunâtre sont observés (figure 1). À l'interrogatoire, la patiente se rappelle avoir reçu un traitement antibiotique en 2011 pendant 1 mois qui n'avait eu aucune efficacité.



Figure 1. Mycétome.

### Questions

1. Quelle maladie devez-vous évoquer devant cette atteinte ?
2. Existe-t-il des diagnostics différentiels ?
3. Quel élément épidémiologique doit obligatoirement être recherché à l'interrogatoire ?
4. Quel est le mode de contamination ?
5. Comment faire le diagnostic de certitude ?
6. Quels sont les principaux agents fongiques responsables de cette pathologie ?
7. Existe-t-il des médicaments efficaces pour traiter un mycétome ?
8. Quelle est l'évolution défavorable de cette pathologie ?

### Réponses

1. Un mycétome doit être évoqué devant une infection granulomateuse polyfistulisée du tissu sous-cutané du pied, associée à la production de grains et faisant suite à un séjour en pays tropical. Le mycétome est défini comme « *tout processus pathologique au cours duquel des agents fongiques ou d'origine exogène produisent des grains* » [1]. Les mycétomes sont le plus souvent dus à des bactéries actinomycètes (actinomycétome). Moins souvent, ils peuvent être dus à des champignons (eumycétome ou mycétome fongique).
2. Il existe peu de diagnostics différentiels du mycétome, notamment lorsque sa présentation clinique est typique. Cependant, même dans ce cas, un prélèvement doit être réalisé pour différencier l'actinomycétome et le mycétome fongique. Les traitements et les pronostics sont différents pour ces deux types de mycétome. Le principal diagnostic différentiel est le sarcome de Kaposi. Les autres diagnostics différentiels sont d'autres mycoses sous-cutanées (chromoblastomycose ou phaeohyphomycose), une ostéite chronique fistulisée ou des pathologies tumorales (sarcome des parties molles ou mélanome).
3. La notion de séjour en pays d'endémie doit être retrouvée. Les actinomycétomes sont plutôt retrouvés suite à des voyages au Mexique ou en Inde, et les eumycétomes suite à des séjours en Afrique (Mauritanie, Soudan, Sénégal, Niger, Somalie, Tchad, Cameroun).
4. La contamination se fait par inoculation d'une bactérie ou d'un champignon au niveau du pied suite à un traumatisme par un végétal dans un pays chaud et sec. Le principal facteur de risque du mycétome est la marche pieds nus ou le port de chaussures ouvertes. En zone d'endémie, ce sont donc les hommes cultivateurs ou éleveurs qui sont les plus touchés par le mycétome du pied. Souvent, la notion de traumatisme n'est pas retrouvée car il existe une longue période d'incubation entre la contamination et l'apparition de signes cliniques (plusieurs mois à plusieurs années).
5. Le mycétome est affirmé par la présence de

Fatimata SOW<sup>a</sup>  
Biologiste

Sid'ahmed Mohamed LIMAM<sup>b</sup>

Médecin orthopédiste

Stéphane PICOT<sup>c</sup>  
Chef de service

Anne-Lise BIENVENU<sup>d,e</sup>  
Praticien hospitalier

<sup>a</sup>ICBMS, CNRS 5246, Université Claude-Bernard Lyon 1, France

<sup>b</sup>Service de traumatologie-orthopédie, hôpital Cheikh Zayed, Nouakchott, Mauritanie

<sup>c</sup>Service Paludisme et mycologie médicale, Institut de parasitologie et mycologie médicale (IP2M), hospices civils de Lyon, 103, Grande-Rue de la Croix-Rouge, 69317 Lyon cedex 04, France

\*Auteur correspondant.  
Adresse e-mail :  
anne-lise.bienvenu@  
recherche.univ-lyon1.fr  
(A.-L. Bienvenu).

## Référence

[1] Symposium du mycotome, Venezuela, 1978.

## Pour en savoir plus

• Chowdhary A, Meis JF, Guarro J, de Hoog GS, Kathuria S, Arandrup MC et al. ESCMID/ECMM Joint Clinical Guidelines for the Diagnosis and Management of Systemic Phaeoophomycosis: Diseases Caused by Black Fungi. *Clin Microbiol Infect*. 2014;Jan 31.

• Ahmed ACA, van Loon W, Fabela A, van de Sande W, Vorbrugg H, van Balkum A. Mycotoma caused by *Madurella mycetomatis*: a neglected infectious burden. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004;4:566-74.

• Al-Tawfiq JA, Amr SS. Madura log due to *Exophiala jeanselmei* successfully treated with surgery and itraconazole therapy. *Mod Mycol*. 2009;47:548-52.

• Capoor MR, Khanna G, Nair D, Hasan A, Rajni Y, Deb M, et al. Eumycetoma pedis due to *Exophiala jeanselmei*. *Indian J Med Microbiol*. 2007;25:155-7.

• Castro LG, Piquero-Casals J. Clinical and mycologic findings and therapeutic outcome of 27 mycotoma patients from Sao Paulo, Brazil. *Int J Dermatol*. 2008;47:160-3.

• Mattioni S, Davoloux M, Brun S, Martin A, Jaunaguy F, Naggara N, Bouchaud O. Management of mycotomas in France. *Mod Med Infect*. 2013;43(7):286-94.

• Davoloux M, Diang MT, Kano A, Ndiaye B. Management of mycotoma in West-Africa. *Bull Soc Pathol Exot*. 2003;96(5):376-82.

Déclaration d'intérêts  
Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

grains visibles à l'œil nu. Le prélèvement de grains est facile lorsque leur émission est spontanée. Dans le cas contraire, il faut utiliser une sonde cannelée ou une aiguille fine pour les prélever. L'examen direct des grains à l'état frais est indispensable pour le diagnostic car la culture est longue ou souvent stérile. Cela permet de distinguer les grains actinomycosiques des grains fongiques. L'examen anatomopathologique des grains doit également être réalisé car il permet, dans certains cas, de faire le diagnostic de l'espèce. En fonction du résultat de l'examen direct (actinomycétome ou eumycétome), la culture est réalisée. Sur les cultures positives, l'identification des bactéries est réalisée par des tests biochimiques et celle des champignons par un examen microscopique. Enfin, l'échographie est très contributive pour le diagnostic de mycotome. Elle est caractérisée par des cavités uniques ou multiples à parois épaisses et les grains produisent des échos hyper-réfléctifs.

6. *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea*, *Leptosphaeria senegalensis*, *Scedosporium boydii*, *Pyrenochaeta romeroi*, *Fusarium spp.*, *Exophiala jeanselmei* sont les principaux champignons responsables des eumycétomes.
7. Les traitements antifongiques sont peu efficaces

sur les eumycétomes, tandis que les antibiotiques ont une place de choix dans le traitement des actinomycétomes. Les antifongiques azolés (itraconazole, voriconazole, posaconazole) sont les plus utilisés pour le traitement des eumycétomes. L'association d'un azolé avec la terbinafine ou la flucytosine est possible. Malgré son efficacité insuffisante, le traitement antifongique doit précéder la prise en charge chirurgicale, car il permettrait de limiter les risques de récurrence, sans que cela soit clairement démontré.

8. L'évolution vers une atteinte osseuse générant des douleurs et des fractures spontanées est l'issue quasiment inéluctable du mycotome. Cette complication fréquente s'explique par l'évolution lente et indolore de l'affection dans des régions rurales désertées, le patient ne se présentant en consultation qu'au moment de la survenue des douleurs. L'atteinte osseuse doit être systématiquement recherchée à l'imagerie (échographie, scanner), car il n'existe pas de parallélisme entre atteinte osseuse et aspect clinique. Elle est de mauvais pronostic et complique la prise en charge thérapeutique. Elle peut conduire à une amputation lorsque l'ostéolyse est très avancée car une exérèse complète de la lésion est nécessaire pour un traitement efficace. ▶

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci.* févr 1999;24(2):47-53.
2. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell.* oct 2000;6(4):961-7.
3. Le Chat L, Sinden RE, Dessens JT. The role of metacaspase 1 in *Plasmodium berghei* development and apoptosis. *Mol Biochem Parasitol.* mai 2007;153(1):41-7.
4. Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, De Monbrison F, Kaiser K, et al. Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis.* 15 juin 2007;195(12):1852-9.
5. Mottram JC, Helms MJ, Coombs GH, Sajid M, Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends Parasitol.* avr 2003;19(4):182-7.
6. Cibulskis RE, Alonso P, Aponte J, Aregawi M, Barrette A, Bergeron L, et al. Malaria: Global progress 2000 – 2015 and future challenges. *Infect Dis Poverty.* 9 juin 2016 [cité 14 juin 2016];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4901420/>
7. Klein SL, Shann F, Moss WJ, Benn CS, Aaby P. RTS,S malaria vaccine and increased mortality in girls. *MBio.* 2016;7(2):e00514-00516.
8. Sauboin CJ, Van Bellinghen L-A, Van De Velde N, Van Vlaenderen I. Potential public health impact of RTS,S malaria candidate vaccine in sub-Saharan Africa: a modelling study. *Malar J.* 23 déc 2015 [cité 7 mars 2016];14. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4690265/>
9. Spanakos G, Alifrangis M, Schousboe ML, Patsoula E, Tegos N, Hansson HH, et al. Genotyping *Plasmodium vivax* isolates from the 2011 outbreak in Greece. *Malar J.* 2013;12:463.
10. Benelli G, Mehlhorn H. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitol Res.* 2 mars 2016;
11. O'Loughlin SM, Magesa SM, Mbogo C, Mosha F, Midega J, Burt A. Genomic signatures of population decline in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Malar J.* 2016;15(1):182.
12. Bennett JW, Yadava A, Tosh D, Sattabongkot J, Komisar J, Ware LA, et al. Phase 1/2a trial of *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidate VMP001/AS01B in malaria-naive adults: safety, immunogenicity, and efficacy. *PLoS Negl Trop Dis.* févr 2016;10(2):e0004423.
13. Vestergaard LS, Ringwald P. Responding to the challenge of antimalarial drug resistance by routine monitoring to update national malaria treatment policies. *Am J Trop Med Hyg.* déc 2007;77(6 Suppl):153-9.
14. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 31 juill 2014;371(5):411-23.
15. Klonis N, Crespo-Ortiz MP, Bottova I, Abu-Bakar N, Kenny S, Rosenthal PJ, et al. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 juill 2011;108(28):11405-10.
16. Takala-Harrison S, Clark TG, Jacob CG, Cummings MP, Miotto O, Dondorp AM, et al. Genetic loci associated with delayed clearance of *Plasmodium falciparum*

- following artemisinin treatment in Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 janv 2013;110(1):240-5.
17. Picot S, Loiseau PM, Bienvenu A-L. New anti-malarial drugs: who cares? *Curr Top Med Chem*. 2014;14(14):1637-42.
  18. Gayathri P, Balaram H, Murthy MRN. Structural biology of plasmodial proteins. *Curr Opin Struct Biol*. déc 2007;17(6):744-54.
  19. Jeremiah S, Janagond AB, Parija SC. Challenges in diagnosis of *Plasmodium knowlesi* infections. *Trop Parasitol*. janv 2014;4(1):25-30.
  20. Krungkrai SR, Krungkrai J. Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Asian Pac J Trop Med*. juin 2016;9(6):525-34.
  21. van Schalkwyk DA, Burrow R, Henriques G, Gadalla NB, Beshir KB, Hasford C, et al. Culture-adapted *Plasmodium falciparum* isolates from UK travellers: in vitro drug sensitivity, clonality and drug resistance markers. *Malar J*. 2013;12:320.
  22. Picot S. [Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria?]. *Médecine Mal Infect*. août 2006;36(8):406-13.
  23. Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJM, Targett GAT. Malaria. *Lancet*. 23 avr 2005;365(9469):1487-98.
  24. Cornejo OE, Escalante AA. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*. déc 2006;22(12):558-63.
  25. Ba H, Duffy CW, Ahouidi AD, Deh YB, Diallo MY, Tandia A, et al. Widespread distribution of *Plasmodium vivax* malaria in Mauritania on the interface of the Maghreb and West Africa. *Malar J*. 2016;15(1):80.
  26. Howes RE, Reiner RC, Battle KE, Longbottom J, Mappin B, Ordanovich D, et al. *Plasmodium vivax* transmission in Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. nov 2015;9(11):e0004222.
  27. Ould Ahmedou Salem MS, Mint Lekweiry K, Mint Deida J, Ould Emouh A, Ould Weddady M, Ould Mohamed Salem Boukhary A, et al. Increasing prevalence of *Plasmodium vivax* among febrile patients in Nouakchott, Mauritania. *Am J Trop Med Hyg*. 4 mars 2015;92(3):537-40.
  28. Wurtz N, Mint Lekweiry K, Bogreau H, Pradines B, Rogier C, Ould Mohamed Salem Boukhary A, et al. Vivax malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual. *Malar J*. 2011;10:336.
  29. Niang M, Thiam LG, Sow A, Loucoubar C, Bob NS, Diop F, et al. A molecular survey of acute febrile illnesses reveals *Plasmodium vivax* infections in Kedougou, southeastern Senegal. *Malar J*. 2015;14:281.
  30. Getachew S, To S, Trimarsanto H, Thriemer K, Clark TG, Petros B, et al. Variation in Complexity of infection and transmission stability between neighbouring populations of *Plasmodium vivax* in Southern Ethiopia. *PLoS ONE*. 15 oct 2015 [cité 14 juin 2016];10(10).  
 Disponible sur:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4607408/>
  31. Shaw-Saliba K, Thomson-Luque R, Obaldía N, Nuñez M, Dutary S, Lim C, et al. Insights into an optimization of *Plasmodium vivax* Sal-1 in vitro culture: The Aotus primate model. *PLoS Negl Trop Dis*. juill 2016;10(7):e0004870.
  32. Barnadas C, Timinao L, Javati S, Iga J, Malau E, Koepfli C, et al. Significant geographical differences in prevalence of mutations associated with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* drug resistance in two regions from Papua New Guinea. *Malar J*. 2015;14(1):399.

33. Getachew S, Thriemer K, Auburn S, Abera A, Gadisa E, Aseffa A, et al. Chloroquine efficacy for *Plasmodium vivax* malaria treatment in southern Ethiopia. *Malar J.* 2015;14(1):525.
34. Marfurt J, de Monbrison F, Brega S, Barbolat L, Müller I, Sie A, et al. Molecular markers of in vivo *Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in pvdhfr and pvmdr1. *J Infect Dis.* 1 août 2008;198(3):409-17.
35. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*--the « bashful » malaria parasites. *Trends Parasitol.* juin 2007;23(6):278-83.
36. Singh B, Daneshvar C. *Plasmodium knowlesi* malaria in Malaysia. *Med J Malaysia.* sept 2010;65(3):166-72.
37. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012013.
38. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet.* 22 févr 2014;383(9918):723-35.
39. Kibret S, Lautze J, McCartney M, Nhamo L, Wilson GG. Malaria and large dams in sub-Saharan Africa: future impacts in a changing climate. *Malar J.* 5 sept 2016;15(1):448.
40. Hoffman SL, Subramanian GM, Collins FH, Venter JC. *Plasmodium*, human and *Anopheles* genomics and malaria. *Nature.* 7 févr 2002;415(6872):702-9.
41. Dia I, Ba H, Mohamed SAO, Diallo D, Lo B, Diallo M. Distribution, host preference and infection rates of malaria vectors in Mauritania. *Parasit Vectors.* 2009;2(1):61.
42. Cowman AF, Crabb BS. A parasite genome sheds light on an old enemy. *Nat Biotechnol.* nov 2002;20(11):1098-9.
43. Rathore D, Wahl AM, Sullivan M, McCutchan TF. A phylogenetic comparison of gene trees constructed from plastid, mitochondrial and genomic DNA of *Plasmodium* species. *Mol Biochem Parasitol.* 25 avr 2001;114(1):89-94.
44. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 3 oct 2002;419(6906):498-511.
45. Gardner MJ. The genome of the malaria parasite. *Curr Opin Genet Dev.* déc 1999;9(6):704-8.
46. Thompson J, Janse CJ, Waters AP. Comparative genomics in *Plasmodium*: a tool for the identification of genes and functional analysis. *Mol Biochem Parasitol.* déc 2001;118(2):147-54.
47. Dogovski C, Xie SC, Burgio G, Bridgford J, Mok S, McCaw JM, et al. Targeting the cell stress response of *Plasmodium falciparum* to overcome artemisinin resistance. *PLoS Biol.* avr 2015;13(4):e1002132.
48. Idro R, Marsh K, John CC, Newton CRJ. Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr Res.* oct 2010;68(4):267-74.
49. Rao A, Kumar MK, Joseph T, Bulusu G. Cerebral malaria: insights from host-parasite protein-protein interactions. *Malar J.* 9 juin 2010;9:155.
50. Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu A-L, Price RN, Ringwald P. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. *Malar J.* 2009;8:89.

51. Win AA, Imwong M, Kyaw MP, Woodrow CJ, Chotivanich K, Hanboonkunupakarn B, et al. K13 mutations and pfmdr1 copy number variation in *Plasmodium falciparum* malaria in Myanmar. *Malar J.* 2016;15:110.
52. Woodrow CJ, Haynes RK, Krishna S. Artemisinins. *Postgrad Med J.* févr 2005;81(952):71-8.
53. Eberl KJ, Jelinek T, Aida AO, Peyerl-Hoffmann G, Heuschkel C, el Valy AO, et al. Prevalence of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from southern Mauritania. *Trop Med Int Health TM IH.* oct 2001;6(10):756-60.
54. Alifrangis M, Nag S, Schousboe ML, Ishengoma D, Lusingu J, Pota H, et al. Independent origin of *Plasmodium falciparum* antifolate super-resistance, Uganda, Tanzania, and Ethiopia. *Emerg Infect Dis.* août 2014;20(8):1280-6.
55. Eziefula AC, Bousema T, Yeung S, Kamya M, Owaraganise A, Gabagaya G, et al. Single dose primaquine for clearance of *Plasmodium falciparum* gametocytes in children with uncomplicated malaria in Uganda: a randomised, controlled, double-blind, dose-ranging trial. *Lancet Infect Dis.* févr 2014;14(2):130-9.
56. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem.* mars 2009;44(3):937-53.
57. Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Craft CJ, Arbe-Barnes S, Miller RM, Shin C-S, et al. Safety and efficacy of pyronaridine-artesunate in uncomplicated acute malaria: an integrated analysis of individual patient data from six randomized clinical trials. *Malar J.* 2013;12:70.
58. Ouldabdallahi M, Alew I, Salem MSOA, Dit Dialaw Ba M, Boukhary AOMS, Khairy MLO, et al. Efficacy of artesunate-amodiaquine for the treatment of acute uncomplicated falciparum malaria in southern Mauritania. *Malar J.* 2014;13:496.
59. Tun KM, Jeeyapant A, Imwong M, Thein M, Aung SSM, Hlaing TM, et al. Parasite clearance rates in Upper Myanmar indicate a distinctive artemisinin resistance phenotype: a therapeutic efficacy study. *Malar J.* 31 mars 2016 [cité 5 avr 2016];15. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4815199/>
60. World Health Organisation 2015. Guidelines for the treatment of malaria. 2015 [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127\_eng.pdf].
61. Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Dokomajilar C, Séré Y, Rosenthal PJ, et al. Randomized comparison of amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine, artemether-lumefantrine, and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Burkina Faso. *Clin Infect Dis.* 1 déc 2007;45(11):1453-61.
62. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N, South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet.* 27 sept 2005;366(9487):717-25.
63. Hyde JE. Drug-resistant malaria - an insight. *FEBS J.* sept 2007;274(18):4688-98.
64. Weissbuch I, Leiserowitz L. Interplay between malaria, crystalline hemozoin formation, and antimalarial drug action and design. *Chem Rev.* nov 2008;108(11):4899-914.
65. Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJL, Laurent V, Su X, Berry A, et al. Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2010;54(5):1872-7.

66. Krungkrai SR, Krungkrai J. Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Asian Pac J Trop Med.* juin 2016;9(6):525-34.
67. Sullivan DJ, Gluzman IY, Russell DG, Goldberg DE. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 oct 1996;93(21):11865-70.
68. Bray PG, Martin RE, Tilley L, Ward SA, Kirk K, Fidock DA. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol Microbiol.* avr 2005;56(2):323-33.
69. Egan TJ. Haemozoin formation. *Mol Biochem Parasitol.* févr 2008;157(2):127-36.
70. Egan TJ, Ross DC, Adams PA. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). *FEBS Lett.* 19 sept 1994;352(1):54-7.
71. Pisciotto JM, Sullivan D. Hemozoin: oil versus water. *Parasitol Int.* juin 2008;57(2):89-96.
72. Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol.* 4 déc 2002;32(13):1645-53.
73. Cowman AF. Functional analysis of drug resistance in *Plasmodium falciparum* in the post-genomic era. *Int J Parasitol.* juill 2001;31(9):871-8.
74. Ferreira PE, Holmgren G, Veiga MI, Uhlén P, Kaneko A, Gil JP. PfMDR1: mechanisms of transport modulation by functional polymorphisms. *PloS One.* 2011;6(9):e23875.
75. Mu J, Ferdig MT, Feng X, Joy DA, Duan J, Furuya T, et al. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol.* août 2003;49(4):977-89.
76. Zhang H, Paguio M, Roepe PD. The antimalarial drug resistance protein *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter binds chloroquine. *Biochemistry (Mosc).* 6 juill 2004;43(26):8290-6.
77. Imwong M, Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Mungthin M, Hanchana S, et al. Exploring the contribution of candidate genes to artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2010;54(7):2886-92.
78. O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues. *Molecules.* mars 2010;15(3):1705-21.
79. Li J, Zhou B. Biological actions of artemisinin: insights from medicinal chemistry studies. *Molecules.* 8 mars 2010;15(3):1378-97.
80. Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science.* 31 mai 1985;228(4703):1049-55.
81. Mok S, Imwong M, Mackinnon MJ, Sim J, Ramadoss R, Yi P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* is associated with an altered temporal pattern of transcription. *BMC Genomics.* 2011;12:391.
82. Noedl H. Artemisinin resistance: how can we find it? *Trends Parasitol.* sept 2005;21(9):404-5.
83. Hastings I. How artemisinin-containing combination therapies slow the spread of antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.* févr 2011;27(2):67-72.
84. Witkowski B, Lelièvre J, Nicolau-Travers M-L, Iriart X, Njomnang Soh P, Bousejra-Elgarah F, et al. Evidence for the contribution of the hemozoin synthesis pathway of the murine *Plasmodium yoelii* to the resistance to artemisinin-related drugs. *PloS One.* 2012;7(3):e32620.

85. Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, et al. *Pfmdr1* and in vivo resistance to artesunate-mefloquine in falciparum malaria on the Cambodian-Thai border. *Am J Trop Med Hyg.* avr 2007;76(4):641-7.
86. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 30 juill 2009;361(5):455-67.
87. Dwivedi A, Khim N, Reynes C, Ravel P, Ma L, Tichit M, et al. *Plasmodium falciparum* parasite population structure and gene flow associated to anti-malarial drugs resistance in Cambodia. *Malar J.* 2016;15:319.
88. Tripura R, Peto TJ, Chalk J, Lee SJ, Sirithiranont P, Nguon C, et al. Persistent *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in a western Cambodian population: implications for prevention, treatment and elimination strategies. *Malar J.* 2016;15(1):181.
89. Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, et al. K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites from sub-Saharan Africa. *J Infect Dis.* 15 avr 2015;211(8):1352-5.
90. Torrentino-Madamet M, Fall B, Benoit N, Camara C, Amalvict R, Fall M, et al. Limited polymorphisms in k13 gene in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal in 2012-2013. *Malar J.* 2014;13:472.
91. Al-Olayan EM, Williams GT, Hurd H. Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol.* août 2002;32(9):1133-43.
92. Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol.* août 2007;23(8):376-83.
93. Madeo F, Fröhlich E, Fröhlich KU. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol.* 3 nov 1997;139(3):729-34.
94. Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, Ambroise-Thomas P. Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* oct 1997;91(5):590-1.
95. Zangger H, Mottram JC, Fasel N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ.* oct 2002;9(10):1126-39.
96. Wong AH-H, Yan C, Shi Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *J Biol Chem.* 24 août 2012;287(35):29251-9.
97. Matthews H, Ali M, Carter V, Underhill A, Hunt J, Szor H, et al. Variation in apoptosis mechanisms employed by malaria parasites: the roles of inducers, dose dependence and parasite stages. *Malar J.* 2012;11:297.
98. Engelbrecht D, Coetzer TL. Turning up the heat: heat stress induces markers of programmed cell death in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cell Death Dis.* 2013;4:e971.
99. Totino PRR, Daniel-Ribeiro CT, Corte-Real S, de Fátima Ferreira-da-Cruz M. *Plasmodium falciparum*: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. *Exp Parasitol.* avr 2008;118(4):478-86.
100. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* janv 2015;22(1):58-73.

101. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* janv 2009;16(1):3-11.
102. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* nov 2004;5(11):897-907.
103. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* nov 1999;6(11):1028-42.
104. Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med.* déc 2004;8(4):432-44.
105. Hu W, Kavanagh JJ. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol.* déc 2003;4(12):721-9.
106. Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P, Van Breusegem F. Are metacaspases caspases? *J Cell Biol.* 5 nov 2007;179(3):375-80.
107. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* juin 2007;35(4):495-516.
108. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* sept 2008;151(1):10-27.
109. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* janv 2012;19(1):107-20.
110. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* oct 2005;115(10):2665-72.
111. McLuskey K, Mottram JC. Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases. *Biochem J.* 1 mars 2015;466(2):219-32.
112. Marco M, Coterón JM. Falcipain inhibition as a promising antimalarial target. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(5):408-44.
113. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* 15 févr 1993;290(Pt 1):205-18.
114. Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov PV. Metacaspases. *Cell Death Differ.* août 2011;18(8):1279-88.
115. Meslin B, Beavogui AH, Fasel N, Picot S. *Plasmodium falciparum* metacaspase PfMCA-1 triggers a z-VAD-fmk inhibitable protease to promote cell death. *PloS One.* 2011;6(8):e23867.
116. Moss CX, Westrop GD, Juliano L, Coombs GH, Mottram JC. Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. *FEBS Lett.* 11 déc 2007;581(29):5635-9.
117. Dame JB, Arnot DE, Bourke PF, Chakrabarti D, Christodoulou Z, Coppel RL, et al. Current status of the *Plasmodium falciparum* genome project. *Mol Biochem Parasitol.* juill 1996;79(1):1-12.
118. de Monbrison F, Maitrejean M, Latour C, Bugnazet F, Peyron F, Barron D, et al. In vitro antimalarial activity of flavonoid derivatives dehydrosilybin and 8-(1;1)-DMA-kaempferide. *Acta Trop.* janv 2006;97(1):102-7.
119. Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Perteau M, Silva JC, et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature.* 3 oct 2002;419(6906):512-9.

120. Matz JM, Kooij TWA. Towards genome-wide experimental genetics in the in vivo malaria model parasite *Plasmodium berghei*. *Pathog Glob Health*. mars 2015;109(2):46-60.
121. Bienvenu A-L, Ferrandiz J, Kaiser K, Latour C, Picot S. Artesunate-erythropoietin combination for murine cerebral malaria treatment. *Acta Trop*. mai 2008;106(2):104-8.
122. Marijon A, Bonnot G, Fourier A, Bringer C, Lavoignat A, Gagnieu M-C, et al. Efficacy of intranasal administration of artesunate in experimental cerebral malaria. *Malar J*. 2014;13:501.
123. Figueiredo LM, Pirrit LA, Scherf A, Pirrit LA. Genomic organisation and chromatin structure of *Plasmodium falciparum* chromosome ends. *Mol Biochem Parasitol*. 25 févr 2000;106(1):169-74.
124. Horrocks P, Dechering K, Lanzer M. Control of gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 15 sept 1998;95(2):171-81.
125. Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*. 3 oct 2002;419(6906):520-6.
126. Carucci DJ, Yates JR, Florens L. Exploring the proteome of *Plasmodium*. *Int J Parasitol*. 4 déc 2002;32(13):1539-42.
127. Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*. 3 oct 2002;419(6906):520-6.
128. Imwong M, Pukrittayakamee S, Grüner AC, Rénia L, Letourneur F, Looareesuwan S, et al. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using *Pvcs* and *Pvmsp1*. *Malar J*. 2005;4:20.
129. Mottram JC, Helms MJ, Coombs GH, Sajid M. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends Parasitol*. avr 2003;19(4):182-7.
130. Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Banerjee D, Goldberg DE. Characterization of native falcipain, an enzyme involved in *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasitol*. 20 déc 1996;83(2):189-200.
131. Gomes MM, Budu A, Ventura PDS, Bagnaresi P, Cotrin SS, Cunha RLOR, et al. Specific calpain activity evaluation in *Plasmodium* parasites. *Anal Biochem*. 1 janv 2015;468:22-7.
132. Zhang G. Protease Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., éditeurs. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [cité 23 sept 2016]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92006/>
133. Leung-Toung R, Zhao Y, Li W, Tam TF, Karimian K, Spino M. Thiol proteases: inhibitors and potential therapeutic targets. *Curr Med Chem*. 2006;13(5):547-81.
134. Spinks D, Ong HB, Mpamhanga CP, Shanks EJ, Robinson DA, Collie IT, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel inhibitors of *Trypanosoma brucei* pteridine reductase 1. *ChemMedChem*. 7 févr 2011;6(2):302-8.
135. Berg M, Van der Veken P, Joossens J, Muthusamy V, Breugelmans M, Moss CX, et al. Design and evaluation of *Trypanosoma brucei* metacaspase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 15 mars 2010;20(6):2001-6.
136. Aravind L, Subramanian G. Origin of multicellular eukaryotes - insights from proteome comparisons. *Curr Opin Genet Dev*. déc 1999;9(6):688-94.

137. Khan MAS, Chock PB, Stadtman ER. Knockout of caspase-like gene, YCA1, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 29 nov 2005;102(48):17326-31.
138. Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, et al. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. Curr Genet. juill 2002;41(4):208-16.
139. Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lächelt S, Herlan M, et al. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. Mol Cell. avr 2002;9(4):911-7.
140. Durand PM, Coetzer TL. Utility of computational methods to identify the apoptosis machinery in unicellular eukaryotes. Bioinforma Biol Insights. 2008;2:101-17.
141. Li M, Wang H, Liu J, Hao P, Ma L, Liu Q. The apoptotic role of metacaspase in *Toxoplasma gondii*. Front Microbiol. 2015;6:1560.
142. Shrestha A, Megeney LA. The non-death role of metacaspase proteases. Front Oncol. 2012;2:78.
143. Watanabe N, Lam E. Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. J Biol Chem. 15 avr 2005;280(15):14691-9.
144. Richie DL, Miley MD, Bhabhra R, Robson GD, Rhodes JC, Askew DS. The *Aspergillus fumigatus* metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress. Mol Microbiol. janv 2007;63(2):591-604.
145. Vercammen D, van de Cotte B, De Jaeger G, Eeckhout D, Casteels P, Vandepoele K, et al. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. J Biol Chem. 29 oct 2004;279(44):45329-36.
146. Szallies A, Kubata BK, Duszenko M. A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 24 avr 2002;517(1-3):144-50.
147. McLuskey K, Rudolf J, Proto WR, Isaacs NW, Coombs GH, Moss CX, et al. Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. Proc Natl Acad Sci U S A. 8 mai 2012;109(19):7469-74.
148. Zalila H, González IJ, El-Fadili AK, Delgado MB, Desponds C, Schaff C, et al. Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major*. Mol Microbiol. janv 2011;79(1):222-39.
149. Wanderley JLM, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. Cell Mol Life Sci CMLS. mai 2010;67(10):1653-9.
150. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. 1976. J Parasitol. juin 2005;91(3):484-6.
- 151 Basco, L.K., 2007. Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. World Health Organization, Geneva.
152. World Health Organisation 2015. Confronting *Plasmodium vivax* malaria. 2015;1-8. [<http://www.searo.who.int/entity/malaria/confronting-plasmodium.pdf?ua=1>].
153. Mizutani M, Fukumoto S, Soubeiga AP, Soga A, Iyori M, Yoshida S. Development of a *Plasmodium berghei* transgenic parasite expressing the full-length *Plasmodium vivax* circumsporozoite VK247 protein for testing vaccine efficacy in a murine model. Malar J. 2016;15(1):251.
154. Mint Lekweiry K, Ould Mohamed Salem Boukhary A, Gaillard T, Wurtz N, Bogreau H, Hafid JE, et al. Molecular surveillance of drug-resistant *Plasmodium vivax* using *pvdhfr*, *pvdhps* and *pvm-dr1* markers in Nouakchott, Mauritania. J Antimicrob Chemother. févr 2012;67(2):367-74.

155. Ouldabdallahi Moukah M, Ba O, Ba H, Ould Khairy ML, Faye O, Bogreau H, et al. Malaria in three epidemiological strata in Mauritania. *Malar J.* 12 avr 2016 [cité 16 juin 2016];15. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4828841/>
156. Talha AA, Pirahmadi S, Mehrizi AA, Djadid ND, Nour BYM, Zakeri S. Molecular genetic analysis of *Plasmodium vivax* isolates from Eastern and Central Sudan using *pvcsp* and *pvmSP-3α* genes as molecular markers. *Infect Genet Evol.* juin 2015;32:12-22.
157. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 11 juill 2016. Doi: 10.4269/ajtmh.16-0141.
158. Mahgoub H, Gasim GI, Musa IR, Adam I. Severe *Plasmodium vivax* malaria among sudanese children at New Halfa Hospital, Eastern Sudan. *Parasit Vectors.* 30 juill 2012;5:154.
159. Moreira CM, Abo-Shehada M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J.* 22 sept 2015 [cité 28 avr 2016];14. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4578340/>
160. Schousboe ML, Ranjitkar S, Rajakaruna RS, Amerasinghe PH, Morales F, Pearce R, et al. multiple origins of mutations in the *mdr1* Gene—A putative marker of chloroquine resistance in *P. vivax*. *PLoS Negl Trop Dis.* 5 nov 2015 [cité 28 avr 2016];9(11). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4634971/>
161. Ould Ahmedou Salem MS, Mohamed Lemine YO, Deida JM, Lemrabott MAO, Ouldabdallahi M, Ba MDD, et al. Efficacy of chloroquine for the treatment of *Plasmodium vivax* in the Saharan zone in Mauritania. *Malar J.* 2015;14(1):39.
162. Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Gradoni L, Udomsangpetch R, et al. Identification of the *Plasmodium vivax mdr*-like gene (*pvmDR1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J Infect Dis.* 15 janv 2005;191(2):272-7.
163. Golassa L, Erko B, Baliraine FN, Aseffa A, Swedberg G. Polymorphisms in chloroquine resistance-associated genes in *Plasmodium vivax* in Ethiopia. *Malar J.* 2015;14:164.
164. Gomes LR, Almeida-de-Oliveira NK, de Lavigne AR, de Lima SRF, de Pina-Costa A, Brasil P, et al. *Plasmodium vivax mdr1* genotypes in isolates from successfully cured patients living in endemic and non-endemic Brazilian areas. *Malar J.* 2016;15(1):96.
165. Rungsihirunrat K, Muhamad P, Chaijaroenkul W, Kuesap J, Na-Bangchang K. *Plasmodium vivax* drug resistance genes; *Pvmdr1* and *Pvcrt-o* polymorphisms in relation to chloroquine sensitivity from a malaria endemic area of Thailand. *Korean J Parasitol.* févr 2015;53(1):43-9.
166. Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov PV. Metacaspases. *Cell Death Differ.* août 2011;18(8):1279-88.
167. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell.* oct 2000;6(4):961-7.
168. Cnops L, Van Esbroeck M, Bottieau E, Jacobs J. Giemsa-stained thick blood films as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR. *Malar J.* 2010;9:370.
169. Meslin B, Zalila H, Fasel N, Picot S, Bienvenu A-L. Are protozoan metacaspases potential parasite killers? *Parasit Vectors.* 2011;4:26.

170. Rezanezhad H, Menegon M, Sarkari B, Hatam GR, Severini C. Characterization of the metacaspase 1 gene in *Plasmodium vivax* field isolates from southern Iran and Italian imported cases. *Acta Trop.* juill 2011;119(1):57-60.
171. Kim J-R, Nandy A, Maji AK, Addy M, Dondorp AM, Day NPJ, et al. Genotyping of *Plasmodium vivax* reveals both short and long latency relapse patterns in Kolkata. *PloS One.* 2012;7(7):e39645.
172. Stennicke HR, Salvesen GS. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ.* nov 1999;6(11):1054-9.