



HAL
open science

Rôle de l'import des ARN de transfert de l'hôte dans le développement Plasmodium

Delphine Kapps

► **To cite this version:**

Delphine Kapps. Rôle de l'import des ARN de transfert de l'hôte dans le développement Plasmodium. Parasitologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ054 . tel-01561790

HAL Id: tel-01561790

<https://theses.hal.science/tel-01561790>

Submitted on 13 Jul 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.

ÉCOLE DOCTORALE 414 Sciences de la Vie et de la Santé

UPR 9002 Architecture et Réactivité de l'ARN

THÈSE présentée par :

Delphine KAPPS

soutenue le : **23 septembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences du vivant / Aspects moléculaires de la biologie

**Rôle de l'import des ARN de transfert de l'hôte
dans le développement de *Plasmodium***

THÈSE dirigée par :

Mme FRUGIER Magali

Directrice de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme CERDAN Rachel

Maître de Conférences, Université de Montpellier

M. RIBAS DE POUPLANA Lluis

Directeur d'équipe, IRB Barcelone

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. CANDOLFI Ermanno

Professeur, Laboratoire de parasitologie et de mycologie médicale,
Strasbourg

A l'issue de ces quatre années de recherche et de la période de rédaction, je réalise l'ampleur de la tâche accomplie, tant bien au niveau personnel que collectif. Le travail solitaire n'est qu'une partie de ma contribution, qui a été tellement valorisée par toutes les personnes qui ont travaillé à mes côtés, qui m'ont aidée, et encouragée. Quelle aventure ! Je rédige ces lignes avec beaucoup d'émotion. Alors à vous toutes et tous, quel que soit votre impact durant ma thèse et même si vous n'êtes pas personnellement cités, je vous dis merci :)

Je remercie le Professeur Eric Westhof de m'avoir accueillie au sein de son unité, et, de façon plus globale, le CNRS et le LabEx NetRNA pour m'avoir permis de réaliser mon doctorat.

Je suis très reconnaissante envers les membres de mon jury qui me font l'honneur d'évaluer mon travail de thèse : Rachel Cerdan, Lluís Ribas de Pouplana et Ermanno Candolfi.

Magali, c'est avec beaucoup de gratitude et d'émotion que je te remercie de m'avoir confié un sujet de recherche si atypique et ambitieux. C'est la parasitologie qui m'a initialement attirée dans le projet, et me voilà également passionnée d'ARN de transfert et de régulation de la traduction. Cette passion que tu m'as transmise a bien sûr été accompagnée de nombreuses connaissances et compétences, et je t'en suis très reconnaissante. Tu m'as offert des conditions de travail de qualité mélangeant rigueur, exigence, confiance, écoute, bonne humeur... Merci aussi pour les congrès ! Je te dédie les quatre rangements annuels de ma paillasse et ceux, bien pires, de mon bureau. Je garderai un souvenir très fort de l'acceptation de notre article, mis en valeur par plusieurs reportages de presse et ton interview pour la Radio Chrétienne Francophone.

Anne, Joëlle, Caro, je vous remercie aussi très chaleureusement <3 Vous contribuez à la bonne ambiance de travail que j'ai tant appréciée dans l'équipe. Votre disponibilité pour me former, me conseiller et m'encourager a été très précieuse. Aussi, vos brioches faites maison, boucles d'oreilles Saoya et autres cookies me manqueront terriblement. Jojo, merci pour les toutes premières corrections de mon manuscrit !

Tania, merci pour le travail que tu as fait sur tRip *in vitro*. Nassira, je te remercie de m'avoir formée à la production de sporozoïtes. Tu m'as appris à rebondir face aux déceptions des multiples dissections et purifications infructueuses. Par contre, m'avoir fait croire (même seulement quelques secondes) que Tchoupie importait les ARNt était vraiment scandaleux ;)

Jana, maman. Tu es devenue une amie très importante. Tu m'as appris énormément au labo, notamment pour la culture cell alors que tu étais, comme toujours, submergée de manips. Tu es d'un grand soutien, avec tes encouragements jusque tard le soir ou les weekend, et tes dons (un peu trop réguliers) de Vogue. Je te remercie d'avoir retrouvé sur la plage la carte de notre hôtel lors du congrès en Grèce. Tous nos souvenirs au labo et en dehors me sont chers.

Marta, ma petite grande sœur : la thèse n'aurait pas été la même sans toi. Nos fous rires, confidences, regards complices et repas dans le bus me rendront nostalgique. Tu as été d'une incroyable ténacité face à ma playlist à six chansons, et ton aide avec l'élevage et la dissection des moustiques a été salutaire. Seulement, pourquoi as-tu rayé ce foutu tableau ? ;D Le congrès à Heidelberg avec toi était un beau moment de science, et ça, c'est cool.

Un grand merci à nos collaborateurs de l'Institut Pasteur pour leur accueil et leur travail. Robert, Sabine, Daniel, il a été extrêmement formateur pour moi de travailler et d'échanger avec vous lors de mes visites parisiennes. J'ai beaucoup appris de votre savoir et savoir-faire en matière de *Plasmodium*. Sabine, je suis ravie que tu m'aies fait découvrir la tarte infiniment citron.

Je remercie David, Karine et Itto pour leur travail à l'animalerie et toutes nos discussions si sympathiques. David, tu m'as beaucoup aidée avec les souris et je te dois mon autonomie en matière d'expérimentation animale. Merci !

Philippe, Lauriane et Johana : je vous remercie pour les résultats obtenus grâce à votre expertise en protéomique. Je sais que vous avez été soulagés de ne plus traiter des échantillons de sporozoïtes qui étaient en fait des bactéries et des bouts de moustiques. Je suis désolée.

Frédéric, je te remercie beaucoup de m'avoir formée à l'utilisation du cytomètre en flux et à l'éradication des paquets d'hépatocytes qui bouchent les tubulures.

Eric, Julien, Steph, Kiki, Nathalie, Randy, et les autres collègues de l'équipe moustique, je vous remercie pour votre accompagnement, depuis le M2 pour certains, où l'encadrement d'Eric m'a donné la fièvre du paludisme (quel jeu de mot douteux !). C'était un plaisir de continuer de travailler avec vous à l'insectarium pour récolter des pupes et courir après les souris réveillées plus tôt que prévu. J'ai toujours pu bénéficier de vos conseils pour faire face aux difficultés rencontrées lors des infections de souris et de moustiques. Merci ! Mention spéciale à Moustiquette, que je remercie pour les « fumer temps », notre session tatouage impromptue et l'escapade toutes les deux sur mon regretté vélo, ce bon vieux Boule de Neige 1.

Je remercie Nathalie Boulanger, ma responsable de stage de M1. Je suis ravie d'avoir conservé un si bon contact, et ce cadeau des anticorps anti-CSP a été d'une grande aide.

Je remercie Maggy Villa, LA professeur qui a marqué ma scolarité. Tu m'as transmis ta passion de l'immunologie et de la parasitologie durant mon BTS, ce qui a orienté mes choix de spécialité de Master et de domaine de recherche. Mon parcours aurait été différent si je n'avais pas assisté à tes cours.

Je remercie tous mes autres amis de l'Institut et du campus : Mickaël, merci pour ton accueil lors de notre virée montluçonnaise et l'escapade au Pharaon ; Pierre, je n'oublierai pas cette bronzette sous le soleil de minuit en salle de culture cellulaire, avec ses UV que nous n'avons jamais réussi à éteindre ; Olivier, merci pour les pauses de fin de journée quand tu « descendais » en 443 ; ma Daphnou, que je n'ai plus quittée depuis notre rencontre en Grèce, nos traditionnels déjeuners du mercredi étaient un plaisir ; Alice-Anne, ma collègue d'étude de *Plasmodium*, il faut absolument que nous développons ce jeu de l'oie du labo (« tes souris injectées ne sont pas infectées : recule de trois cases », « tu as oublié de réserver le cytomètre : passe ton tour ») ; mon Emilie en mousse : quel parcours incroyable depuis ce BTS génial et l'année plutôt décevante de licence à Reims, puis ces six années strasbourgeoises de master et de thèse. Nos confidences et tes encouragements ont rendu nombre de moments difficiles plus surmontables. Comme quoi, nous n'allons peut-être pas finir en CAP coiffure ^_^

A mes fidèles amis de la promo de master, « Les immunos, promo 2012 » : Mélisandre, Annie, Diane, Marion, Quentin (et Elise, même si les arts décoratifs ne sont pas notre domaine). Je vous remercie de l'opiniâtreté collective que nous avons manifestée pour garder un si bon contact, que quelques mètres ou milliers de kilomètres nous séparent. Mélisandre, longue vie à nos discussions quasi quotidiennes sur la couture, l'efficacité des huiles bio, le sens de la vie et de la thèse. Annie, Diane, je vous remercie pour l'époque « Girls Gone Wild » et son « Strasbourg World Tour ». Marion, ta fête d'anniversaire dans Le Carré à Liège est mémorable. Je garde un souvenir génial de ton EVJF, Quentin, ainsi que de ton mariage. Merci les amis <3

Merci à tous les autres : Néno (merci pour ton soutien depuis 11 ans !!!), Ludo, Yacine, Marie, Gérald, Paola, Claire, Alain, JC, Semih, Mathieu, Julien, Patrick, Anaïs, Emilionel, Mathi (et dire que tu m'as appris à utiliser une pipette, à débouchonner un tube du petit doigt et à ensemercer des géloses), la famille et les amis de Marcel, le groupe de course à pied...

Je remercie ma famille. En particulier, Maman, Papa, Nono, je vous remercie du fond du cœur pour votre aide et votre soutien depuis toujours. Je doute avoir réussi à vous captiver avec mes histoires de *Plasmoche* et de dissections de glandes salivaires de centaines de moustiques, mais vos encouragements m'ont aidée à rester motivée dans les moments de creux.

Marcel, merci pour ton soutien et ton attention au quotidien. Ce que nous avons construit est un socle solide qui est une force pour ma vie professionnelle. Tu as joué un rôle important dans ma thèse, notamment durant la période de rédaction. Merci <3

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
A. Plasmodium	3
1. Brève présentation de <i>Plasmodium</i> et du paludisme	3
2. Les différents génomes de <i>Plasmodium</i>	5
a. Le génome nucléaire	6
b. Le génome apicoplastique	6
c. Le génome mitochondrial	7
3. Description du cycle de <i>Plasmodium</i>	8
a. Infection de l'hôte vertébré	9
b. Infection de l'hôte invertébré	10
c. Régulation de la traduction du parasite au cours du cycle de vie	10
4. Echanges moléculaires entre hôte et parasite	12
a. Le glucose	12
b. L'hémoglobine	13
c. Echanges de protéines : le translocon	15
d. Autres échanges (sélection)	16
B. Les ARNt	19
1. Place des ARNt dans la machinerie traductionnelle	19
2. Biosynthèse et maturation des ARNt	22
3. Fonctions des ARNt	23
a. Aminoacylation	23
b. Autres fonctions	23
4. Structure des ARNt	24
5. Les gènes d'ARNt et possibles conséquences sur la traduction chez <i>Plasmodium</i>	25
a. Un nombre de gènes d'ARNt réduit	25
b. Le cas particulier de l'ARNt ^{Asn} et le décodage des LCR	26
C. Circulation intracellulaire des ARNt	29
1. Transport nucléo-cytoplasmique	30
a. Circulation du noyau vers le cytosol	30
b. Circulation du cytosol vers le noyau/processus rétrograde	31
2. Circulation du cytosol vers la mitochondrie	32
a. <i>S. cerevisiae</i>	32
b. Les plantes	34
c. Homo sapiens	35
d. Les eucaryotes unicellulaires pathogènes	35

<i>(i) Les Kinétoplastides : Trypanosoma et Leishmania</i>	35
<i>(ii) Les Apicomplexes : Toxoplasma et Plasmodium</i>	37
3. Circulation du cytosol vers d'autres organelles	37
D. Répartition et rôles des protéines homologues à Trbp111 chez les parasites unicellulaires	39
E. Objectifs de la thèse	41
RESULTATS	43
A. Le sporozoïte importe des ARNt exogènes	45
B. Implication des ARNt importés dans la physiologie du parasite au stade sanguin	49
1. Les ARNt ayant interagi avec tRip conservent-ils leur structure 3D ?	50
<i>a. Utilisation des gels retard</i>	51
<i>b. Utilisation des sondes de structure</i>	51
2. Comparaison des protéomes des parasites sauvage et tRip-KO	54
<i>a. Préparation des échantillons</i>	54
<i>b. Analyse des protéomes</i>	54
<i>c. Comparaison des protéomes WT et KO</i>	56
<i>(i) Facteurs de traduction et protéines ribosomales</i>	56
<i>(ii) Protéines du métabolisme des sucres</i>	57
<i>(iii) Protéines sous-exprimées dans le mutant tRip-KO</i>	60
<i>(iv) Aminoacyl-ARNt synthétases</i>	60
<i>d. Usage des acides aminés</i>	61
3. Identification des interactants protéiques de tRip	62
<i>a. Co-immunoprécipitation</i>	62
<i>b. Analyse des résultats</i>	63
<i>c. Etude préliminaire de la GluRS de P. berghei</i>	65
C. Implication des ARNt importés dans la physiologie du parasite au stade sporozoïte	69
1. Pourquoi je n'ai pas pu identifier les interactants de tRip et comparer les protéome au stade sporozoïte	69
2. Transmigration	71

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	75
A. Conclusions	77
B. Perspectives	81
1. Origine des ARNt importés	81
<i>a. Est-ce que l'import se fait in vivo ?</i>	81
<i>b. Quelle est la source des ARNt importés ?</i>	81
2. Fonctions moléculaires de tRip	82
<i>a. Est-ce que tRip est un transporteur ou un récepteur ?</i>	82
(i) Un transporteur ?	82
(ii) Un récepteur ?	82
<i>b. Quel est le rôle du complexe protéique organisé autour de tRip ?</i>	83
<i>c. Est-ce que tous les ARNt sont importés avec la même efficacité ?</i>	83
3. Devenir des ARNt importés	84
<i>a. Rôle canonique dans la traduction</i>	84
<i>b. Est-ce que les ARNt de l'hôte pourraient être une source</i>	
<i>d'ARN régulateurs ?</i>	84
(i) tRFs ?	84
(ii) siRNA ?	85
4. Quelles autres fonctions que l'import d'ARNt pour tRip ?	86
 MATERIEL ET METHODES	 87
A. Matériel	89
1. Produits chimiques	89
2. Macromolécules commerciales	90
<i>a. Enzymes</i>	90
<i>b. Anticorps</i>	90
3. Macromolécules non commerciales	90
<i>a. Enzymes</i>	90
<i>b. ARNt</i>	90
<i>c. Anticorps</i>	91
4. Les plasmides	91
<i>a. Les plasmides d'expression bactérienne</i>	91
<i>b. Les plasmides d'expression eucaryote</i>	91
5. Souches bactériennes et cellules compétentes	91

<i>a. Souches bactériennes</i>	92
<i>b. Production de bactéries électrocompétentes</i>	92
<i>c. Production de bactéries chimiocompétentes</i>	92
6. Animaux et parasites	
<i>a. Les souris</i>	92
<i>b. Les moustiques</i>	93
<i>c. Les souches plasmodiales</i>	94
B. Méthodes	95
1. Infection des animaux et production de parasites	95
<i>a. Souris</i>	95
<i>(i) Injection de sporozoïtes</i>	95
<i>(ii) Injection de sang parasité</i>	96
<i>(iii) Suivi des infections</i>	96
<i>b. Moustiques</i>	97
<i>(i) Infection des moustiques</i>	97
<i>(ii) Observation des ookystes</i>	97
<i>(iii) Récupération des sporozoïtes</i>	98
2. Préparation de stocks de parasites	99
3. Purification des sporozoïtes	100
<i>a. Purification sur coussin de Percoll</i>	100
<i>b. Purification sur colonne échangeuse d'anions</i>	100
<i>c. Technique de coussin d'Accudenz modifiée</i>	101
4. Génération de la souche <i>Pb</i> tRip-KO	102
<i>a. Construction du plasmide</i>	102
<i>b. Préparation des parasites receveurs</i>	104
<i>c. Sélection des parasites recombinants</i>	105
<i>d. Clonage</i>	105
<i>e. Génotypage</i>	105
5. Phénotypage de la souche <i>Pb</i> tRip-KO	107
<i>a. Suivi qualitatif du développement du parasite <i>Pb</i> tRip-KO in vivo</i>	107
<i>b. Etude comparative du développement de <i>Pb</i> tRip-KO et de la souche sauvage chez la souris</i>	108
<i>c. Mesure de la traversée cellulaire par cytométrie en flux</i>	108
6. Identification de partenaires protéiques de tRip par spectrométrie de masse	109
<i>a. Préparation des échantillons</i>	109
<i>(i) A partir des stades sanguins des souches sauvage et tRip-KO</i>	109

(ii) A partir de sporozoïtes des souches sauvage et <i>tRip-KO</i>	111
b. Analyse des échantillons	111
7. Protéomique comparative des parasites au stade schizonte sanguin	112
a. Maturation des parasites	112
b. Purification des parasites	112
8. Production de protéines recombinantes	113
a. <i>tRip</i> de <i>P. falciparum</i> (<i>PftRip</i>)	113
(i) Culture des cellules surproductrices	113
(ii) Purification de <i>PftRip</i>	113
b. Glutamyl-ARNt synthétase de <i>P. berghei</i> (<i>PbGluRS</i>)	115
(i) Clonage	115
(ii) Purification	115
9. Préparations d'ARN	116
a. Extraction d'ARN total	116
(i) ARN de bactéries ou de cellules de mammifères	116
(ii) A partir de foie de souris	117
b. Purification d'ARNt total à partir d'ARN total	117
c. Marquage radioactif d'ARNt en 3'	118
d. Génération de transcrits d'ARNt^{Glu}	118
10. Gel retard	118
11. Tests d'aminocyclation de <i>PbGluRS</i>	120
12. Test de structure des ARNt liés à <i>PftRip</i>	120
a. Incubation préalable	120
b. Gel retard	120
c. Cartographie en solution	120
(i) Clivages enzymatiques	120
(ii) Clivage au plomb	121

REFERENCES **123**

ABREVIATIONS

A	adénine
aa	acide aminé
aaRS	aminoacyl-ARNt synthétase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Amp	ampicilline
AMP	adénosine 5'-monophosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ARNt ^{xxx}	ARNt correspondant à l'aa xxx précisé en exposant
ATP	adénosine 5'triphosphate
BSA	sérumalbumine bovine
Ci	Curie
Cpm	coup par minute
CTP	cytidine 5' triphosphate
Da	Dalton
DDM	n-dodécyl β-D maltoside
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
dNTP	désoxyribonucléotide
DTE	dithioérythritol
DTT	dithiotréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
G	guanine
g	gramme ou gravitationnel
GMP	guanosine mono-phosphate
h	heure
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
k	kilo
Kan	kanamycine
L	litre
LB	Luria Bertani
m	milli
min	minute
M	molaire
μ	micro
n	nano
N	normal
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacétique
nt	nucléotide
p	pico
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen-strep	pénicilline-streptomycine

pH	potentiel hydrogène
ppi	pyrophosphate
p/V	poids pour volume
RNAse	ribonucléase
Rpm	rotation par minute
S	svedberg (coefficient de sédimentation)
SDS	sodium dodécyl sulfate
Spz	sporozoïte
SVF	sérum de veau foetal
TBE	Tris Borate EDTA
TCA	acide trichloroacétique
TEMED	tétraméthyléthylènediamine
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
U	unité
UV	ultraviolet
V	Volt
°C	degré Celsius

INTRODUCTION

A. Plasmodium

1. Brève présentation de Plasmodium et du paludisme

Plasmodium est le parasite responsable du paludisme. C'est une maladie à transmission vectorielle : le parasite est inoculé par la piqûre d'un moustique infecté. Cet eucaryote unicellulaire fait partie du phylum des *Apicomplexa*. Egalement appelés sporozoaires, certains de ces parasites intracellulaires sont responsables de graves épidémies. Avec *Toxoplasma*, l'agent responsable de la toxoplasmose, ce sont les deux pathogènes apicomplexes majeurs. Sept autres genres viennent compléter le règne : *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Gregarina*, *Monospora*, *Neospora* et *Theileria*. Eux aussi sont responsables de pathologies. Par exemple, *Cryptosporidium parvum* provoque la cryptosporidiose, une maladie intestinale grave. Elle se manifeste chez les bovins et les oiseaux et se transmet à l'Homme.

Il existe au total près de 150 espèces de *Plasmodium* pouvant infecter oiseaux, reptiles, mammifères primates et non primates. Parmi elles, cinq espèces causent le paludisme chez l'Homme : *P. falciparum*, *P. malariae* (les deux seuls à être exclusifs à l'humain), *P. ovale*, *P. vivax*, ainsi que *P. knowlesi*. Ces trois derniers peuvent également infester certains singes. Selon les dernières estimations de l'OMS, 214 millions de cas de paludisme et 438000 décès ont été enregistrés en 2015. Le paludisme représente l'une des trois maladies infectieuses causant le plus de décès dans le monde avec le VIH et la tuberculose. Près de la moitié de la population mondiale est exposée au paludisme, dans 95 pays principalement situés en Afrique, en Asie du Sud et du Sud-Est, ainsi qu'en Amérique centrale et du Sud (**Figure 1**). L'Afrique Subsaharienne est la zone la plus largement touchée. Elle compte 88% des personnes impaludées et 90% des décès y surviennent (OMS, 2015).

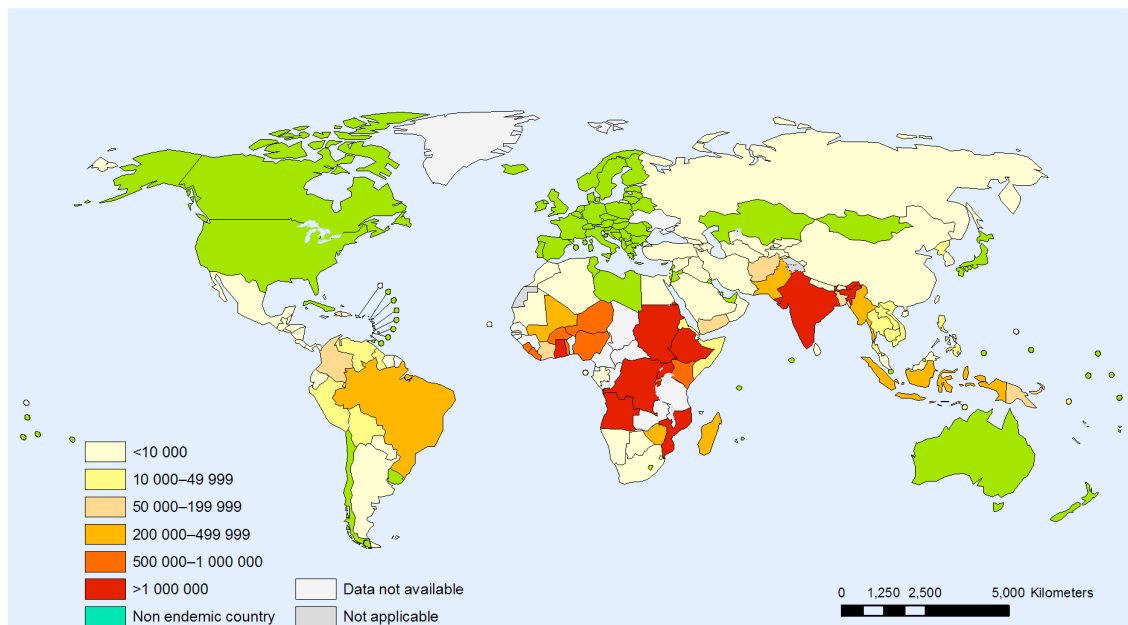


Figure 1 : Carte de répartition des cas de paludisme dans le monde (OMS, 2010).

Le cycle des *Plasmodia* comporte de multiples étapes. Initialement, le foie est infecté mais cette phase est asymptomatique. Les symptômes sont dus à l'invasion des hématies par le parasite. Le plus caractéristique d'entre eux est l'accès palustre, c'est-à-dire des crises répétées de tremblements, de frissons et sensations de froid associées à une fièvre élevée. Les crises sont espacées de quelques jours qui correspondent à la période nécessaire au parasite pour achever un cycle érythrocytaire. Cette période varie selon la vitesse de développement propre à chaque espèce de *Plasmodium*. De graves complications peuvent entraîner la mort, en particulier si l'infection est due à *P. falciparum*. On parle alors d'accès perniciosus palustre. Les patients sont victimes de troubles de la conscience, de détresse respiratoire, de convulsions, d'insuffisance rénale aiguë et d'une grave anémie.

Le paludisme peut être soigné si le diagnostic est réalisé suffisamment tôt, ce qui permet de donner un traitement adapté rapidement. Les médicaments disponibles sont nombreux mais deux problèmes importants sont rencontrés : leur prix est élevé et les parasites développent des résistances contre ces médicaments. Pour pallier à l'apparition récurrente de résistances, des thérapies combinatoires sont utilisées, comme l'ACT (« Artemisinin-based combination therapy »). L'ACT repose sur l'utilisation combinée de deux molécules. L'une est dérivée de l'artémisinine, qui est extraite de la plante *Artemisia annua*, l'armoise annuelle. Ses dérivés les plus retrouvés sont l'artéméther et l'artésunate. La deuxième molécule est synthétique, par exemples la luméfantine et l'amodiaquine. Son rôle est d'amplifier les effets du dérivé de l'artémisinine et de retarder l'apparition de résistances. L'activation *in vivo* et le mode d'action de l'artémisinine sont controversés (Klonis *et al.*, 2013). Deux hypothèses principales sont proposées. L'artémisinine serait clivée par une voie dépendante de l'hème et la production de radicaux carbonés entraîne des dommages cellulaires. Alternativement, l'artémisinine serait activée par des ions ferreux ; elle provoquerait alors la peroxydation des lipides et la libération de dérivés actifs de l'oxygène. Dans les deux cas, la mort du parasite est provoquée par la production de molécules très réactives et instables. Pour la découverte des effets de cette molécule, le prix Nobel de Médecine et Physiologie 2015 a été remis au Dr Tu Youyou. Comme pour d'autres molécules, des résistances à l'artémisinine ont fait leur apparition récemment. Il est donc crucial d'identifier de nouvelles molécules antipaludiques et de nouvelles cibles (Antony et Parija, 2016).

Il n'existe pas encore de vaccin commercialisé, mais les recherches dans ce domaine sont très actives. Actuellement, plus de 20 vaccins candidats contre le paludisme à *P. falciparum* sont en phase d'évaluation clinique ou préclinique avancée (OMS, 2016). L'un d'eux, le vaccin RTS,S/AS01 a achevé l'évaluation de phase 3. Testé sur plus de 15000 enfants de sept pays d'Afrique Subsaharienne, il protège 51% des enfants au cours de la première année suivant la vaccination. Cependant, cette protection n'atteint plus que 26% après 3 ans. Comme illustré par

cet exemple, les tentatives d'établissement d'un vaccin rencontrent de nombreuses limitations : la protection établie est limitée dans le temps, et/ou ne couvre qu'un faible pourcentage des individus vaccinés.

Le cycle de vie du parasite, très complexe, est à l'origine des difficultés rencontrées. A chaque stade de développement, le parasite exprime des protéines, donc des antigènes différents, qui permettent entre autres au parasite d'échapper au système immunitaire. Les tentatives de vaccins basés sur l'injection de sporozoïtes (formes infectieuses du parasite transmises par la piqûre d'un anophèle infecté) atténués sont soit inefficaces, soit dangereuses. Cela est dû à la difficile maîtrise de l'atténuation par irradiation : trop forte, elle tue les sporozoïtes qui ne génèrent aucune réaction immunitaire ; trop faible, les sporozoïtes sont encore infectieux. La solution serait de générer des sporozoïtes mutés génétiquement pour pallier à ces problèmes. Une étude encourageante a été publiée dans ce sens (Shen *et al.*, 2016).

2. Les différents génomes de *Plasmodium*

Les parasites du genre *Plasmodium* possèdent une organisation interne spécifique : on y trouve notamment une mitochondrie unique, un apicoplaste et des organelles impliquées dans l'invasion des cellules-hôtes appelées micronèmes et rhoptries (**Figure 2**). L'apicoplaste est caractérisé par différentes voies de signalisation : la voie FASII de synthèse des acides gras (Shears *et al.*, 2015), la voie de synthèse des précurseurs d'isoprénoïdes, ainsi qu'une partie de la voie de synthèse de l'hème (Lim et McFadden, 2010). La présence de ces voies métaboliques rend l'apicoplaste essentiel chez *Plasmodium*.

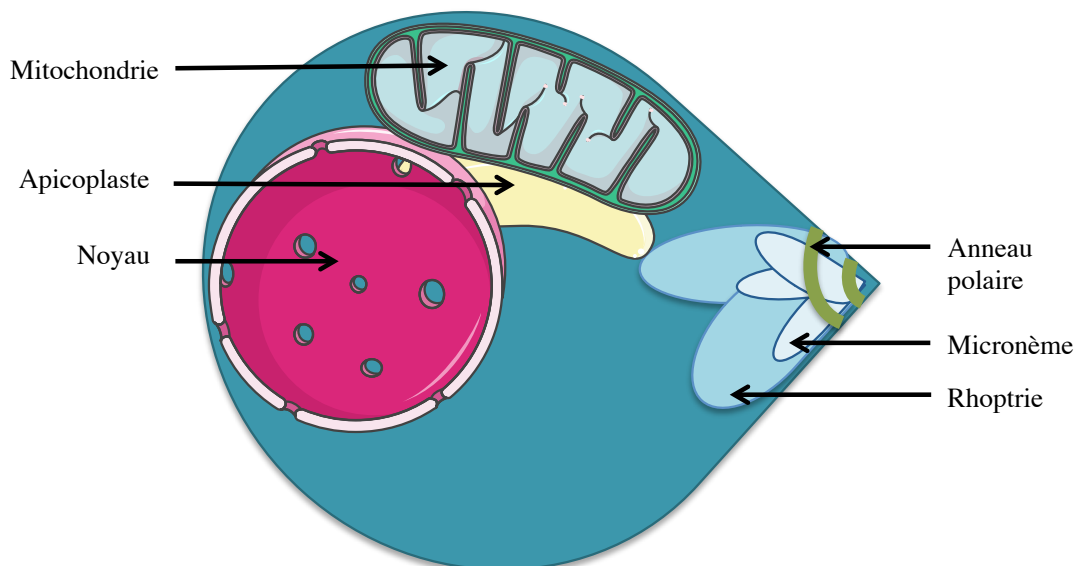


Figure 2 : Représentation schématique d'un mérozoïte de *Plasmodium*, la forme invasive des érythrocytes. Il dispose d'un noyau, d'une mitochondrie unique et d'un apicoplaste. Les anneaux polaires forment la pointe apicale. Les micronèmes et les rhoptries ont pour rôle de libérer les protéines nécessaires à l'invasion des cellules hôtes.

La biologie du parasite est orchestrée par trois génomes : les génomes nucléaire, mitochondrial et apicoplastique.

a. Le génome nucléaire

Le génome nucléaire de *Plasmodium*, haploïde sauf au stade de zygote, fait 22,8 Mb répartis en 14 chromosomes (Gardner *et al.*, 2002) et environ 5400 gènes de protéines ont été prédits. En comparaison, la levure *S. cerevisiae* possède un génome de 13 Mb pour 6600 gènes de protéines (Christie *et al.*, 2004). Ceci indique que la taille moyenne des gènes de protéines de *Plasmodium* est significativement supérieure à celle des gènes de l'organisme modèle *S. cerevisiae*. En effet, les protéines plasmodiales sont en moyenne plus longue que leurs homologues chez d'autres organismes à cause de la présence de nombreuses insertions. Ces insertions contiennent très peu d'acides aminés différents et sont donc appelées régions à complexité faible, ou LCR (« Low Complexity Regions », Pizzi et Frontali, 2001). Ces LCR représentent environ 35% du protéome (Singh *et al.*, 2004). Pour les espèces *P. falciparum*, *P. yoelii*, *P. berghei* et *P. chabaudi*, la composition des LCR reflète un biais pour les acides aminés codés par les bases A et T qui représentent environ 80% du génome : la lysine, le glutamate, l'aspartate et l'asparagine. Chez *P. vivax* et *P. knowlesi*, le pourcentage en GC est plus élevé et c'est l'alanine qui prédomine dans les LCR. D'une moyenne de 37 résidus (Zilversmit *et al.*, 2010), les insertions peuvent être difficilement rattachées à une fonction spécifique puisqu'elles sont retrouvées dans plus de 90% des protéines du parasite. Toutefois, il a été proposé que ces LCR pourraient avoir un rôle d'échappement au système immunitaire (Hughes, 2004) ou constituer des domaines d'interaction entre protéines (Karlin *et al.*, 2002). L'accumulation de ces insertions donne probablement un avantage au parasite. Cependant, leur présence est un obstacle pour identifier les similarités de séquences entre les protéines de *Plasmodium* et les protéines connues des autres organismes. En effet, seulement 40% des protéines plasmodiales ont une fonction prédite (Gardner *et al.*, 2002).

b. Le génome apicoplastique

L'apicoplaste est un organelle relique non photosynthétique présent chez tous les *Apicomplexa*. Chez *Plasmodium*, il a été acquis par endosymbiose secondaire durant laquelle l'ancêtre du parasite tel que nous le connaissons a absorbé et conservé une algue eucaryote (Foth et McFadden, 2003 ; Lim et McFadden, 2010 ; van Dooren et Striepen, 2013). Il est entouré de quatre membranes (Roos, 1999). Comme les autres plastides, l'apicoplaste possède son propre génome. Il est constitué de 35 kb d'ADN circulaire (**Figure 3**). Il contient des gènes codant pour une trentaine de protéines mais aussi pour les ARNr de la petite et de la grande sous-unité du ribosome, ainsi que pour un set complet de gènes d'ARNt. En conséquence, de

nombreuses protéines codées par le génome nucléaire (466 protéines prédites) sont importées dans l'apicoplaste (Foth *et al.*, 2003). Ceci se fait grâce à la présence d'un signal bipartite présent en amino-terminal de ces protéines.

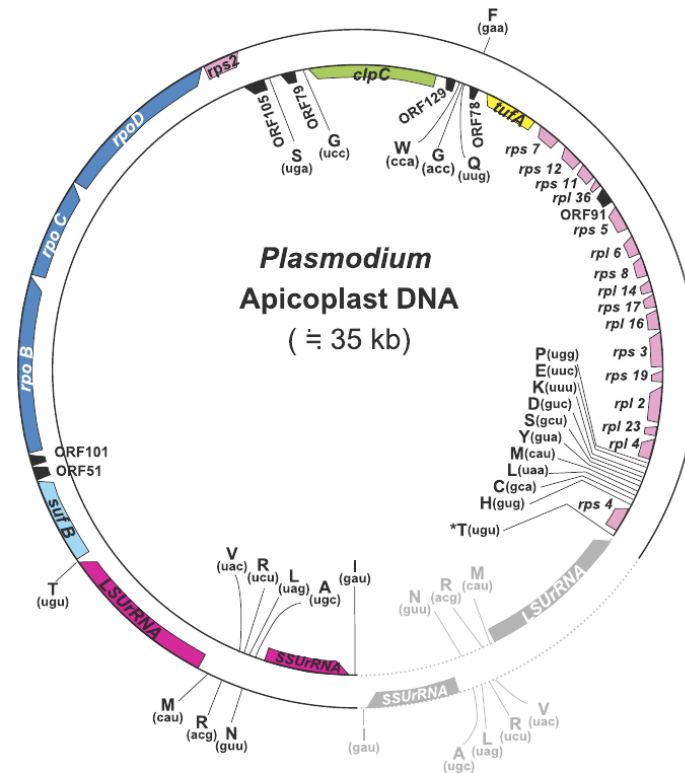


Figure 3 : Le génome apicoplastique de *Plasmodium*. Les gènes à l'extérieur du cercle sont transcrits dans le sens horaire, les gènes à l'intérieur dans le sens anti-horaire. Globalement, la même structure est retrouvée chez toutes les espèces, sauf la région dupliquée en gris clair qui est absente uniquement chez *P. chabaudi* (La figure est tirée de Arisue *et al.*, 2012).

Longtemps, les preuves d'une synthèse protéique apicoplastique n'étaient qu'indirectes : des particules ressemblant à des ribosomes avaient été observées dans l'apicoplaste (Roy *et al.*, 1999) et l'efficacité d'inhibiteurs de la traduction soupçonnés d'être actifs dans l'apicoplaste a été reportée par diverses études (Fichera et Roos, 1997 ; McConkey *et al.*, 1997 ; McFadden et Roos, 1999 ; Foth et McFadden, 2003). En 2005, la première preuve directe de l'existence d'une synthèse protéique apicoplastique a été apportée par l'identification du facteur d'élongation EF-Tu, produit du gène *tufA* (Chaubey *et al.*, 2005).

c. Le génome mitochondrial

Le génome mitochondrial de *Plasmodium* est exceptionnellement court. Ne faisant que 6 kb, il est le plus simple décrit à ce jour (Feagin, 2000, **Figure 4**). Il ne code que pour trois protéines de la chaîne de transport d'électrons : les sous-unités 1 et 3 de la cytochrome c oxydase, ainsi que le cytochrome b. La chaîne de transport d'électrons compte quatre complexes

protéiques appelés complexes I, II, III et IV. Le cytochrome b est la sous-unité principale du complexe III alors que la cytochrome c oxydase fait partie du complexe IV. Les trois protéines codées par le génome mitochondrial sont essentielles au fonctionnement de la mitochondrie, donc pour la survie du parasite. En conséquence, elles doivent être traduites ; cependant, il n'y a pas de preuve de traduction dans la mitochondrie de *Plasmodium* à ce jour.

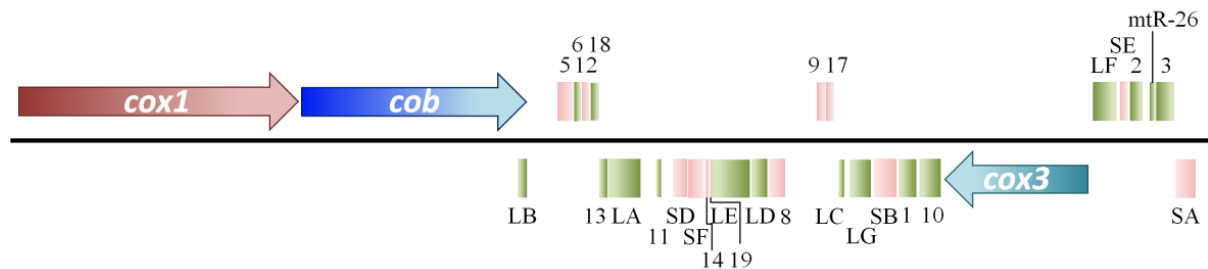


Figure 4 : Le génome mitochondrial des parasites *Plasmodium*. Les flèches épaisses représentent les trois gènes codant pour trois protéines : les sous-unités 1 et 3 de la cytochrome c oxydase (gènes *cox1* et *cox3*), ainsi que le cytochrome b (gène *cob*). Les zones vertes correspondent à des fragments d'ARNr de la grande sous-unité du ribosome, les zones roses à des fragments d'ARNr de la petite sous-unité du ribosome. La figure est tirée de Hikosaka *et al.*, 2013.

La mitochondrie est le compartiment où la synthèse protéique est la plus énigmatique. Les molécules indispensables à l'expression de son génome (ARNt, protéines ribosomales, aminoacyl-tRNA synthétases, facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction) doivent toutes être importées du cytoplasme (Jackson *et al.*, 2011). Comme pour les protéines adressées à l'apicoplaste, les protéines sont localisées à la mitochondrie par la présence d'un peptide signal situé à l'extrémité N-terminale des protéines. Le nombre total de protéines prédites adressées à la mitochondrie atteint 246, dont 148 avec un niveau de confiance intermédiaire ou haut (Gardner *et al.*, 2002). Parmi elles, on sait que les facteurs d'initiation de la traduction IF2A et IF3A ainsi que le facteur d'élongation EF-G sont importés dans la mitochondrie de *P. falciparum* alors qu'IF1 ne semble pas requis (Johnson *et al.*, 2011 ; Haider *et al.*, 2015). A priori, certaines aminoacyl-tRNA synthétases (aaRS) seraient ciblées à la fois vers l'apicoplaste et vers la mitochondrie (Gardner *et al.*, 2002). Un seul article présente l'import d'une aaRS, la PheRS, ainsi que de l'ARNt^{Phe} dans la mitochondrie de *Plasmodium* (Sharma et Sharma, 2015). Enfin, une quarantaine de protéines ribosomiques seraient importées dans la mitochondrie (Gupta *et al.*, 2014). Il a été proposé que les sous-unités du ribosome sont synthétisées dans l'apicoplaste puis importées dans la mitochondrie (Gupta *et al.*, 2014), mais ceci reste extrêmement spéculatif.

3. Description du cycle de *Plasmodium*

Le parasite suit un cycle de vie très complexe partagé entre son vecteur, l'anophèle femelle, et un hôte vertébré (**Figure 5**). Au fur et à mesure de sa progression chez ses hôtes, il

adopte différentes formes, appelées stades, chacune caractérisée par sa morphologie, son tropisme et son métabolisme.

a. Infection de l'hôte vertébré

Un individu est infecté par la piqûre d'un moustique femelle infecté. Le vecteur principal est *Anopheles gambiae*, mais d'autres espèces sont également vecteurs. Lors de la piqûre, le moustique prélève du sang contenant les nutriments nécessaires à la maturation de ses œufs. De manière concomitante, le moustique injecte de la salive dont les propriétés anticoagulante et anesthésique facilitent la prise du repas sanguin. Les sporozoïtes de *Plasmodium* présents dans les glandes salivaires sont alors inoculés dans le derme. Ils deviennent motiles et quittent le site d'inoculation en direction du foie par voie sanguine. Il s'ensuit la formation de schizontes hépatiques qui, à maturité, éclatent et libèrent des mérozoïtes dans le flux sanguin. Les mérozoïtes adhèrent aux érythrocytes et les envahissent (Koch et Baum, 2016). Le cycle sanguin peut alors commencer. Comme durant le cycle hépatique, le parasite se reproduit

Les mérozoïtes adhèrent aux érythrocytes et les envahissent (Koch et Baum, 2016). Le cycle sanguin peut alors commencer. Comme durant le cycle hépatique, le parasite se reproduit

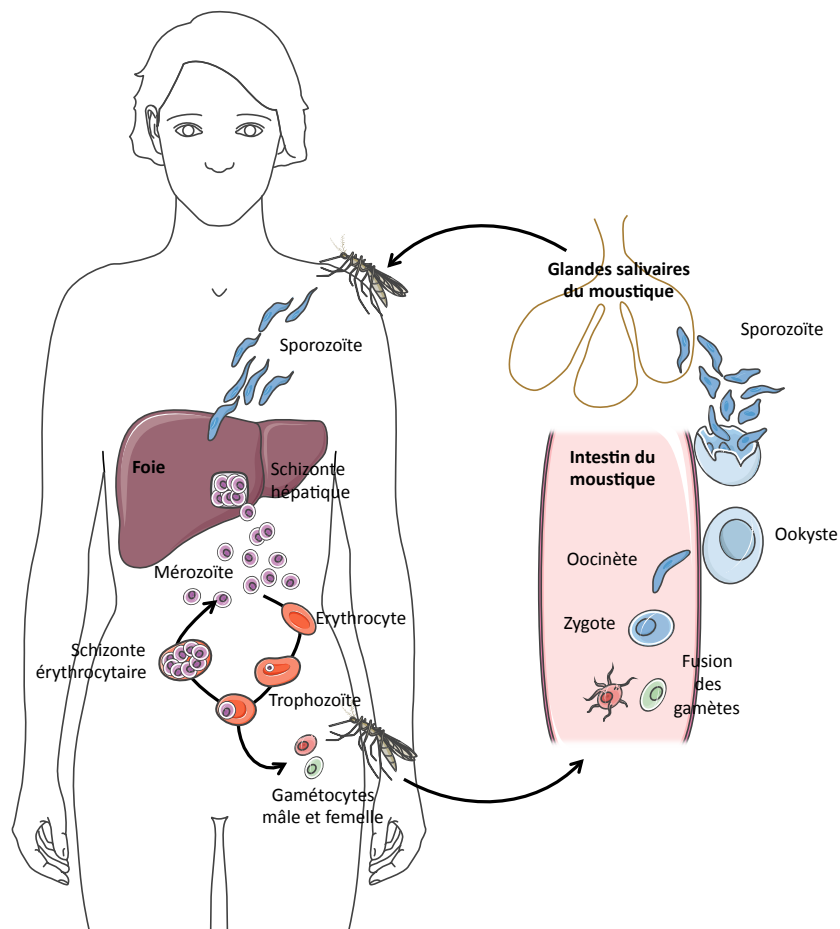


Figure 5 : Cycle de vie du parasite *P. falciparum*. Le développement de *Plasmodium* se partage entre son vecteur l'anophèle femelle (cycle de reproduction sexuée), à droite, et l'Homme (reproduction asexuée), à gauche. Chez l'Homme, le cycle de vie comporte deux grandes étapes : le cycle hépatique et le cycle érythrocytaire. Le nom de chaque stade de *Plasmodium* est indiqué.

de façon asexuée dans les hématies. La forme la plus jeune est le trophozoïte, qui mature en schizonte érythrocytaire où 8 à 16 mérozoïtes se développent. L'érythrocyte éclate et libère les mérozoïtes, prêts à entamer un nouveau cycle. Une petite proportion de trophozoïtes ne se différencie pas en schizonte mais en forme sexuée du parasite : les gamétocytes mâles et femelles (Josling et Ilinas, 2015 ; Guttery *et al.*, 2015). Il est connu que le stress est un facteur déclenchant la gamétocytogenèse, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas entièrement compris.

b. Infection de l'hôte invertébré

Lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté, un anophèle femelle ingère les multiples formes sanguines de *Plasmodium*. Stimulés par la baisse de température, l'augmentation du pH et la présence d'acide xanthurénique (Billker *et al.*, 1997 ; Billker *et al.*, 1998), les gamétocytes mâles exflagellent dans l'intestin du moustique pour favoriser la fusion avec les gamétocytes femelles. Les autres formes sanguines du parasite sont quant à elles digérées. Les zygotes formés deviennent des oocinètes mobiles qui quittent la lumière de l'intestin pour se réfugier derrière la lame basale. On parle alors d'ookystes, où une intense multiplication a lieu pour former des milliers de sporozoïtes. Les ookystes rompent et libèrent les sporozoïtes dans l'hémolymphe. Certains d'entre eux parviennent à traverser les cellules acineuses et à atteindre les canaux des glandes salivaires. En latence, les sporozoïtes sont prêts à poursuivre leur cycle, au moment où le moustique qu'ils parasitent les inoculera dans la peau d'un nouvel hôte.

c. Régulation de la traduction du parasite au cours du cycle de vie

Le besoin de coordonner l'expression de protéines à chaque étape du cycle de développement de *Plasmodium* est essentiel et révèle un programme moléculaire hautement régulé. Chez *Plasmodium*, la régulation de l'expression génique intervient principalement au niveau post-transcriptionnel (Cui *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2013a ; Vembar *et al.*, 2016). D'une part, cette hypothèse est confirmée par l'absence de facteurs de transcription spécifiques (Gardner *et al.*, 2002 ; Coulson *et al.*, 2004 ; Reddy *et al.*, 2015). D'autre part, il n'y a pas de corrélation entre le transcriptome et le protéome du parasite (pour 30% des gènes) (Bunnik *et al.*, 2013) ; en effet, on observe en moyenne un délai de 11 à 18 heures entre la transcription d'un ARNm et sa traduction en protéine (Le Roch *et al.*, 2004).

La régulation de la traduction joue un rôle majeur dans l'orchestration des événements développementaux du parasite, aux stades gamétocyte (sang) et sporozoïte (moustique) (Cui *et al.*, 2015). La phosphorylation de eIF2 (facteur d'initiation de la traduction) est un mécanisme de répression de la synthèse protéique globale (**Figure 6**). Chez *Plasmodium*, trois kinases spécifiques de la sous-unité α de eIF2 ont été identifiées : IK1, IK2 et PK4 (Ward *et al.*, 2004). IK1

et PK4 sont surtout exprimées durant la phase sanguine. PK4 est une protéine essentielle (Zhang *et al.*, 2010 ; Solyakov *et al.*, 2011) elle phosphoryle eIF2 α (en position S59) et inhibe ainsi la synthèse protéique aux stades schizontes et gamétocytes (Zhang *et al.*, 2012). Il a été proposé que PK4 serait activée suite à un stress nutritionnel provoqué par la consommation de la plupart de l'hémoglobine (Zhang *et al.*, 2012). D'une part, l'inhibition de la traduction chez les gamétocytes en fait des formes latentes, qui chez *P. falciparum* peuvent subsister dans le sang de patients plus d'un mois après l'élimination des formes sanguines asexuées (Bousema *et al.*, 2010). Cette dormance confère au parasite un bénéfice évident en vue de poursuivre son cycle dans le moustique. D'autre part, la diminution d'intensité de traduction chez les schizontes s'accompagne de la réplication de l'ADN nécessaire à la formation de nouveaux mérozoïtes. La kinase IK2 est principalement exprimée dans les sporozoïtes pour bloquer la traduction des parasites stockés dans les glandes salivaires du moustique (Zhang *et al.*, 2010). Une traduction active reprend lorsque le parasite est injecté à l'hôte vertébré par la déphosphorylation de eIF2 α , assurée par la phosphatase UIS2 (Zhang *et al.*, 2016a).

Les mécanismes de régulation peuvent également être plus ciblés. Ainsi, la protéine DOZI, une ARN hélicase, contrôle la stabilité de certains ARNm dans le gamétocyte femelle en formant

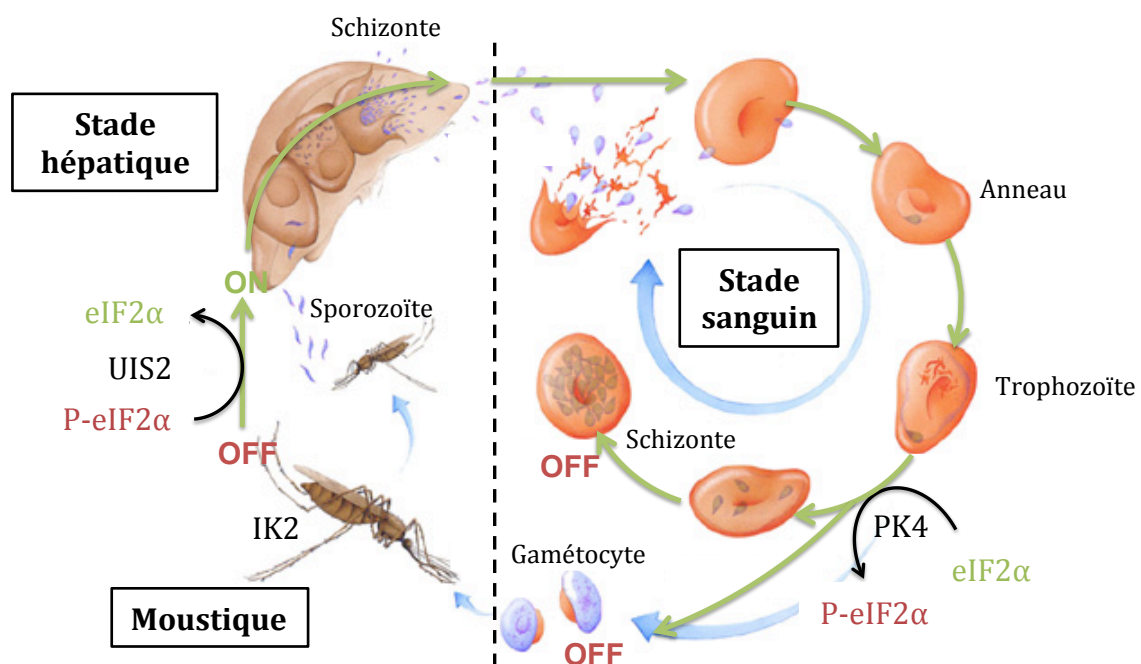


Figure 6 : Contrôle de la traduction de *Plasmodium* au cours du cycle de vie. Le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α est phosphorylé par PK4 au stade sanguin (P-eIF2 α) ce qui inhibe la traduction dans les schizontes sanguins et les gamétocytes. Au stade sporozoïte, dans le moustique, c'est la kinase IK2 qui maintient le statut phosphorylé d'eIF2 α et donc la répression de la traduction. Lorsque le sporozoïte est transmis à l'hôte vertébré, P-eIF2 α est déphosphorylé par UIS2, ce qui permet à la traduction de reprendre dans le parasite.

des complexes ribonucléoprotéiques où ces ARNm sont protégés de la dégradation (Mair *et al.*, 2006). La protéine Puf2 joue un rôle important chez les gamétocytes et les sporozoïtes. Chez *P. berghei*, sa délétion stimule la différenciation des stades sanguins sexués (Miao *et al.*, 2010) et provoque une métamorphose prématurée des sporozoïtes des glandes salivaires en formes arrondies évoquant les stades hépatiques (Müller *et al.*, 2011). Les cibles moléculaires de Puf2 sont des motifs structuraux des régions 5' et 3' UTR de deux ARNm Pfs25 et Pfs28, sa fixation bloquant leur traduction (Miao *et al.*, 2013).

4. Echanges moléculaires entre hôte et parasite

Au cours de son développement, de nombreuses interactions moléculaires s'établissent entre le parasite et ses hôtes en particulier pour le prélèvement des nutriments nécessaires au métabolisme du parasite. L'essentiel des connaissances acquises concernent le parasite au stade sanguin (Kirk et Saliba, 2007 ; Landfear, 2011). L'identification des voies de transport de nutriments dans *Plasmodium* constitue des pistes exploitables en vue de créer des thérapies, en bloquant ces voies ou en les utilisant pour faire pénétrer des molécules médicamenteuses. Ici, je présenterai quelques exemples d'échanges entre le parasite et son hôte en présentant les différentes membranes qui constituent cette surface d'échange.

La vacuole parasitophore englobe le parasite lorsqu'il envahit une cellule. C'est le contenu des rhoptries qui est impliqué dans sa biogenèse (Tufet-Bayona *et al.*, 2009), par la sécrétion de nombreux lipides et protéines venant s'ancrer dans la membrane probablement dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte (Spielmann *et al.*, 2012). La vacuole parasitophore est présente autour des formes intracellulaires en créant une niche favorable au développement du parasite (Tufet-Bayona *et al.*, 2009). C'est donc elle qui se situe à l'interface entre hôte et parasite pendant la croissance parasitaire au cours des stades sanguin et hépatique. Elle est criblée de canaux de transport de haute capacité et faible spécificité qui rendent cette membrane perméable à de nombreux petits solutés.

a. Le glucose

La consommation de glucose par un trophozoïte est cent fois plus élevée que celle d'un érythrocyte non infecté (Roth, 1987). En effet, la glycolyse est la source d'énergie majeure des stades sanguins de *Plasmodium* (Landfear, 2011). Le plasma constitue une source riche en glucose, qui est acheminé au travers de multiples membranes (**Figure 7**). Il doit d'abord traverser la membrane plasmique de l'hématie en utilisant le transporteur GLUT1 (Desai *et al.*, 1993) qui est un transporteur d'hexoses de haute capacité constitutivement exprimé par les hématies (Hruz et Mueckler, 2001). Le glucose traverse ensuite la membrane de la vacuole parasitophore grâce à un second transporteur de faible spécificité (Desai *et al.*, 1993) et passe au

travers de la membrane plasmique du parasite via le transporteur d'hexoses PfHT (Woodrow *et al.*, 1999). Malgré la succession d'étapes nécessaires au passage du glucose du plasma jusqu'à l'intérieur du parasite, le processus ne prend qu'une trentaine de secondes (Goodyer *et al.*, 1997). Le transporteur GLUT1 est également retrouvé dans les membranes des compartiments intracellulaires des hépatocytes. L'infection de la cellule par *Plasmodium* va modifier sa localisation : lors de la schizogonie hépatique, les transporteurs GLUT1 transloquent à la membrane plasmique des hépatocytes pour subvenir à la très importante demande en glucose du parasite (Meireles *et al.*, 2016).

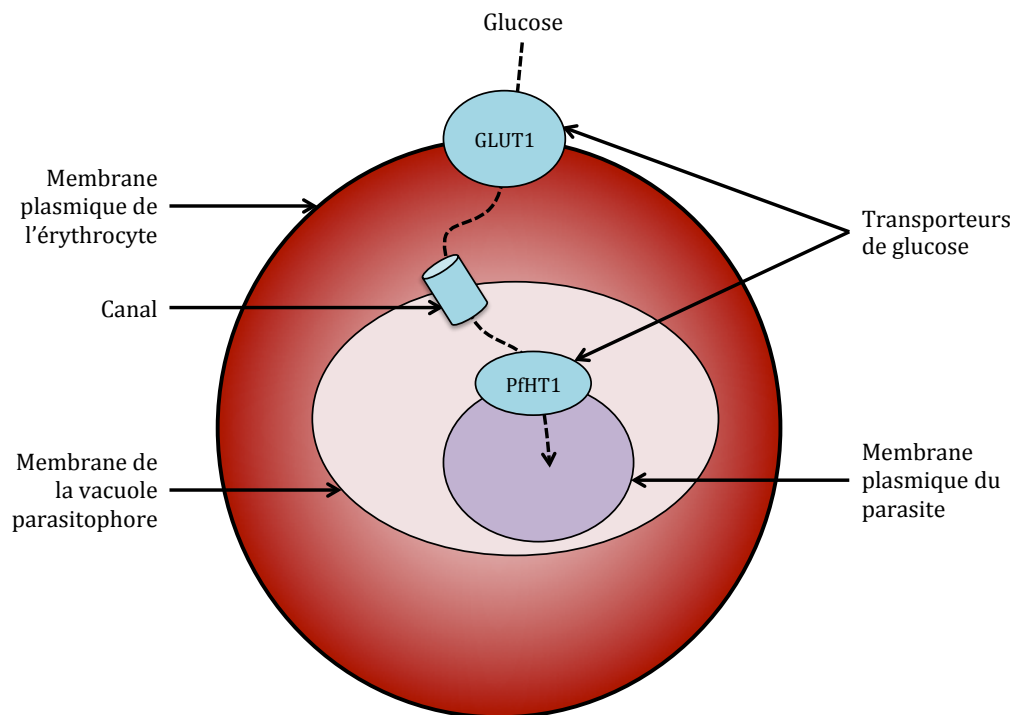


Figure 7: Prélèvement du glucose par le parasite *Plasmodium* intraérythrocytaire. Le glucose est prélevé dans le plasma. Il traverse la membrane de l'érythrocyte hôte, puis la membrane de la vacuole parasitophore et enfin la membrane plasmique du parasite via différentes protéines membranaires indiquées. La figure est inspirée de Landfear, 2011.

b. L'hémoglobine

L'hémoglobine est massivement consommée par les stades intra-érythrocytaires. C'est un mécanisme indispensable à la survie du parasite puisque son inhibition provoque l'arrêt de son développement (Francis *et al.*, 1996) Sa dégradation est un processus obligatoire pour le développement du parasite (Milani *et al.*, 2015). Il est connu depuis longtemps que l'hémoglobine est internalisée, principalement par les trophozoïtes matures, mais le mécanisme est caractérisé depuis peu. Ce sont des structures particulières appelées cytoosomes qui initient l'internalisation de l'hémoglobine (**Figure 8** ; Milani *et al.*, 2015). On dénombre un à quatre cytoosomes par globule rouge infecté. Ils sont localisés à l'interface entre la membrane

plasmique du parasite et la membrane de la vacuole parasitophore. Leur forme évoque un collier (on parle aussi de collier cytotosomal) qui, grâce à l'action concomitante du système actine-myosine, forme une vésicule contenant de l'hémoglobine. La vésicule ainsi formée est délimitée par une membrane double. Dans un deuxième temps, la membrane extérieure fusionne avec celle de la vacuole digestive grâce aux protéines SNARE (Milani *et al.*, 2015) pour n'en faire qu'une. La vésicule et l'hémoglobine qu'elle contient sont digérées par des lipases et des protéases de la famille des plasmepsines, des falcipaines et des aminopeptidases (Goldberg, 2005).

L'hémoglobine est une source d'acides aminés pour *Plasmodium*. Environ 16% du produit de sa digestion sont utilisés pour la synthèse des protéines du parasite. Comme l'hémoglobine est dépourvue d'isoleucine et constitue une source pauvre en méthionine, cystéine, glutamine et glutamate, le reste des acides aminés est prélevé dans le plasma (Krugliak *et al.*, 2002). Enfin, la digestion de l'hémoglobine libère l'hème qui est toxique pour *Plasmodium*. Celui-ci est alors converti en un pigment inerte appelé hémozoïne. La phagocytose de l'hémozoïne fait perdre leurs propriétés immunitaires aux phagocytes, contribuant ainsi à la pathogenèse du paludisme (Celada *et al.*, 1983).

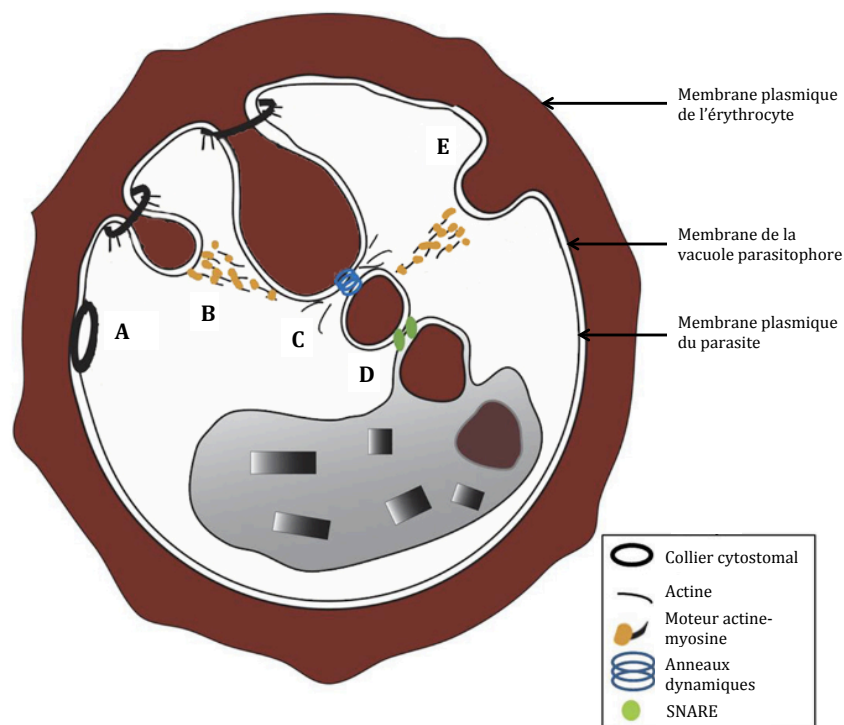


Figure 8 : Internalisation de l'hémoglobine par un trophozoïte érythrocytaire de *Plasmodium*. (A) Collier cytotomal à l'interface entre la membrane de la vacuole parasitophore et la membrane plasmique. (B) Naissance d'une vésicule contenant de l'hémoglobine par action de l'actine et du moteur actine-myosine. (C) Formation de la vésicule grâce aux anneaux dynamiques d'actine. (D) Fusion de la vésicule avec la vacuole digestive, impliquant les protéines SNARE. (E) Internalisation indépendante des colliers cytotomaux, par la formation d'un phagotrophe. La figure est tirée de Milani *et al.*, 2015.

c. Echanges de protéines : le translocon

La stratégie de survie du parasite implique également l'exportation de protéines parasitaires dans la cellule hôte à travers ces membranes (Elsworth *et al.*, 2014). Les protéines exportées contiennent un motif spécifique appelé « *Plasmodium* EXport ELement », ou PEXEL. Ces protéines jouent des rôles divers et sont essentielles dans les processus pathogènes. Les protéines PEXEL exportées sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique du parasite et passent à travers la membrane de la vacuole par l'intermédiaire d'une translocation protéique ATP-dépendante *via* le translocon d'export des protéines, ou PTEX (« *Plasmodium* translocon of exported proteins » ; de Koning-Ward *et al.*, 2009) (**Figure 9**). Ce complexe est d'origine parasitaire et réside à l'intérieur de la membrane de la vésicule parasitophore. Il est constitué de 5 protéines : HSP101, EXP2, TRX2, PTEX150 et PTEX88. HSP101 est un hexamère qui semble être le moteur central de la machine qui déplierait les protéines afin de les faire passer à travers un pore de membrane. L'identité du pore n'a pas été déterminée avec certitude, mais EXP2 est le

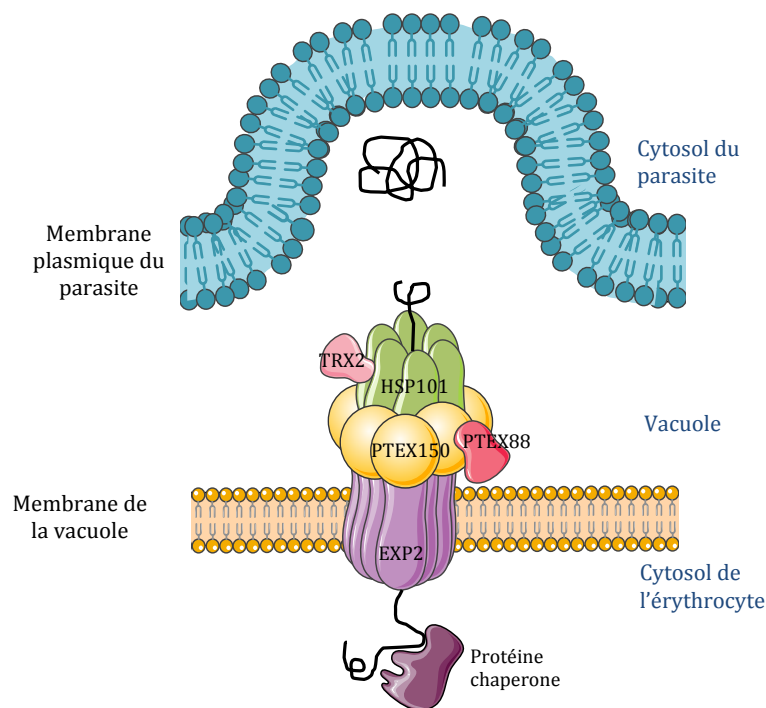


Figure 9 : Schéma représentant le translocon (PTEX) de *Plasmodium*. Les protéines parasitaires à exporter sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique du parasite et migrent vers la membrane plasmique par transport vésiculaire (non représenté). La vésicule fusionne avec la membrane plasmique du parasite, puis les protéines sont dépliées et transitent grâce au translocon à travers la membrane de la vacuole parasitophore. À ce jour, cinq protéines ont été identifiées dans le translocon et leur disposition hypothétique est montrée. Dans le cytosol de l'érythrocyte, l'export des protéines parasitaires est probablement assisté par des protéines chaperonnes de l'hôte. La figure est inspirée des publications Elsworth *et al.*, 2014 et AhYoung *et al.*, 2015.

candidat le plus probable pour un tel rôle. L'autre composante majeure de la machine PTEX est PTEX150, qui interagit étroitement avec HSP101. Ainsi la taille du complexe formé par les protéines HSP10, PTEX150 et EXP2 est d'au moins 1 mDa (Sanders *et al.*, 2007). PTEX88 et TRX2 sont des composants moins abondants de la machine PTEX et seraient plus impliqués dans la régulation du transport plutôt que dans un rôle structural fondamental. Une fois arrivées dans le cytosol de la cellule hôte, les protéines parasites sont repliées grâce à des protéines chaperonnes de l'hôte.

Un exemple d'export de protéine parasite vers l'hôte est l'export de la protéine de surface majeure du sporozoïte, la CSP (« circumsporozoïte protein ») (**Figure 10**). Lorsque le sporozoïte s'installe dans l'hépatocyte, la CSP est clivée et excrétée par le parasite, elle traverse la membrane de la vacuole parasitophore (motifs PEXEL) et pénètre dans le noyau de l'hépatocyte (signal bipartite de localisation nucléaire) pour moduler l'expression des gènes de l'hôte (Singh *et al.*, 2007). La translocation de la CSP dans le noyau de la cellule hôte inhibe la translocation et donc l'activité du facteur de transcription NF- κ B (« nuclear factor- κ B »). En conséquence, les gènes cibles de NF- κ B sont réprimés dans la cellule hôte infectée. Comme NF κ B est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire, le schizonte hépatique se développe sans déclencher la réponse inflammatoire de l'hôte infecté.

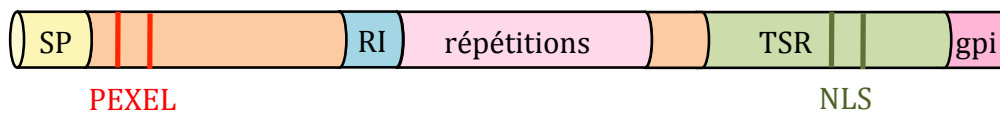


Figure 10 : Organisation modulaire de la protéine circumsporozoïte de *Plasmodium*. Les acronymes SP, RI, TSR et gpi signifient « peptide signal », région I, « Thrombospondin-like repeat » et « glycosylphosphatidylinositol » respectivement. Les deux traits rouges désignent les motifs d'export PEXEL à travers la vacuole parasitophore et les deux traits verts désignent le signal bipartite de localisation nucléaire (NLS). La figure est inspirée des publications de Aly *et al.*, 2009 et de Coppi *et al.*, 2011.

d. Autres échanges (sélection)

Comme beaucoup d'autres parasites unicellulaires, *Plasmodium* ne dispose pas des voies de synthèses des purines. Celles-ci sont prélevées dans le plasma, via les transporteurs érythrocytaires hENT1 et hFNT1 localisés dans la membrane de l'érythrocyte (Quashie *et al.*, 2008 ; Quashie *et al.*, 2010). Alors que le transporteur situé dans la membrane de la vacuole parasitophore n'est pas identifié, les purines utiliseraient la protéine PfNT1, une protéine à 11

domaines transmembranaires pour traverser la membrane plasmique du parasite (Carter *et al.*, 2000).

L'import du panthoténate (ou vitamine B5) est crucial. En effet, la privation du milieu en panthoténate provoque un arrêt complet de la croissance du parasite (Saliba *et al.*, 2005). Converti en coenzyme A, il est acheminé dans l'apicoplaste où il est utilisé pour la synthèse des acides gras du parasite (Saliba *et al.*, 1998). Son import requiert un mécanisme original utilisant une protéine parasitaire localisée à la membrane de l'érythrocyte qui n'a pas été encore identifiée. En revanche, le transporteur localisé à la membrane plasmique du parasite est connu, il s'agit de la protéine PfPAT (Augagneur *et al.*, 2013).

La choline est elle aussi importée depuis le plasma et est utilisée pour la synthèse des membranes du parasite.

B. Les ARNt

Les connaissances disponibles concernant les ARNt de *Plasmodium* sont limitées. Ils constituent pourtant un domaine de recherche attrayant étant donné l'importance de bien connaître les divers acteurs de la traduction chez un organisme dévastateur en vue de développer des traitements capables de l'inhiber spécifiquement. Plusieurs aspects sont intéressants dans ce contexte. On peut potentiellement inhiber le parasite à chacun de ses stades chez l'Homme : schizontes hépatique et érythrocytaire, mérozoïte, trophozoïte, et même gamétocyte afin d'empêcher une future transmission au moustique.

Certains acteurs de la traduction sont les cibles de molécules antipaludiques. Il existe des molécules inhibitrices de facteurs d'élongation de la traduction, comme les facteurs de traduction eEF2 (Baragaña *et al.*, 2015), et EF-G (Black *et al.*, 1985), les aminoacyl-ARNt synthétases ou encore les ARNr (Jackson *et al.*, 2011 ; Pham *et al.*, 2014 ; Khan, 2016). Bloquer spécifiquement la traduction de nature procaryotique de l'apicoplaste, par exemple en ciblant EF-Tu (Biswas *et al.*, 2011) offre en plus la possibilité de concevoir des molécules n'ayant pas d'activité délétère sur la physiologie du patient à traiter (Dahl et Rosenthal, 2008).

1. Place des ARNt dans la machinerie traductionnelle

Les ARNt sont de petits ARN non-codants ubiquitaires et essentiels, constitués de 75 à 95 nucléotides. Ces ARN sont des adaptateurs qui dirigent l'intégration des acides aminés. Ils sont chargés de façon spécifique par les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS), et, grâce à leur anticodon, décodent les codons présents dans l'ARN messager au sein du ribosome.

D'une part, 21 acides aminés sont transportés par les ARNt eucaryotes : les 20 acides aminés classiques et la sélénocystéine. D'autre part, il existe 64 combinaisons possibles de codons. En conséquence, plusieurs codons correspondent à un même acide aminé (redondance des codons, **Figure 11A**), ce qui implique l'existence d'ARNt « isoaccepteurs ». Les ARNt isoaccepteurs sont chargés par le même acide aminé mais décodent des codons différents. De plus, un même ARNt peut reconnaître plusieurs codons synonymes grâce au mode d'appariement non canonique appelé « Wobble ». Notamment, la base modifiée inosine est très importante car elle peut s'apparier avec l'uracile (U), l'adénine (A) et la cytosine (C). On la trouve fréquemment en première position de l'anticodon des ARNt (voir **Figure 11B**). Elle est formée par la désamination de l'adénosine, réaction catalysée par les enzymes ADAT (« Adenosine Deaminases Acting on tRNAs ») (Auxilien *et al.*, 1996).

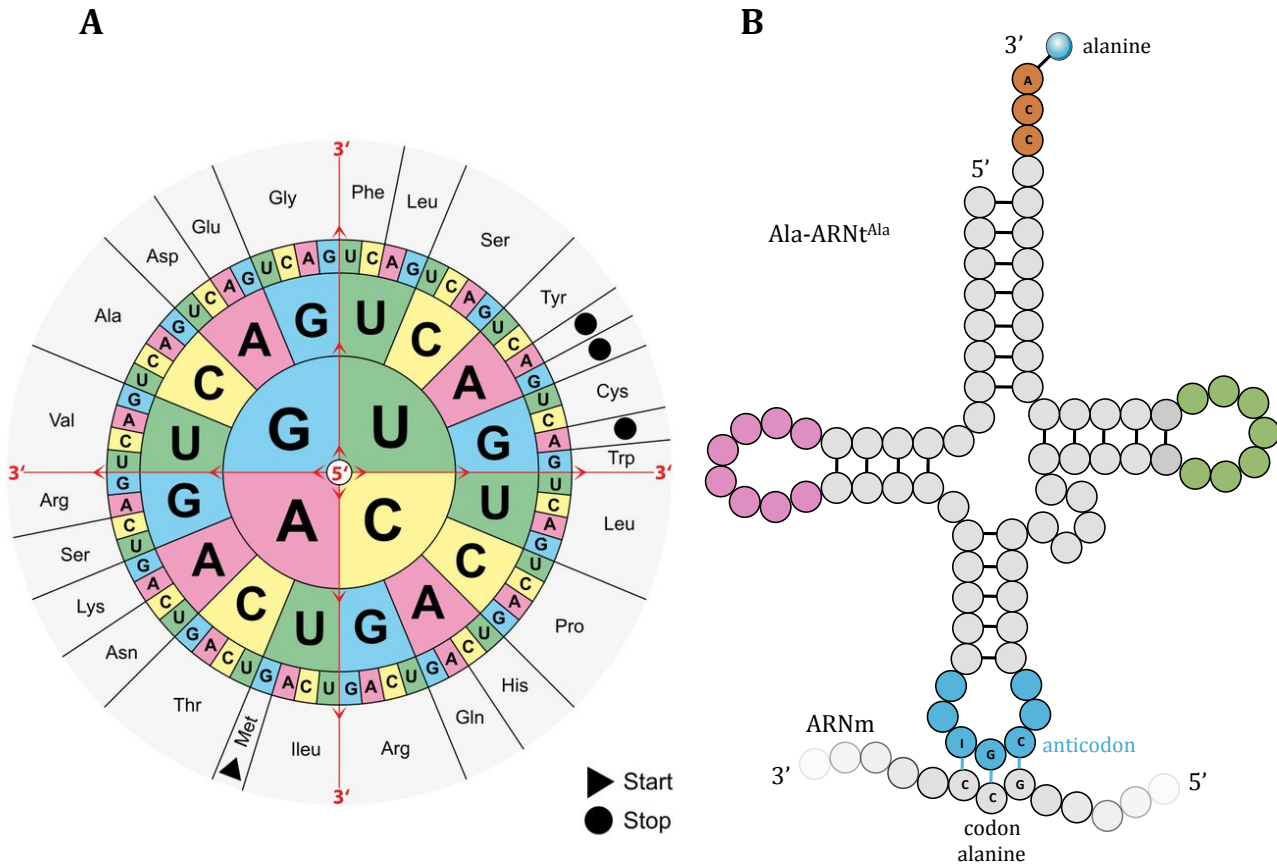


Figure 11 : Code génétique et appariement entre codon et anticodon. (A) Au centre, la première base du codon en 5', puis la deuxième et la troisième. La zone grise indique l'acide aminé correspondant par son code à trois lettres. **(B)** Un ARNm hybridé par l'alanyl-ARNt^{Ala}. L'anticodon alanine IGC lie le codon GCC de l'ARNm. L'alanine est liée par estérification à l'extrémité 3' de l'ARNt.

Chaque ARNt est porteur d'un acide aminé spécifique, fruit de la réaction d'estérification catalysée par une aaRS spécifique. L'aminocyl-ARNt (aa-ARNt) est acheminé au ribosome où a lieu la traduction. Les ribosomes, structures mixtes de protéines et d'ARNr, sont composés de deux sous-unités, une grande (L, « Large »), et une petite (S, « Small »). Leur taille et leur composition varient entre eucaryote et procaryote. Le coefficient de sédimentation du ribosome eucaryote est de 80S. Sa grande sous-unité (60S) est constituée de 49 protéines ribosomiques ainsi que de trois molécules d'ARNr : 5S, 5,8S et 28S. Sa petite sous-unité (40S) ne comporte qu'un seul ARNr, de 18S, et 33 protéines ribosomales. Au total, le ribosome eucaryotique fonctionnel compte donc quatre ARNr et plus de 80 protéines. Le ribosome procaryote est plus petit. La grande sous-unité (50S) est composée d'ARN 5S, 23S et de 34 protéines. La petite sous-unité (30S) compte l'ARNr 16S et 21 protéines. Chez *Plasmodium*, on trouve ces deux types de ribosomes : les ribosomes de type

eucaryote assurent la traduction cytosolique tandis que la traduction dans les organelles est assurée par les ribosomes de type procaryote (Gupta *et al.*, 2014).

L'expression des gènes d'ARNr cytosoliques de *Plasmodium* est différentielle selon le stade de son cycle de vie. Ils ont donc été classés en trois catégories : les ARNr de type A, spécifiques des cycles hépatique et sanguin, de type O, spécifiques de l'oocinète, et de type S, spécifiques du sporozoïte (Waters *et al.*, 1989).

La structure du ribosome cytosolique 80S de *P. falciparum* a été étudiée par cryo-microscopie électronique, liée à une molécule antipaludique, l'émétine (Wong *et al.*, 2014), ou à un ARNt (Sun *et al.*, 2015). Elle a permis de schématiser l'ensemble des ARNr ainsi que 74 protéines (44 dans la grande sous-unité et 30 dans la petite sous-unité). Alors que le cœur structural du ribosome est conservé, des caractéristiques spécifiques de *P. falciparum* ont été révélées, notamment de grandes expansions à la périphérie de l'ARNr 18S. Ces particularités illustrent la diversité structurale des ribosomes eucaryotes et offrent la possibilité de concevoir des molécules inhibitrices spécifiques.

Plusieurs facteurs de traduction des trois compartiments de synthèse protéique ont été identifiés chez *Plasmodium* : des facteurs d'initiation, comme eIF-5A (Molitor *et al.*, 2004), eIF-4E (Shaw *et al.*, 2007), eIF-1, eIF-2 et eIF-3 (Haider *et al.*, 2015), des facteurs d'élongation, comme EF-1 α , EF-1 β , EF1 δ , EF-1 γ (Takebe *et al.*, 2007), EF-2 (Baragaña *et al.*, 2015), EF-Tu (Chaubey *et al.*, 2005), EF-G (Gupta *et al.*, 2013a), des facteurs de terminaison de la traduction (Vaishya *et al.*, 2016) et des facteurs de recyclage du ribosome (Gupta *et al.*, 2013b). Ils interviennent à chaque étape de la traduction qui se résume de la façon suivante : la reconnaissance du codon d'initiation AUG par le complexe eIF2/ARNt^{Met} initiateur initie la traduction sur la petite sous-unité du ribosome. La grande sous-unité contient les trois sites de liaison des ARNt aminoacylés qui permettent l'élongation : les sites A (pour « accepteur »), P (pour « peptidyl-ARNt »), et E (pour « exit »). L'aminoacyl-ARNt (aa-ARNt) est déposé dans le site A du ribosome par le facteur d'élongation eEF1A. La réaction de transpeptidation est catalysée au niveau du centre peptidyl transférase de l'ARNr 28S. Elle permet de former une liaison peptidique entre le COOH du peptide naissant qui estérifie l'extrémité 3' OH de l'ARNt fixé dans le site P et la fonction NH₂ de l'acide aminé lié à l'ARNt fixé dans le site A. Après formation de cette liaison peptidique, l'ARNt déchargé contenu dans le site P et le peptidyl-ARNt contenu dans le site A sont transloqués vers le site de sortie E et P, respectivement. Cela se fait grâce à l'hydrolyse du GTP fixé sur le facteur eEF2 présent dans le site A du ribosome. La terminaison a lieu lorsque le ribosome rencontre un des 3 codons stop (UUA, UGA ou UAG).

2. Biosynthèse et maturation des ARNt

Chez *S. cerevisiae*, les ARNt nécessitent plus de 100 enzymes différentes pour être transcrits, maturés, modifiés et localisés (Hopper, 2013). Le promoteur des gènes d'ARNt est interne à leur séquence. Il se trouve au niveau des bases 8 à 19 et 52 à 62. Après transcription par l'ARN polymérase III, les ARNt subissent diverses étapes de maturation qui impliquent (i) la RNase P qui clive l'extension du pré-ARNt en 5', (ii) la RNase Z qui mature l'extrémité 3' en aval de la base discriminatrice (Mörl et Marchfelder, 2001) et (iii) la CCCase qui ajoute les trois bases CCA en 3' (Wolfe *et al.*, 1996). Chez les eucaryotes, cette dernière étape est nécessaire pour obtenir un ARNt fonctionnel, contrairement aux procaryotes où l'extrémité CCA est codée par le gène. Certains ARNt possèdent des introns qui sont épissés. Chez la levure c'est le cas de 22% des ARNt (Chan et Lowe, 2009). L'épissage est effectué par le complexe SEN (Trotta *et al.*, 1997). Chez *Plasmodium*, deux ARNt contiennent un intron : il s'agit des l'ARNt^{Tyr}(GUA) cytosolique et ARNt^{Leu}(UAA) apicoplastique.

Enfin, certains nucléotides des ARNt sont modifiés. Par exemple, la base en position 55 de l'ARNt, dans la boucle T, est une pseudouridine strictement conservée. La formation de cette base est catalysée chez les eucaryotes par les pseudouridine synthases Pus4 et Pus10 (Watanabe et Gray, 2000 ; McCleverty *et al.*, 2007). De même, la formation de la dihydrouridine, présente dans la boucle D aux positions 16, 17 et 20, est catalysée par les protéines Dus (dihydrouridine synthases). Au total, chez la levure, 25 modifications différentes sont trouvées sur les ARNt, et une molécule d'ARNt possède en moyenne 12 bases modifiées (Phizicky et Hopper, 2010). Le rôle d'une partie de ces modifications a été identifié. La plupart d'entre elles sont impliquées dans la stabilisation de la structure de l'ARNt. Par exemple, la méthylation du nucléotide A9 de l'ARNt^{Lys} mitochondrial humain est essentielle car en empêchant son interaction avec U64 elle permet le repliement correct de l'ARNt (Helm *et al.*, 1998).

Les modifications des ARNt de *Plasmodium* n'ont pas été clairement démontrées, mais l'identification de gènes codant pour des enzymes de modification suggère fortement que les ARNt sont modifiés comme chez les autres organismes. Par homologie de séquence, un homologue de Pus4 a été trouvé chez *P. falciparum*, et deux protéines Dus ont été retrouvées en recherchant des protéines homologues aux Dus humaines et de levure (Thèse de Tania Bour, 2009).

Les ARNt sont des molécules très stables dont la demi-vie varie de plusieurs heures à quelques jours (Phizicky and Hopper, 2010). Elles sont dégradées, soit de 3' en 5' par l'exosome nucléaire et le complexe TRAMP (Kadaba *et al.*, 2004 ; Vanacova *et al.*, 2005), soit de 5' vers 3' par la voie Rapid tRNA Decay (Alexandrov *et al.*, 2006 ; Chernyakov *et al.*, 2008).

3. Fonctions des ARNt

a. Aminoacylation

Comme je viens de l'évoquer, les ARNt sont principalement substrats des aaRS, enzymes spécialisées dans la réaction d'aminacylation. Cette réaction se déroule en deux étapes. En présence d'ATP, l'acide aminé est activé sous la forme d'un aminoacyl-AMP par l'aaRS homologue. Dans un deuxième temps, l'acide aminé activé est transféré sur l'ARNt par la formation d'une liaison ester reliant l'extrémité 3'OH de l'ARNt au groupement COOH de l'acide aminé. La reconnaissance des ARNt par les aaRS repose sur un nombre réduit de signaux dispersés dans la structure des ARNt appelés éléments d'identité. Ce sont le plus souvent des nucléotides ou des modifications de nucléotides qui sont reconnus spécifiquement par l'aaRS homologue, ou, à l'inverse qui bloquent la reconnaissance de cet ARNt par une ou plusieurs aaRS hétérologues (évitant ainsi la charge de l'ARNt par un acide aminé incorrect). Il est ainsi possible de charger de l'ARNt^{Phe} de levure avec de l'aspartate en insérant les déterminants d'identité de l'ARNt^{Asp} U25, U35, C36 et G73 (Pütz *et al.*, 1991), et la méthylation du G37 de l'ARNt^{Asp} de levure le prévient d'une misacylation par l'arginine (en bloquant la reconnaissance de l'ARNt^{Asp} par l'arginyl-ARNt synthétase) (Pütz *et al.*, 1994).

b. Autres fonctions

Certains ARNt, qu'ils soient aminoacylés ou non, remplissent d'autres fonctions que celle du décodage des codons. Ces mécanismes ont été caractérisés en particulier chez les bactéries (Raina et Ibba, 2014). Par exemple, chez *B. subtilis*, l'ARNt non aminoacylé se lie à la T-box présente à l'extrémité 5' de l'ARNm de l'aaRS homologue en cours de transcription. Cette interaction facilite la formation d'une structure « anti-terminaison » en 3' et permet ainsi la transcription efficace du gène (Green *et al.*, 2010). Il est aussi connu que la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire des bactéries fait intervenir des ARNt chargés, ainsi que l'aminacylation des phospholipides membranaires, la biogenèse d'antibiotiques (Raina et Ibba, 2014)... Chez les eucaryotes, il a été proposé que les ARNt pourraient réguler l'expression des gènes (Shaheen et Hopper, 2005 ; Whitney *et al.*, 2007 ; Hurto *et al.*, 2007 ; Rudinger-Thirion *et al.*, 2011 ; Chu et Hopper, 2013). De plus, le rôle des fragments d'ARNt dans la régulation de l'expression génique ouvre des perspectives particulièrement intéressantes. Cette problématique et les conséquences sur les perspectives de mon travail seront développées dans la partie Conclusions et perspectives de ce manuscrit.

4. Structure des ARNt

En deux dimensions, la séquence d'ARNt prend la forme d'un trèfle (**Figure 12A**). On distingue cinq domaines : le bras accepteur, le domaine D, le domaine anticodon, la région variable et le domaine T. Certaines caractéristiques sont conservées, semi-conservées, ou bien spécifiques d'un organisme (Giegé et Frugier, 2003).

Chez tous les ARNt cytosoliques, la taille du bras accepteur ainsi que des branches anticodon et T sont strictement conservées. Le bras accepteur compte sept paires de bases ainsi que quatre bases non appariées (la séquence CCA conservée en 3' et la base précédente en position 73 appelée discriminatrice). Les branches du domaine anticodon et du domaine T comportent chacune cinq paires de bases. La boucle T compte plusieurs résidus conservés : G53, T54, Ψ55, C56, A58 et C61 ; et des résidus semi-conservés : R57 et Y60. Dans le domaine anticodon, les résidus conservés sont Y32 et R38. C'est par le domaine anticodon, constitué des nucléotides en position 34 à 36, que l'ARNt hybride l'ARNm.

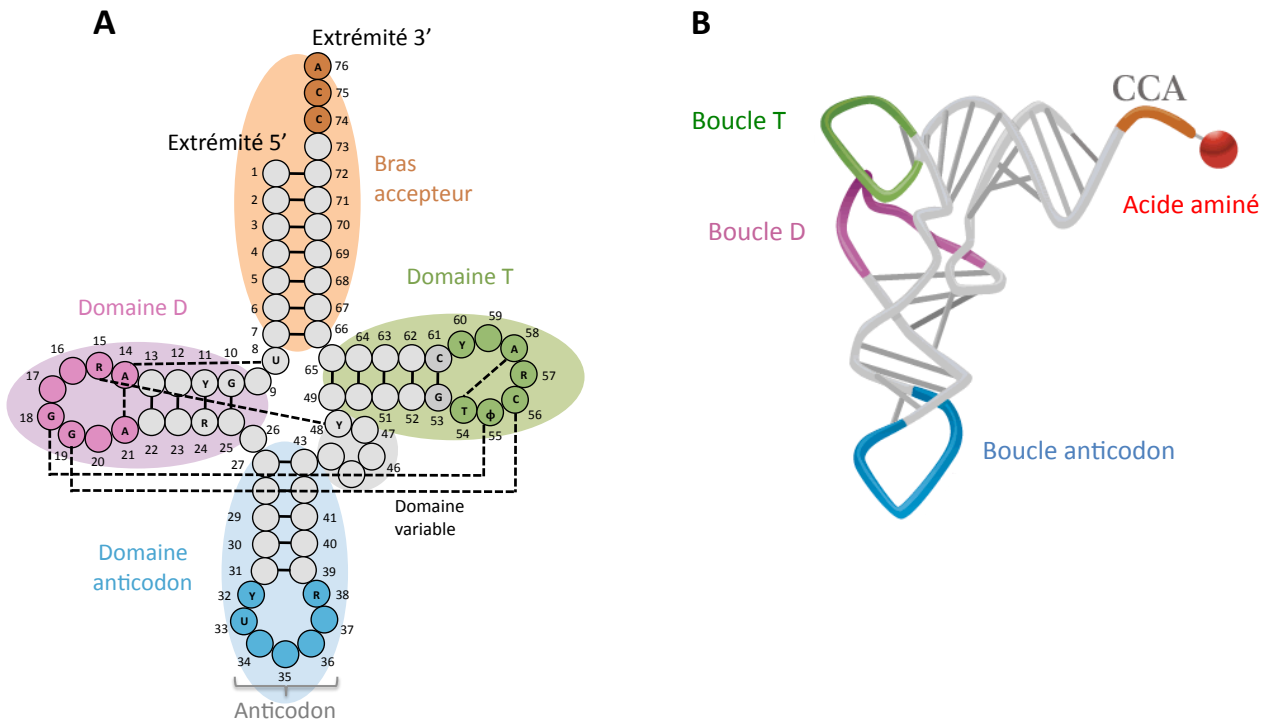


Figure 12 : Représentations schématiques de la molécule d'ARNt. (A) Structure en deux dimensions, montrant la forme en feuille de trèfle. Les liaisons indiquées en pointillé permettent le repliement tridimensionnel. Les lettres Ψ, Y et R indiquent respectivement une pseudouridine, une pyrimidine et une purine. (B) Structure tertiaire en forme de L. L'acide aminé est lié à l'extrémité 3' CCA de l'ARNt. © Université de Tokyo

Deux domaines sont de taille variable : la boucle D et la région variable, qui peuvent contenir des bases supplémentaires. Les résidus conservés trouvés dans la boucle D sont A14, G18, G19 et A21, et la région variable comporte toujours la base Y48. Les résidus semi-conservés du domaine D sont Y11, R15 et R24. La longueur de la région variable, qui peut atteindre jusqu'à 23 nucléotides, est à l'origine du classement des ARNt (Rich et RajBhandary, 1976). Les ARNt dits de classe 1 ont une région variable de 4 à 5 nucléotides. Les ARNt de classe 2 contiennent une longue région variable qui peut atteindre 23 nucléotides (ARNt^{Leu} et ARNt^{Ser} chez les eucaryotes).

Dans sa conformation tridimensionnelle, l'ARNt prend la forme de la lettre L (**Figure 12B**), impliquant des interactions tertiaires entre les résidus conservés des boucles D et T : U8-A14, A14-A21, R15-Y48, G18-Ψ55, G19-C56, T54-A58 (**Figure 12A**). Le coude de l'ARNt, formé par les interactions entre boucles D et T, est reconnu par de nombreuses protéines et ARN (revu par Zhang et Ferré-D'Amaré, 2016b). La conservation de sa structure permet par exemple aux ARNt d'être liés par l'ARNr 23S, la ribonucléase P, la CCCase...

La première structure à avoir été déterminée, par rayons X, est celle de l'ARNt^{Phe} de *S. cerevisiae* (Kim *et al.*, 1974). Depuis, de très nombreuses structures d'ARNt ont été résolues (Giegé *et al.*, 2012). Le bras accepteur ainsi que la boucle anticodon sont d'une importance cruciale dans la spécificité de l'aminoacylation par les aaRS : les déterminants d'identité y sont préférentiellement localisés. Ils sont très importants car la fidélité de la traduction en dépend.

Les ARNt de *Plasmodium* ne sont pas étudiés de façon approfondie. On ignore par exemple beaucoup sur leurs modifications et les enzymes impliquées. Néanmoins, leurs gènes ont été annotés et leurs séquences déterminées. Ils ressemblent en tout point aux ARNt canoniques que je viens de présenter.

5. Les gènes d'ARNt et possibles conséquences sur la traduction chez *Plasmodium*

a. Un nombre de gènes d'ARNt réduit

Habituellement, les génomes contiennent les gènes d'ARNt en copies multiples, à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes. Le nombre de copies de gènes d'une même espèce d'ARNt varie grandement d'un organisme à un autre (Marck et Grosjean, 2002) : certaines espèces d'ARNt peuvent être complètement absentes du génome de certains groupes d'organismes alors que d'autres prédominent largement. Cependant, ce n'est pas le cas chez *Plasmodium* où chaque ARNt est codé par un gène unique. Ainsi, *Plasmodium* possède un jeu minimal d'ARNt (46 gènes), mais suffisant pour décoder son génome (Gardner *et al.*, 2002). Par exemples, la levure *Saccharomyces cerevisiae* (avec une taille de génome comparable) code pour 286 gènes d'ARNt et *Homo sapiens* pour

plus de 500 gènes d'ARNt (**Figure 13**).

Il est surprenant de trouver si peu de gènes d'ARNt chez un organisme comme *Plasmodium* qui se multiplie intensément au cours de certaines étapes de son cycle de vie, telles que la schizogonie dans le stade hépatique ou la sporogénèse dans l'ookyste (voir le paragraphe 3 de la partie A). Dans ces conditions, il est légitime de se poser la question suivante : est-ce qu'une quantité limitante de gènes d'ARNt peut moduler l'efficacité de la synthèse protéique dans *Plasmodium* ?

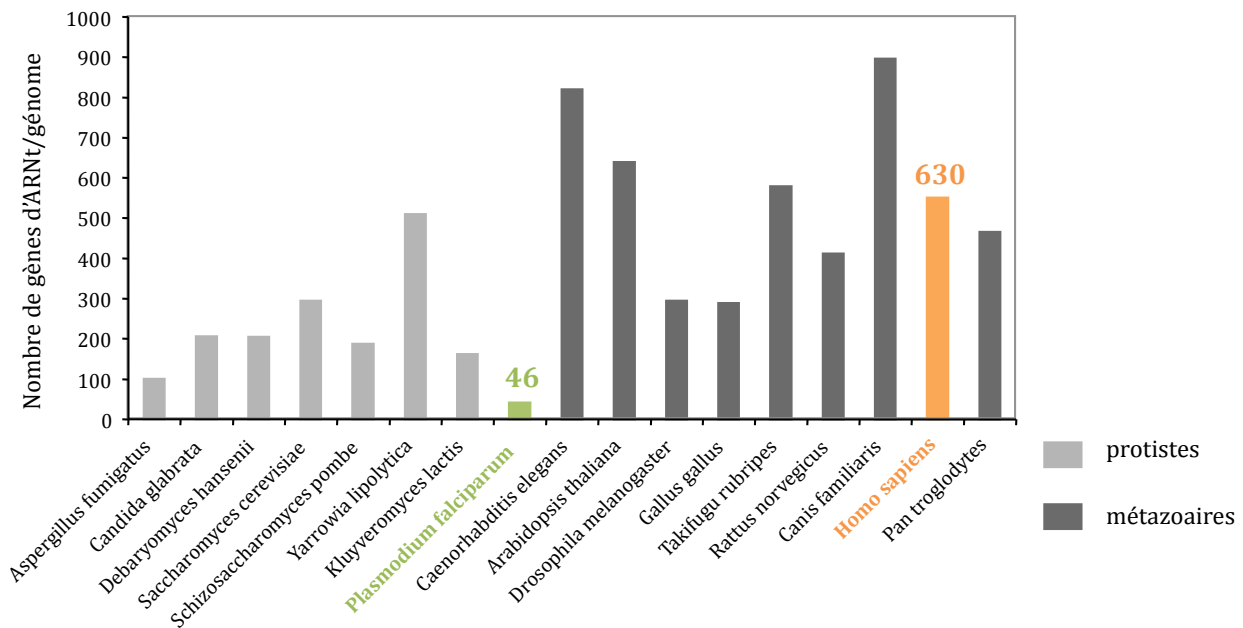


Figure 13 : Quantité de gènes d'ARNt chez divers organismes. *Plasmodium* est une exception parmi les eucaryotes par l'absence de copies de gènes d'ARNt. Les données ont été extraites de la genomic tRNA database (<http://gtrnadb.ucsc.edu/>).

b. Le cas particulier de l'ARNt^{Asn} et le décodage des LCR

En règle générale, la fréquence d'utilisation d'un codon est corrélée avec le nombre de copies de gènes de l'ARNt correspondant (Tuller *et al.*, 2010a). En d'autres termes les ARNt codés par le plus grand nombre de copie de gènes sont les ARNt les plus exprimés et sont ceux qui décodent les codons les plus abondants dans le génome. Ces observations ont des implications majeures concernant l'efficacité de la traduction (Cannarozzi *et al.*, 2010 ; Tuller *et al.*, 2010b). Ainsi, la disponibilité des ARNt peut moduler la vitesse de traduction du ribosome (Zhang *et al.*, 2009). La présence d'une copie de gène unique pour chaque ARNt de *Plasmodium*, il apparaît qu'il n'y a pas de corrélation entre l'abondance des ARNt et l'usage des codons dans cet organisme.

L'ARNt^{Asn} est l'un des ARNt les plus sollicités dans la traduction des gènes de *Plasmodia* (avec l'ARNt^{Ile} et l'ARNt^{Lys}). Chez *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. falciparum*, il a été montré que les codons asparagine forment des répétitions et sont concentrés dans les LCR des gènes de protéines (1,8 ; 2,4 et 1,9 fois, respectivement) (DePristo *et al.*, 2006), suggérant que le besoin en ARNt asparaginylés serait augmenté localement pour décoder ces régions. Ainsi, l'utilisation excessive des codons asparagine dans les gènes de protéines des *Plasmodia* implique que l'ARNt^{Asn} est un ARNt peu disponible (Filisetti *et al.*, 2013). Or, une vitesse de traduction réduite a à son tour un effet positif sur la qualité du repliement co-translationnel des protéines (Tsai *et al.*, 2008 ; Marin, 2008).

Lorsque la vitesse de traduction est réduite, la partie N-terminale de la protéine peut se replier indépendamment de la partie C-terminale et ainsi favoriser la production d'une protéine repliée correctement, soluble et active. Ainsi, chez *Plasmodium*, la rareté de l'ARNt^{Asn} (en particulier) permettrait de ralentir la vitesse de décodage du ribosome dans les LCR qui colonisent abondamment les protéines du parasite (Frugier *et al.*, 2010) et permettre le repliement co-translationnel des protéines du parasite (**Figure 14**).

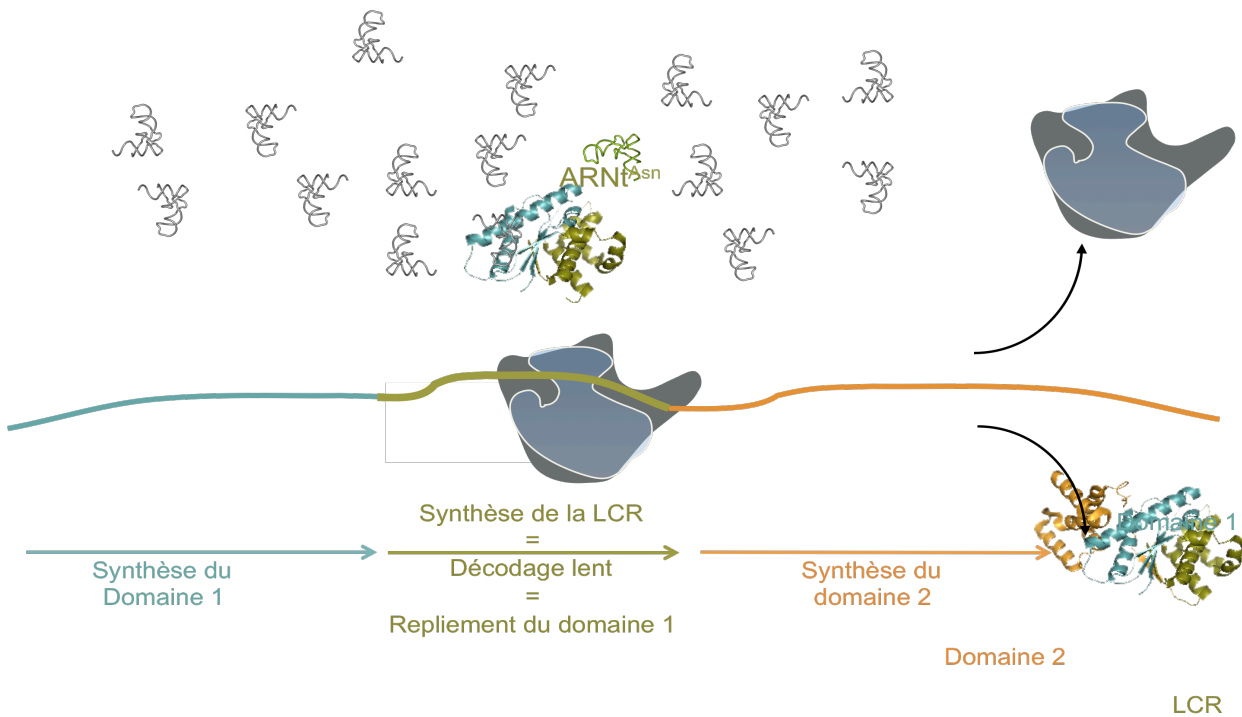


Figure 14 : Les LCR agissent comme des éponges à ARNt^{Asn}. Résumé du concept décrit dans (Frugier *et al.*, 2010). Au cours de la traduction d'une protéine constituée de plusieurs domaines structuraux, la concentration limitante en ARNt^{Asn} dans *Plasmodium* ralentit le ribosome lorsqu'il décode la portion d'ARNm correspondant à une LCR riche en asparagines (en vert). Ce processus donne du temps au premier domaine (en bleu) de se replier indépendamment, avant la synthèse du second domaine (en orange).

L'ensemble de ces observations a amené mon équipe à proposer que le parasite pourrait, dans certaines conditions, utiliser les ARNt de l'hôte pour sa propre synthèse protéique. Si les ARNt de l'hôte peuvent être substrats des aaRS homologues du parasite, leur import pourrait compenser le déficit de certains ARNt du parasite, en particulier d'ARNt^{Asn}, et ainsi aider la synthèse des protéines contenant de longues répétitions d'asparagines (**Figure 14**). Deux observations semblent conforter cette hypothèse : (i) les séquences d'ARNt de *Plasmodia* contiennent une proportion de G et C similaire à ce qui est retrouvé chez les ARNt de vertébrés, alors que leurs génomes sont très riches en A et T (Pütz *et al.*, 2010) et (ii) les éléments d'identité qui gouvernent la reconnaissance spécifique des ARNt par leur aminoacyl-ARNt synthétase homologue sont globalement conservés entre les vertébrés et les *Plasmodia*.

Cette hypothèse originale implique l'import des ARNt de l'hôte. Cependant, aucun exemple d'import d'ARNt d'une cellule à une autre n'est connu. Seuls des mouvements d'ARNt intracellulaires ont été caractérisés jusqu'à présent. En effet, l'ARNt est synthétisé dans le noyau et est utilisé dans le cytosol. Depuis le cytoplasme, les ARNt peuvent également être importés dans les organelles. La capacité des ARNt à changer de compartiment cellulaire et les machineries moléculaires impliquées sont détaillées dans la partie C de cette introduction.

C. Circulation intracellulaire des ARNt

De multiples paramètres influent sur la localisation d'un ARNt : son état de maturation, d'aminocyclation, la présence de modifications. Autant de facteurs rendent difficile l'obtention d'une vue claire sur l'import et l'export des ARNt. Plusieurs mécanismes d'import et d'export des ARNt coexistent au sein d'une même cellule (**Figure 15**). Ils font intervenir différentes voies qui sont soit concertées, soit indépendantes. Si une voie est inhibée, une voie de substitution peut être utilisée pour ne pas mettre la vie de la cellule en péril.

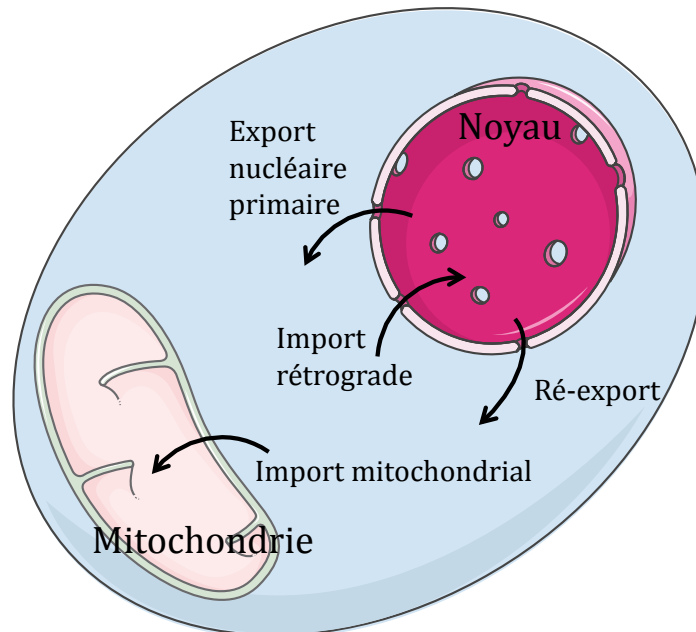


Figure 15 : Vue générale des mouvements d'import et d'export des ARNt dans une cellule eucaryote. Les mouvements nucléo-cytoplasmiques font intervenir les pores de l'enveloppe nucléaire alors que l'import mitochondrial fait intervenir des canaux plus spécifiques situés aux membranes externe et interne.

Les ARNt sont transcrits dans le noyau alors que la traduction a lieu dans le cytoplasme et dans la mitochondrie. Ainsi l'export nucléaire primaire et l'import mitochondrial sont indispensables (Hopper et Shaheen, 2008 ; Rubio et Hopper, 2011). Les ARNt sont aussi relocalisés dans le noyau pour leur assurer un contrôle qualité (Hopper et Huang, 2015), ou encore pour exercer un contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes (Shaheen et Hopper, 2005 ; Whitney *et al.*, 2007). Cependant, ces mécanismes de transport ne sont pas forcément conservés d'un organisme à l'autre. La grande majorité des données disponibles concernent la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Mais, afin d'illustrer ces variations au cours de l'évolution, les connaissances acquises chez l'Homme, les plantes et quelques organismes unicellulaires eucaryotes tels que les Kinétoplastides et les Apicomplexes, bien que moins exhaustives, seront aussi exposées.

1. Transport nucléo-cytoplasmique

Les ARNt utilisent les mêmes pores nucléaires que les protéines et les autres ARN, pour sortir ou rentrer dans le noyau. Ce sont les protéines cargos qui sont spécifiques. Les protéines cargos sont les protéines solubles qui permettent aux différentes molécules de traverser le pore nucléaire dans un sens ou dans l'autre. Ce mécanisme a été décrit essentiellement chez la levure *S. cerevisiae*.

a. Circulation du noyau vers le cytosol

On distingue deux exports nucléaires survenant à deux moments distincts de la vie d'un ARNt : (i) un premier export nucléaire, survenant juste après la transcription de l'ARNt et qui permet d'acheminer un ARNt non mûré aux abords de la mitochondrie où les introns sont épissés (**Figure 16A**), et (ii) un second export qui permet de délivrer des ARNt mûrés et fonctionnels à la machinerie traductionnelle (**Figure 16C** ; Huang et Hopper, 2015).

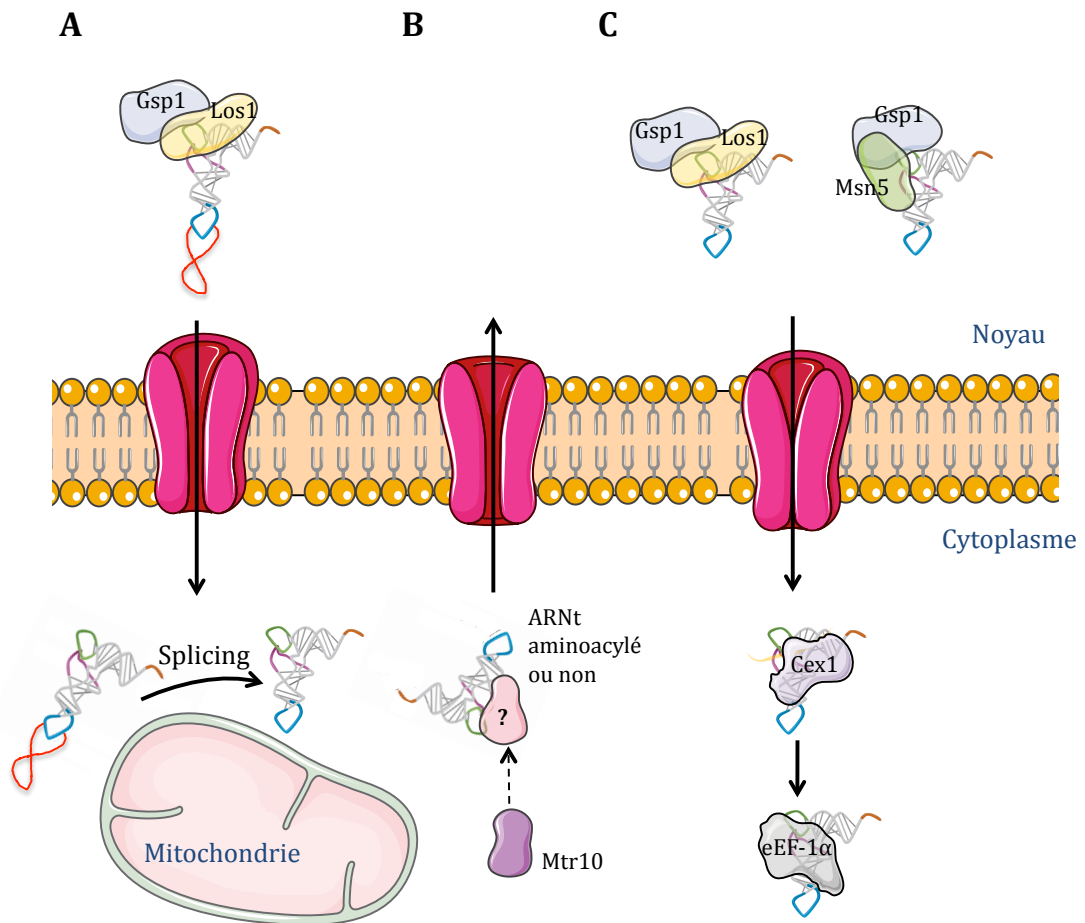


Figure 16 : Mouvements nucléo-cytoplasmiques des ARNt chez *S. cerevisiae*. (A) Export nucléaire primaire d'un ARNt contenant un intron. L'export permet aux ARNt contenant un intron d'être épissés à la surface de la mitochondrie. (B) Import rétrograde de l'ARNt Mtr10-indépendante. La protéine liant directement les ARNt n'est pas connue. (C) Ré-export des ARNt via Los1 ou Msn5. Les voies d'export Los1- et Msn5-indépendantes ne sont pas encore caractérisées. La figure est inspirée de Huang et Hopper, 2015.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine cargo Los1, membre de la famille des β -importines, est impliquée dans les deux types d'export que je viens de présenter (Sarkar et Hopper, 1998). Dans le noyau, l'ARNt se lie au complexe Los1/Gsp1 (une Ran-GTPase, qui fournit l'énergie nécessaire à la translocation de l'ARNt) et le tout traverse le pore nucléaire. Il a été suggéré que l'interaction entre les protéines Los1 et Gsp1 serait stimulée par la protéine nucléolaire Utp8 (Strub *et al.*, 2007).

Essentiellement pour les ARNt matures, ils peuvent également être pris en charge par une autre protéine cargo, Msn5 (Eswara *et al.*, 2009 ; Murthi *et al.*, 2010 ; Huang et Hopper, 2015). Elle aussi s'associe à Gsp1 pour transporter l'ARNt à travers le pore nucléaire (Hellmuth *et al.*, 1998 ; Quan *et al.*, 2004 ; McGuire et Mangroo, 2007 ; Huang et Hopper, 2015). Le complexe Msn5/Gsp1 lie préférentiellement les ARNt aminoacylés (Lund et Dahlberg, 1998). Les protéines nucléolaires Utp8 et Utp9 assistent la formation du complexe Msn5-Gsp1-aminoacyl-ARNt (Eswara *et al.*, 2009). En effet, il a été proposé que les ARNt sont aminoacylés, avant d'être exportés vers le cytosol. Cependant, il n'est pas établi que cette aminoacylation nucléaire soit une condition nécessaire (Sarkar *et al.*, 1999 ; Grosshans *et al.*, 2000). Une fois dans le cytosol, la protéine Cex1, en se fixant sur l'ARNt entraîne la dissociation de Los1 et Gsp1 (Nozawa *et al.*, 2013). Finalement, Cex1 transfère l'ARNt au facteur d'élongation eEF-1 α .

Les protéines Los1 et Msn5 ne sont pas essentielles (Hurt *et al.*, 1987 ; Alexandrov *et al.*, 2006 ; Takano *et al.*, 2005), ce qui indique l'existence d'autre(s) voie(s) d'export nucléaire des ARNt. Jouant le rôle de cargos dans une autre voie Los1-indépendante, deux protéines ont été identifiées (Feng et Hopper, 2002) : Cca1 (qui ajoute le CCA en 3' des ARNt au cours de leur maturation) et la MetRS (chargée de l'aminoacylation de l'ARNt^{Met}).

b. Circulation du cytosol vers le noyau/processus rétrograde

Le processus rétrograde est le processus actif par lequel les ARNt cytosoliques sont réimportés dans le noyau (**Figure 16B**). Notamment, les ARNt contenant des introns sont épissés dans le cytoplasme (Yoshihisa *et al.*, 2003 et 2007) puis ré-importés dans le noyau pour compléter leur maturation (Shaheen et Hopper, 2005 ; Takano *et al.*, 2005). Le processus rétrograde est intensifié en cas de carences nutritionnelles, comme la privation en acides aminés (Shaheen *et al.*, 2007), en glucose (Whitney *et al.*, 2007), ou en phosphates (Hurto *et al.*, 2007). Par exemple, les ARNt s'accumulent dans le noyau lorsque les levures sont soumises à un régime strict en glucose (Shaheen et Hopper, 2005 ; Murthi *et al.*, 2010).

Une première voie fait intervenir la protéine Mtr10, également connue pour médier l'import nucléaire de la protéine Npl3 (Senger *et al.*, 1998). En effet, en l'absence de Mtr10, l'accumulation des ARNt dans les noyau des levures soumises à un régime strict en glucose n'est

plus détectable. Cependant, Mtr10 ne se lie pas directement aux ARNt et le cargo qui permet le passage à travers le pore nucléaire n'est pas encore connu (Huang et Hopper, 2015).

Une autre voie impliquant la protéine cargo Ssa2, (une protéine chaperonne cytoplasmique) a récemment été identifiée (Takano *et al.*, 2015). En complexe avec deux co-chaperonnes cytoplasmiques, Sis1 et Ydj1, Ssa2 lie directement les ARNt et son interaction avec la nucléoporine Nup116 permettrait une translocation ATP-dépendante. L'affinité de Ssa2 pour les ARNt est augmentée quand la structure de ceux-ci est relâchée (en particulier au niveau du bras accepteur), ce qui suggère que Ssa2 participerait au contrôle qualité des ARNt du cytoplasme ou à leur dégradation (Takano *et al.*, 2015).

2. Circulation du cytosol vers la mitochondrie

Dans la plupart des organismes, les mitochondries sont capables d'importer des ARNt cytosoliques (Rubio *et al.*, 2008). L'identité des ARNt importés varie d'un organisme à l'autre, ainsi que le nombre d'espèces d'ARNt concernés. Par exemples, chez *S. cerevisiae*, seuls trois ARNt sont importés (un ARNt^{Lys} et deux ARNt^{Gln}), alors que chez *Leishmania*, dont le génome mitochondrial ne code pour aucun ARNt, la totalité des ARNt cytosoliques est recrutée. Les protéines impliquées dans cet import sont multifonctionnelles et varient d'un organisme à l'autre (Salinas *et al.*, 2008).

La première étude démontrant le passage d'ARNt cytosolique dans la mitochondrie a été faite chez le protozoaire *Tetrahymena pyriformis* (Suyama, 1967), les auteurs ayant constaté que le génome mitochondrial ne codait que pour un tiers des ARNt nécessaires à la traduction. Depuis, ce mécanisme a été identifié chez une multitude d'organismes incluant la levure (Martin *et al.*, 1979), les plantes (Maréchal-Drouard *et al.*, 1988), les mammifères (Dörner *et al.*, 2001 ; Rubio *et al.*, 2008), et les Kinétoplastides (Simpson *et al.*, 1989 ; Hancock *et al.*, 1992).

a. *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, l'import d'ARNt dans la mitochondrie peut s'effectuer selon deux systèmes. Le système de type A requiert la voie d'import des protéines ATP-dépendante (on parle aussi de co-import, dans la revue Schneider, 2011). Cette voie permet l'import de l'ARNt^{Lys} (CUU) cytoplasmique (Tarassov *et al.*, 1995). Cet import est très spécifique puisque l'ARNt^{Lys}(UUU) cytosolique n'est pas importé. Il peut paraître redondant d'importer cet ARNt puisque la mitochondrie dispose du gène codant pour l'ARNt^{Lys} (UUU), capable de décoder les deux codons lysine, AAA et AAG. Seulement, en condition de stress, l'ARNt synthétisé dans la mitochondrie peut être hypomodifié et devient inapte à déchiffrer les codons. Une partie de la population d'ARNt^{Lys} cytosolique est donc importée dans la mitochondrie pour compenser ce déficit (Kamenski *et al.*, 2007). L'ARNt^{Lys} (CUU) interagit avec deux facteurs cytosoliques pour

être importé dans la mitochondrie (**Figure 17**) : la protéine Eno2, une énoïase glycolytique et le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale (mtLysRS, codée par le génome nucléaire). Le complexe mtLysRS/ART^{Lys}(CUU), est importé via le système d'import des protéines (Tarassov *et al.*, 1995 ; Entelis *et al.*, 2006 ; Tarassov *et al.*, 2007). La forme immature de la LysRS est un exemple de protéine multifonctionnelle impliquée dans l'import des ARNt : elle sert à la fois de transporteur à l'ARNt^{Lys}(CUU) cytosolique vers la mitochondrie et, une fois maturée, elle catalyse l'aminocyclation de l'ARNt^{Lys} (UUU) mitochondrial.

Dans le système de type B, les ARNt^{Gln} (CUG) et (UUG) ne requiert apparemment aucun facteur cytosolique sont importés indépendamment de la voie d'import des protéines (Hartl *et al.*, 1989 ; Baker et Schatz, 1991 ; Rinehart *et al.*, 2005).

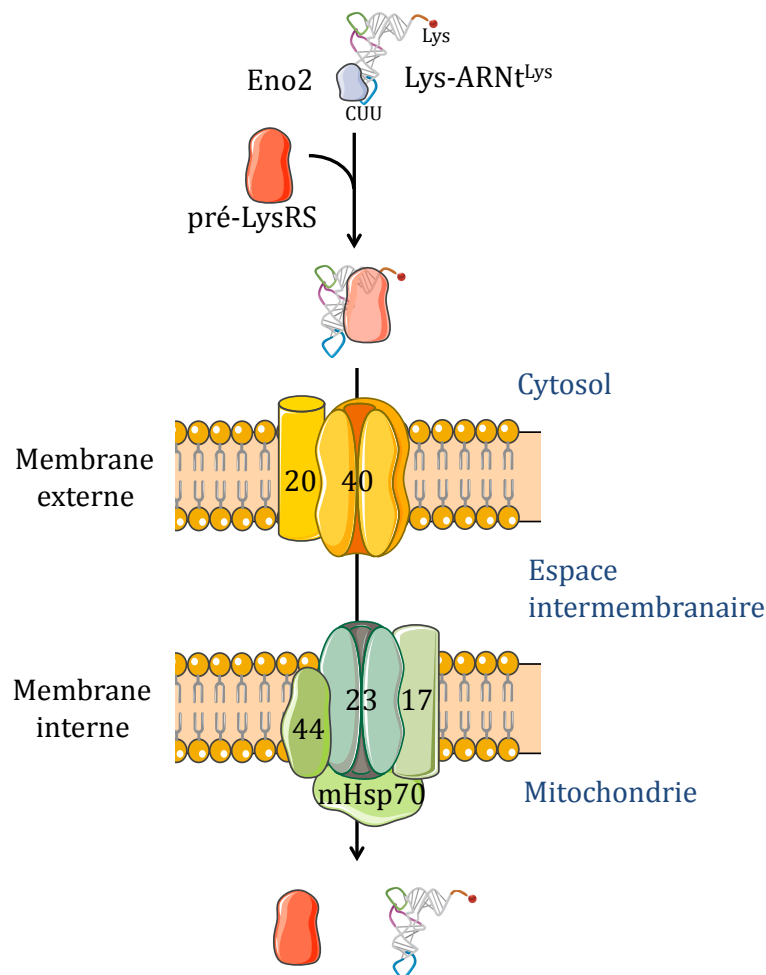


Figure 17 : Modèle d'import de l'ARNt^{Lys} (CUU) dans la mitochondrie chez *S. cerevisiae* (système de type A). L'ARNt est acheminé en périphérie de la mitochondrie par l'énoïase Eno2p. Il est ensuite lié par la pré-LysRS mitochondriale et entre dans la mitochondrie en passant par les complexes d'import des protéines TOM puis TIM (« Translocase Outer/Inner Membrane »), en jaune et vert respectivement. Les tailles des sous-unités des complexes sont indiquées en kDa. La figure est adaptée de la revue de Salinas-Giéé *et al.*, 2015.

b. Les plantes

L'import d'ARNt dans la mitochondrie a été démontré chez plusieurs plantes : *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*... (Salinas-Giegé *et al.*, 2015). Cependant, les connaissances sur la mécanistique d'import d'ARNt dans les mitochondries des plantes sont encore fragmentaires (**Figure 18**). On sait qu'il est ATP-dépendant (Delage *et al.*, 2003), et que le canal de translocation VDAC (« Voltage Dependant Anion Channel ») localisé dans la membrane externe mitochondriale apparaît, *in vitro*, comme le principal canal d'import des ARNt (Salinas *et al.*, 2006). Ce canal de faible sélectivité est impliqué dans le transport d'ATP, de pyruvate, de malate, et d'autres métabolites. Étonnamment, le complexe TOM localisé dans la membrane externe de la mitochondrie, serait impliqué mais pas le complexe TIM localisé dans la membrane interne (Salinas *et al.*, 2006). Plusieurs observations contradictoires ont été rapportées : *in vivo*, les aaRS seraient indispensables à l'import d'ARNt dans la mitochondrie, sans toutefois que leur rôle précis n'ait été démontré (Dietrich *et al.*, 1996) alors qu'*in vitro*, les ARNt entrent dans les mitochondries sans facteurs additionnels (Delage *et al.*, 2003 ; Salinas *et al.*, 2005 ; Salinas *et al.*, 2006).

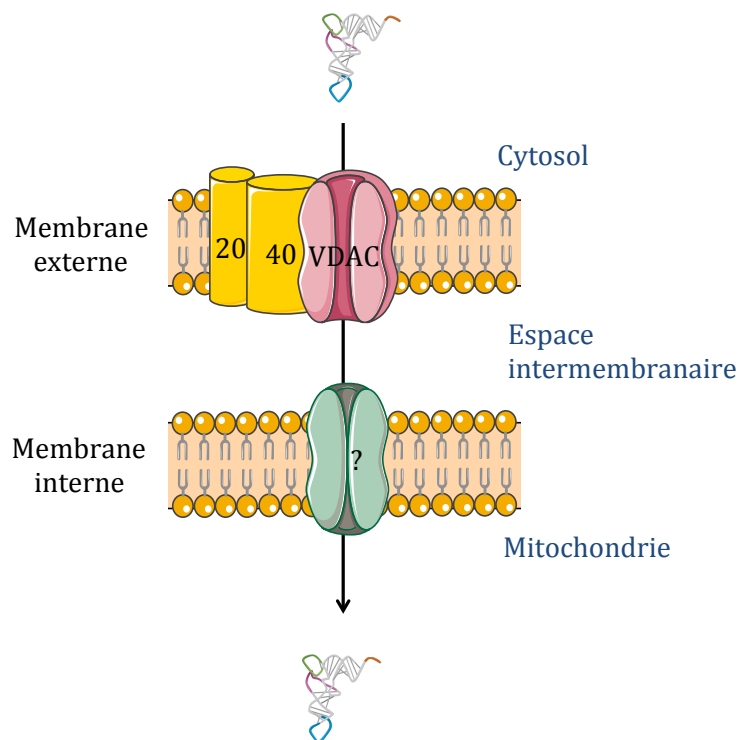


Figure 18 : Modèle d'import des ARNt dans les mitochondries de plantes. Les ARNt traversent la membrane externe de la mitochondrie via le canal VDAC. Les tailles des sous-unités supplémentaires nécessaires à l'import sont indiquées. Le recrutement éventuel de facteurs cytosoliques pour acheminer les ARNt ainsi que la voie d'import au travers la membrane interne ne sont pas connus. La figure est inspirée de la revue de Salinas-Giegé *et al.*, 2015.

c. Homo sapiens

Chez l'Homme, l'import d'ARNt^{Gln} a été démontré *in vivo* dans des mitochondries de cellules HeLa (Rubio *et al.*, 2008). Cet import est ATP-dépendant, distinct de la voie d'import des protéines et ne requiert pas de facteurs cytosoliques additionnels. Il a été montré récemment que l'ARNt^{Lys} est aussi importé dans la mitochondrie humaine (Baleva *et al.*, 2015). Comme chez la levure (**Figure 17**), l'import de l'ARNt^{Lys} requiert l'interaction avec la protéine Eno2p et donc la voie d'import des protéines. A priori, les deux voies d'import d'ARNt, de type A et de type B, co-existent chez *Homo sapiens*.

d. Les eucaryotes unicellulaires pathogènes

(i) Les Kinétoplastides : *Trypanosoma* et *Leishmania*

Le cas le plus extrême d'import d'ARNt cytosolique dans la mitochondrie est trouvé chez les kinétoplastides. En effet, la traduction mitochondriale de *Trypanosoma* et *Leishmania* repose intégralement sur l'import d'ARNt cytosoliques étant donné que leurs génomes mitochondriaux ne codent pour aucun ARNt. Les trois Kinétoplastides les mieux décrits sont *T. brucei*, *L. tropica* et *L. tarentolae* (**Figure 19**).

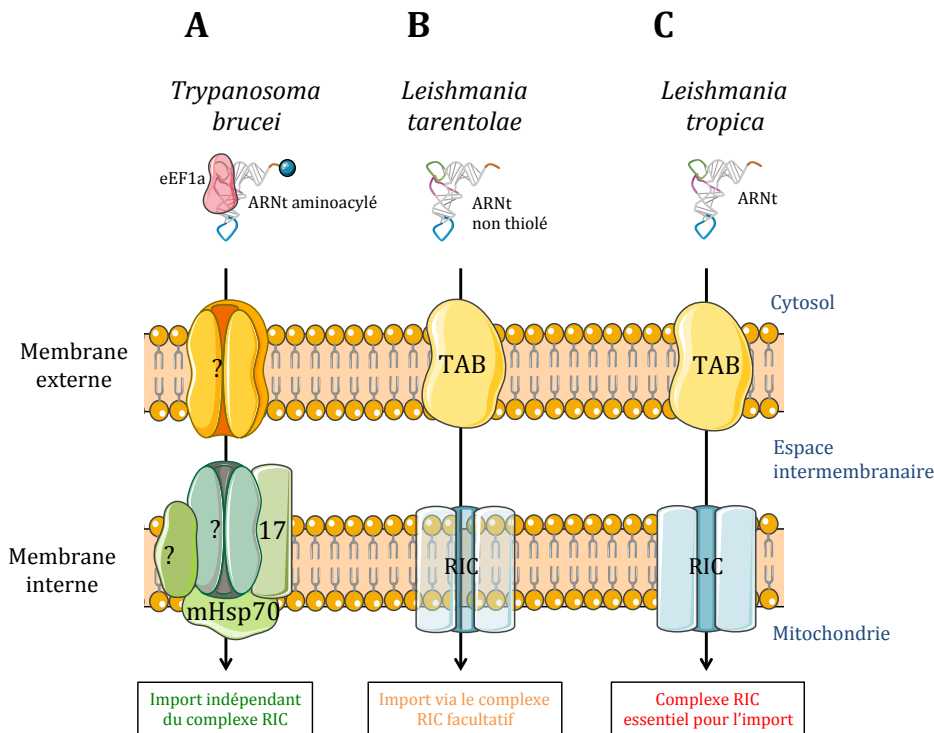


Figure 19 : Modèles d'import des ARNt dans les mitochondries de *Trypanosoma* et *Leishmania*. *T. brucei* : la voie d'import au travers la membrane externe n'est pas connue. Les deux protéines manquantes au complexe de la membrane interne sont Tb11.01.4590 et Tb09.v1.0420, mais leur position dans le complexe n'est pas connue. *L. tarentolae* et *L. tropica* : la protéine TAB est le récepteur des ARNt à la surface de la mitochondrie. Son ancrage dans la membrane et sa participation à la formation d'un éventuel complexe ne sont pas démontrés. La figure est inspirée de l'article de Paris *et al.*, 2009 et de la revue de Rubio et Hopper, 2011.

Chez *T. brucei*, eEF-1 α est le cargo cytosolique des ARNt aminoacylés vers la mitochondrie (Bouzaidi-Tiali *et al.*, 2007) (**Figure 19A**). Les deux seuls ARNt qui n'interagissent pas avec eEF-1 α , l'ARNt^{Met} initiateur (Crausaz-Esseiva *et al.*, 2004), et l'ARNt^{Sec} (Geslain *et al.*, 2006) ne sont pas transportés. Comme les rapports entre les différents ARNt isoaccepteurs varient entre la mitochondrie et le cytosol, il a été proposé que les différents ARNt sont importés avec des efficacités différentes (Tan *et al.*, 2002). La protéine Tim17, du complexe membranaire mitochondrial d'import de protéines (Singha *et al.*, 2008), la protéine mHsp70 (trouvée dans la matrice mitochondriale; Tschopp *et al.*, 2011) et deux protéines non caractérisées Tb11.01.4590 et Tb09.v1.0420 (Seidman *et al.*, 2012) sont requises pour l'import d'ARNt dans la mitochondrie de *T. brucei*. Le transporteur se situant à la membrane externe de la mitochondrie n'est pas encore connu. A l'heure actuelle, deux hypothèses sont proposées : les complexes mitochondriaux d'import de protéines et des ARNt ont seulement certains composants en commun, ou il n'y aurait qu'un seul translocon pour les protéines et les ARNt (Seidman *et al.*, 2012).

Chez *T. evansi*, la situation est encore plus mystérieuse. Alors que sa mitochondrie n'a pas de génome à décoder, celle-ci importe quand même des ARNt. Cela démontre que la machinerie d'import d'ARNt dans la mitochondrie fait uniquement intervenir des protéines codées par le génome nucléaire, et pose la question de l'utilité des ARNt importés. Leur fonction est-elle non canonique, ou l'import est-il conservé chez cette espèce alors qu'il n'est pas utile ? Il pourrait être le vestige d'une mitochondrie anciennement active et qui a à présent perdu son matériel génétique (Paris *et al.*, 2011).

Chez *L. tarentolae*, le mécanisme d'import ne nécessiterait pas de facteur protéique cytosolique (**Figure 19B**). Une protéine localisée à la surface de la mitochondrie, la protéine TAB (« Tubulin antisense-binding protein ») joue le rôle de récepteur aux ARNt, dont la reconnaissance est séquence-spécifique plutôt que structure-spécifique (Mahapatra et Adhya, 1996 ; Adhya *et al.*, 1997). Cette protéine est également impliquée dans l'import chez *L. donovani* (Ghosh *et al.*, 1994) et chez *L. tropica* (Mahapatra *et al.*, 1998 ; Bhattacharyya *et al.*, 2000).

L'un des éléments importants impactant l'import dans la mitochondrie de *L. tarentolae* est la thiolation des ARNt au niveau de la base « wobble » de l'anticodon. Il s'agit d'un déterminant négatif pour ce processus puisque cette modification empêche la translocation des ARNt dans la mitochondrie (Kaneko *et al.*, 2003). Cette inhibition est spécifique de *L. tarentolae* puisque chez *T. brucei*, la thiolation des ARNt n'affecte pas leur import (Paris *et al.*, 2009 ; Bruske *et al.*, 2009).

Chez *L. tropica*, le complexe de translocation des ARN, RIC (« RNA Import Complex ») localisé dans la membrane interne mitochondriale est bien caractérisé (**Figure 19C**). Au moins 5 des 11 sous unités, RIC-4A, -6, -8A, -8B et -9 sont requises pour l'import (Bhattacharyya *et al.*,

2003 ; Chatterjee *et al.*, 2006 ; Mukherjee *et al.*, 2007 ; Adhya, 2008). Le complexe RIC est multifonctionnel puisqu'il est également essentiel pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chatterjee *et al.*, 2006).

(ii) Les Apicomplexes : *Toxoplasma* et *Plasmodium*

La preuve d'une traduction mitochondriale chez les Apicomplexes est récente et indirecte (Pino *et al.*, 2010) : la molécule antipaludique atovaquone tue *P. berghei* en ciblant le cytochrome b, un des trois seuls gènes codé par le génome mitochondrial (Siregar *et al.*, 2008). Or, comme les Kinétoplastides, les Apicomplexes ne possèdent pas de gène d'ARNt dans leur génome mitochondrial (Feagin, 2000). Ceci suppose donc l'import d'ARNt cytosoliques pour permettre la traduction dans cet organite.

Chez *Toxoplasma gondii*, six ARNt cytosoliques ont été localisés dans la mitochondrie (Esseiva *et al.*, 2004) : Ala, Ile, Gln, Ser, Trp et Met-élongateur. Ils sont importés sous leur forme aminoacylée (Pino *et al.*, 2010). Il est proposé que les ARNt des Apicomplexes sont transportés par eEF-1 α comme c'est le cas chez *T. brucei* (Bouzaidi-Tiali *et al.*, 2007).

A ce jour, un seul article présente la possibilité d'un import d'ARNt dans la mitochondrie de *Plasmodium* (Sharma and Sharma, 2015). Les ARNt^{Cys} et ARNt^{Phe} seraient importés via une PheRS spécifique, la seule aaRS éventuellement présente dans la mitochondrie.

3. Circulation du cytosol vers d'autres organelles

L'import d'ARNt cytosoliques dans la mitochondrie de la levure alors que celle-ci code pour un jeu complet d'ARNt montre qu'on ne peut exclure la présence d'un import dans cette situation.

Le génome apicoplastique de *P. falciparum* code pour 25 ARNt différents, aptes à décoder l'ensemble des codons (Preiser *et al.*, 1995). Celui de *T. gondii* apparaît lui aussi autosuffisant en ARNt (Pino *et al.*, 2010). A ce jour, aucun import d'ARNt cytosolique dans l'apicoplaste n'a pu être mis en évidence expérimentalement. De même, aucune publication ne démontre l'import d'ARNt cytosolique dans les chloroplastes. Le génome des chloroplastes de plantes dites vasculaires (comme *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* et près de 400000 autres espèces) contient 30 gènes d'ARNt (Sugiura et Wakasugi, 1989 ; Bock, 2007), ce qui est théoriquement insuffisant pour décoder tous les codons. Dans ce cas, soit cet import existe pour compenser ce déficit en ARNt, soit il n'y a pas d'import et le « superwobbling » (qui permet à un U non modifié de s'apparier avec n'importe laquelle des quatre bases en troisième position de l'anticodon ; Rogalski *et al.*, 2008), permet aux seuls ARNt chloroplastiques de décoder l'ensemble des codons (Alkatib *et al.*, 2012).

D. Répartition et rôles des protéines homologues à Trbp111 chez les parasites unicellulaires

La protéine tRip (tRNA import protein) de *Plasmodium*, sujet de ma thèse, a été identifiée par homologie de séquence avec Trbp111, le module protéique minimal de liaison aux ARNt identifié chez *A. aeolicus* (Morales *et al.*, 1999). Trbp111 est constituée d'un domaine structural « OB-fold » (Oligonucleotid Binding). Ce domaine est retrouvé dans tous les organismes, bactéries, archaeae et eucaryotes, seul ou fusionné notamment à des aminoacyl-ARNt synthétases ou des domaines d'ancrage de complexes multisynthétasiques. Le plus souvent, la présence de ce domaine augmente la capacité de liaison aux ARNt de la protéine ou du complexe et augmente l'efficacité d'aminocyclation. De plus, chez les métazoaires, le domaine OB-fold a acquis de nouvelles fonctions cytokine.

Le domaine OB-fold a fait l'objet d'une recherche exhaustive dans les banques de données spécialisées réunissant les génomes des eucaryotes unicellulaires pathogènes (EupathDB). Ces données sont rassemblées dans une revue afin de faire le point sur la distribution évolutive de ces protéines ainsi que sur leurs fonctions potentielles dans les eucaryotes pathogènes.

tRNA binding OB-fold in pathogen unicellular eukaryotes

Delphine Kapps¹, Marta Cela¹, Tamara Hendrickson² and Magali Frugier^{1*}

¹RNA Architecture and Reactivity, Strasbourg University, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.

²Department of Chemistry, Wayne State University, 5101 Cass Avenue, Detroit, MI 48202, USA.

*For correspondence: M.Frugier@ibmc-cnrs.unistra.fr

In this review, we consider “tRNA binding OB-fold”, any protein containing a domain homologous to the bacterial tRNA binding protein Trbp-111. We recapitulate the ability of OB-fold homologs to bind nucleic acids and their distribution in evolution. Functional extension of such proteins is intimately associated with the addition of new domains during the evolution especially in eukaryotes. While most of these proteins have retained their ability to bind nucleic acids, here we review the current knowledge about how they developed their complexity to expand their functions especially in unicellular pathogenic eukaryotes.

Introduction

The aim of most tRNA is to enable protein synthesis. tRNAs are molecules with highly conserved three-dimensional structures. A defining characteristic of the three-dimensional structure of the tRNA is the " elbow " where the nucleotides of D- and T- loops interact to give rise to the L-shape canonical tRNAs (1) (2). In elongator tRNAs, the D-loop is composed of 8 to 10 residues that adopt an irregular structure in which the two conserved guanines at positions 18 and 19 are extruded and are involved in tertiary interactions with residues Ψ 55 and C56 in the T-loop (Figure 1A). Among the proteins, which bind to the tRNA elbow, enzymes involved in tRNA maturation, modification, aminoacylation, transport and the factors that guide them through the cell compartments and on the ribosome illustrate various tRNA elbow recognition strategies (3). This domain is also recognized by proteins, that perform no apparent catalytic function. Such a protein exists in bacteria as an independent and minimal module called Trbp-111 (tRNA binding protein 111) (4). Trbp-111 is 111 amino acids-long polypeptide identified in *Aquifex aeolicus*. It is homologous to several other bacterial proteins and domains of bacterial methionyl-tRNA synthetases (MetRS) and phenylalanyl-tRNA synthetases (PheRS) (5) (6) (7) (8). The resolution of the crystal structure of Trbp-111 and its counterpart in *Escherichia coli* revealed a dimeric organization and the presence of a conventional OB-fold in each monomer (Figure 1B) (9). The tRNA binding site in Trbp-111 is formed in part by the dimer interface. Thus, only one tRNA can bind at a time, in agreement with the experimentally measured stoichiometry of one tRNA per Trbp111 dimer (4).

Building a model of the complex between Trbp-111 and tRNA suggested that Trbp-111 interacts with the outside corner of the L-shaped tRNA formed by the D- and T-loops, thus that all tRNA sequences may be bound. Analysis of Trbp-111 footprint on tRNA showed that the dimer recognizes asymmetrically the convex side of the tRNA and protects multiple sites surrounding these conserved residues in tRNA structures (10). In these conditions, the apparent dissociation constant (K_d) is 32 nM. Extensive mutagenesis identified 6 aminoacids (K33, E45, N71, R75, S82 and M85) important for tRNA binding, S82 and M85 having the greatest effect (Figure 1B) (9).

Inventory of OB-fold fusions

The attachment of the OB-fold to the tRNA elbow can significantly increase the binding affinity of the fused protein and also ensure that the tRNA structure obeys the canonical L-shape. A tRNA, sandwiched between its homologous aminoacyl-tRNA synthetase that attaches to the inside of the L-shaped structure and Trbp-111 bound outside is still aminoacylated, indicating that the tRNA tertiary structure is intact (10). Yet, the aminoacylation rate is increased, suggesting that this tRNA binding domain acts as a cofactor for aminoacylation, which stabilizes the fold of the bound tRNA or induces a conformational adjustment. This feature may have helped the selection of this domain during evolution. Figure 2 recapitulates protein fusions containing a Trbp-111 OB-fold domain. OB-folds are fused to different proteins as aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) and glutathione S-transferase (GST) or NUDE_C modules. The aaRS family is an essential component of the translation apparatus. They catalyze the first reaction step in the synthesis of proteins, which consists of fixing each amino acid to its specific tRNA (11). Most of them primarily recognize non-elbow features of tRNA, like the anticodon domain and/or the acceptor stem of the molecule (12). Moreover, the presence of a general tRNA binding domain in the vicinity of their catalytic site should facilitate amino acid charging by increasing the local concentration of the tRNA and allowing maintaining optimal aminoacylation levels without compromising the specificity (13). Four aaRSs contain a OB-fold domain, in many organisms, regardless of their classification (Figure 2): Bacterial PheRS (class II), MetRS (class I) in

the three domains of life, tyrosyl-tRNA synthetase (TyrRS) (class I) only in vertebrates and lysyl-tRNA synthetase (LysRS) (class II) in amoeba. GST or NUDE_C fusions are found in eukaryotic proteins and are involved in protein-protein interactions (14). They allow the formation of protein complexes with aaRSs, which contributes to the efficiency of translation by preventing the diffusion of charged tRNA into the cytoplasm and allows their recycling (15). In mammals, nine aminoacyl-tRNA synthetases are found in the multisynthetase complex (MARS) with three auxiliary proteins: AIMP1, AIMP2 and AIMP3 (16) (17). The C-terminal OB-fold of AIMP1 (aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 1) bind tRNAs and contribute to the efficiency of translation. AIMP1 dimerization is sustained by its NuDE_c N-terminal domain, which contains two putative coiled-coil motifs. The first motif is responsible for its association with the corresponding motif in AIMP2, whereas the second motif is required for association of glutamyl- (GlnRS) and arginyl- (ArgRS) tRNA synthetases to the complex (18). Yet, its role in delivering tRNA^{Arg} to ArgRS is still controversial (19) (19).

The NuDE_c module of AIMP1 is found exclusively in vertebrates and correlates with the emergence of an additional function for its fused OB-fold. AIMP1 is the precursor of the endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAPII) (20). AIMP1 is cleaved by caspase 7 (21) and EMAPII dissociates from the MARS complex (22). EMAPII only matches the extended OB-fold domain, which fails in tRNAs binding (apparent KD of 40 μ M) and switch towards its various cytokine activities in cell signaling and developmental pathways. In humans, EMAPII has a broad spectrum of action, which induces apoptosis and migration in endothelial cells, and migration of inflammation related cell types, like macrophages and monocytes (23) (24).

OB-fold domain in unicellular pathogenic eukaryotes

EuPathDB is an integrated database covering eukaryotic pathogen genomes (25). These pathogens are responsible for a large amount of morbidity and mortality worldwide. They represent a diverse group of eukaryotic single-celled organisms, which have only superficial similarities. They are often referred to as parasites and cause a variety of diseases in plants and animals. In human, prevalent eukaryotic pathogens are divided into (i) intestinal pathogens such *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* or *Cryptosporidium parvum*, (ii) urogenital as *Trichomonas vaginalis*, and (iii) infecting blood and tissues, like *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*.

tRNA binding potential of OB-fold in unicellular eukaryotic pathogens

OB-C : In eukaryotic a single monomer partially mimics the homodimeric structure of Trbp111, due to a C-terminal extended OB-fold domain, (26) (Figures 1B, 2B). Many isolated OB-fold domains characterized by such an prolonged C-terminal sequence but deprived of any fused N-terminal structural module (Figure 3). They were designated OB-C in this review and are found in most pathogens, except *Apicomplexa* and nearly all fungi (Table 1). They are about 200 to 300 amino acid long peptides. Such a close bacterial tRBP-111 homolog has been studied in the *kinetoplastida Trypanosoma* (27). The *Kinetoplastida* group includes a number of parasites that cause serious diseases in humans and other animals, as well as various forms found in soil and aquatic environments. Diseases caused by its members include sleeping sickness and Chagas disease, caused by *Trypanosoma* species, and leishmaniasis, caused by *Leishmania* species.

In *T. brucei*, the OB-C MCP2 is a component of the MARS complex encompassing six aaRSs and two other proteins (MCP1, and MCP3) and contributes to efficient tRNA-aminoacylation (27). Recombinant MCP2 formed dimers and show selectivity to tRNAs *in vitro*. Its depletion from the cell resulted in slow parasite growth and decreased infectivity in mouse. This probably reflects its role in increasing the efficiency of tRNA-aminoacylation.

OB-C are found as the only OB-fold protein in *Microsporidiae* and *Diplomonadida* both causing opportunistic intestinal infection in animals. In other pathogens, up to 3 copies of OB-C genes can be found (i.e. *Trichomonas vaginalis*) and or in combination with GST- or aaRS-OB fusions.

GST-OB in Fungi: Fusions between the OB-fold and a GST-like domain (as it is the case in plants) (Figure 2A) are the most abundant version found in eukaryotic pathogens. The GST fusion is often the only source of OB-fold in most fungi. A well-known example is Arc1p (aaRS cofactor 1) from the fungi *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* is now regarded as an opportunistic pathogen, albeit of low virulence. Overall, existing data indicate that Arc1p has a similar mode of interaction with tRNAs than Trbp-111. However, the selection and binding of tRNAs are facilitated by two additional modules: the extended C-terminal module (like in OB-C), which recognizes the conserved ‘elbow’ structure of the tRNA and a N terminal lysine-rich domain, which binds RNA non specifically (28). The complex Arc1p / tRNA was studied by cross-linking and gel retardation experiments and showed a binding affinity corresponding to a Kd value of about 10 nM, which requires both the OB-fold and the lysine-rich domains (28).

The GST-like module does not possess enzymatic activity but is used for the assembly of proteins (14). In *S. cerevisiae*, it interacts with the N-terminal domains of Glutamyl-tRNA synthetase (GluRS) and MetRS (29). Both GluRS and MetRS have a catalytic benefit by associating with Arc1p, as shown in the *in vitro* reconstitution and analysis of the corresponding complexes (30) (31). Thus the Arc1p OB-fold domain is crucial for the delivery of tRNA^{Glu} and tRNA^{Met} to their respective synthetases. The binding of the first tRNA does not influence the binding efficiency of the second tRNA, and both tRNA can bind simultaneously to the complex. However, it is not known if both tRNA can bind to Arc1p simultaneously or if they recognize Arc1p one at a time (32) (28) (30). Moreover, by binding GluRS and MetRS, Arc1p takes part in their subcellular localization (33) and the establishment of the switched fermentation metabolism respiration in yeast (34). It was also proposed that Arc1p could also act as an adapter in the nucleocytoplasmic trafficking of tRNA (31).

GST-OB in Apicomplexa : The GST-OB fold is present in *Apicomplexa*. Many of the apicomplexan parasites are important pathogens of human and domestic animals and lead to devastating infections, like malaria and toxoplasmosis. *Apicomplexa* parasites presented in Table 1 can be classified into two groups depending on their hosts. A first group including *Cryptosporidium*, *Neospora*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma* and *Hammondia*, develops in a unique vertebrate host and a second group including *Babesia*, *Theileria*, *Cytosoon*, *Plasmodium*, *Eimeria* and *Gregarina* develop in both an insect and a vertebrate host.

(i) *Toxoplasma*: The first group of *Apicomplexa*, with the exception of *Cryptosporidium*, contains both GST and aaRS fusions. The GST-OB found in *Toxoplasma gondii* was named Tg-p43. As a dimer, it belongs to a MARS complex containing 4 aaRSs. When the corresponding gene was deleted, the parasite appeared to be viable without any obvious defect in culture and no differences in infectivity and lethality when injected into mice compared to the parental strain (35).

(ii) *Plasmodium*: The GST-OB fusion is the only OB-fold protein in the second group of *Apicomplexa*, characterized by a life cycle in two different hosts. *Plasmodium*, the cause of malaria, is representative of this group. In *Plasmodium*, tRip (tRNA import protein) is an Arc1p homolog (36). *In vitro*, tRip binds human tRNAs with a high affinity and recognizes the elbow of the molecule *via* its C-terminal OB-fold. Besides, tRip is located at the surface of the parasite, its OB-fold being exposed outside. The presence of a transmembrane domain, responsible for this peripheral localization was predicted only in *Apicomplexa* genomes. It has been shown that tRip mediates tRNA entrance in the parasite sporozoites. *Plasmodium* sporozoites are the infectious

form of the parasite, which accumulates in *Anopheles* mosquito's salivary glands, and which are transmitted to the vertebrate host. In the absence of tRip, the sporozoite development is not disturbed apparently, but translation and parasite infectivity is diminished at the blood stage. Since mature red blood cells do not contain tRNAs, authors propose that the observed phenotype would be the result of either a delayed effect of imported tRNAs at the sporozoite stage, or tRNA import in reticulocytes (precursors of red blood cells containing tRNAs).

(iii) *kinetoplastida*: In *Kinetoplastida*, the GST-OB fusion (MCP1) coexists with the MCP2 OB-C. MCP1 is found in the same aminoacyl-tRNA complex than MCP2 but was not further studied (27).

AaRS-OB

Methionyl- and lysyl-tRNA synthetases

In unicellular pathogens, MetRS is the most profuse aaRS-OB proteins. It is present in *Amoeba*, *Chromerida*, *Oomycetes* and some *Apicomplexa* (group 1, with the exception of *Cryptosporidium*). MetRS and lysyl-tRNA synthetase (LysRS) from *E. histolytica* share the same OB-fold (37). Yet again, the tRNA binding module distinguishes by an extended C-terminal sequence. *E. histolytica* is an amitochondriate unicellular protozoan and the leading cause of dysenteric human deaths in the world. The disruption of the C-terminal OB-fold affect the aminoacylation efficiency of the LysRS (40 fold), by reducing equally the K_M and the K_{cat} of the reaction, suggesting that the OB-fold binds tRNAs. This resembles other eukaryotic MetRSs containing a C-terminal OB-fold. Functional studies of *O. sativa* and *C. elegans* MetRSs has led to the conclusion that MetRS OB-fold domains bind tRNAs as monomers and provide the enzymes with better catalytic efficiency (38) (39). Likewise, in *O. sativa*, the OB-fold produces a stable complex with tRNA ($K_D=120$ nM) and facilitates aminoacylation (10-fold increase in K_M for tRNA^{Met} aminoacylation). Interestingly, cognate and non-cognate tRNAs were found to bind MetRS with similar affinity, but only tRNA^{Met} was aminoacylated. Therefore the general RNA binding capacity of the OB-fold did not interfere with the tRNA aminoacylation selectivity of MetRS (38).

In vivo, *E. histolytica* LysRS and MetRS are proteolytically cleaved and release the C-terminal OB-fold containing an heptapeptide migration motif (KVGKIIIE). The released OB-fold attracts human endothelial cells, which in turn generate a chemoattractant signal for monocytes. Authors propose that LysRS and MetRS are involved in a strategy to exploit host's TNF-alpha. TNF-alpha stimulates amoeba motility, which allows to escape the immune response of the host (37).

Other aaRS-OB specific for unicellular eukaryots

Interestingly, 3 new aaRS-OB fusions were identified in EupathDB. They correspond to tryptophanyl- (TrpRS), GlnRS and TyrRS (Figure 3, Table 1). Until now, the C-terminal OB-fold was not noticed in any TyrRSs from unicellular eukaryotes and were only known in arthropods and vertebrates. In these organisms, removing the OB-fold does not change the TyrRS aminoacylation activity (40), suggesting that it does not bind tRNAs. However, in vertebrates this OB-fold is a structural and functional EMAPII homolog with similar cytokine functions than the AIMP1 OB-fold. TyrRS and AIMP1 EMAPII domains display also an heptapeptide migration motif (40) (Figures 1B, 2B): RVGKIIT in AIMP1 and RIGKIIT in TyrRS. It slightly differs from the LysRS and MetRS motif (KVGKIIE). This is enough to promote different chemotactic effects: this specific motif induces directional migration of mononuclear phagocytes and polymorphonuclear leukocytes, it activates endothelial cells by stimulating leukocyte adherence. It also inhibits angiogenesis, plays a role in regulating tumor vascular growth, up-regulates the production of TNF, tissue factors, and the release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes (41). Amputation of EMAPII from TyrRS exposes another cytokine tripeptide motif, ELR, otherwise buried in the catalytic domain (42). This ELR motif stimulates angiogenesis and begins to appear in insects' TyrRS, simultaneously with the addition the C-terminal OB-fold domain.

The presence of TyrRS-OB in isolated unicellular eukaryotes raises many questions. Amoeba *Acanthamoeba castellanii* and the fungi *Spizellomyces punctatus* and *Batrachochytrium dendrobatidis* are 3 pathogens with very distinct hosts and leading to different diseases. Amoeba *A. Castellanii* is an opportunistic human parasite responsible for encephalitis with fatal consequences. *S. punctatus* are important members of soil microbial communities influencing plant production, both adversely and beneficially and, *B. dendrobatidis* is an aquatic fungus, which causes fatal infectious disease in amphibians by blocking their respiratory organs. Moreover, TyrRS-OB was also identified in 6 other fungi genomes (NCBI Blast) that are not considered as pathogenic by EupathDB: *Rozella allomyces*, *Mortierella verticillata*, *Mortierella elongate*, *Taphrina deformans* (plant pathogen), *Gonapodya prolifera* and *Rhizophagus irregularis*, suggesting that the presence of a TyrRS-OB is not correlated with the pathogenicity of the fungi.

Genomes of *S. punctatus*, *B. dendrobatidis* (Table 1) as well as *Gonapodya prolifera* contain not only a TyrRS-OB but also a GlnRS-OB and *V. brassicaformis* seems to be the only organism containing a TrpRS-OB. GlnRS-OB and TrpRS-OB fusions don't have any homolog in other organisms, thus the putative role played by their respective OB-fold is enigmatic.

Yip1-OB

Yip1 family members are transmembrane proteins. Yip1 participates in the transport pathway that serves to translocate proteins to their respective membrane residences. However, the precise function of Yip1 in ER to Golgi membrane transport remains under study (43). Yip1 proteins contain four transmembrane α helices, the N-terminus is oriented in the cytosol. Thus, in the plant pathogen *Pythium aphanidermatum* (Table 1), the C-terminus OB-fold of the unique Yip1-OB fusion should also be located on the cytosolic side of the ER.

Conclusions

All eukaryotic unicellular pathogens genomes found in EupathDB contain at least one copy of OB-fold and show a propensity to add new modules to this OB-fold. Most of these N-terminal extensions participate *a priori* to well-known tRNA biology. The presence of this unspecific tRNA binding domain in the neighborhood of aaRSs catalytic site should increase the binding of the tRNA and allow optimal aminoacylation levels in these organisms. Likewise, GST-fusions, which allow the formation of protein complexes with aaRSs, contribute also to the efficiency of tRNA charging (e.g. in *S. cerevisiae* and *T. gondii*). However, new function arises in unicellular eukaryotes. For example, in *Plasmodium*, the GST fusion is localized in the parasite membrane and is involved in tRNA trafficking. The Yip-OB fusion present in *P. aphanidermatum* is another illustration of a possible membrane OB-fold tRNA binding domain. Besides, many of these OB-fold proteins are isolated polypeptides with no acknowledged structural N-terminal domain. In this circumstance, when the OB-fold is outside an "aminoacylation context" (aaRS or MARS), one wonders about the selectivity of this domain towards tRNA sequences. Deinert and collaborators showed that under competition conditions, the OB-fold of Arc1p binds preferentially to a subset of tRNA species, not only to tRNA^{Glu} and tRNA^{Met} but also to tRNA^{Phe}, tRNA^{Lys}, and tRNA^{Arg} (30). These tRNAs display G-C elements that may act as positive determinants for the interaction with the OB-fold. This selectivity is reminiscent of the initial identification of Arc1p as a protein (named G4p1) with affinity for DNA and RNA G-quadruplex (44). Indeed Arc1p binds DNA or RNA quadruplex structures which are found in gene promoters, both 5' and 3' untranslated regions and especially in subtelomeric regions (45).

While retaining the amino acids responsible for tRNA binding (especially N71, S82 and M85), does the resulting fusion proteins developed other roles? The presence of heptapeptide migration motifs would be consistent with the possibility that some OB-fold domains retrieved in this parasites' genomes might be involved in interaction with host target cells. No accurate sequence homology with the consensus sequence XIGXI(V/I)(T/E) (Figure 4) is found in pathogenic

eukaryotic unicellular proteins, except in *Entamoeba* LysRS and MetRS (37). However, in *Chromerida* (algal ancestry of malaria parasite), *Oomicetes* (plant parasites), *Spironucleus salmonicida* (fish parasite) and some *Microsporidia* (infect insects and vertebrates), some X-OB or GST-OB sequences differs only by one amino acid from this consensus sequence. This is particularly true in *Trichomonas vaginalis* (the parasite responsible for trichomoniasis), where the 4 OB-fold-containing proteins encoded by the genome display conserved heptapeptide sequences where only the amino acid at position 7 is different from the consensus sequence (RVGKIVK, RVGKIVS, RVGKIIH and RVGKIIQ). Likewise, most of the aaRS-OB identified (Table 1) show only few changes in this migration heptapeptide sequence (Figure 4). For example, in *S. punctatus*, a plant pathogen, TyrRS not only contain a RVGRIVD heptapeptide sequence in its OB-fold domain, but has also a ELR sequence which aligns with the ELR sequence exclusively found in insects and vertebrate TyrRSs. Though, does it make sense when the pathogen infects plants? Further studies will be necessary to determine potential structure-function relationships precisely. Yet, the discovery in pathogens of fusion homologous to the vertebrate TyrRS-OB raises interesting question concerning its evolutionary history.

The accumulation of new aaRSs-OB in pathogenic unicellular eukaryotes reflects the growing biological complexity of this domain. The emergence of these unsuspected domains fused to the OB-fold, its (neglected) affinity for G-quadruplex structures as well as the conservation of potential cytokine sequences, suggests their involvement in a wide range of unsuspected biological functions.

References:

1. Kim S (1975) Symmetry recognition hypothesis model for tRNA binding to aminoacyl-tRNA synthetase. *Nature* 256(5519):679-681.
2. Westhof E, Dumas P, & Moras D (1988) Restrained refinement of two crystalline forms of yeast aspartic acid and phenylalanine transfer RNA crystals. *Acta Crystallogr A* 44 (Pt 2):112-123.
3. Zhang J & Ferre-D'Amare AR (2016) The tRNA Elbow in Structure, Recognition and Evolution. *Life (Basel)* 6(1).
4. Morales AJ, Swairjo MA, & Schimmel P (1999) Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *EMBO J* 18(12):3475-3483.
5. Cassio D & Waller JP (1971) Modification of methionyl-tRNA synthetase by proteolytic cleavage and properties of the trypsin-modified enzyme. *Eur J Biochem* 20(2):283-300.
6. Kalogerakos T, Dessen P, Fayat G, & Blanquet S (1980) Proteolytic cleavage of methionyl transfer ribonucleic acid synthetase from *Bacillus*

7. Kohda D, Yokoyama S, & Miyazawa T (1987) Functions of isolated domains of methionyl-tRNA synthetase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *J Biol Chem* 262(2):558-563.
8. Goldgur Y, et al. (1997) The crystal structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with cognate tRNA^{Phe}. *Structure* 5(1):59-68.
9. Swairjo MA, Morales AJ, Wang CC, Ortiz AR, & Schimmel P (2000) Crystal structure of trbp111: a structure-specific tRNA-binding protein. *EMBO J* 19(23):6287-6298.
10. Nomanbhoy T, et al. (2001) Simultaneous binding of two proteins to opposite sides of a single transfer RNA. *Nat Struct Biol* 8(4):344-348.
11. Arnez JG, Augustine JG, Moras D, & Francklyn CS (1997) The first step of aminoacylation at the atomic level in histidyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14):7144-7149.
12. Giege R, Sissler M, & Florentz C (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* 26(22):5017-5035.
13. Negrutskii BS & Deutscher MP (1991) Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11):4991-4995.
14. Cho HY, et al. (2015) Assembly of Multi-tRNA Synthetase Complex via Heterotetrameric Glutathione Transferase-homology Domains. *J Biol Chem* 290(49):29313-29328.
15. Karanasios E & Simos G (2010) Building arks for tRNA: structure and function of the Arc1p family of non-catalytic tRNA-binding proteins. *FEBS Lett* 584(18):3842-3849.
16. Mirande M, Le Corre D, & Waller JP (1985) A complex from cultured Chinese hamster ovary cells containing nine aminoacyl-tRNA synthetases. Thermolabile leucyl-tRNA synthetase from the tsH1 mutant cell line is an integral component of this complex. *Eur J Biochem* 147(2):281-289.
17. Havrylenko S & Mirande M (2015) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes in evolution. *Int J Mol Sci* 16(3):6571-6594.
18. Kaminska M, et al. (2009) Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J Biol Chem* 284(10):6053-6060.
19. Guigou L, Shalak V, & Mirande M (2004) The tRNA-interacting factor p43 associates with mammalian arginyl-tRNA synthetase but does not modify its tRNA aminoacylation properties. *Biochemistry* 43(15):4592-4600.
20. Quevillon S, Agou F, Robinson JC, & Mirande M (1997) The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. *J Biol Chem* 272(51):32573-32579.
21. Behrensdoerf HA, van de Craen M, Knies UE, Vandenabeele P, & Clauss M (2000) The endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP II) is a substrate for caspase-7. *FEBS Lett* 466(1):143-147.

22. Shalak V, *et al.* (2001) The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. *J Biol Chem* 276(26):23769-23776.
23. Park SG, Choi EC, & Kim S (2010) Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins (AIMPs): a triad for cellular homeostasis. *IUBMB Life* 62(4):296-302.
24. Liang D, Halpert MM, Konduri V, & Decker WK (2015) Stepping Out of the Cytosol: AIMp1/p43 Potentiates the Link Between Innate and Adaptive Immunity. *Int Rev Immunol* 34(5):367-381.
25. Aurrecochea C, *et al.* (2013) EuPathDB: the eukaryotic pathogen database. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue):D684-691.
26. Renault L, *et al.* (2001) Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry. *EMBO J* 20(3):570-578.
27. Cestari I, *et al.* (2013) A multiple aminoacyl-tRNA synthetase complex that enhances tRNA-aminoacylation in African trypanosomes. *Mol Cell Biol* 33(24):4872-4888.
28. Simos G, Sauer A, Fasiolo F, & Hurt EC (1998) A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell* 1(2):235-242.
29. Karanasios E, Simader H, Panayotou G, Suck D, & Simos G (2007) Molecular determinants of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly. *J Mol Biol* 374(4):1077-1090.
30. Deinert K, Fasiolo F, Hurt EC, & Simos G (2001) Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *J Biol Chem* 276(8):6000-6008.
31. Graindorge JS, Senger B, Tritch D, Simos G, & Fasiolo F (2005) Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* 44(4):1344-1352.
32. Simos G, *et al.* (1996) The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J* 15(19):5437-5448.
33. Galani K, Grosshans H, Deinert K, Hurt EC, & Simos G (2001) The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J* 20(23):6889-6898.
34. Frechin M, *et al.* (2014) Expression of nuclear and mitochondrial genes encoding ATP synthase is synchronized by disassembly of a multisynthetase complex. *Mol Cell* 56(6):763-776.
35. van Rooyen JM, *et al.* (2014) Assembly of the novel five-component apicomplexan multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex is driven by the hybrid scaffold protein Tg-p43. *PLoS One* 9(2):e89487.
36. Bour T, *et al.* (2016) Apicomplexa-specific tRip facilitates import of exogenous tRNAs into malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(17):4717-4722.
37. Castro de Moura M, *et al.* (2011) Entamoeba lysyl-tRNA synthetase contains a cytokine-like domain with chemokine activity towards human endothelial cells. *PLoS Negl Trop Dis* 5(11):e1398.
38. Kaminska M, Deniziak M, Kerjan P, Barciszewski J, & Mirande M (2000) A recurrent general RNA binding domain appended to plant methionyl-tRNA synthetase acts as a cis-acting cofactor for aminoacylation. *EMBO J* 19(24):6908-6917.
39. Havrylenko S, Legouis R, Negrutskii B, & Mirande M (2010) Methionyl-tRNA synthetase from *Caenorhabditis elegans*: a specific multidomain organization for convergent functional evolution. *Protein Sci* 19(12):2475-2484.
40. Wakasugi K & Schimmel P (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* 284(5411):147-151.
41. van Horssen R, Eggermont AM, & ten Hagen TL (2006) Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho)physiological processes. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(5):339-348.
42. Wakasugi K & Schimmel P (1999) Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. *J Biol Chem* 274(33):23155-23159.
43. Yang X, Matern HT, & Gallwitz D (1998) Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *EMBO J* 17(17):4954-4963.
44. Frantz JD & Gilbert W (1995) A novel yeast gene product, G4p1, with a specific affinity for quadruplex nucleic acids. *J Biol Chem* 270(35):20692-20697.
45. Rhodes D & Lipps HJ (2015) G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res* 43(18):8627-8637.
46. Ruff M, *et al.* (1991) Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science* 252(5013):1682-1689.
47. Giessen TW, *et al.* (2015) A synthetic adenylation-domain-based tRNA-aminoacylation catalyst. *Angew Chem Int Ed Engl* 54(8):2492-2496.
48. Ruggiero MA, *et al.* (2015) A higher level classification of all living organisms. *PLoS One* 10(4):e0119248.
49. Kao J, *et al.* (1994) A peptide derived from the amino terminus of endothelial-monocyte-activating polypeptide II modulates mononuclear and polymorphonuclear leukocyte functions, defines an apparently novel cellular interaction site, and induces an acute inflammatory response. *J Biol Chem* 269(13):9774-9782.

Table 1: list of OB-fold-containing proteins identified in EupathDB genomes.

DATABANK	SPECIES	X-OB	GST-OB	aaRSs-OB	
DIPLOMONADIDA GiardabDB	<i>G. intestinalis</i>	1			
	<i>S. salmonicida</i>	1			
MICROSPORIDIUM MicrosporidiadB	<i>N. ceranae</i>	1			
	<i>M. bombycis</i>	1			
	<i>M. daphniae</i>	1			
	<i>T. hominis</i>	1			
	<i>E. intestinalis</i>	1			
	<i>E. hellem</i>	1			
	<i>E. romaleae</i>	1			
	<i>E. cuniculi</i>	1			
	<i>E. leishmani</i>	1			
	<i>S. leishmani</i>	1			
	<i>V. vulgicus</i>	1			
	<i>VITAFORMA</i>	1			
	<i>A. algerae</i>	1			
	<i>O. colligata</i>	1			
<i>E. aedis</i>	1				
<i>N. parisi</i>	1				
FUNGI FungIDB	Agaricomycetes	1			
	Blastocladiomycetes	1			
	Chytridiomycetes	1			
	Eurotiomycetes	1			
	Leotiomycetes	1			
	Pucciniomycetes	1			
	Pneumocystidomycetes	1			
	Schizosaccharomycetes	1			
	Sordariomycetes	1			
	Tremellomycetes	1			
	Ustilaginomycetes	1			
	Zygomycetes	1			
OOMYCETES	<i>Y. lipolytica</i>	1			
	<i>M. circineoloides</i>	2			
	<i>P. blakesleeanus</i>	2			
	<i>A. macrocyneus</i>	2			
	<i>S. punctatus</i>	1			
	<i>S. dendrobatidis</i>	1			
	<i>S. parasitica</i>	2			
	<i>S. diclina</i>	2			
	<i>H. arabidopsidis</i>	2			
	<i>P. capsici</i>	1			
	<i>P. infestans</i>	1			
	<i>P. cinnamomi</i>	1			
<i>P. parasitica</i>	1				
<i>P. ramorum</i>	1				
<i>P. sojae</i>	1				
<i>A. invadans</i>	1				
<i>A. astaci</i>	1				
<i>P. aphanidermatum</i>	1				
<i>P. irregulare</i>	2				
<i>P. ultimum</i>	2				
<i>P. arrhenomanes</i>	1				
<i>P. vexans</i>	1				
<i>P. iwuyamai</i>	2				
<i>A. laibachii</i>	2				
<i>A. candida</i>	2				
<i>M. floweri</i>	2				
<i>A. castellani</i>	1				
<i>E. invadans</i>	1				
<i>E. histolitica</i>	1				
<i>E. moshkovskii</i>	1				
<i>E. dispar</i>	1				
<i>V. brassicaeformis</i>	1				
<i>C. vella</i>	2				
AMOEBOZOA AmoebaDB	<i>M. floweri</i>	1			
	<i>A. castellanii</i>	1			
	<i>E. invadans</i>	1			
	<i>E. histolitica</i>	1			
	<i>E. moshkovskii</i>	1			
	<i>E. dispar</i>	1			
	<i>V. brassicaeformis</i>	1			
	<i>C. vella</i>	2			
	CHROMERIDA crypToDB	<i>V. brassicaeformis</i>	1		
		<i>C. vella</i>	2		
		<i>Y. lipolytica</i>	1		
		<i>M. circineoloides</i>	2		
<i>P. blakesleeanus</i>		2			
<i>A. macrocyneus</i>		2			
<i>S. punctatus</i>		1			
<i>S. dendrobatidis</i>		1			
<i>S. parasitica</i>		2			
<i>S. diclina</i>		2			
<i>H. arabidopsidis</i>		2			
<i>P. capsici</i>		1			
<i>P. infestans</i>	1				
<i>P. cinnamomi</i>	1				
<i>P. parasitica</i>	1				
<i>P. ramorum</i>	1				
<i>P. sojae</i>	1				
<i>A. invadans</i>	1				
<i>A. astaci</i>	1				
<i>P. aphanidermatum</i>	1				
<i>P. irregulare</i>	2				
<i>P. ultimum</i>	2				
<i>P. arrhenomanes</i>	1				
<i>P. vexans</i>	1				
<i>P. iwuyamai</i>	2				
<i>A. laibachii</i>	2				
<i>A. candida</i>	2				
<i>M. floweri</i>	2				
<i>A. castellanii</i>	1				
<i>E. invadans</i>	1				
<i>E. histolitica</i>	1				
<i>E. moshkovskii</i>	1				
<i>E. dispar</i>	1				
<i>V. brassicaeformis</i>	1				
<i>C. vella</i>	2				
DIPLOMONADIDA GiardabDB	<i>G. intestinalis</i>	1			
	<i>S. salmonicida</i>	1			
	MICROSPORIDIUM MicrosporidiadB	<i>N. ceranae</i>	1		
		<i>M. bombycis</i>	1		
		<i>M. daphniae</i>	1		
		<i>T. hominis</i>	1		
		<i>E. intestinalis</i>	1		
		<i>E. hellem</i>	1		
		<i>E. romaleae</i>	1		
		<i>E. cuniculi</i>	1		
		<i>E. leishmani</i>	1		
		<i>S. leishmani</i>	1		
<i>V. vulgicus</i>		1			
<i>VITAFORMA</i>		1			
<i>A. algerae</i>		1			
<i>O. colligata</i>		1			
<i>E. aedis</i>	1				
<i>N. parisi</i>	1				
FUNGI FungIDB	Agaricomycetes	1			
	Blastocladiomycetes	1			
	Chytridiomycetes	1			
	Eurotiomycetes	1			
	Leotiomycetes	1			
	Pucciniomycetes	1			
	Pneumocystidomycetes	1			
	Schizosaccharomycetes	1			
	Sordariomycetes	1			
	Tremellomycetes	1			
	Ustilaginomycetes	1			
	Zygomycetes	1			
OOMYCETES	<i>Y. lipolytica</i>	1			
	<i>M. circineoloides</i>	2			
	<i>P. blakesleeanus</i>	2			
	<i>A. macrocyneus</i>	2			
	<i>S. punctatus</i>	1			
	<i>S. dendrobatidis</i>	1			
	<i>S. parasitica</i>	2			
	<i>S. diclina</i>	2			
	<i>H. arabidopsidis</i>	2			
	<i>P. capsici</i>	1			
	<i>P. infestans</i>	1			
	<i>P. cinnamomi</i>	1			
<i>P. parasitica</i>	1				
<i>P. ramorum</i>	1				
<i>P. sojae</i>	1				
<i>A. invadans</i>	1				
<i>A. astaci</i>	1				
<i>P. aphanidermatum</i>	1				
<i>P. irregulare</i>	2				
<i>P. ultimum</i>	2				
<i>P. arrhenomanes</i>	1				
<i>P. vexans</i>	1				
<i>P. iwuyamai</i>	2				
<i>A. laibachii</i>	2				
<i>A. candida</i>	2				
<i>M. floweri</i>	2				
<i>A. castellanii</i>	1				
<i>E. invadans</i>	1				
<i>E. histolitica</i>	1				
<i>E. moshkovskii</i>	1				
<i>E. dispar</i>	1				
<i>V. brassicaeformis</i>	1				
<i>C. vella</i>	2				
AMOEBOZOA AmoebaDB	<i>M. floweri</i>	1			
	<i>A. castellanii</i>	1			
	<i>E. invadans</i>	1			
	<i>E. histolitica</i>	1			
	<i>E. moshkovskii</i>	1			
	<i>E. dispar</i>	1			
	<i>V. brassicaeformis</i>	1			
	<i>C. vella</i>	2			
	CHROMERIDA crypToDB	<i>V. brassicaeformis</i>	1		
		<i>C. vella</i>	2		
		<i>Y. lipolytica</i>	1		
		<i>M. circineoloides</i>	2		
<i>P. blakesleeanus</i>		2			
<i>A. macrocyneus</i>		2			
<i>S. punctatus</i>		1			
<i>S. dendrobatidis</i>		1			
<i>S. parasitica</i>		2			
<i>S. diclina</i>		2			
<i>H. arabidopsidis</i>		2			
<i>P. capsici</i>		1			
<i>P. infestans</i>	1				
<i>P. cinnamomi</i>	1				
<i>P. parasitica</i>	1				
<i>P. ramorum</i>	1				
<i>P. sojae</i>	1				
<i>A. invadans</i>	1				
<i>A. astaci</i>	1				
<i>P. aphanidermatum</i>	1				
<i>P. irregulare</i>	2				
<i>P. ultimum</i>	2				
<i>P. arrhenomanes</i>	1				
<i>P. vexans</i>	1				
<i>P. iwuyamai</i>	2				
<i>A. laibachii</i>	2				
<i>A. candida</i>	2				
<i>M. floweri</i>	2				
<i>A. castellanii</i>	1				
<i>E. invadans</i>	1				
<i>E. histolitica</i>	1				
<i>E. moshkovskii</i>	1				
<i>E. dispar</i>	1				
<i>V. brassicaeformis</i>	1				
<i>C. vella</i>	2				
DIPLOMONADIDA GiardabDB	<i>G. intestinalis</i>	1			
	<i>S. salmonicida</i>	1			
	MICROSPORIDIUM MicrosporidiadB	<i>N. ceranae</i>	1		
		<i>M. bombycis</i>	1		
		<i>M. daphniae</i>	1		
		<i>T. hominis</i>	1		
		<i>E. intestinalis</i>	1		
		<i>E. hellem</i>	1		
		<i>E. romaleae</i>	1		
		<i>E. cuniculi</i>	1		
		<i>E. leishmani</i>	1		
		<i>S. leishmani</i>	1		
<i>V. vulgicus</i>		1			
<i>VITAFORMA</i>		1			
<i>A. algerae</i>		1			
<i>O. colligata</i>		1			
<i>E. aedis</i>	1				
<i>N. parisi</i>	1				
FUNGI FungIDB	Agaricomycetes	1			
	Blastocladiomycetes	1			
	Chytridiomycetes	1			
	Eurotiomycetes	1			
	Leotiomycetes	1			
	Pucciniomycetes	1			
	Pneumocystidomycetes	1			
	Schizosaccharomycetes	1			
	Sordariomycetes	1			
	Tremellomycetes	1			
	Ustilaginomycetes	1			
	Zygomycetes	1			
OOMYCETES	<i>Y. lipolytica</i>	1			
	<i>M. circineoloides</i>	2			
	<i>P. blakesleeanus</i>	2			
	<i>A. macrocyneus</i>	2			
	<i>S. punctatus</i>	1			
	<i>S. dendrobatidis</i>	1			
	<i>S. parasitica</i>	2			
	<i>S. diclina</i>	2			
	<i>H. arabidopsidis</i>	2			
	<i>P. capsici</i>	1			
	<i>P. infestans</i>	1			
	<i>P. cinnamomi</i>	1			
<i>P. parasitica</i>	1				
<i>P. ramorum</i>	1				
<i>P. sojae</i>	1				
<i>A. invadans</i>	1				
<i>A. astaci</i>	1				
<i>P. aphanidermatum</i>	1				
<i>P. irregulare</i>	2				
<i>P. ultimum</i>	2				
<i>P. arrhenomanes</i>	1				
<i>P. vexans</i>	1				
<i>P. iwuyamai</i>	2				
<i>A. laibachii</i>	2				
<i>A. candida</i>	2				
<i>M. floweri</i>	2				
<i>A. castellanii</i>	1				
<i>E. invadans</i>	1				
<i>E. histolitica</i>	1				
<i>E. moshkovskii</i>	1				
<i>E. dispar</i>	1				
<i>V. brassicaeformis</i>	1				
<i>C. vella</i>	2				
AMOEBOZOA AmoebaDB	<i>M. floweri</i>	1			
	<i>A. castellanii</i>	1			
	<i>E. invadans</i>	1			
	<i>E. histolitica</i>	1			
	<i>E. moshkovskii</i>	1			
	<i>E. dispar</i>	1			
	<i>V. brassicaeformis</i>	1			
	<i>C. vella</i>	2			
	CHROMERIDA crypToDB	<i>V. brassicaeformis</i>	1		
		<i>C. vella</i>	2		
		<i>Y. lipolytica</i>	1		
		<i>M. circineoloides</i>	2		
<i>P. blakesleeanus</i>		2			
<i>A. macrocyneus</i>		2			
<i>S. punctatus</i>		1			
<i>S. dendrobatidis</i>		1			
<i>S. parasitica</i>		2			
<i>S. diclina</i>		2			
<i>H. arabidopsidis</i>		2			
<i>P. capsici</i>		1			
<i>P. infestans</i>	1				
<i>P. cinnamomi</i>	1				
<i>P. parasitica</i>	1				
<i>P. ramorum</i>	1				
<i>P. sojae</i>	1				
<i>A. invadans</i>	1				
<i>A. astaci</i>	1				
<i>P. aphanidermatum</i>	1				
<i>P. irregulare</i>	2				
<i>P. ultimum</i>	2				
<i>P. arrhenomanes</i>	1				
<i>P. vexans</i>	1				
<i>P. iwuyamai</i>	2				
<i>A. laibachii</i>	2				
<i>A. candida</i>	2				
<i>M. floweri</i>	2				
<i>A. castellanii</i>	1				
<i>E. invadans</i>	1				
<i>E. histolitica</i>	1				
<i>E. moshkovskii</i>	1				

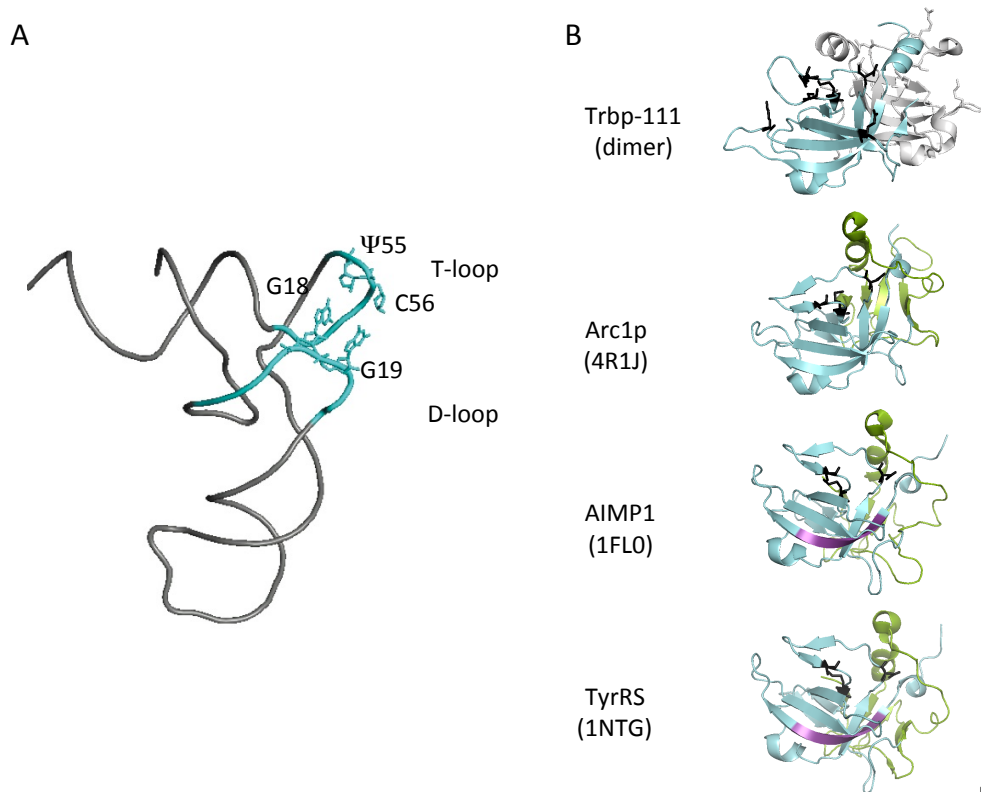


Figure 1

Figure 1: Structure of tRNA and tRNA binding OB-fold domains. **(A)** Crystal structure of *S. cerevisiae* tRNA^{Asp} (46). The D- and T-loops are in blue and the 4 nucleotides G18, G19 (D-loop), pseudouridine Ψ55 and C56 (T-loop) involved in the formation of the tRNA elbow are indicated. **(B)** Crystal structure of OB-fold domains. The *A. aeolicus* dimeric Trbp111 structure (9) shows one monomer in blue and the second in grey. In the structures corresponding to *S. cerevisiae* Arc1p (47), human AIMP1 (26) and TyrRS (45) OB-folds, the Trbp111 conserved domain is shown in blue and the extended C-terminal domain is indicated in green. The extended C-terminal domain mimicks the dimeric structure of Trbp111. The migration motifs (RVGKIIT in AIMP1 and RIGCIIT in TyrRS) are shown in purple. Aminoacids identified as essential for tRNA binding (K33, E45, N71, R75, S82 and M85) are indicated with black sticks. The structures were prepared with PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC. <https://www.pymol.org/>).

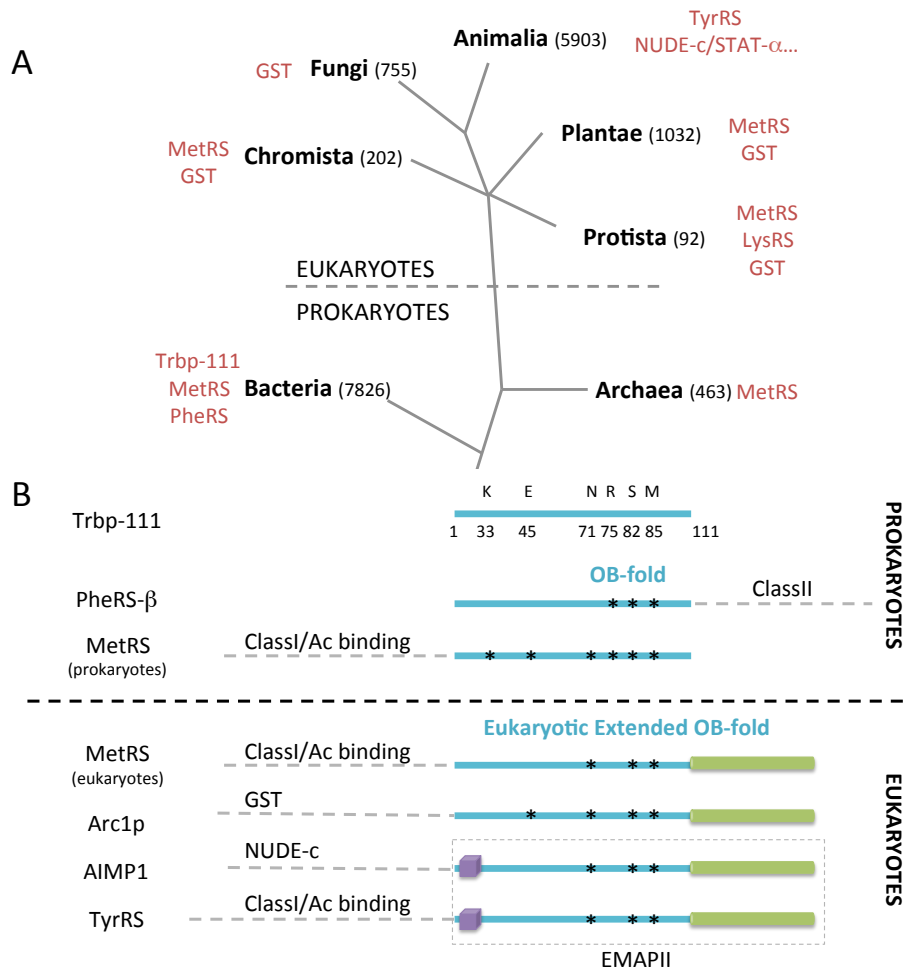


Figure 2

Figure 2: Evolution and organization of OB-fold-containing proteins. **(A)** Phylogenetic tree based on the classification by (48), indicating N-terminal domains fused to the OB-fold, which were identified and studied in prokaryotes (bacteria and archae) and eukaryotes. The number of genes identified in each taxon are indicated in brackets. **(B)** Modular organization of OB-fold-containing proteins. The OB-fold domain is shown in blue, the extended C-terminal domain in green, the migration heptapeptide signal in purple and the conservation of aminoacids involved in tRNA binding are indicated with black stars.

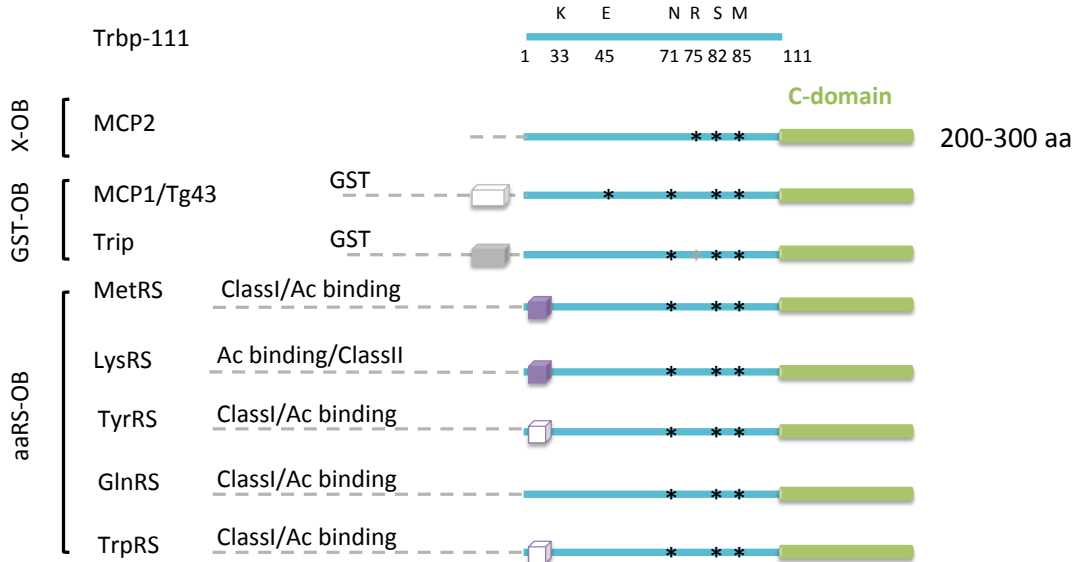


Figure 3

Figure 3: Modular organization of OB-fold-containing proteins from pathogenic unicellular eukaryotes. The same color code than in Figure 2 B was used.

Species	Protein	Heptapeptide
<i>Mus musculus</i>	AIMP1	RIGRIVT
		RIGRIIT
		AIGRIVT
		(RIGRAVT)
<i>Homo sapiens</i>	AIMP1	RIGCIIT
	TyrRS	RVGKIIT
<i>E. invadens</i>	LysRS	RVGEIVE
	MetRS	RVGQIVE
<i>E. histolitica</i>	LysRS	RVGKIVE
	MetRS	RVGKIVE
<i>E. moshkovskii</i>	LysRS	KVGKIVE
	MetRS	KVGKIVE
<i>E. dispar</i>	LysRS	KVGKIIE
	MetRS	RVGKIVE
CONSENSUS		xIGx(I/V)(T/E)
<i>V. brassicaformis</i>	TrpRS	RVGRILE
<i>N. floweri</i>	MetRS	RVGQIET
<i>A. castellanii</i>	TyrRS	KVGRIVD
<i>S. punctatus</i>	TyrRS	RVGRIVD
	GlnRS	CVGRILD
<i>B. dendrobatidis</i>	TyrRS	RVGKVIE
	GlnRS	CVGRILD
<i>G. proliferata</i>	TyrRS	RVGRIVS
	GlnRS	RVGKIKS
<i>M. elongata</i>	TyrRS	RVARILE
<i>M. verticillata</i>	TyrRS	RVARILE
<i>R. allomyces</i>	TyrRS	VVGEIKE
<i>R. irregularis</i>	TyrRS	RVAKIIK
<i>T. deformans</i>	TyrRS	RVGLIED

Figure 4

Figure 4: Sequence of the migration heptapeptide signals and possible conservation in eukaryotic pathogen's aaRS-OB fusions. The mouse migration heptapeptide sequence and the related mutants were retrieved from (49). The consensus sequence was determined based on this study and the sequences found in human AIMP1 and TyrRS and in amoeba MetRS and LysRS. Putative migration heptapeptides from unicellular eukaryotes were identified by alignment of their OB-fold with human AIMP1 and TyrRS and amoeba MetRS and LysRS OB-folds using Clustal (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>)

E. Objectifs de la thèse

Mon travail de thèse s'inscrit dans le projet du laboratoire sur la protéine tRip, initié par la doctorante Tania Bour et la post-doctorante Nassira Mahmoudi-Kaïdi. La protéine tRip a été identifiée par bioinformatique, par homologie de séquence au domaine de liaison bactérien aux ARNt : tRBP111 (Partie D de cette introduction ; Morales *et al.*, 1999). Cette protéine a été baptisée tRip, pour tRNA Import Protein. Cette protéine est constituée de trois domaines (**Figure 20A**) : un domaine N-terminal intracellulaire sans homologie certaine, un domaine transmembranaire, et enfin le domaine de liaison aux ARNt localisé à l'extérieur du parasite (**Figure 20B**).

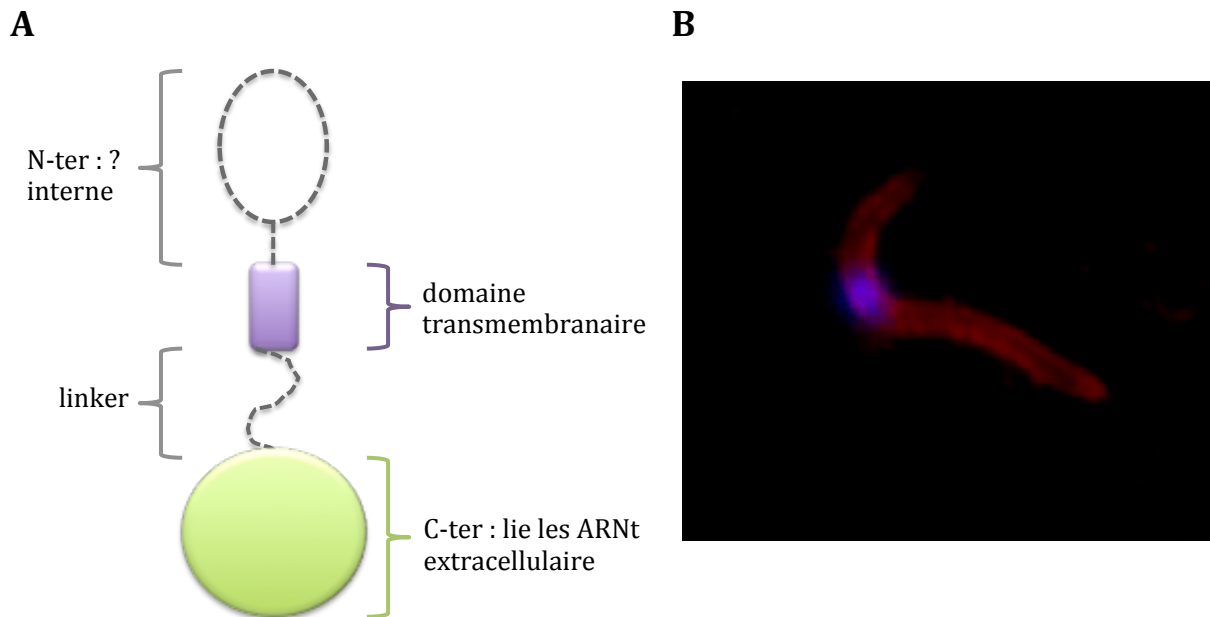


Figure 20 : La protéine tRip est localisée à la surface du sporozoïte de *P. berghei*. (A) Schéma de la protéine : le domaine C-terminal de liaison aux ARNt est extracellulaire, un linker le relie au domaine membranaire et enfin, le domaine N-terminal sans homologie apparente est intracellulaire. (B) L'immunolocalisation de tRip sans perméabilisation préalable du parasite indique que la protéine est localisée à la périphérie du parasite. De plus, l'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre le domaine C-terminal démontre que ce domaine est accessible sans perméabilisation de la membrane et est donc localisé à l'extérieur de la cellule.

Les différentes expériences menées *in vitro* ont permis de confirmer la capacité de cette protéine à lier spécifiquement les ARNt par reconnaissance de leur structure tridimensionnelle et a priori de façon indépendante de la séquence. *In vivo*, chez *Plasmodium berghei* (*P. berghei*), qui est le parasite murin cultivé dans le laboratoire, cette protéine est détectée chez tous les stades testés (dans le moustique, dans le foie et le sang de l'hôte vertébré). La prédiction bioinformatique a été confirmée en démontrant que cette protéine est une protéine intégrale de membrane et est présente à la surface du sporozoïte. Enfin, *in vitro*, les sporozoïtes sont non seulement capables de lier les ARNt exogènes mais aussi de les importer dans leur cytoplasme.

Le stade sporozoïte a été choisi car, lors de la traversée cellulaire (étape durant laquelle le parasite quitte la peau pour rejoindre le foie en traversant de nombreux types cellulaires), et contrairement aux autres stades de développement, le parasite n'est pas enveloppé dans une vacuole parasitophore. L'absence de cette vacuole lui permet donc d'être en contact direct avec les ARNt cytoplasmiques de la cellule hôte. C'est pourquoi nous pensons qu'*in vivo*, l'import d'ARNt de l'hôte pourrait se faire lors de cette étape. L'implication de la protéine d'intérêt dans ce mécanisme d'import a été vérifiée en montrant que les sporozoïtes ne sont plus capables d'importer les ARNt (i) en présence d'anticorps bloquant spécifiquement le domaine carboxy-terminal de la protéine et (ii) dans le mutant tRip-KO.

L'entrée d'ARNt exogènes dans une cellule (quelle qu'elle soit) n'a été rapportée par aucune autre étude dans la littérature. Ces résultats ont mis en évidence une interaction hôte-parasite inédite qui soulève de très nombreuses questions, en particulier sur le rôle de l'import d'ARNt exogènes dans la physiologie de *Plasmodium*. Au cours de ma thèse, j'ai étudié les conséquences de l'absence d'import d'ARNt sur le développement du parasite chez l'hôte vertébré. Dans ce but, j'ai (i) recherché si la protéine tRip et donc l'import d'ARNt étrangers sont essentiels à la survie du parasite, (ii) défini l'étape du développement du parasite affectée par cet import, (iii) étudié si l'import d'ARNt a un impact sur l'efficacité de la synthèse protéique du parasite ou sur son protéome et (iv) identifié les partenaires protéiques de tRip *in vivo*.

RESULTATS

A. Le sporozoïte importe des ARNt exogènes

Les parasites du genre *Plasmodium*, responsables du paludisme, sont transmis aux vertébrés par une piqûre de moustique. Pour se développer et se multiplier, ces parasites intracellulaires de l'embranchement des Apicomplexes ont développé divers mécanismes pour exploiter leurs hôtes. Parmi ces mécanismes figure le prélèvement de petits métabolites des cellules infectées, comme les purines ou les acides aminés. Jusqu'à présent, rien ne supposait que les ARNt de l'hôte pourraient être exploités par le parasite. Nous avons identifié un gène unique chez les Apicomplexes, dont la séquence code pour un domaine membranaire et un site de liaison aux ARNt. Cette protéine, nommée tRip pour « tRNA import protein », est ancrée dans la membrane plasmique du parasite et dirige l'import d'ARNt exogènes. En l'absence de tRip, l'intensité de multiplication des parasites au stade sanguin est significativement réduite, suggérant que le parasite aurait besoin des ARNt de l'hôte pour assurer sa propre traduction, ou comme molécules régulatrices. Ainsi, *Plasmodium* est le premier exemple, à notre connaissance, d'une cellule capable d'importer des ARNt exogènes. Ce mécanisme suggère une adaptation remarquable de ce parasite pour étendre son atteinte à la biologie de la cellule hôte.

Mon travail a commencé par l'établissement de la souche de *P. berghei* délétée du gène codant pour la protéine tRip. La transgénése est une méthode couramment utilisée pour caractériser le rôle d'une protéine *in vivo*, ou plutôt le mécanisme qui lui est associé, dans notre cas. Ce travail a été fait en collaboration avec l'équipe du Dr. Robert Ménard de l'Institut Pasteur de Paris. Le gène TRIP a été remplacé par le gène de la protéine fluorescente mCherry et un gène de résistance à la pyriméthamine par double recombinaison homologue. L'obtention de la souche *PbtRip-KO*, identifiable en particulier grâce à la présence du marqueur de fluorescence mCherry (et donc différenciable de la souche sauvage utilisée exprimant la GFP), a été une étape décisive dans mon projet. Elle a établi l'outil nécessaire pour répondre aux questions biologiques que nous nous posons.

J'ai vérifié, d'abord de façon qualitative, que la souche délétée est viable à tous les stades de développement du parasite. J'ai cultivé la souche tRip-KO dans les souris où j'ai pu observer des trophozoïtes (**Figure 21A, B**), des schizontes et des gamétocytes dans les proportions habituelles (respectivement environ 85, 11 et 4% des parasites totaux). Dans les moustiques, les oocinètes, ookystes (**Figure 21C**) et sporozoïtes (**Figure 21D, E**) observés sont d'apparence normale. La présence de tous ces stades de développement indique le caractère non essentiel de la protéine tRip tout au long du cycle de *P. berghei*.

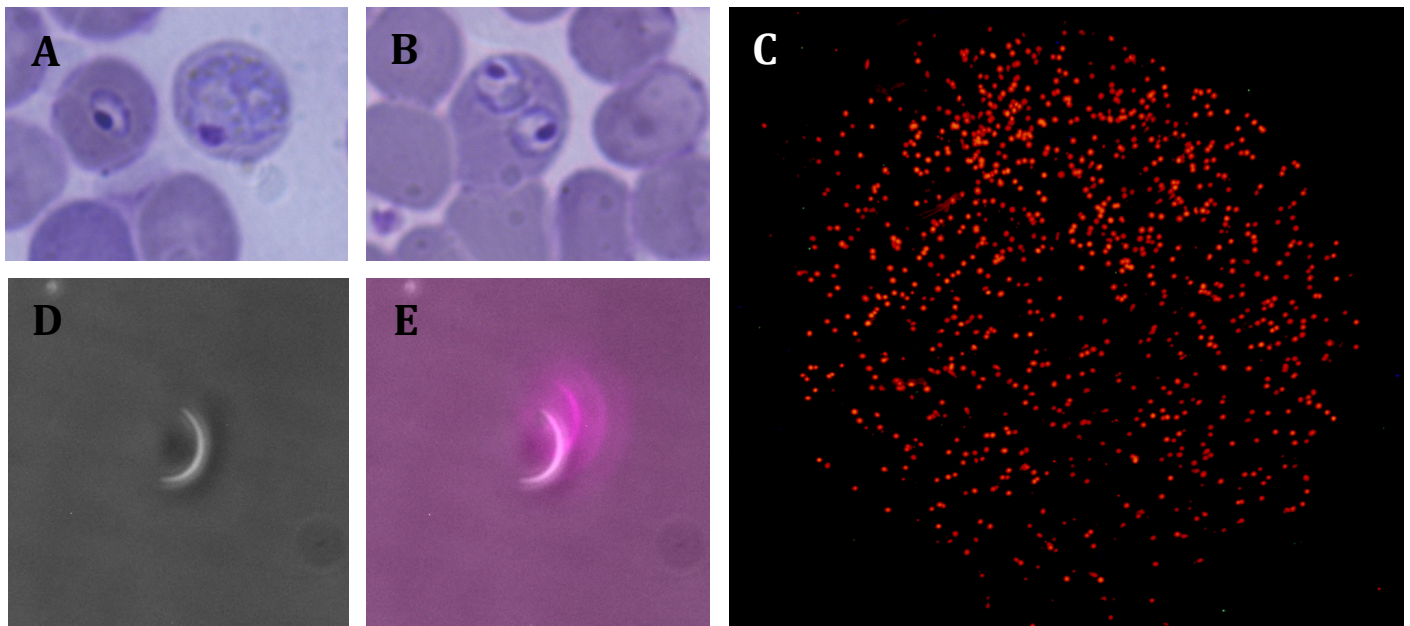


Figure 21 : La souche tRip-KO est viable au long du cycle de vie de *Plasmodium*. (A) Trophozoïte jeune (ou anneau) à gauche, trophozoïte mature à droite (érythrocyte : 7 μm) (B) Polyparasitisme : deux trophozoïtes dans un même érythrocyte. (C) Ookystes (100 μm de diamètre). (D) Sporozoïte (10 μm de longueur sur 1 μm), vu sous lumière blanche et (E) en fluorescence. Les photos A, B, D et E ont été prises au microscope Olympus BX51 à l'aide du logiciel Cell D. La photo C a été prise au macroscopie Nikon AZ100 à l'aide du logiciel NIS-Element.

L'incapacité des sporozoïtes tRip-KO à importer des ARNt exogènes a été vérifiée, confirmant ainsi les résultats antérieurs démontrant le rôle de tRip dans l'import d'ARNt. Le phénotype de la souche délétée a ensuite été évalué à chacun des stades de développement par un ensemble d'expériences menées *in vitro* et *in vivo*, en le comparant à la souche sauvage de référence. Les stades de développement chez le moustique et dans le foie (ookystes, sporozoïtes, schizontes hépatiques) ne diffèrent pas entre la souche sauvage et la souche tRip-KO. En revanche, le développement du stade sanguin est altéré chez la souche tRip-KO par rapport à la souche sauvage (**Figure 22**). C'est un résultat que j'ai obtenu par co-injection de parasites au stade sanguin sauvage (WT) et tRip-KO à des souris C57BL/6, et qui a été répété chez nos collaborateurs.

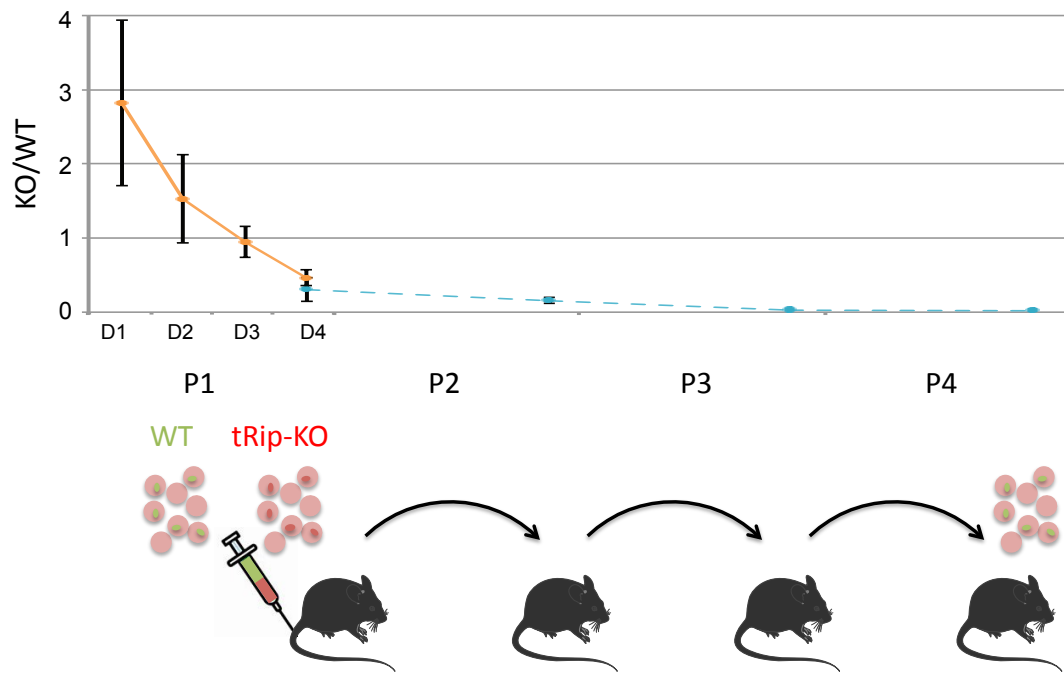


Figure 22 : La capacité à se multiplier dans les érythrocytes est fortement réduite chez *P. berghei* tRip-KO. Un groupe de souris a été injecté par intraveineuse avec un mélange équivalent en érythrocytes infectés par la souche WT et par la souche tRip-KO, puis la parasitémie ainsi que la proportion de parasite tRip-KO/parasites WT ont été évaluées. Le sang des souris infectées a été transféré à de nouveaux groupes de souris, et ce trois fois en tout, en continuant d'évaluer la parasitémie et le rapport KO/WT. Au fur et à mesure des jours et des passages, la proportion de parasites tRip-KO diminue drastiquement pour atteindre zéro : le quatrième groupe de souris n'est infecté que par des parasites WT.

L'ensemble de ce travail a été publié dans le journal PNAS en avril 2016 : *PNAS* (2016) **113**, 4717-4722.

***Apicomplexa*-specific tRip facilitates import of exogenous tRNAs into malaria sporozoites.**

Delphine Kapps¹, Tania Bour¹, Nassira Mahmoudi-Kaïdi¹, Sabine Thiberge, Daniel Bargieri, Robert Ménard, Magali Frugier.

¹ : Tania, Nassira et moi-même sommes co-premiers auteurs de ce travail.

Apicomplexa-specific tRip facilitates import of exogenous tRNAs into malaria parasites

Tania Bour^{a,1}, Nassira Mahmoudi^{a,1}, Delphine Kapps^{a,1}, Sabine Thiberge^b, Daniel Bargieri^{b,2}, Robert Ménard^b, and Magali Frugier^{a,3}

^aArchitecture and Reactivity of RNA, University of Strasbourg, CNRS, Institute for Molecular and Cellular Biology, 67084 Strasbourg Cedex, France; and ^bMalaria Biology and Genetics Unit, Pasteur Institute, 75015 Paris, France

Edited by Paul Schimmel, The Skaggs Institute for Chemical Biology, La Jolla, CA, and approved March 15, 2016 (received for review January 11, 2016)

The malaria-causing *Plasmodium* parasites are transmitted to vertebrates by mosquitoes. To support their growth and replication, these intracellular parasites, which belong to the phylum *Apicomplexa*, have developed mechanisms to exploit their hosts. These mechanisms include expropriation of small metabolites from infected host cells, such as purine nucleotides and amino acids. Heretofore, no evidence suggested that transfer RNAs (tRNAs) could also be exploited. We identified an unusual gene in *Apicomplexa* with a coding sequence for membrane-docking and structure-specific tRNA binding. This *Apicomplexa* protein—designated tRip (tRNA import protein)—is anchored to the parasite plasma membrane and directs import of exogenous tRNAs. In the absence of tRip, the fitness of the parasite stage that multiplies in the blood is significantly reduced, indicating that the parasite may need host tRNAs to sustain its own translation and/or as regulatory RNAs. *Plasmodium* is thus the first example, to our knowledge, of a cell importing exogenous tRNAs, suggesting a remarkable adaptation of this parasite to extend its reach into host cell biology.

tRNA | *Plasmodium* | trafficking

In *Plasmodium*, the causative agent of malaria, the nuclear genome has a minimal set of 45 transfer RNA (tRNA) genes, with only one gene per tRNA isoacceptor (1). This single-gene feature is an exception among eukaryotes, where tRNA genes are usually present in multiple copies. Discrepancies between codon use and expression levels of corresponding tRNAs were also observed in *Plasmodium falciparum* blood stages (2). These considerations raise the possibility that, under at least some conditions, the parasite may need an additional source of tRNAs and possibly rely on the import of exogenous tRNAs.

tRNA trafficking is only known to occur between compartments within eukaryotic cells. For example, nuclear-encoded tRNAs can transit from the nucleus to the cytoplasm, return to the nucleus, and be re-exported to the cytoplasm, depending on the tRNA maturation status and cellular environment (3). Cytoplasmic tRNAs are also imported into mitochondria (and chloroplasts) and participate in protein synthesis, mainly to supplement incomplete sets of organellar tRNAs (4). Which tRNAs are imported, and the mechanisms used for their transport, diverge considerably among organisms (5, 6). With these considerations in mind, we identified a *Plasmodium* genome-encoded protein that has motifs associated with tRNA binding. We show that this surface protein binds and imports exogenous tRNAs from the extracellular space into the parasite and that its deletion affects parasite development.

Results

Identification of *Plasmodium* tRip. A widely distributed tRNA binding motif is exemplified by a minimal tRNA binding protein—Trbp111—that was first identified in *Aquifex aeolicus* (7). This free-standing homodimeric protein specifically binds tRNA by recognizing its characteristic elbow structure. Other proteins that contain this motif include the yeast aminoacyl-tRNA synthetase cofactor 1 (ARC1p) (8), the metazoan AIMP1 (9), and *Toxoplasma gondii* Tg-p43 aminoacyl-tRNA synthetase interacting proteins (10).

Like Trbp111, ARC1p and AIMP1 bind tRNAs. Consistently, Tg-p43 is part of a multisynthetase complex, suggesting a tRNA-binding capability. We identified a gene encoding a 402-amino-acid *Plasmodium* protein (PF3D7_1442300 in *P. falciparum*) with a Trbp111-orthologous domain at its C terminus and an N-terminal region exhibiting a transmembrane helix motif (<https://www.predictprotein.org:443/>) (Fig. S1). Anticipating that this protein might import exogenous tRNAs, we designated it as tRip (tRNA import protein). We define tRip orthologs as proteins containing a C-terminal tRNA binding domain and a predicted transmembrane helix motif, which we found only in *Apicomplexa*, a phylum of parasitic protists that contains other human pathogens such as *Toxoplasma* and *Cryptosporidium*, in addition to *Plasmodium* (Fig. S2).

***P. falciparum* tRip Binds Human tRNAs.** In an in vitro assay, recombinant *P. falciparum* protein PftRip binds human native unfractionated tRNAs (Fig. 1A). The apparent dissociation constant (K_d) of 5 nM is of the same order of magnitude as that reported for Trbp111 (32 nM) (7) and ARC1p (5–10 nM) (11), and more than one order of magnitude lower than that observed for AIMP1 (200 nM) (12). To delineate PftRip tRNA binding activity, this experiment was repeated with fragments PftRip_{1–174} (containing the transmembrane helix) and PftRip_{214–402} (containing the Trbp111-like domain). Only the C-terminal module (PftRip_{214–402}) binds tRNAs, with an apparent K_d of 15 nM (Fig. 1B and C). These experiments suggest that PftRip has a similar or higher affinity for tRNAs than Trbp111, ARC1p, and AIMP1 and that the C-terminal domain of the protein is responsible for this binding activity.

Significance

We identified a membrane protein that is unique to *Plasmodium* (malaria-causing parasite) and its phylogenetic family members. This protein is localized at the parasite's surface, binds transfer RNAs (tRNAs) specifically, and directs the import of exogenous tRNAs into the parasite. In the absence of this protein, the parasite's development is severely reduced. We propose that *Plasmodium* diverts tRNAs from host cells to support its life cycle and discuss the biological pertinence of this unprecedented host–pathogen interaction, as well as the possible fate of imported tRNAs.

Author contributions: R.M. and M.F. designed research; T.B., N.M., D.K., S.T., and D.B. performed research; T.B., N.M., D.K., S.T., D.B., R.M., and M.F. analyzed data; and R.M. and M.F. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹T.B., N.M., and D.K. contributed equally to this work.

²Present address: Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-900 São Paulo SP, Brazil.

³To whom correspondence should be addressed. Email: M.Frugier@ibmc-cnrs.unistra.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1600476113/-DCSupplemental.

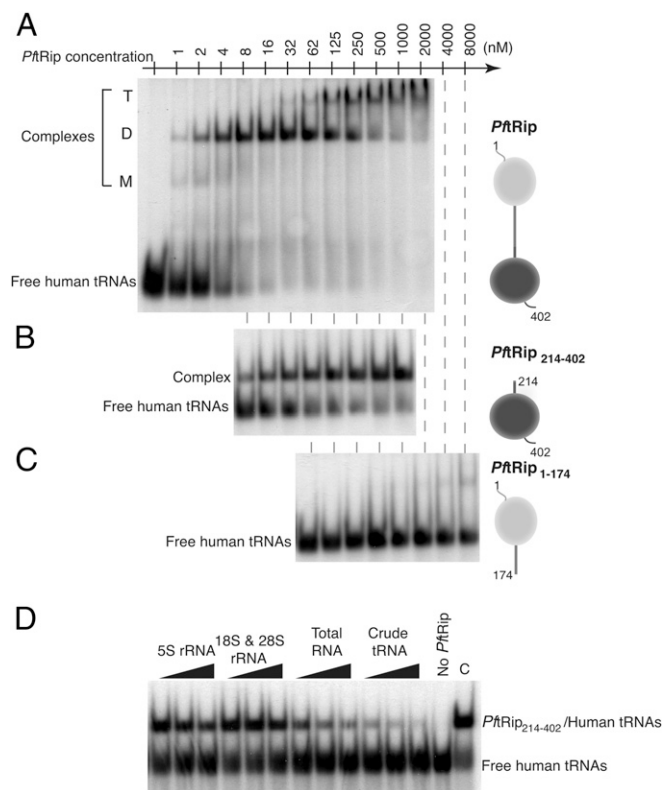


Fig. 1. Binding capacity and specificity of recombinant *PftRip* for tRNAs. Band shift assays were performed with radiolabeled crude extracts of human tRNA and increasing concentrations of (A) *PftRip*, (B) *PftRip*_{214–402}, and (C) *PftRip*_{1–174}. Bound tRNAs were visible at three different positions corresponding to monomeric (M), dimeric (D), and tetrameric (T) forms of *PftRip*. (D) Competition assays were conducted in the presence of RNA from different species (*Xenopus laevis* 5S rRNA, calf liver 18S and 28S rRNAs, total human RNA and crude extracts of human tRNA). C, control experiment without RNA competitor.

To investigate the specificity of *PftRip*_{214–402} for tRNAs compared with other RNAs, we conducted competition experiments with different pools of RNAs: (i) 5S ribosomal RNA (rRNA), (ii) 18S and 28S rRNAs, (iii) total RNAs, including tRNAs, and (iv) unfractionated tRNAs. Only extracts containing tRNAs (total RNAs or crude tRNAs) competed efficiently with a preformed complex between labeled human tRNAs and *PftRip*_{214–402} (Fig. 1D). We then carried out an RNA footprinting analysis to identify contact points between *PftRip* and tRNAs. *PftRip* binds to the outside corner of the L-shaped tRNA molecule (Fig. S3A and B). To further characterize tRNA recognition, we determined whether *PftRip* could still engage the tRNA in the yeast aspartyl-tRNA synthetase (AspRS)/tRNA^{Asp} complex (13). AspRS recognizes the “inside” of the L-shaped tRNA. This experiment showed that both *PftRip* and AspRS bind simultaneously to tRNA^{Asp} (Fig. S3C). The formation of this ternary complex confirms that *PftRip* binds only to the outside of the L-shaped tRNA structure. A similar ternary complex has been observed for tRNA^{Ile}, Trbp111, and isoleucyl-tRNA synthetase (14).

Expression and Subcellular Localization of tRip in *P. berghei*. The *Plasmodium* life cycle is complex, involving several parasite stages. The parasite multiplies in the midgut of the mosquito vector and inside hepatocytes (15) and erythrocytes (16) in the mammalian host (Fig. S4A). Analysis of transcriptomic and proteomic data from *P. falciparum* and *P. yoelii* (plasmodb.org/plasmo/) indicates that tRip is produced virtually constitutively during the parasite life cycle, i.e., in asexual and sexual blood stages (17–19), mosquito

forms (20), and pre-erythrocytic stages (21, 22). Likewise, *Toxoplasma* (23) or *Cryptosporidium* (24) transcriptomic databases do not show any significant variations in tRip mRNA expression. Immunofluorescence assays with purified anti-*PftRip*_{214–402} antibodies (Fig. S4B) confirmed the presence of tRip in *P. berghei* extracellular ookinete and sporozoite stages and intracellular hepatocytic and erythrocytic stages (Fig. S4C).

Assays using salivary gland sporozoites revealed similar peripheral fluorescence staining for tRip and the major surface protein, CSP (circumsporozoite protein; Fig. 2A). As the sporozoite pellicle contains an outer membrane (plasma membrane) and two inner membranes, we used the differential solubility characteristics of these membranes toward Triton X-100 to more precisely localize tRip (25). In untreated sporozoites, the fluorescence signals generated by tRip and CSP were evenly distributed at the parasite periphery (Fig. 2B). Fluorescence at the periphery was lost following outer membrane disruption with Triton X-100. This observation demonstrates that tRip is anchored to the plasma membrane

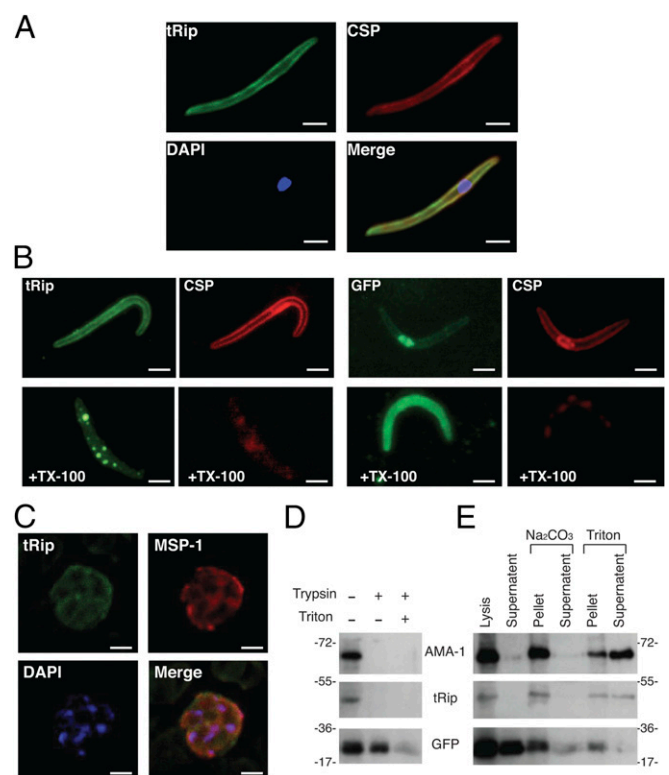


Fig. 2. tRip localization. (A) Coimmunolocalization assays on *P. berghei* sporozoites. The major sporozoite surface protein CSP and tRip were probed with anti-CSP antibodies and anti-*PftRip*_{214–402}, respectively, and the sporozoite nucleus was stained with DAPI. (B) Extraction of tRip with Triton X-100 (TX-100). TX-100 selectively removes the plasma membrane and its associated proteins (CSP and tRip), whereas the inner membrane complex is resistant to this treatment (25). Sporozoite integrity is shown by GFP staining, with CSP staining shown to verify successful Triton X-100 extraction. (Scale bars, 2 μ m.) (C) Subcellular localization of tRip in asexual blood-stage parasites of *P. berghei*. The schizont of *P. berghei* was doubly labeled with mouse anti-MSP-1 antibody (surface marker, red) and rabbit anti-tRip antibody (green). Nuclei were visualized with DAPI (blue). (Scale bars, 5 μ m.) (D) Protease protection assays on blood-stage parasites. Assays were performed with schizonts freed from erythrocytes, treated with trypsin, and probed with anti-*PftRip*_{214–402} antibody. GFP was used as a cytosolic control, digested by trypsin only under denaturing conditions (+ Triton). (E) Carbonate vs. Triton extraction of membrane proteins from blood-stage parasites (schizonts). Both tRip and the apical membrane antigen 1 (AMA-1) (41) were found in the membrane pellet after Na₂CO₃ treatment and were released into the supernatant only on Triton treatment.

of the sporozoite, presumably via its protein transmembrane helix motif (Fig. S1), thus enabling interaction with exogenous tRNAs.

Additionally, in blood-stage parasites, tRip and the surface protein MSP-1 colocalize (Fig. 2C). Protease protection assays on the parasite blood stage confirmed this cell surface localization (Fig. 2D) because signals corresponding to AMA-1 (apical membrane antigen 1) and tRip both vanished on trypsin treatment. Comparison of carbonate vs. detergent extraction showed that tRip behaves like AMA-1 and is only found in the reaction supernatant after Triton extraction and not after lysis or Na_2CO_3 treatment, indicating that it is an integral membrane protein (Fig. 2E).

Plasmodium Sporozoites Import Exogenous tRNAs. All *Apicomplexa* have in common the sporozoite stage. Unlike blood stages, the sporozoite is an accessible extracellular stage, which is characterized by its motility and its ability to traverse cells (26–28) without forming a parasitophorous vacuole. Thus, this parasite stage has an opportunity to directly interact with host tRNAs. For these reasons, we tested the ability of tRip to uptake exogenous tRNAs into *P. berghei* sporozoites. A FISH experiment was performed with *Escherichia coli* tRNA^{Val} and live or heat-treated sporozoites (50 °C for 30 min). Import of *E. coli* tRNA^{Val} was observed only in live WT parasites (Fig. 3A). tRNA import was also observed with sporozoites of two other *Plasmodium* species: *P. falciparum* and *P. yoelii* (Fig. 3A).

To examine whether this import is specific for tRNAs (as implied by the RNA binding assays above; Fig. 1D), live *P. berghei* sporozoites were incubated with Alexa Fluor-labeled in vitro-transcribed *E. coli* tRNA^{Val} and with human 5S rRNA (control). The fluorescent *E. coli* tRNA^{Val} transcript entered and accumulated inside the parasite, whereas the fluorescent 5S rRNA did not (Fig. S5). Radiolabeled full-length tRNAs from mouse hepatocytes (Hep1-6 cells) were protected from extracellular RNase treatment inside live but not heat-treated sporozoites (Fig. 3B). Based on these results, we conclude that full-length tRNAs enter sporozoites by an active process.

In a first attempt to show that import was dependent on tRip, sporozoites were incubated with an anti-*Pf*tRip_{214–402} antibody to block tRNA binding in a FISH experiment. The number of parasites demonstrating tRNA import was drastically reduced (Fig. 4A). Addition of increasing concentrations of recombinant *Pf*tRip restored tRNA import, presumably by competing for the antibody. At higher *Pf*tRip concentrations, tRNA import ultimately declined because *Pf*tRip also competes for exogenous tRNAs (Fig. 4A).

***P. berghei* tRip Is Important for Normal Blood-Stage Growth.** To assess tRip importance to parasite survival, the tRip-encoding gene (*TRIP*) was knocked out and replaced in the genome of the WT *P. berghei* ANKA strain by the hDHFR selectable marker and an mCherry cassette via double cross-over homologous recombination (29). Several independent tRip-KO clones were isolated, and successful recombination and the absence of tRip expression were confirmed by Southern and Western blot, respectively (Figs. S6A and S7A).

To confirm that tRNA import in sporozoites is indeed tRip dependent, the tRNA import assay was repeated with tRip-KO sporozoites. As expected, tRNA import was not observed in any tRip-KO sporozoite (>100 sporozoites were examined), consistent with complete ablation of tRNA import had occurred on KO of *TRIP* (Fig. 4B).

To determine whether tRip played any role in blood-stage replication, mice were coinfectd with tRip-KO (mCherry⁺) and GFP-encoding WT blood-stage parasites. The proportions of red and green fluorescent parasites were scored consecutively for 4 d during the parasite exponential growth phase (Fig. 5A and Fig. S6B). The proportion of tRip-KO parasites decreased at each multiplication cycle compared with WT parasites. Furthermore, the tRip-KO parasite was completely absent in mouse blood after only

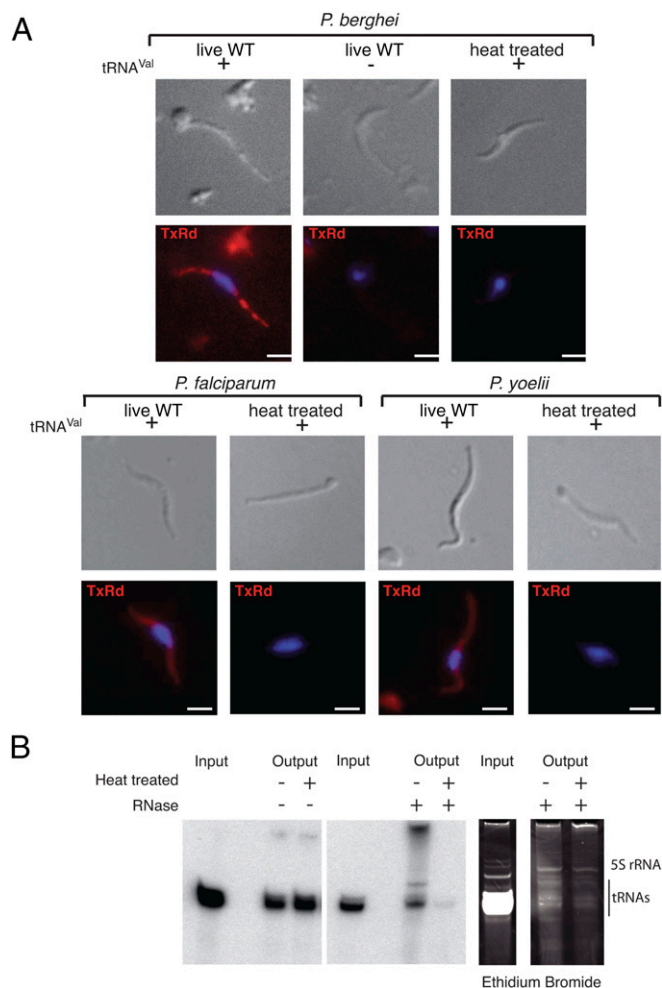


Fig. 3. Import of tRNAs in *Plasmodium* sporozoites. (A) *P. berghei*, *P. yoelii*, and *P. falciparum* WT sporozoites were incubated with (+) or without (–) *E. coli* tRNA^{Val} and were subjected to FISH. Due to high sequence similarities between mammalian and plasmodial tRNAs, *E. coli* tRNA^{Val} was chosen as a template so that a specific FISH probe could be designed [3′ end-labeled with Texas Red (TxRd)] that does not cross-hybridize with any *Plasmodium* endogenous tRNAs. On tRNA import, about 80% of sporozoites (WT *P. berghei*, *P. yoelii*, and *P. falciparum*) hybridized the fluorescent probe. (Scale bars, 2 μm.) (B) Radioactive tRNAs from mouse Hep1-6 cells were cosedimented with both infectious and noninfectious *P. berghei* sporozoites in the absence (Left) and presence (Center and Right) of RNase A. Following extracellular RNase treatment, intracellular sporozoite endogenous tRNAs were undamaged (Right), and exogenously added radiolabeled tRNAs were observed within living sporozoites only (Center), indicating tRNA import had occurred. Additional bands correspond to tRNA aggregation resulting from phenol extraction.

four successive passages (Fig. 5B). Thus, tRip appears to confer a selective advantage to the parasite during blood-stage infection.

We hypothesized that this phenotype might be a consequence of reduced translational activity in blood-stage tRip-KO parasites. To test this hypothesis, metabolic labeling was performed with [³⁵S] methionine. After 2 and 4 h, equal amounts of [³⁵S]-labeled parasites were analyzed by SDS/PAGE (Fig. S6C). WT and tRip-KO parasites showed the same translational profiles, with more intense labeling for WT, suggesting that translation is globally reduced in the absence of tRip.

To test whether tRip-KO parasites displayed any other phenotype during the parasite life cycle, *Anopheles stephensi* mosquitoes were infected with blood-stage parasites. tRip-KO clones developed normally inside mosquito midguts (Fig. S7B) and yielded normal numbers of sporozoites in mosquito salivary glands

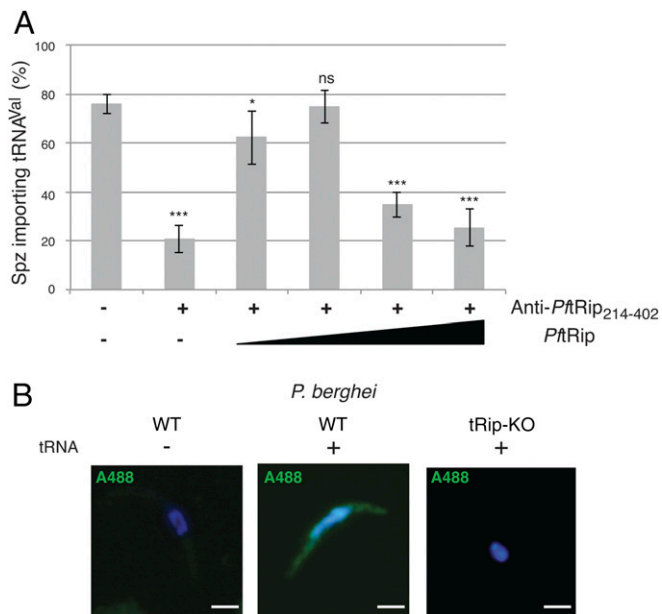


Fig. 4. tRip triggers tRNA import. (A) Import of tRNAs in *P. berghei* WT sporozoites was inhibited in the presence of anti-PfRip₂₁₄₋₄₀₂ antibody. It was gradually rescued following the addition of low concentrations of recombinant PfRip protein (80 and 160 nM). Higher PfRip concentrations (320 and 760 nM) lead to tRNA sequestration thereby reducing import. Values correspond to the percentage of tRNA-importing sporozoites ($n = 50$), means are from three independent experiments, error bars are SDs, unpaired t test: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, ns indicates that values are not significantly different ($P > 0.1$). (B) *P. berghei* WT and tRip-KO sporozoites were incubated with (+) or without (-) *E. coli* tRNA^{Val} and were subjected to FISH. Because the tRip-KO parasite expresses mCherry, the probe was 3' end-labeled with Alexa Fluor 488 (A488). (Scale bars, 2 μ m.)

(Fig. S7C). Sporozoite infectivity in vivo was then measured by comparing prepatent periods of infection following i.v. injection of 5×10^3 WT or mutant salivary gland sporozoites (per 4-wk-old C57BL/6 mouse, five mice per group). Blood-stage parasites were detected in all mice 3 d after injection, and parasitemia at day 4 was indistinguishable between WT and tRip-KO (cl4) parasites ($\sim 0.06\%$ each), indicating that tRip-KO sporozoites induce a normal pre-erythrocytic phase in the mouse (Fig. S7D). In vitro, tRip-KO parasites developed efficiently inside HepG2 hepatoma cells, releasing similar numbers of merozoites as WT parasites (Fig. S7E–G). Therefore, the lack of tRip in *P. berghei* appears to affect the growth of only blood-stage parasites.

Discussion

Our findings demonstrate a direct connection between tRip and tRNA import in *Plasmodium*. This discovery not only reveals unsuspected molecular exchanges between the parasite and its host, but is also the first report, to our knowledge, of intracellular import of exogenous tRNA in any cell.

We find that *P. falciparum* tRip specifically binds human tRNAs, through its C-terminal domain, with affinity similar to that of well-characterized tRNA-binding proteins such as Trbp111 (7) and ARC1p (11). In agreement with transcriptomic and proteomic data (plasmodb.org/plasmo/), immunolocalization data in *P. berghei* indicate that tRip is expressed throughout the *Plasmodium* life cycle, in intra- and extracellular stages (Fig. S4C), and is integral to the plasma membrane of the sporozoite and blood stages (Fig. 2). Crucially, WT *P. berghei* sporozoites, and presumably other parasite stages as well, can import exogenous tRNAs (Fig. 3), but this capability is lost on disruption of tRip expression (Fig. 4). Together, these data indicate that the

malaria parasite has the ability to import exogenous tRNAs via a tRip-dependent pathway. Host tRNAs would help parasite protein synthesis, provided (i) they are substrates for plasmodial aminoacyl-tRNA synthetases or (ii) they import bound host aminoacyl-tRNA synthetase (we observed formation of such a ternary complex between AspRS, tRNA^{Asp}, and tRip in vitro; Fig. S3C). Imported tRNAs could balance the surprisingly limited expression of endogenous tRNAs or alter a translational bias.

Gene targeting experiments in *P. berghei* indicate that parasites lacking tRip have a specific defect during the blood phase of the parasite life cycle, i.e., the repeated cycles of parasite multiplication inside erythrocytes is defective. Although lack of tRip is not lethal to blood-stage parasites, coinfection experiments in the mouse blood clearly show that the absence of tRip affects the integrity of blood-stage multiplication (Fig. 5). This phenotype is concomitant with globally reduced protein synthesis in tRip-KO blood-stage parasites, consistent with a scenario wherein host tRNAs are required for robust protein synthesis to proceed (Fig. S6C).

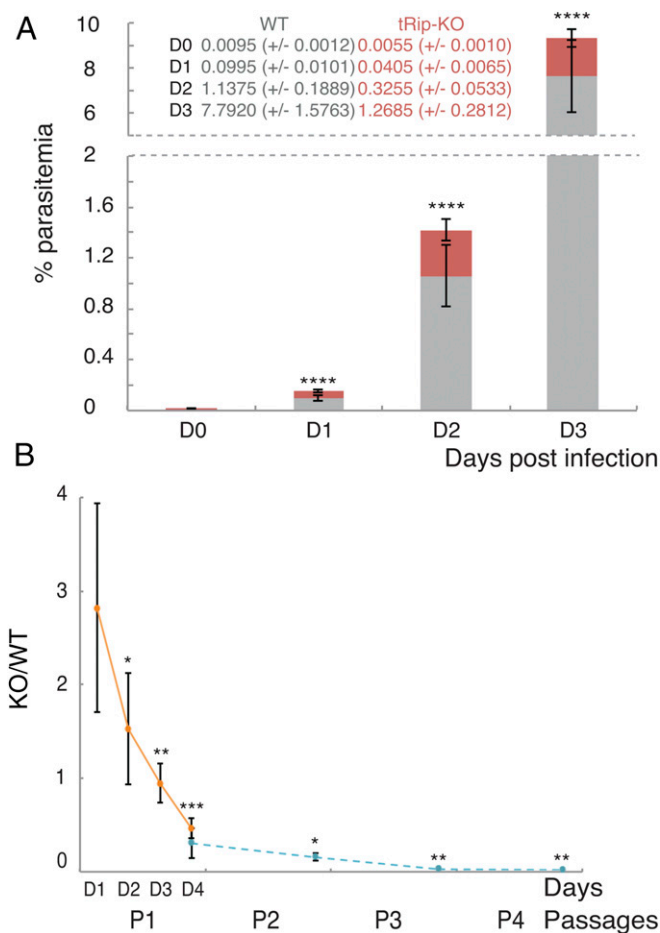


Fig. 5. Phenotype of the tRip-KO parasite. (A) Four-week-old mice were coinfecting by WT/GFP⁺ (gray) and tRip-KO/mCherry⁺ parasites (red). Values correspond to the percentage of red blood cells infected with WT (gray) or tRip-KO (red) parasites, $n = 15$, error bars are SDs, unpaired t test: $****P < 0.0001$. (B) Ratio of tRip-KO mCherry⁺/WT GFP⁺ parasites in the blood, measured at days 1, 2, 3, and 4 after infection during the course of a first passage (orange) and at day 4 throughout four repeated passages (blue). Values correspond to the ratio of red blood cells infected with tRip-KO parasites to red blood cells infected with WT parasites, at days 1–4 during the first passage (P1, $n = 6$) and at day 4 during the three following passages (P2–P4, $n = 5$), error bars are SDs, unpaired t test: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

The observation that tRip is important only during parasite multiplication in the blood is unexpected, from both the parasite stage and host cell perspectives. On the parasite side, why would imported tRNAs be important during the life cycle stage in which multiplication is most limited, and which presumably requires less protein synthesis? Blood-stage parasites only multiply 10-fold per replicative cycle, whereas an oocyst in the mosquito midgut or the liver stage in the mammalian host give rise to tens of thousands of parasite progeny during schizogony (Fig. S44). In this context, it is interesting to note that orthologs of *Plasmodium* tRip-encoding genes are found only among apicomplexan parasites, which lack an RNA interference pathway (RNAi, except for *T. gondii*) (30). Imported tRNAs may thus serve as a source of regulatory RNAs. In fact, tRNAs and tRNA fragments act as regulatory molecules in other organisms (31–33). Parasites may thus rely on exogenous tRNAs as a growth regulatory mechanism.

On the host cell side, there is no direct evidence for the presence of tRNAs in mature erythrocytes (34). Red blood cells contain no nucleus, and protein biosynthesis is assumed to be absent in these cells. However, mRNAs for the translational machinery are still detected in mature red blood cells (35). Furthermore, many *Plasmodium* species preferentially invade reticulocytes (36), which contain high levels of tRNAs (34) compared with mature erythrocytes (35).

The parasite stage(s) that actually imports the host tRNAs for blood-stage growth remain unknown. Among blood stages, the extracellular merozoite is short-lived and does not traverse host cells, whereas the intraerythrocytic stages resides within a parasitophorous vacuole (PV). Therefore, the most likely hypothesis is that intraerythrocytic parasites pump tRNAs across the PV membrane and, secondarily, across the parasite plasma membrane via tRip. It could also be speculated that tRNAs may be imported during the liver stage or even the sporozoite stage, the only stage that can traverse host cells and thus lie in direct contact with the host cell cytosol and tRNAs, for use in subsequent developmental stages. However, cell traversal-deficient parasites have no defect in invading and developing inside hepatocytes *in vivo* and *in vitro*, nor in subsequent development inside erythrocytes (28). We cannot exclude the possibility that tRip, may have a function other than tRNA import during blood-stage growth. For example it might interact with aminoacyl-tRNA synthetases in a manner similar to other Trbp111 homologs such as yeast ARC1p (8), human AIMP1 (9), and *Toxoplasma gondii* Tg-43 (10).

In conclusion, our data describing the tRip-directed import of external tRNAs reveal a novel adaptation of *Plasmodium* parasites to their host, as well as a first occurrence of optimal cell growth dependent on import of exogenous tRNA. Incidentally, tRip function provides a unique molecular system for targeting exogenous molecules into the cytosol of *Plasmodium* cells.

Materials and Methods

Identification of *Pf*tRip Gene. Additional information can be found in *SI Materials and Methods*. The *Pf*tRip gene (PF14_0401) was identified by blasting the yeast ARC1p (NP_011410) and human AIMP1 (NP_004748) sequences against PlasmoDB (plasmodb.org/plasmo/). The sequence alignment was computed with Tcoffee software (tcoffee.vital-it.ch/apps/tcoffee/index.html), and the detection of the transmembrane helix was achieved with the PredictProtein software (<https://www.predictprotein.org/443/>).

***Pf*tRip Cloning and Production.** The *Pf*tRip gene was amplified by PCR from a *P. falciparum* cDNA library (provided by H. Vial, CNRS UMR 5235, University of Montpellier 2, Montpellier, France) and sequenced. Both *Pf*tRip and *Pf*tRip_{1–174} were cloned into pQE30 (Qiagen) to produce proteins with a 6-histidine fusion tags at their N termini. The recombinant *Pf*tRip_{214–402}, corresponding to the 260-amino-acid C-terminal domain, was cloned into pGEX-2T (Amersham Biosciences) to yield an N-terminal GST fusion protein. Thrombin cleavage occurred at Proline 214 (instead of the cleavage site provided in pGEX-2T); thus, the C-terminal domain of *Pf*tRip was consequently referred as *Pf*tRip_{214–402}. Tagged proteins were purified according to

the manufacturer's instructions on Ni-NTA resin (*Pf*tRip and *Pf*tRip_{1–174}, in the presence of 0.005% n-dodecyl β -D-maltopyranoside) or on a glutathione-Sepharose resin (*Pf*tRip_{141–402}) and were further purified by gel filtration (Superdex 200; GE Healthcare) in 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.4, 150 mM KCl, and 10% (vol/vol) glycerol. Gel filtration analysis showed that *Pf*tRip_{1–174} and *Pf*tRip_{214–402} eluted at ~44 kDa, suggesting that they behaved as homodimers, whereas *Pf*tRip behaved as a tetramer and eluted at ~158 kDa (based on comparisons to standards).

Enzymatic Footprinting. Yeast native tRNA^{Asp} was 5' or 3' labeled as described in refs. 37 and 38, respectively. Assays were performed as described in ref. 38 with 50,000 cpm labeled tRNA, 5 μ M *Pf*tRip in 50 mM Hepes, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, and 25 mM KCl, and 0.01 μ g/ μ L 5S rRNA from *X. laevis*.

Gel Shift Assays. In binding assays, radiolabeled tRNAs (1,000 cpm/ μ L) were incubated for 20 min on ice in 25 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 10% (vol/vol) glycerol, and 20 ng/ μ L oligo-dT, with increasing concentrations of *Pf*tRip (0–2,000 nM *Pf*tRip; 0–1,000 nM *Pf*tRip_{214–402}, and 0–8,000 nM *Pf*tRip_{1–174}). In competition assays, labeled tRNA (1,000 cpm/ μ L) and 30 nM *Pf*tRip_{214–402} were incubated with increasing amounts of unlabeled competitor RNAs (0.625, 1.25, and 2.5 ng/ μ L total RNA, ribosomal RNAs, or crude tRNAs). Assays were analyzed on an acrylamide/bisacrylamide gel (37.5/1) 6% (wt/vol) in Tris/borate/EDTA buffer, at 140 V for 90 min (*Pf*tRip_{214–402}) or 150 min (*Pf*tRip_{1–402}) at 4 °C. Radiolabeled yeast tRNA^{Asp} was incubated under the same conditions with either 75 nM yeast AspRS alone and increasing concentrations of *Pf*tRip_{214–402} (12.5, 25, and 50 nM) or 30 nM *Pf*tRip_{214–402} and increasing concentrations of yeast AspRS (37.5, 75, and 150 nM).

Immunofluorescence. Sporozoite membrane extraction was performed as previously described (25). Samples were analyzed with rabbit anti-*Pf*tRip_{214–402} affinity purified using the *Pf*tRip_{141–402} recombinant protein, rabbit anti-GFP antibodies, and mouse anti-CSP serum (39) and detected with anti-rabbit IgG [fluorescein isothiocyanate (FITC)] and anti-mouse IgG [tetramethylrhodamine-isothiocyanate (TRITC)] (Sigma-Aldrich), respectively. Nuclei were spotted with 1 μ g/mL DNA stain DAPI (Sigma-Aldrich). Parasites were observed using epifluorescence microscopy (Axiovert200; Zeiss; 100 \times objective with the corresponding filters).

Air-dried infected erythrocytes were acetone fixed, permeabilized with ice cold methanol, and incubated with rabbit anti-tRip antibodies (1:50 dilution). Mouse anti-MSP-1 antibody was used as a colocalization marker (PEM-2; Santa Cruz Biotechnology). The parasite nuclei were stained with DAPI. Parasites were observed using confocal microscopy (LSM780; Zeiss; 60 \times objective).

Protease Protection Assays. Infected blood was lysed in PBS containing 0.01% saponin for 5 min on ice. The parasites were washed in PBS and incubated for 30 min at 37 °C in PBS, 1 mM CaCl₂, and 6 ng/ μ L trypsin (Promega), without or with 1% Triton X-100. tRip, AMA-1, and GFP were detected by Western blotting with purified rabbit antibodies raised against the recombinant *Pf*tRip_{214–402}, anti-AMA-1 rat antibodies (integral membrane protein control), and anti-GFP-rabbit antibodies (cytosolic control).

Solubility Analysis. Carbonate vs. detergent extraction of membrane proteins was performed on *P. berghei* blood-stage schizonts as described in ref. 40. Parasites were lysed by three cycles of freeze/thaw in 5 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing antiprotease mixture (1/100; Sigma-Aldrich) and centrifuged 10 min at 16,000 \times g. The membrane-containing pellets were then incubated for 30 min on ice in 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.5) or 1% Triton and centrifuged for 15 min at 16,000 \times g. All fractions were analyzed by Western blot with specific antibodies against *Pf*tRip_{214–402}, AMA-1, and GFP.

Import Assays. Sporozoites (2 \times 10⁴/ μ L) were first incubated with 0.4 μ M radioactive Hepa1-6 tRNAs (50,000 cpm/pmol) in DMEM supplemented with penicillin, streptomycin (Invitrogen), and 1 U/ μ L RNasin (Promega) for 15 min at room temperature and then washed five times with PBS. After cosedimentation (5 min at 9,000 \times g), parasite-bound tRNAs were directly dissolved in loading buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM EDTA, 8 M urea, and 0.01% of each bromophenol and xylene cyanol dyes) or subjected to RNase A treatment (0.1 μ g/ μ L) for 3 min at 25 °C in PBS and phenol extracted (TRI-Reagent; Sigma-Aldrich) before analysis on a denaturing (8 M urea) PAGE (19/1) 12% (wt/vol). For FISH experiments, to avoid cross-tRNA hybridization, and because its sequence was sufficiently distinct from the parasite's tRNAs, *E. coli* tRNA^{Val} was chosen as a probe. Sporozoites (1 \times 10³/ μ L) were processed as described previously and subjected to passive sedimentation

for 1 h at room temperature in cell-line diagnostic microscope slides. The slides were then washed with PBS and air-dried overnight. Samples were fixed with 4% (wt/vol) paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature, and blocked in 2% (wt/vol) BSA, Denhardt's 5 \times , saline-sodium citrate (SSC) buffer 5 \times , and 35% (vol/vol) deionized-formamide for 1 h at room temperature. The DNA probes (100 ng/mL; 5'-GAGGTGCTCTCCAGCTGAGCTAATCACCC-3') were 3' end-labeled with Texas Red (TxRd) for probing WT *P. berghei* sporozoites and with Alexa Fluor 488 (A488) for probing tRip-KO sporozoites. Samples were heated at 75 °C for 5 min and incubated together overnight at room temperature in the dark under constant shaking. The slides were washed for 5 min at room temperature with SSC 2 \times containing 50% (vol/vol) deionized-formamide, and then SSC 2 \times , SSC 1 \times containing 1 μ g/mL DAPI, and finally SSC 0.5 \times . Alternatively, sporozoites (1 \times 10³/ μ L) were preincubated for 15 min at room temperature in the presence of anti-PfRip₂₁₄₋₄₀₂ (1/50 or 1/20) and increasing concentrations of recombinant PfRip (80, 160, 320, and 640 nM) before the addition of 0.4 μ M *E. coli* tRNA^{Val}. *P. berghei* sporozoites (2 \times 10³/ μ L) were mixed with 0.4 μ M Alexa Fluor-labeled in vitro-transcribed *E. coli* tRNA^{Val} or human 5S ribosomal RNA in PBS and RNasin. Immediately after, the mixture (sporozoites and tRNAs) was put

between the slide and coverslip with a drop of 0.5% agar/PBS and observed by epifluorescence microscopy.

Parasite Production, Generation of tRip-KO Mutant Parasites, and Phenotyping Procedures. Additional information can be found in *SI Materials and Methods*. All animal experiments were performed in accordance with the CNRS animal care and use committee guidelines.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Tamara Hendrickson and Ermanno Candolfi for support and discussions and Marie Miller, Oliver Miller, and Joe Chihade for comments on the manuscript. We acknowledge Sylvie Friand, David Bock, Marta Cela, Caroline Paulus, Julien Soichot, and Anne Théobald-Dietrich for assistance. This work was supported by the CNRS, the Université de Strasbourg, the Fondation pour la Recherche Médicale Alsace, the Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Luxembourg (Tania Bour), the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-07-BLAN-0069-01), and the European Community's Seventh Framework, Programme (FP7/2007-2013) under Grant 223024. This work has been published under the framework of the Laboratory of Excellence: ANR-10-LABX-0036_NETRNA and the equipment of excellence: I2MC.

- Gardner MJ, et al. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419(6906):498–511.
- Filissetti D, et al. (2013) Aminoacylation of *Plasmodium falciparum* tRNA(Asn) and insights in the synthesis of asparagine repeats. *J Biol Chem* 288(51):36361–36371.
- Hopper AK, Pai DA, Engelke DR (2010) Cellular dynamics of tRNAs and their genes. *FEBS Lett* 584(2):310–317.
- Salinas T, Duchêne AM, Maréchal-Drouard L (2008) Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem Sci* 33(7):320–329.
- Schneider A (2011) Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation. *Annu Rev Biochem* 80:1033–1053.
- Megel C, et al. (2015) Surveillance and cleavage of eukaryotic tRNAs. *Int J Mol Sci* 16(1):1873–1893.
- Morales AJ, Swairjo MA, Schimmel P (1999) Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *EMBO J* 18(12):3475–3483.
- Karanasios E, Simos G (2010) Building arks for tRNA: Structure and function of the Arc1p family of non-catalytic tRNA-binding proteins. *FEBS Lett* 584(18):3842–3849.
- Kim JH, Han JM, Kim S (2014) Protein-protein interactions and multi-component complexes of aminoacyl-tRNA synthetases. *Top Curr Chem* 344:119–144.
- van Rooyen JM, et al. (2014) Assembly of the novel five-component apicomplexan multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex is driven by the hybrid scaffold protein Tg-p43. *PLoS One* 9(2):e89487.
- Simos G, Sauer A, Fasiolo F, Hurt EC (1998) A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell* 1(2):235–242.
- Shalak V, et al. (2001) The EMAP1 cytokine is released from the mammalian multi-synthetase complex after cleavage of its p43/proEMAP1 component. *J Biol Chem* 276(26):23769–23776.
- Ruff M, et al. (1991) Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: Crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science* 252(5013):1682–1689.
- Nomanbhoy T, et al. (2001) Simultaneous binding of two proteins to opposite sides of a single transfer RNA. *Nat Struct Biol* 8(4):344–348.
- Ménard R, et al. (2013) Looking under the skin: The first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol* 11(10):701–712.
- Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE (2007) Malaria: Mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol* 2:217–249.
- Silvestrini F, et al. (2010) Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics* 9(7):1437–1448.
- Bowyer PV, Simon GM, Cravatt BF, Bogoy M (2011) Global profiling of proteolysis during rupture of *Plasmodium falciparum* from the host erythrocyte. *Mol Cell Proteomics* 10(5):M110001636.
- Bunnik EM, et al. (2013) Polysome profiling reveals translational control of gene expression in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Biol* 14(11):R128.
- López-Barragán MJ, et al. (2011) Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* 12:587.
- Lindner SE, et al. (2013) Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. *Mol Cell Proteomics* 12(5):1127–1143.
- Williams CT, Azad AF (2010) Transcriptional analysis of the pre-erythrocytic stages of the rodent malaria parasite, *Plasmodium yoelii*. *PLoS One* 5(4):e10267.
- Fritz HM, et al. (2012) Transcriptomic analysis of toxoplasma development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. *PLoS One* 7(2):e29998.
- Mauzy MJ, Enomoto S, Lancto CA, Abrahamsen MS, Rutherford MS (2012) The *Cryptosporidium parvum* transcriptome during in vitro development. *PLoS One* 7(3):e31715.
- Bergman LW, et al. (2003) Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *J Cell Sci* 116(Pt 1):39–49.
- Risco-Castillo V, et al. (2015) Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles. *Cell Host Microbe* 18(5):593–603.
- Mota MM, et al. (2001) Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* 291(5501):141–144.
- Amino R, et al. (2008) Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe* 3(2):88–96.
- Ménard R, Janse C (1997) Gene targeting in malaria parasites. *Methods* 13(2):148–157.
- Baum J, et al. (2009) Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites. *Nucleic Acids Res* 37(11):3788–3798.
- Mei Y, et al. (2010) tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation. *Mol Cell* 37(5):668–678.
- Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP, Anderson P (2011) Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol Cell* 43(4):613–623.
- Raina M, Ibba M (2014) tRNAs as regulators of biological processes. *Front Genet* 5:171.
- Smith DW, McNamara AL (1972) The transfer RNA content of rabbit reticulocytes: Enumeration of the individual species per cell. *Biochim Biophys Acta* 269(1):67–77.
- Kabanova S, et al. (2009) Gene expression analysis of human red blood cells. *Int J Med Sci* 6(4):156–159.
- Cromer D, Evans KJ, Schofield L, Davenport MP (2006) Preferential invasion of reticulocytes during late-stage *Plasmodium berghei* infection accounts for reduced circulating reticulocyte levels. *Int J Parasitol* 36(13):1389–1397.
- Rudinger J, et al. (1992) Determinant nucleotides of yeast tRNA(Asp) interact directly with aspartyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(13):5882–5886.
- Frugier M, Moulinier L, Giegé R (2000) A domain in the N-terminal extension of class IIb eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases is important for tRNA binding. *EMBO J* 19(10):2371–2380.
- Boulangier N, Charoenvit Y, Kretzli A, Betschart B (1995) Developmental changes in the circumsporozoite proteins of *Plasmodium berghei* and *P. gallinaceum* in their mosquito vectors. *Parasitol Res* 81(1):58–65.
- Pachlatko E, et al. (2010) MAHRP2, an exported protein of *Plasmodium falciparum*, is an essential component of Maurer's cleft tethers. *Mol Microbiol* 77(5):1136–1152.
- Bargieri DY, et al. (2013) Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nat Commun* 4:2552.
- Sinden RE, Butcher GA, Beetsma AL (2002) Maintenance of the *Plasmodium berghei* life cycle. *Methods Mol Med* 72:25–40.
- Kennedy M, et al. (2012) A rapid and scalable density gradient purification method for *Plasmodium sporozoites*. *Malar J* 11:421–430.
- Janse CJ, Waters AP (1995) *Plasmodium berghei*: The application of cultivation and purification techniques to molecular studies of malaria parasites. *Parasitol Today* 11(4):138–143.
- Sinnis P, De La Vega P, Coppi A, Krzych U, Mota MM (2013) Quantification of sporozoite invasion, migration, and development by microscopy and flow cytometry. *Methods Mol Biol* 923:385–400.
- Sinden RE, Hartley RH, Winger L (1985) The development of *Plasmodium* ookinets in vitro: An ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology* 91(Pt 2):227–244.
- Deans JA, Thomas AW, Cohen S (1983) Stage-specific protein synthesis by asexual blood stage parasites of *Plasmodium knowlesi*. *Mol Biochem Parasitol* 8(1):31–44.
- Mellot P, Mechulam Y, Le Corre D, Blanquet S, Fayat G (1989) Identification of an amino acid region supporting specific methionyl-tRNA synthetase: tRNA recognition. *J Mol Biol* 208(3):429–443.
- Kleeman TA, Wei D, Simpson KL, First EA (1997) Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine. *J Biol Chem* 272(22):14420–14425.
- Castro de Moura M, et al. (2011) Entamoeba lysyl-tRNA synthetase contains a cytokine-like domain with chemokine activity towards human endothelial cells. *PLoS Negl Trop Dis* 5(11):e1398.
- Wakasugi K, Schimmel P (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* 284(5411):147–151.
- Yang XL, Skene RJ, McRee DE, Schimmel P (2002) Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(24):15369–15374.

Supporting Information

Bour et al. 10.1073/pnas.1600476113

SI Materials and Methods

RNA Preparation. Native *E. coli* tRNA^{Val} (tdbR00000456; trnadb.bioinf.uni-leipzig.de/) was purchased from Subriden RNA. Total RNA from HeLa or Hepa1-6 cells was extracted using Tri-Reagent LS (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. Further fractionation on a gel filtration column (Superdex 200; GE Healthcare) in 50 mM Hepes, pH 7.5, and 150 mM NaCl allowed the separation of tRNAs from mRNAs and ribosomal RNAs.

Radioactive 3' end labeling of tRNAs (Hepa 1–6 crude tRNAs and yeast tRNA^{Asp}) was achieved with [α -³²P]ATP exchanged in 45 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 μ M CTP, 10 mM MgCl₂, 7.5 mM dithio-erythritol (DTE), and 40 ng/ μ L *E. coli* CCase (gift from A. Théobald-Dietrich, CNRS UPR 9002, Institute for Molecular and Cellular Biology, Strasbourg, France) for 30 min at 37 °C. Nonincorporated radioactive nucleotides were removed on a NAP-5 column (GE Healthcare). Before use, all tRNAs and tRNA transcripts were renatured in H₂O by heating at 65 °C for 2 min and then cooled for 10 min at room temperature in the presence of 10 mM MgCl₂.

The *E. coli* tRNA^{Val} sequence was cloned under the control of the T7 RNA polymerase promoter in pUC119. Transcriptions were performed for 2 h at 37 °C with 50 ng/ μ L linearized plasmid, 5 μ g/mL T7 RNA polymerase in 40 mM Tris-HCl, pH 8.1, 10 mM DTE, 2 mM spermidine, 11 mM MgCl₂, 0.5 mM of ATP, CTP, GTP, 0.4 mM UTP, and 0.1 mM UTP Chromatide Alexa Fluor 546 (Molecular Probes). Nonincorporated nucleotides were removed on a NAP-5 column (GE Healthcare).

Western Blot. Pellets of purified sporozoites (5×10^5 parasites per lane) or blood-stage parasites (schizonts, 5×10^6 parasites per lane) were dissolved in 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (vol/vol) glycerol, 100 mM β -mercapto-ethanol, 2% (wt/vol) SDS, and 0.01% bromo-phenol blue and heated for 5 min at 95 °C. *P. berghei* tRip was detected by Western blotting with a purified rabbit antibody raised against the recombinant PflRip₂₁₄₋₄₀₂.

Parasite Production.

Sporozoites. *A. stephensi* mosquitoes were raised and infected with GFP-transgenic *P. berghei* (ANKA 2.34 clone), the tRip-KO mutant parasite, or *P. yoelii* (17XNL strain) as described in ref. 42, and sporozoites were isolated by dissection of their salivary glands 18–21 d later. Isolated sporozoites glided and were thus considered infectious. As a control, when heated at 50 °C for 30 min, sporozoites were immotile and considered noninfectious (27). When necessary, sporozoites were further purified as described in ref. 43. *P. falciparum* (NF54 strain) sporozoites were isolated by dissection of salivary glands of *A. stephensi* mosquitoes infected by *P. falciparum* (University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands).

***P. berghei* blood stages.** Three-week-old Swiss mice were infected i.v. with $\sim 1 \times 10^6$ cryopreserved parasites. Infected blood was collected when parasitemia reached 5–10% and, when necessary, was cultured in vitro for an additional 22 (WT) or 44 h (tRip-KO) to collect schizonts as described in ref. 44.

In vitro differentiation of *P. berghei* sporozoites into hepatic schizont was achieved in 48 h as described in ref. 45.

In vitro differentiation of *P. berghei* gametocytes into ookinetes was achieved from the blood of an infected mouse according to ref. 46.

Generation of tRip-KO Mutant Parasites. For replacement of tRip, a 575-bp 5' fragment (sense: 5'-GGTACCGTGAGCATCTATA-TATTTGTTACGTATCATATTTTAAAAAATTG-3'; antisense: 5'-CTCGAGGTTGGGGGAATATAATATCGAATATTATA-TATATGTGTGTA-AATGC-3') and a 455-bp 3' fragment (sense: 5'-AGATCTGTTAGTTGGAAAACGAGGTTATTTAGCTCTG-TATAATATCCGAC-3'; antisense: 5'-GAATTCCTTATCGTTG-GTGAAATTGGGAAAATCACCTTCTACCATTGTGCATG-3') were amplified by PCR using *P. berghei* genomic DNA as template. *P. berghei* merozoites were transformed and mutant clones were selected as previously described (29). Plasmid integration in the genome was verified by Southern analysis and PCR for eight clones.

Phenotyping Procedures. Two tRip-KO clones [clone 3 (cl3) and clone 4 (cl4)] were tested for their development in vivo and in vitro and compared with the WT parasite. Swiss mice (3 wk old) were infected i.v. with $\sim 1 \times 10^6$ cryopreserved WT and tRip-KO parasites (clones 3 and 4). Four days later, infected blood was diluted and transferred to recipient mice to a final parasitemia of 0.005% each. Daily, the blood of each donor mouse was monitored for the development of tRip-KO/mCherry⁺ and WT/GFP⁺ infected erythrocytes. GFP⁺ and mCherry⁺ parasites were counted by FACS (FacsFortessa) from 10^6 events for each point [$n = 15$ for tRip-KO (cl3 or cl4) and WT coinfections and $n = 8$ for the control experiment (WT/mCherry⁺ and WT/GFP⁺ coinfections)]. At day 4 after infection, replicated parasites were diluted and transferred to recipient mice ($n = 5$) to a final parasitemia of 0.01% (tRip-KO + WT) and were subsequently passaged through four successive rounds of infection.

Monitoring of hepatic stage development in vitro. HepG2 cells were cultured in DMEM growth medium containing 100 μ g/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 200 μ g/mL neomycin, and 10% (vol/vol) FCS. Cells were seeded into 24-well plates, at a density of 1.5×10^5 cells per well, and infected with 5×10^4 sporozoites per well. After a 62-h incubation, cells were collected, fluorescent merosomes were counted, their size was measured, and the number of released merozoites was determined by fluorescence microscopy.

Monitoring of hepatic stage development in vivo. Swiss mice (3 wk old) were infected i.v. with 10^4 WT or tRip-KO (clones 3 and 4) sporozoites. RT-PCR analysis was performed 46 h after injection using 40 ng total RNA extracted from the liver. Analysis was completed with primers for *P. berghei* 18S rRNA using the Δ CT method (User bulletin 2; Applied Biosystems).

Detection of protein synthesis activities in blood-stage parasites. The protocol was adapted from ref. 47. For metabolic labeling, infected red blood cells (3×10^9 infected erythrocytes) were grown in 750 μ L RPMI 1640 containing 50 μ M methionine, 1 mg/mL glucose, 40 mM *N*-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid, 1 U/mL heparin, 10% (vol/vol) FBS, and 30 μ Ci/mL [³⁵S] methionine for 4 h at 37 °C with gentle agitation and in the presence of 5% CO₂. Cultures were harvested, washed with RPMI, and incubated in PBS containing 0.1% saponin and anti-protease mixture 1/100 (Sigma-Aldrich) for 5 min on ice. Pellets corresponding to labeled parasites were quantified by Bio-Rad protein assay and analyzed on SDS/PAGE.

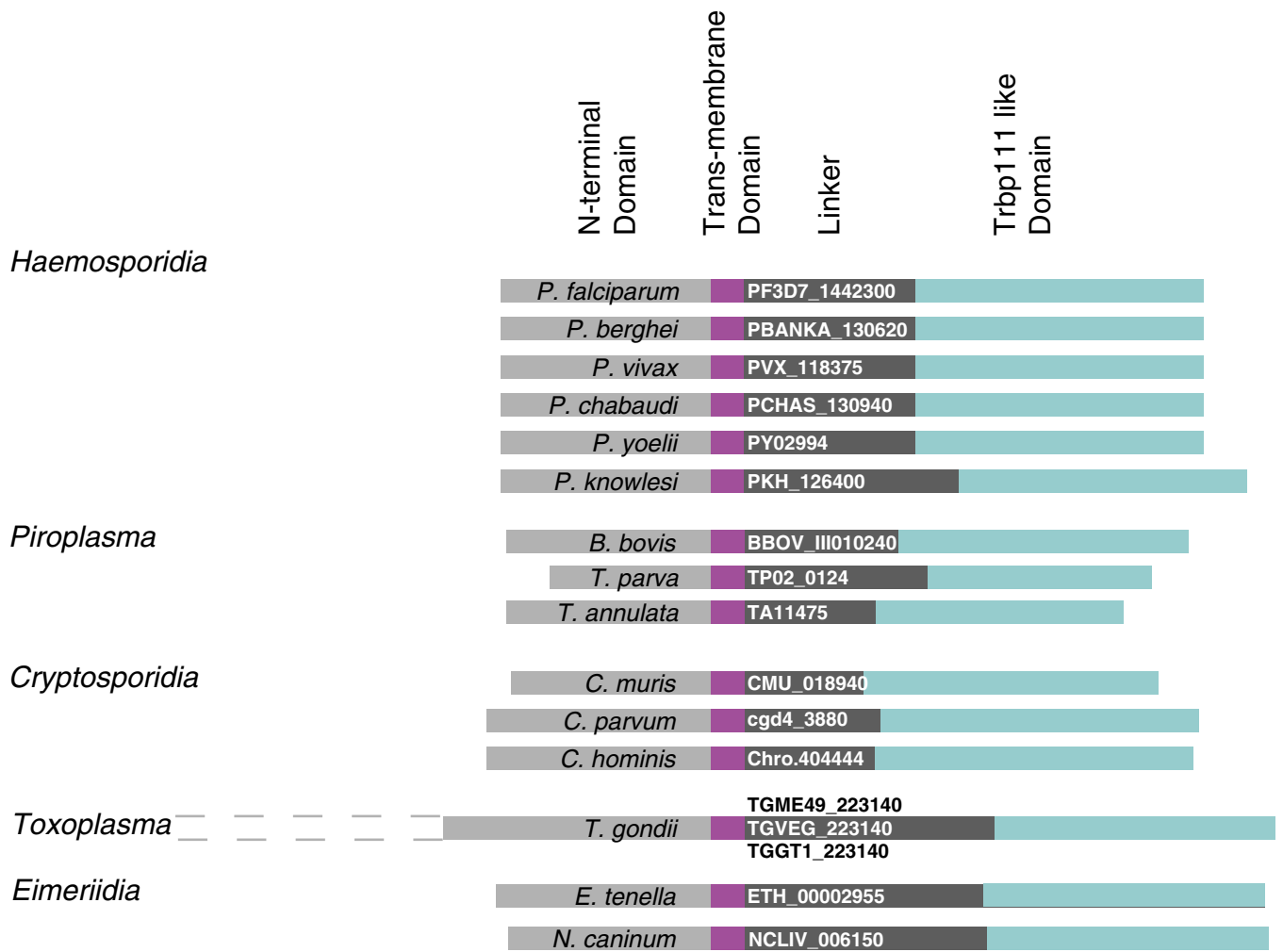


Fig. S2. Identification of tRip homologs in other *Apicomplexa* genomes. The amino acid sequence of *Pf*tRip was used as a bait to retrieve similar proteins from the eukaryotic pathogen database (eupathdb.org/eupathdb/). Outside plasmodial genes, other sequences matched the same global organization of tRip: an N-terminal domain (light gray), a variable linker (dark gray), and a conserved C-terminal Trbp111-like domain (blue). N-terminal sequences of these orthologs diverged significantly among families. For example, *Toxoplasma* genes code for an additional N-terminal domain (indicated by dotted lines, not used in transmembrane domain predictions). tRip homologs displayed predicted transmembrane domains characterized by $HTM > 0.6$ (purple, <https://www.predictprotein.org/443/>); however, for some sequences, topological predictions varied from one submission to the other. A tRip homolog containing a predicted transmembrane domain ($HTM > 0.6$) was also identified in *Trichomonas vaginalis* (TVAG_328570). As this is the only genome from the phylum *Trichomonadida* sequenced thus far, it was difficult to interpret this information. Among other sequenced genomes available in the database, tRip homologs were found in *Kinetoplastids* (*Leishmania* and *Trypanosoma*), yet the reliabilities of transmembrane domain predictions were too low to be considered. Finally, no tRip homolog was found in *Microporida*, *Diplomonadida* and *Amoebozoa*.

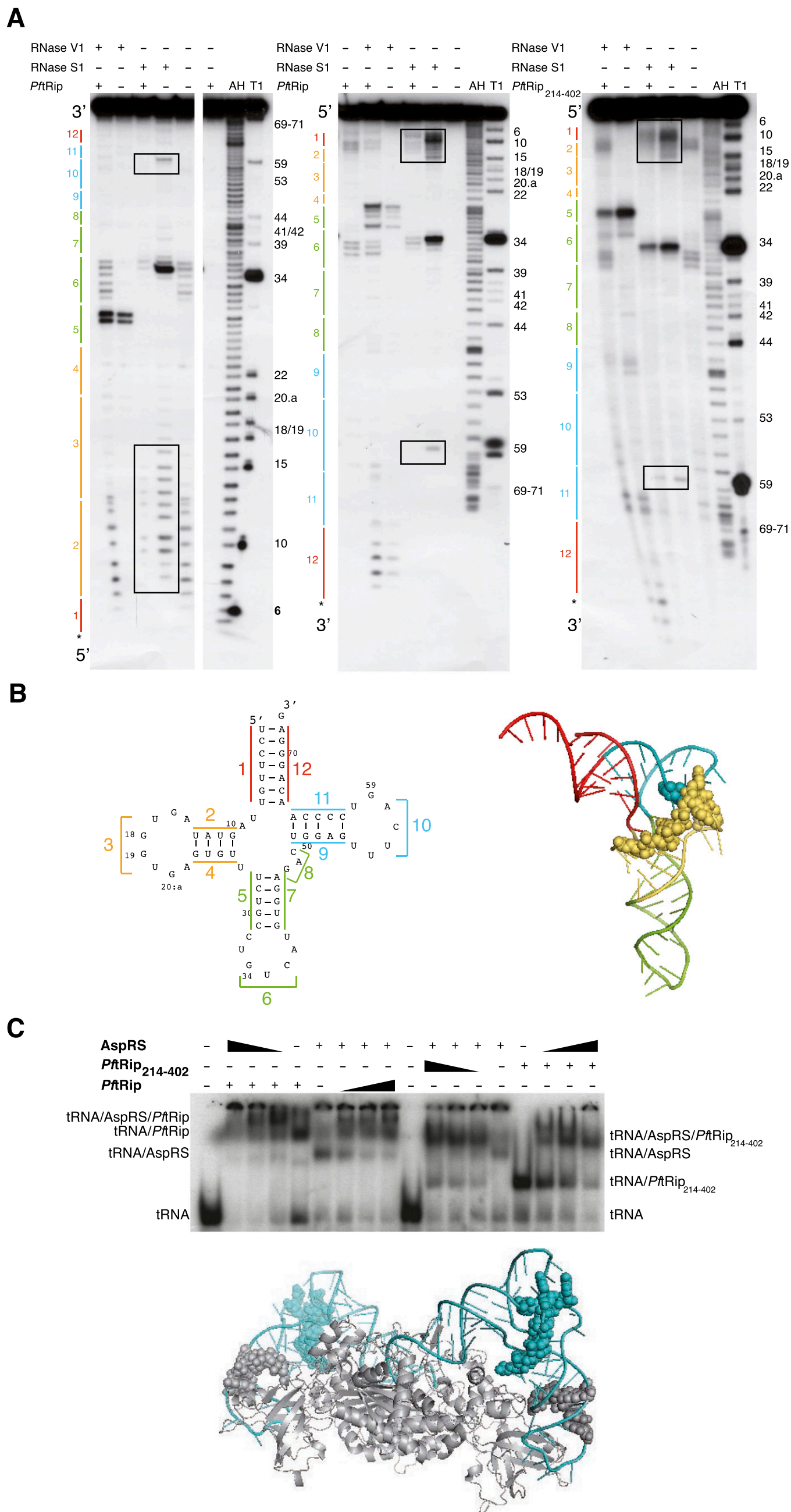


Fig. S3. *PftRip* footprint on yeast tRNA^{Asp}. (A) Autoradiographs of RNase V1 (cuts double-stranded and structured RNA regions) and RNase S1 (cuts single-stranded RNA regions) cleavage patterns of tRNA^{Asp} in the presence (+) or in the absence (-) of *PftRip* or *PftRip*₂₁₄₋₄₀₂. The tRNA^{Asp} molecule was [³²P] labeled at its 5' (Left) or 3' (Center and Right) end. The tRNA architecture described in B is schematized on the left side and nucleotide positions are indicated on the right side of the autoradiographs. Controls without RNases (with or without the *PftRip* recombinant proteins), as well as alkaline hydrolysis (AH) and RNase T1 (T1) ladders, were run simultaneously. Protections were only considered when present in all three experiments. The tRNA anticodon domain (regions 5, 6, and 7) was somewhat protected from S1 and simultaneously became accessible to V1 in the presence of *PftRip*₂₁₄₋₄₀₂, suggesting long-range structural changes in the tRNA on binding. However, these reactivity changes toward S1 and V1 were intensified with *PftRip*, indicating that the N-terminal domain of tRNA caused additional steric hindrance. (B) Secondary (Left) and tertiary (Right) structures of tRNA^{Asp}. Each tRNA domain is indicated in a different color: in red (acceptor arm formed by strands 1 and 12), yellow (D-branch, formed by strands 2, 3, and 4), green (anticodon/variable region-branch, strands 5, 6, 7, and 8), and blue (T-branch, strands 9, 10, and 11). Protections of nucleotides within the D and T branches against RNases (squared in A) are shown with yellow and blue spheres, respectively. (C) Simultaneous binding of yeast aspartyl-tRNA synthetase (AspRS) and *PftRip*₂₁₄₋₄₀₂ on the same tRNA^{Asp} molecule and model of their potential interaction. tRNA^{Asp} was incubated with either *PftRip* and AspRS (Left) or *PftRip*₂₁₄₋₄₀₂ and AspRS (Right). The interactions based on footprinting experiments were modeled on the crystal structure of the yeast tRNA^{Asp} (blue)/AspRS (gray) complex (13). Gray spheres indicate the protection of tRNA^{Asp} by the AspRS N-terminal extension (38) and blue spheres correspond to *PftRip* footprinting.

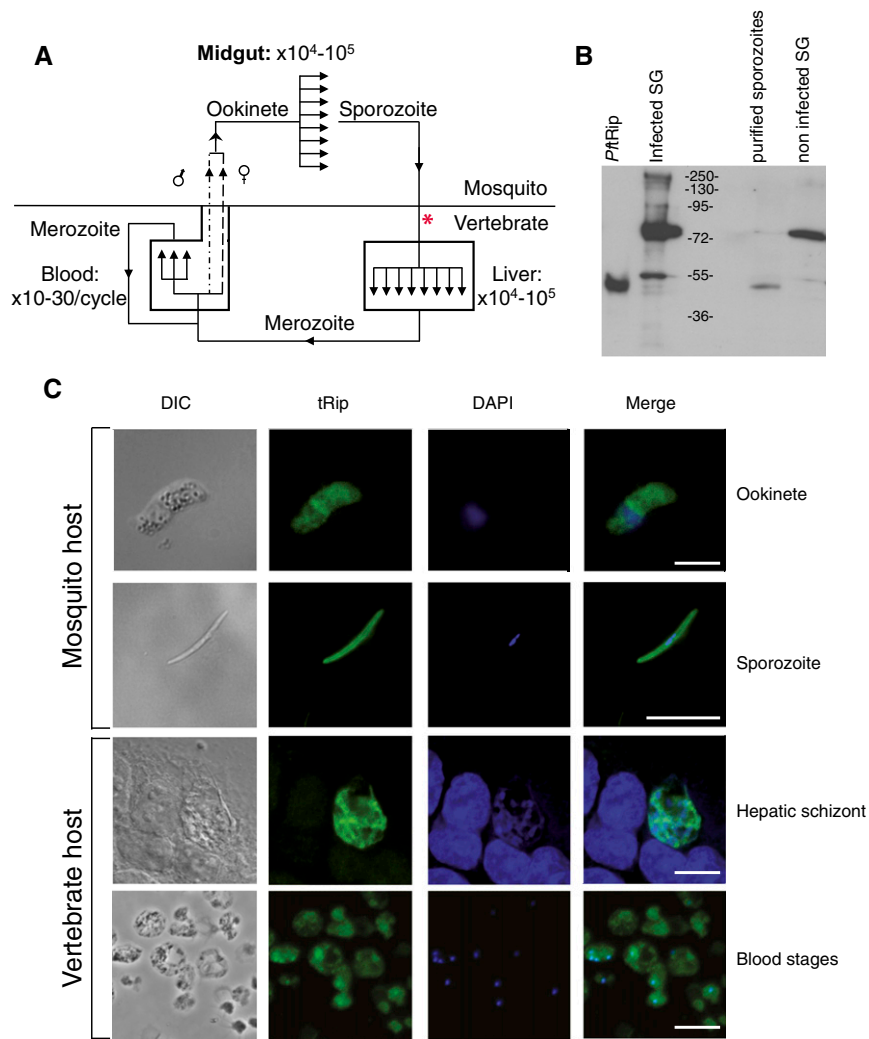


Fig. 54. *Plasmodium* life cycle and tRip expression. (A) The cycle of vertebrate infection starts when a mosquito injects sporozoites into the host (see asterisk). Sporozoites invade hepatocytes (entering the liver stage), multiply asexually, and produce tens of thousands of merozoites per infected hepatocyte (15). Merozoites exit the liver and develop repeatedly in red blood cells (blood stages) to produce 10–30 new merozoites per intraerythrocytic cycle (16). Some of the erythrocytic merozoites differentiate into gametocytes (sexual forms, dashed lines). Schizonts are not shown but are another stage that occurs as part of the intraerythrocytic cycle. Fertilization takes place in mosquitoes where gametocytes are ingested during a blood meal and then mature and fuse, leading to zygotes. Zygotes develop into ookinets, which traverse the mosquito midgut wall and form oocysts. In 8–15 d, each oocyst produces and releases 10^4 – 10^5 sporozoites, which invade the mosquito salivary glands, completing the cycle. (B) Specificity of anti-*PftRip*_{214–402}. Recombinant *PftRip*, *A. stephensi* infected salivary glands (SG), purified sporozoites, and noninfected *A. stephensi* SG were probed with anti-*PftRip*_{214–402}. Strong additional signals were observed only in extracts of crude infected and noninfected mosquito SG, indicating that the cross-reactive protein at 72 kDa is not from parasites. (C) Detection of tRip in *P. berghei* ookinets (fertilized form of the parasite found in the mosquito), sporozoites, hepatic schizonts (liver stages), and *P. berghei* blood stages was assessed using immunofluorescence with anti-tRip_{214–402} antibodies from rabbit. Cells were treated with DAPI (blue) and anti-rabbit FITC antibody (green). Overlay panels show the merged images. (Scale bars, 10 μ m.) DIC, differential interference contrast.

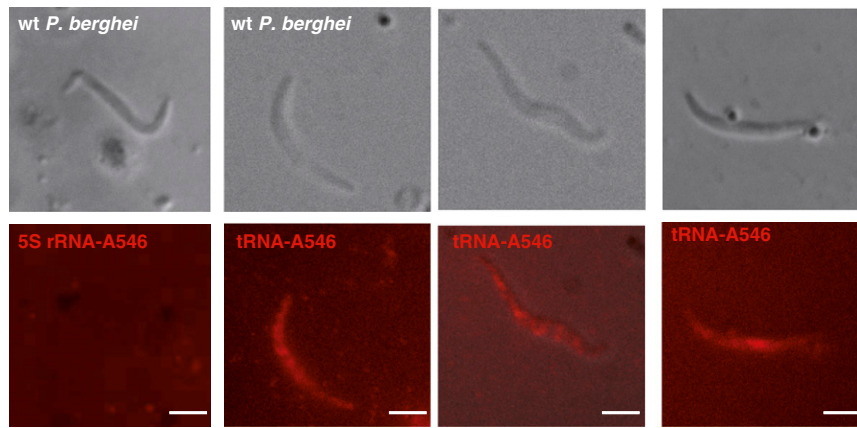


Fig. S5. tRNA import in *P. berghei* sporozoites. Direct visualization of imported Alexa Fluor-labeled in vitro transcribed *E. coli* tRNA^{Val} and human 5S ribosomal RNA. (Scale bars, 2 μ m.)

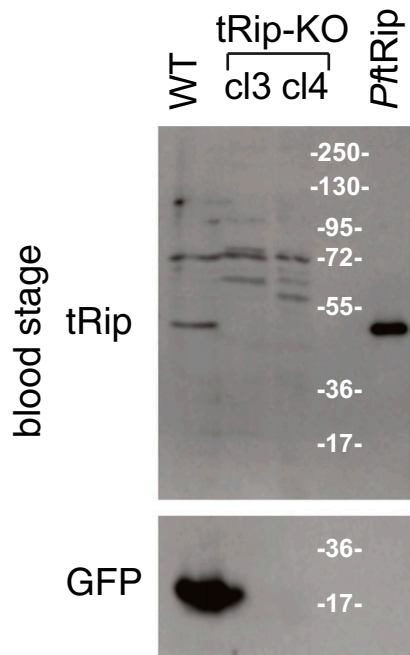
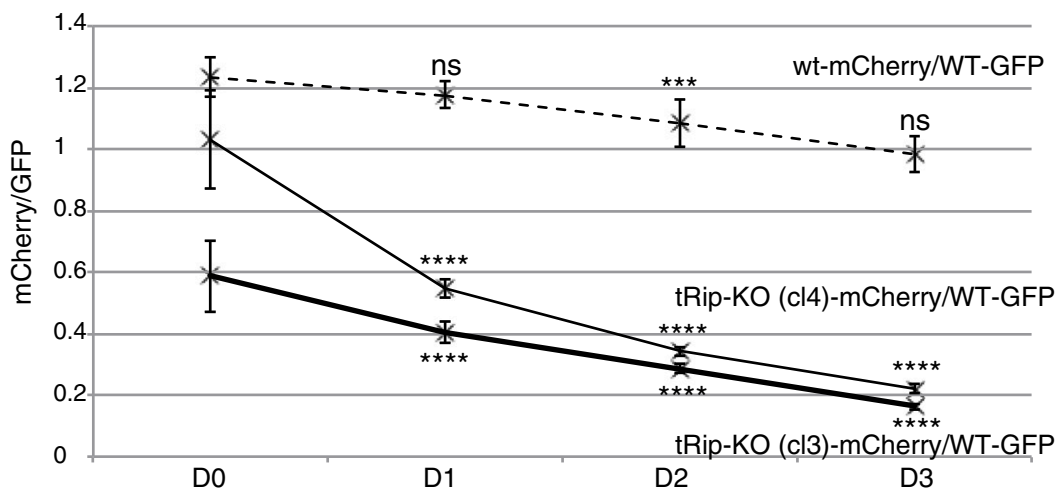
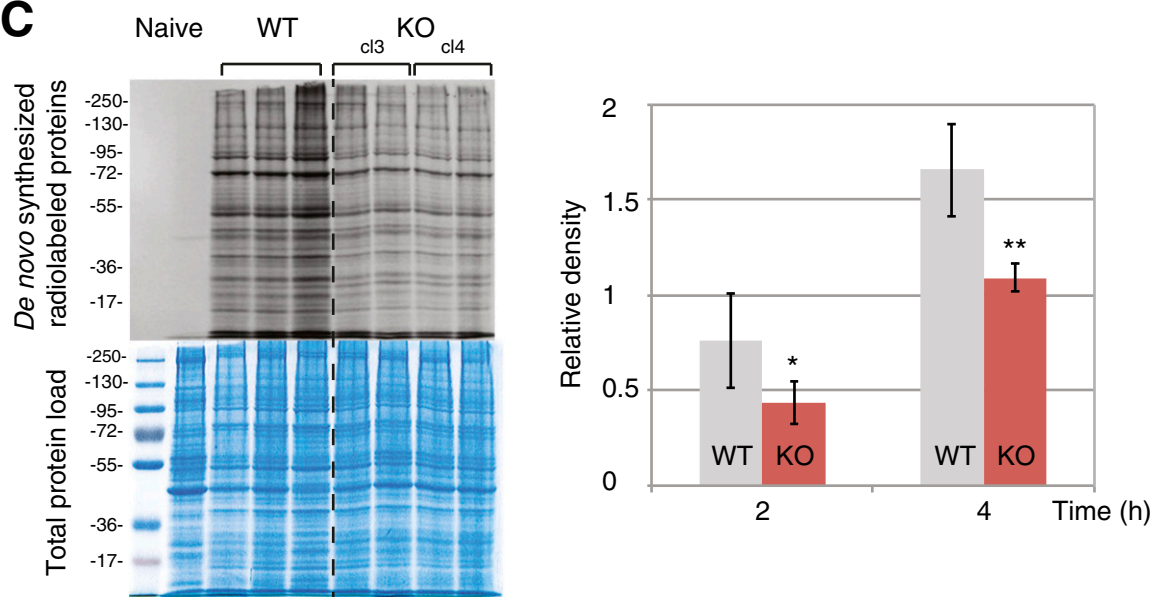
A**B****C**

Fig. S6. Phenotype of tRip-KO blood-stage parasites. (A) Western blot on blood-stage WT and tRip-KO (cl3 and cl4) parasites probed with anti-PfRip₂₁₄₋₄₀₂. *P. berghei* blood stages were matured into schizonts *in vitro* before analysis. Additional bands around 72 kDa correspond to cross-reactive proteins from the host. (B) Ratio of mCherry⁺/GFP⁺ parasites in the blood of 4-wk-old mice coinfecting by WT/mCherry⁺ and WT/GFP⁺ parasites (dashed line, $n = 8$) or tRip-KO/mCherry⁺ (cl3 and cl4) and WT/GFP⁺ parasites (plain lines, $n = 15$). Error bars are SDs, unpaired t test: *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; ns indicates that values are not significantly different ($P > 0.1$). (C) Protein synthesis by WT or tRip-KO *P. berghei* blood-stage parasites. Infected red blood cells with WT ($n = 3$, based on the number of mice), tRip-KO cl3 ($n = 2$), or tRip-KO cl4 ($n = 2$) parasites were metabolically labeled with [³⁵S] methionine for 2 or 4 h at 37 °C. The level of de novo synthesized proteins was determined by SDS/PAGE autoradiography. Autoradiograms shown correspond to the 4-h time point. The magnitude of radiolabel incorporation was expressed as [³⁵S] methionine incorporation into proteins relative to total protein load (Coomassie blue staining). Error bars are SDs, and asterisks indicate statistically significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) between the tRip-KO (red) and WT parasites (gray) translational activities.

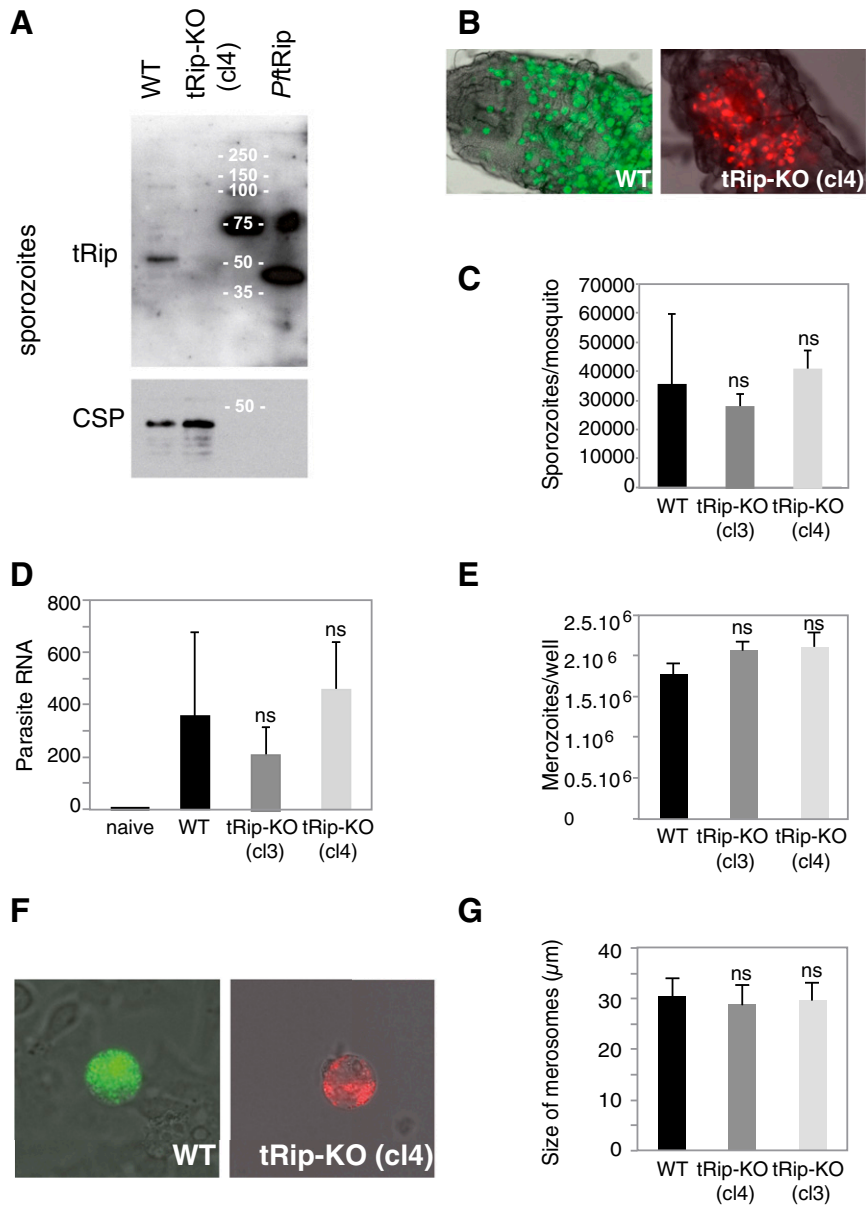


Fig. 57. Prepatent stages of the tRip-KO parasite. (A) Western blot of purified WT and tRip-KO sporozoites. (B) Oocysts of the WT (*Left*) or tRip-KO (c14; *Right*) clones developing in the midgut of *A. stephensi* mosquitoes 11 d after the mosquito's infective blood meal. (C) Mosquitoes infected with WT or tRip-KO (c3 and c4) parasites harbored similar numbers of sporozoites in their salivary glands 18 d (and onward) after infection. Means are from two independent experiments, with $n = 16$ –30 female mosquitoes. (D) Parasite loads in the liver 46 h after i.v. injection of 10^4 sporozoites were quantified by RT-PCR analysis. The histogram shows the abundance of parasite RNA obtained from 16 infected mice (for each clone), using the mouse *HPRT* gene as a standard. (E) Incubation of 2×10^5 HepG2 hepatoma cells with 5×10^4 salivary gland WT or tRip-KO (c3 and c4) sporozoites (per well) generated similar numbers of merozoites. (F) Representative WT (*Left*) and mutant (*Right*) merosomes, which are merozoite-filled vesicles that bud off from infected HepG2 cells after 60–65 h of liver stage development. (G) Size of merosomes released by WT and tRip-KO liver stages. Error bars are SDs, unpaired *t* test: ns indicates that values are not significantly different ($P > 0.1$).

B. Implication des ARNt importés dans la physiologie du parasite au stade sanguin

Le parasite tRip-KO présente une sévère anomalie de développement au cours du stade sanguin (**Figure 5** de la publication et **Figure 22** ci-dessus). De plus, l'intensité de traduction est réduite chez les parasites tRip-KO au stade sanguin, comparée à celle des parasites sauvages (**Figure S6C** de la publication ou **Figure 23** ci-dessous).

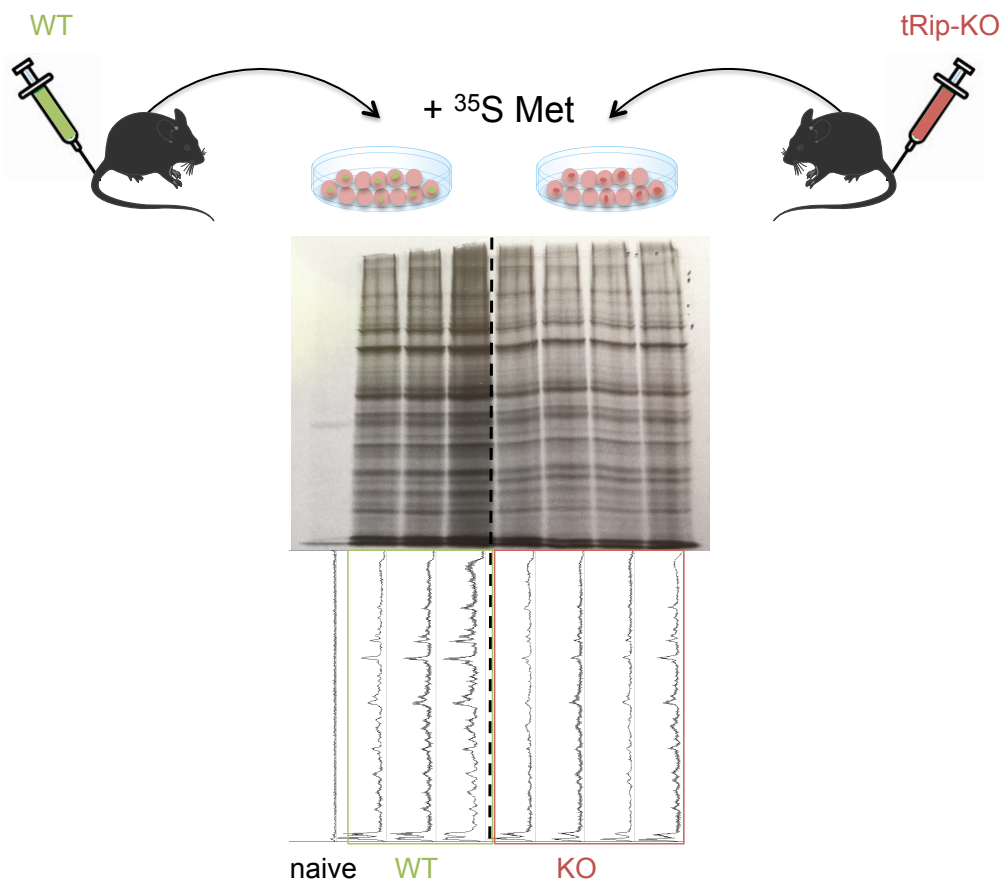


Figure 23 : Durant le stade sanguin, la synthèse protéique des parasites *P. berghei* tRip-KO est diminuée. Chacun des parasites aux stades sanguins, WT et tRip-KO, sont cultivés dans la souris. Après ponction du sang et libération des parasites des érythrocytes, la synthèse protéique *de novo* est évaluée par l'ajout de Met [³⁵S] puis incubation 2 h ou 4 h à 37°C.

Ces résultats suggèrent que le prélèvement des ARNt de l'hôte stimule la traduction dans le parasite. Cet effet peut être dû à deux mécanismes : soit les ARNt importés participent à la synthèse des protéines du parasite, soit ils exercent une activité régulatrice de l'expression de ses gènes. On peut aussi envisager que les deux processus soient concomitants. Dans l'hypothèse où les ARNt importés sont impliqués directement dans la traduction des protéines du parasite, ceux-ci doivent impérativement conserver une structure tridimensionnelle canonique leur permettant d'être reconnus non seulement par les aminoacyl-ARNt synthétases de *Plasmodium*, mais aussi par le ribosome et l'ensemble des facteurs de traduction. A l'inverse, si la structure

tridimensionnelle des ARNt est affectée par leur interaction avec tRip, ceci représente une limite certaine à leur utilisation dans la traduction. Cette deuxième hypothèse permet d'imaginer leur implication dans d'autres processus tels que leur hybridation avec d'autres acides nucléiques qui permettrait de réguler l'expression de certains gènes, comme c'est le cas avec les micro-ARN.

1. Les ARNt ayant interagi avec tRip conservent-ils leur structure 3D ?

J'ai testé *in vitro* si les ARNt liés par PftRip conservent leur structure repliée en forme de L. Je n'ai pas travaillé avec la même protéine tRip recombinante que celle utilisée dans la publication, qui est une version « optimisée » pour l'usage des codons chez *E. coli*. La protéine PftRip recombinante « optimisée » n'est pas stable, c'est à dire qu'elle ne se conserve pas et forme des agrégats rapidement. La protéine recombinante que j'ai utilisée au cours de ce travail est une version « harmonisée » de tRip, qui a permis de produire une protéine beaucoup plus stable que l'on peut conserver.

Dans un premier temps, j'ai vérifié l'affinité de cette nouvelle protéine recombinante pour les ARNt (**Figure 24**), selon le même protocole que celui utilisé dans la publication. La version harmonisée de PftRip est, comme attendu, capable de lier les ARNt. Elle oligomérisse de la même façon que la forme optimisée en formant des dimères et tétramères.

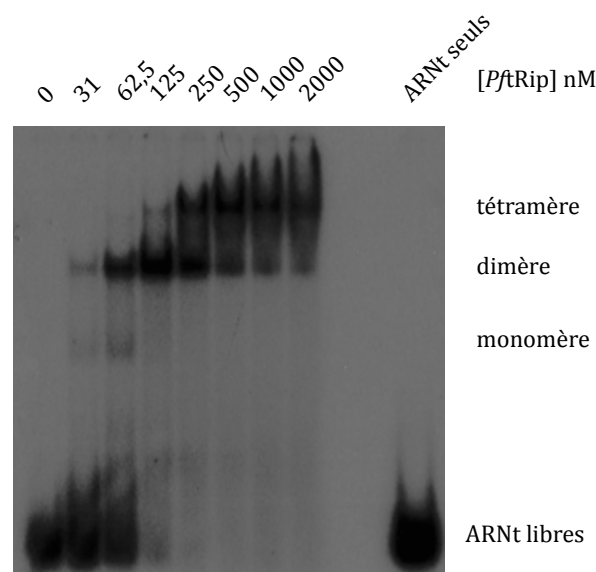


Figure 24 : Capacité de liaison aux ARNt de la version harmonisée de la protéine recombinante tRip de *P. falciparum*. Le gel retard a été réalisé avec 10 nM d'ARNt extraits de fibroblastes de primates (Cos 7) et des concentrations croissantes en protéine.

Afin de déterminer l'effet de la liaison de tRip sur la structure des ARNt, j'ai utilisé deux approches. La première consiste à vérifier qu'après une première interaction, l'ARNt a toujours la capacité de se lier à tRip ; la deuxième approche utilise des sondes de structure pour

comparer les repliements d'ARNt ayant interagi ou non avec tRip.

a. Utilisation des gels retard

Dans une première démarche, j'ai procédé à deux incubations successives de *PftRip* avec l'ARNt^{Phe} de *S. cerevisiae* (**Figure 25A**). La première incubation sert à laisser tRip lier les ARNt et éventuellement défaire les liaisons permettant leur repliement tertiaire. Les ARNt sont récupérés par extraction phénolique puis incubés de nouveau avec tRip pour réaliser un gel retard. Comme la reconnaissance des ARNt par tRip est basée sur leur conformation tridimensionnelle, la présence de complexes indiquerait que les ARNt sont intacts, alors que l'absence de complexes témoignerait d'une structure tertiaire altérée par tRip.

Après une première incubation des ARNt avec la protéine tRip recombinante (250 nM et 2 μ M), ceux-ci sont toujours capables de se lier à tRip (**Figure 25B**). On n'observe aucune différence dans les profils de retard sur gels entre les ARNt pré-incubés sans protéine ou avec de la BSA et les ARNt pré-incubés avec tRip (quelle que soit la concentration). Ceci donne une première indication sur l'intégrité du coude de l'ARNt et donc de l'interaction entre les boucles D et T des ARNt.

b. Utilisation des sondes de structure

La recherche de modifications éventuelles dans le repliement tertiaire des ARNt a nécessité une technique plus sensible que les tests de liaison à tRip. J'ai utilisé la technique de cartographie au plomb pour comparer les structures des ARNt avant et après leur contact avec tRip (**Figure 26A**). Le plomb a la propriété de couper les régions d'ARN lorsqu'elles sont accessibles, c'est à dire simples brins. J'ai aussi réalisé des contrôles en parallèle en utilisant l'ARNt sans incubation, en l'incubant seul, ou avec de la BSA. Les profils de migration des ARNt pré-incubés avec ou sans tRip sont identiques (**Figure 26B**), ce qui indique que la reconnaissance des ARNt par tRip ne modifie pas leur conformation tridimensionnelle. Il manque à ces expériences un contrôle positif de perte du repliement des ARNt, qui permettrait de s'assurer de la validité du protocole proposé. Hélas, nous n'avons pas de protéines liant les ARNt qui seraient capables de les déplier à notre disposition. La littérature ne reporte aucune protéine qui aurait cette propriété.

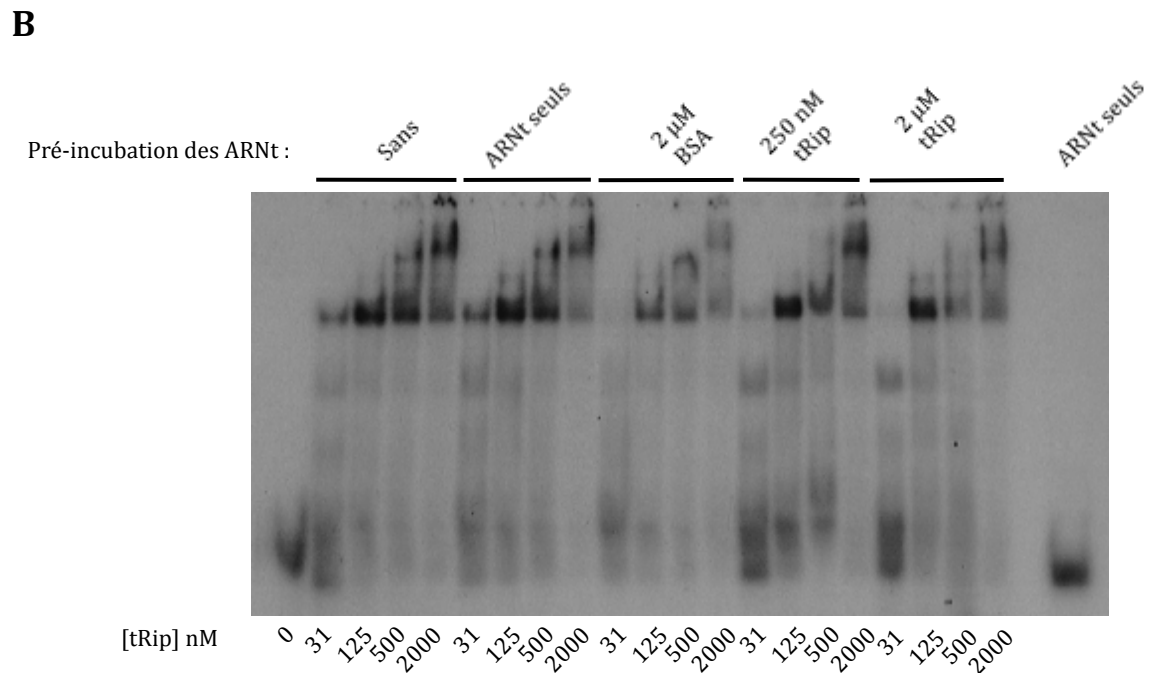
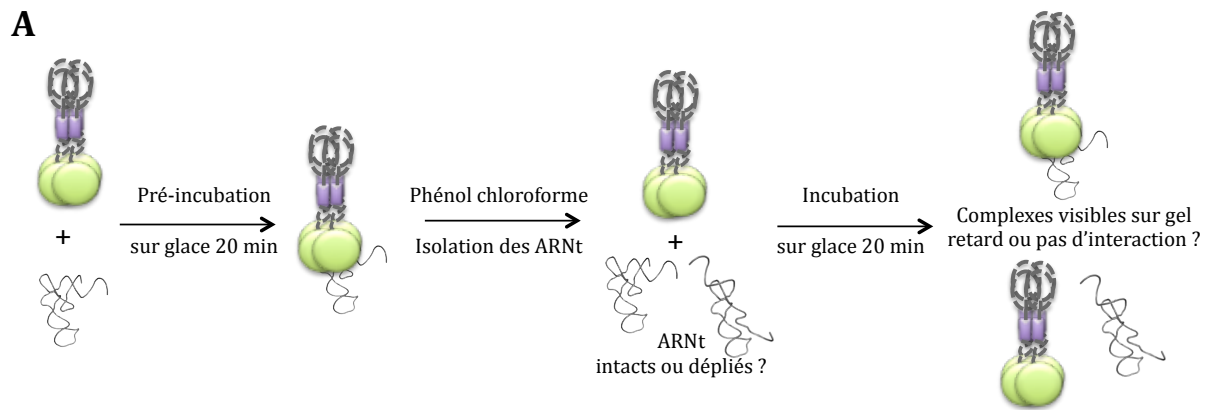


Figure 25 : Test de structure des ARnt liés par *PftRip* par gel retard. (A) Principe du test. Les ARnt sont pré-incubés avec tRip, puis isolés et incubés de nouveau avec tRip. La présence de complexes tRip/ARnt est vérifiée par gel retard et dépend de la structure 3D des ARnt. (B) Capacité des ARnt pré-incubés à lier *PftRip*. Le gel retard a été réalisé avec 1 nM d'ARnt^{Phe} de *S. cerevisiae* radiomarké et une concentration croissante en protéine.

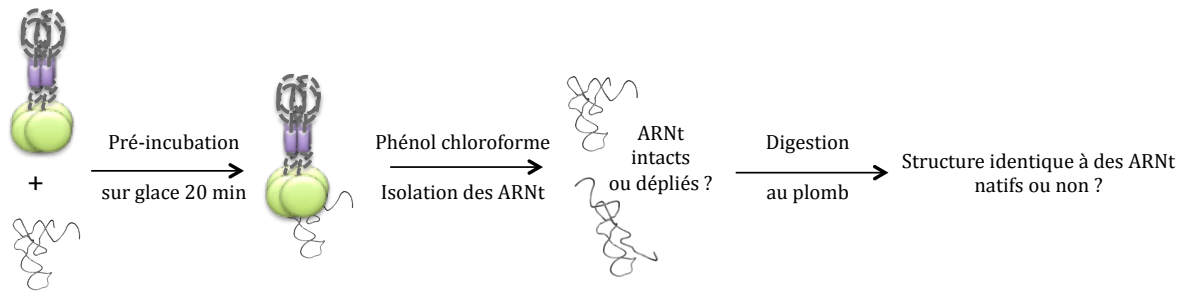
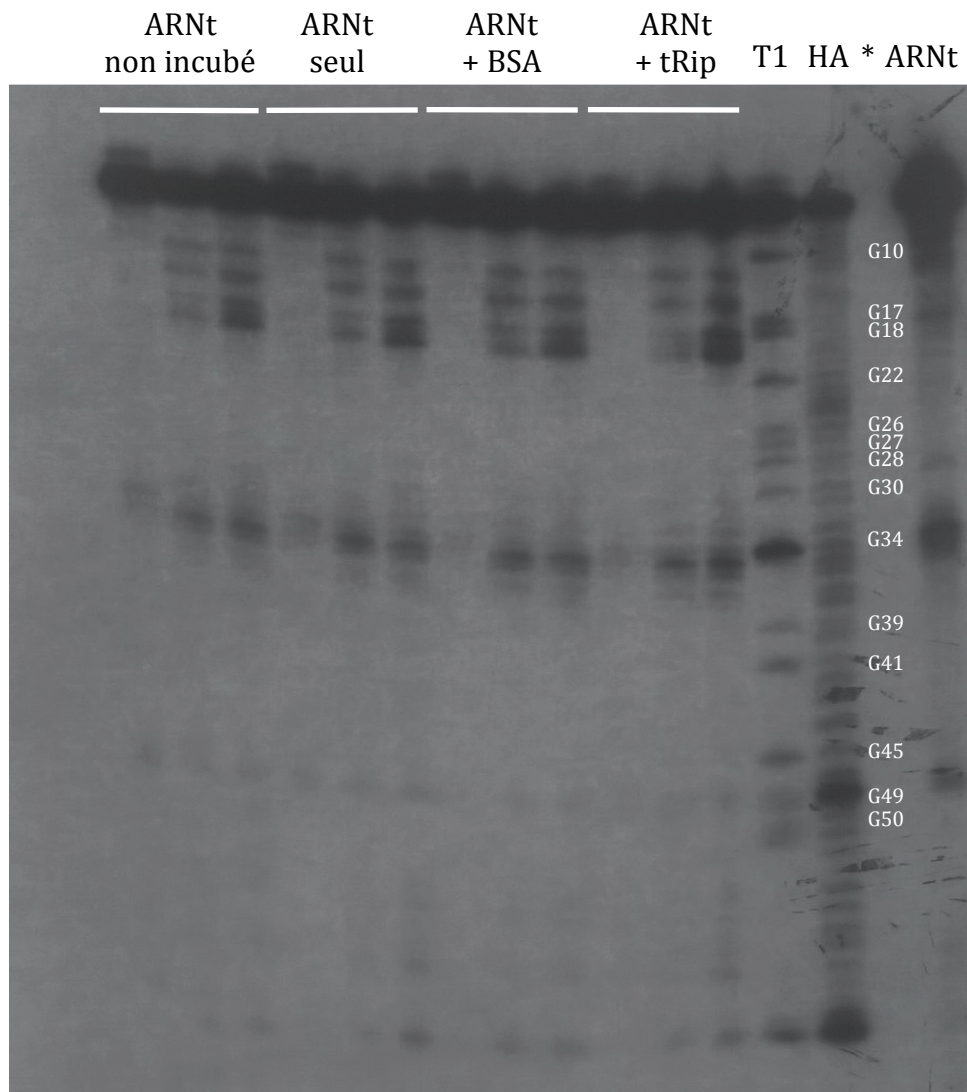
A**B**

Figure 26 : Test de structure des ARNt liés par *PftRip* par cartographie en solution. (A) Principe du test. Les ARNt sont pré-incubés avec tRip, puis isolés et soumis à une digestion au plomb. Après migration sur gel, la structure est déterminée selon le profil obtenu. **(B)** Profils de migration d'ARNt^{Asp} de *S. cerevisiae* soumis à différents traitements indiqués. Pour chaque échantillon, trois concentrations de plomb sont testées : 25, 50 et 100 mM. T1 : enzyme qui coupe après les résidus de guanine. Leurs positions sont indiquées sous la piste *. HA : hydrolyse alcaline. ARNt : témoin sans plomb.

Les deux approches *in vitro* utilisées n'indiquent pas de modification fondamentale de la structure des ARNt suite à leur liaison avec tRip, suggérant qu'*in vivo*, les ARNt importés par le parasite conservent leur repliement caractéristique en forme de L. *A priori*, ces ARNt peuvent donc participer au décodage de l'information génétique du parasite en étant reconnus par les aaRS, le ribosome, et tous les facteurs de traduction. Cependant, il est plausible qu'*in vivo*, un autre facteur soit capable de défaire la structure tertiaire des ARNt et que ceux-ci après import dans le parasite, n'aient pas conservé leur conformation canonique.

2. Comparaison des protéomes des parasites sauvage et tRip-KO

a. Préparation des échantillons

Dans le cas où les ARNt importés participent à la synthèse protéique de façon classique, le protéome du parasite tRip-KO et donc en l'absence d'import d'ARNt de l'hôte, devrait être essentiellement comparable à celui du WT, mise à part une décroissance homogène des quantités de protéines chez la souche tRip-KO. C'est ce que suggère le résultat de l'expérience de synthèse protéique *de novo* de la publication (**Figure 23**). Afin de vérifier si, effectivement, toutes les protéines sont affectées dans leur synthèse ou si seulement certaines d'entre elles sont plus ou moins exprimées, j'ai préparé des parasites sauvages et tRip-KO au stade schizonte sanguin, analysé puis comparé leurs protéomes. Brièvement, des souris sont infectées par injection intraveineuse de sang parasité par chacune des deux souches. Le sang est ponctionné plusieurs jours plus tard, le temps pour l'infection de se développer au maximum pour avoir suffisamment de matériel, en veillant toutefois à ne pas laisser l'état de santé des souris se dégrader. Le sang récupéré est mis en culture *in vitro* afin que tous les parasites se développent jusqu'au stade schizonte. Vingt-deux heures de culture sont nécessaires pour que les parasites sauvages évoluent tous en schizontes. En revanche, l'observation directe au microscope de frottis coloré a permis de constater que cette incubation est trop courte pour les parasites tRip-KO, où j'ai pu encore observer la présence de trophozoïtes après 22 h de culture. Le temps d'incubation a donc été prolongé jusqu'à 44 h pour synchroniser tous les parasites tRip-KO au stade schizonte. A l'issue de cette incubation, les cultures sont récupérées, les schizontes sont purifiés puis libérés en lysant les membranes des érythrocytes.

b. Analyse des protéomes

Trois protéomes ont ainsi pu être obtenus pour chaque souche. Les résultats sont très similaires entre les triplicats, ce qui les rend exploitables pour notre analyse (**Tableau 1**). Le nombre de spectres totaux obtenus varie de 14000 à 18000, soit entre 1000 à 1800 protéines identifiées, dans chacun des six protéomes. Malgré nos précautions pour préparer les échantillons les plus purs possibles, la contamination en protéines murines est conséquente : au

plus bas, elle est de 21% (WT-2), et monte jusque 52% (KO-1). En termes de nombre de protéines de *P. berghei*, la fourchette s'étend de 694 protéines (KO-3) à 962 (WT-2).

Tableau 1 : Qualité des données de protéomique obtenues pour les schizontes WT et tRip-KO de *P. berghei*.

Sample	WT-1	WT-2	WT-3	KO-1	KO-2	KO-3
Number of proteins in the Proteinscape file (<i>P.berghei</i> database)	762	962	885	869	704	694
Number of proteins in the Proteinscape file (<i>M.musculus</i> database)	645	262	304	931	566	310
Percent of murine contamination (number of proteins)	45,84	21,41	25,57	51,72	44,57	30,88
Number of MSMS spectra in the <i>P.berghei</i> database	7352	10560	10097	8103	6738	8007
Number of MSMS spectra in the <i>M.musculus</i> database	8291	4190	5127	10058	10156	6143
Percent of murine contamination (total number of MSMS spectra)	53,00	28,41	33,68	55,38	60,12	43,41
Total number of proteins	1407	1224	1189	1800	1270	1004
Total number of spectra	15643	14750	15224	18161	16894	14150
Normalization factor	1,16	1,23	1,19	1,00	1,07	1,28

Les protéomes ont été faits en triplicats pour chaque souche.

Le génome nucléaire de *Plasmodium* code pour environ 5385 protéines (EupathDB.org). En se basant sur le transcriptome du parasite, le nombre de protéines spécifiques du stade sanguin schizonte avoisine 1200. Ce nombre est du même ordre de grandeur pour les stades sporozoïte (1049), mérozoïte (839), trophozoïte (1036) et gamétocyte (1147) chez *P. falciparum* (Florens *et al.*, 2002). Ce n'est qu'une approximation étant donné qu'en moyenne, au cours du stade sanguin, un délai de 11 à 18 h est observé entre l'ARNm et l'expression de la protéine correspondante (Le Roch *et al.*, 2004). Pour environ 30% des gènes, les ARNm sont transcrits à un stade donné et sont traduits au cours d'un stade ultérieur (Bunnik *et al.*, 2013). De ce fait, il n'y a pas de concordance stricte entre le transcriptome et le protéome. De plus, la préparation des schizontes effectuée ici, et réalisée de façon similaire dans d'autres publications chez d'autres espèces de *Plasmodium* (Roobsoong *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2013b ; Bouyer *et al.*, 2016), implique de lyser les membranes des érythrocytes et de laver intensément les schizontes pour les débarrasser des quantités importantes d'hémoglobine. Cette méthode a pour inconvénient de faire perdre toutes les protéines excrétées dans le cytoplasme de la cellule hôte et celles exportées à sa membrane plasmique (voir la partie A.4. de l'introduction). Nous ne disposons donc pas des informations reliées à l'expression de ces protéines dans nos résultats.

Ne disposant pas d'autre information sur le protéome total au stade schizonte chez *P. berghei*, le nombre de protéines variant de 694 à 962 dans mes expériences, j'ai considéré que les protéomes obtenus sont représentatifs.

c. Comparaison des protéomes WT et KO

Dans le **Tableau 2**, qui récapitule le nombre de protéines prises en considération pour la comparaison des deux protéomes, je n'ai considéré que les protéines qui sont détectées :

- au moins dans les trois échantillons WT (quand la protéine est sous-exprimée dans le KO),
- au moins dans les trois échantillons KO (lorsqu'elle est sous-exprimée dans le WT),
- uniquement les protéines qui sont représentées par au moins 10 peptides au total dans les 3 échantillons correspondant à une même souche,
- au moins un facteur 2 entre les WT et le KO est considéré comme différence significative.

Tableau 2 : Nombre de protéines comparées entre les protéomes WT et KO de *P. berghei*.

Classification	Expression différentielle	Nombre de protéines
protéines sous-exprimées dans KO	KO/WT < 0,5	104
protéines surexprimées dans KO	KO/WT > 2	28
protéines stables	0,5 < KO/WT < 2	339

Les protéines sont classées en trois groupes selon leur rapport KO/WT : sous-exprimées, surexprimées, ou stables. Les seuils choisis et le nombre de protéines concerné sont indiqués.

Etant donné la sélection draconienne appliquée à nos données, nous ne prenons en considération qu'environ 60% des protéines plasmodiales identifiées dans les protéomes : 471 protéines sur une moyenne de 800 protéines détectées dans chacun des six protéomes. Ceci représente environ 40% du protéome théorique correspondant au stade schizonte (≈ 1200), soit 9% de l'ensemble des protéines potentiellement exprimées par *Plasmodium* (5385). Sur les 471 protéines sélectionnées, la grande majorité des protéines ne sont pas significativement affectées dans leur expression (soit 339), 22 % ont une expression réduite dans le KO (104) et seulement 6 % sont significativement surexprimées dans le KO par rapport au WT (28). Le nombre important de protéines sous-exprimées dans la souche tRip-KO est en accord avec la baisse du niveau de la synthèse protéique *de novo* observée sur gel (**Figure 23**).

La banque initialement utilisée pour annoter les spectres est Uniprot. Cependant, les fonctions et les séquences complètes des protéines ont été recherchées dans la banque spécialisée plasmoDB (EupathDB.org).

(i) Facteurs de traduction et protéines ribosomales

Dans l'ensemble des données, on détecte 16 sous-unités de facteurs d'initiation de la traduction, un facteur d'élongation (EF-1 α), un facteur de terminaison et une « poly(A) binding protein ».

Seuls le facteur eIF-5A est surexprimé dans la souche KO (KO/WT = 2,9 ; **Tableau 3**) et le facteur eIF-4G est significativement sous-exprimé dans la souche KO (KO/WT = 0,31 ; **Tableau**

4). Tous les autres facteurs de traduction ne sont pas significativement affectés par la délétion de TRIP (variant entre 0,42 et 1,86). On retrouve également 70 polypeptides prédits comme protéines ribosomales, certainement correspondant non seulement aux protéines ribosomales cytosoliques (47 protéines chez les eucaryotes) mais également aux protéines ribosomales apicoplastiques (33 protéines chez les ribosomes de type bactérien). Parmi ces protéines, seules L27 (KO/WT = 2) et S21 (KO/WT = 0,09) varient significativement (**Tableaux 3 et 4**, respectivement).

Tableau 3 : Protéines surexprimées dans le mutant *PbtRip-KO*

Uniprot	PplasmDB	fonction prédite	Spectres WT			Spectres KO			nombre total spectres KO	ratio KO/WT
			WT-1	WT-2	WT-3	KO-1	KO-2	KO-3		
Q4YRX2_PLABA	PBANKA_1326400	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	28	27	14	157	55	58	270	3,91
Q4YW41_PLABA	PBANKA_1125600	pyruvate kinase	14	20	16	73	43	40	156	3,12
Q4Z504_PLABA	PBANKA_1122900	hexokinase	5	17	19	48	41	50	139	3,39
Q4YX83_PLABA	PBANKA_1235600	Adenosylhomocysteinase	1	11	12	33	22	38	93	3,88
LDH_PLABA	PBANKA_1340100	L-lactate dehydrogenase	8	12	7	27	27	23	77	2,85
Q4Z393_PLABA	PBANKA_0931200	heat shock protein 101	4	10	9	20	24	17	61	2,65
Q4YL39_PLABA	PBANKA_1117000	histone H2A	5	6	6	32	16	5	53	3,12
Q4YSN0_PLABA	PBANKA_1362900	lysine--tRNA ligase		3	1	22	8	12	42	10,50
Q4YTR2_PLABA	PBANKA_1429600	proline--tRNA ligase	1	9	3	10	9	11	30	2,31
Q4YQI0_PLABA	PBANKA_0603200	eukaryotic translation initiation factor 5A	1	4	5	13	12	4	29	2,90
Q4YJT0_PLABA	PBANKA_0109100	Transketolase		2	3	12	8	7	27	5,40
Q4Z0X8_PLABA	PBANKA_0407600	asparagine synthetase		3	7	9	7	9	25	2,50
Q4ZSU3_PLABA	PBANKA_0816400	6-phosphofructokinase	2	3	3	10	3	10	23	2,88
Q4YDT0_PLABA	PBANKA_1016300	proliferation-associated protein 2g4	1	4	4	8	5	8	21	2,33
Q4Z371_PLABA	PBANKA_1223300	ras-related protein Rab-18		4	4	7	8	6	21	2,63
Q4YZP5_PLABA	PBANKA_0915000	apical membrane antigen 1	3	4	1	7	3	10	20	2,50
Q4Z4D7_PLABA	PBANKA_0922500	?	3	3	3	9	6	5	20	2,22
Q4Z5F5_PLABA	PBANKA_0107400	ornithine aminotransferase	1	6	3	8	10	2	20	2,00
Q4YAY1_PLABA	PBANKA_1309900	M17 leucyl aminopeptidase	2	2	3	10	3	5	18	2,57
Q4Y9Q9_PLABA	PBANKA_1200400	BIR protein				6	6	4	16	KO only
Q4YCR7_PLABA	PBANKA_1117700	malate dehydrogenase		1		8	5	3	16	16,00
Q4YR58_PLABA	PBANKA_1456200	rab specific GDP dissociation inhibitor	1	1	3	7	4	4	15	3,00
Q4YBI2_PLABA	PBANKA_1324400	60S ribosomal protein L27	1	3	3	8	4	2	14	2,00
Q4YRL0_PLABA	PBANKA_1459500	myosin light chain 1	3			8	2	2	12	4,00
Q4YYS2_PLABA	PBANKA_1441100	haloacid dehalogenase-like hydrolase		2	1	3	5	3	11	3,67
Q4YSY8_PLABA	PBANKA_0813900	26S proteasome regulatory subunit RPN8		2	2	7	2	2	11	2,75
Q4YNK4_PLABA	PBANKA_0210200	aspartate--tRNA ligase		1	1	4	4	2	10	5,00
Q4ZIT1_PLABA	PBANKA_1332700	duffy-binding protein	1			4	2	4	10	10,00

protéines impliquées dans la traduction

aaRSs

(ii) Protéines du métabolisme des sucres

Les protéines qui sont fortement représentées et surexprimées dans le KO par rapport au WT (**Tableau 3**) sont, pour la plupart, impliquées dans le métabolisme des sucres, en particulier la glycolyse : la G3PDH, une hexokinase, la L-lactate déshydrogénase, la pyruvate kinase 6-phosphofructokinase ; ainsi que la gluco-génèse avec la malate déshydrogénase. Ceci semble indiquer que l'augmentation de ces enzymes dans le KO permettrait de maintenir un apport énergétique constant.

Tableau 4 : Protéines sous-exprimées dans le mutant *PbtRip-KO*

Uniprot	PplasmDB	fonction prédite	Spectres WT			Spectres KO			nombre total spectres wt	ratio KO/WT
			WT-1	WT-2	WT-3	KO-1	KO-2	KO-3		
Q4Z273_PLABA	PBANKA_0831000	merozoite surface protein 1 (MSP1)	261	219	145	110	59	102	625	0,44
Q4YC86_PLABA	PBANKA_0938400	endoplasmic reticulum-resident Ca binding prot	77	58	51	38	27	33	186	0,53
Q4Z2X5_PLABA	PBANKA_1439200	polyadenylate-binding protein, putative	49	60	65	39	32	21	174	0,53
Q4YR38_PLABA	PBANKA_1200600	Plasmodium exported protein	63	47	39	9	20	31	149	0,38
Q4YRG9_PLABA	PBANKA_1423500	Ribosomal protein L13	35	40	46	21	8	21	121	0,41
Q4YJ91_PLABA	PBANKA_1210200	PRE-binding protein	36	30	33	16	17	14	99	0,47
Q4YWJ5_PLABA	PBANKA_0610400	SERCA-type Ca2+ -transporting P-ATPase	29	30	35	17	19	9	94	0,48
Q4YTT7_PLABA	PBANKA_0937200	asparagine-rich antigen	33	30	25	2	9	12	88	0,26
Q4Z2J7_PLABA	PBANKA_1411300	eukaryotic translation initiation factor 4 G	30	23	25	8	7	9	78	0,31
Q4YQV1_PLABA	PBANKA_0416000	high molecular weight rhoptyr protein 3	17	32	26	13	7	11	75	0,41
Q4Z2X6_PLABA	PBANKA_1032700	CUGBP Elav-like family member 2	17	27	28	10	11	10	72	0,43
Q4YP36_PLABA	PBANKA_1206100	eukaryotic translation initiation factor 3 su D	16	27	30	8	6	18	62	0,43
Q4YP85_PLABA	PBANKA_1301300	trailer hitch homolog	23	19	19	5	10	4	61	0,31
Q4Z732_PLABA	PBANKA_0524800	small exported protein (SEP1)	19	21	20	6	5	10	60	0,35
Q4YY72_PLABA	PBANKA_1205000	RNA-binding protein	10	22	24	7	5	11	56	0,41
Q4YCE5_PLABA	PBANKA_0511400	peroxiredoxin	17	19	20	3	7	19	56	0,52
Q4Z1Z6_PLABA	PBANKA_1362000	GlURS	11	22	22	4	5	6	55	0,27
Q4Z3H7_PLABA	PBANKA_1434700	clathrin heavy chain	10	18	21	10	5	6	49	0,43
Q4YRZ4_PLABA	PBANKA_0939600	polyadenylate-binding protein-interacting prot 1	23	13	10		2	2	46	0,09
Q4Z3D6_PLABA	PBANKA_0824800	RNA-binding protein	14	17	14	3	9	9	45	0,47
Q4YPE3_PLABA	PBANKA_1424300	?	11	15	17	2	5	6	43	0,30
Q4Z161_PLABA	PBANKA_1322700	ATP-dependent RNA helicase DBP5	9	19	15	6	7	7	43	0,47
Q4Z3P2_PLABA	PBANKA_1315500	sortilin	8	18	14	4	2	3	40	0,26
Q4YB67_PLABA	PBANKA_1349100	MSP7-like protein (MSP7)	19	13	7	3	5	6	39	0,36
Q4YA28_PLABA	PBANKA_0709000	protein transport protein SEC61 subunit beta	13	16	10	1	7	7	39	0,38
Q4YUI8_PLABA	PBANKA_0804100	?	13	14	11	4	4	10	38	0,47
Q4Z7U2_PLABA	PBANKA_1242800	eukaryotic translation initiation factor 3 su E	7	14	15	2	7	6	36	0,42
Q4YB18_PLABA	PBANKA_0524200	small exported protein (SEP2)	12	12	11	2	2	4	35	0,23
Q4Z285_PLABA	PBANKA_1112300	ras-related protein Rab-1B	10	11	14	5	5	7	35	0,49
Q4YVG3_PLABA	PBANKA_1019700	?	9	14	12	4	8	6	35	0,51
Q4Z3W3_PLABA		tRip	8	13	13				34	WT only
Q4Z4G1_PLABA	PBANKA_0714200	chaperone protein ClpB1	6	16	11	7	5	2	33	0,42
Q4Z1Y0_PLABA	PBANKA_0100700	Plasmodium exported protein	10	12	9	4	4	4	31	0,39
Q4YYA8_PLABA	PBANKA_1450300	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	7	12	10	8	2	3	29	0,45
Q4YUP6_PLABA	PBANKA_1450300	ATP synthase subunit beta	8	12	8	10	1	2	28	0,46
Q4YIR2_PLABA	PBANKA_0100700	Plasmodium exported protein	8	10	9	4	4	4	27	0,44
Q4Z6J2_PLABA	PBANKA_1450700	clustered-asparagine-rich protein	8	8	10			5	26	0,19
Q4YV79_PLABA	PBANKA_1308600	fructose-bisphosphate aldolase 2	9	12	5	6	1	3	26	0,38
Q4YB68_PLABA	PBANKA_1349000	MSP7-like protein (MSRP2)	13	7	4	1		1	24	0,08
Q4YVE2_PLABA	PBANKA_1331400	?	4	12	8	2	2	1	24	0,21
Q4YUU4_PLABA	PBANKA_1419100	component of 2-oxoglutarate dehydrogenase	6	9	9	6		3	24	0,38
Q4YJ75_PLABA	PBANKA_1101300	?	8	9	6		1	1	23	0,09
Q4YT96_PLABA	PBANKA_0414600	40S ribosomal protein S15A	4	11	8	6	2	2	23	0,43
Q4Z434_PLABA	PBANKA_0506100	?	5	12	6	10		2	23	0,52
Q4YBD9_PLABA	PBANKA_1142800	?	9	5	8	1	2	3	22	0,27
Q4Z0B8_PLABA	PBANKA_1229200	60S ribosomal protein L19	3	9	10	3	3	3	22	0,41
Q4YXF0_PLABA	PBANKA_0819900	nucleosome assembly protein (NAPS)	7	6	9	2	4	4	22	0,45
ALF2_PLABA	PBANKA_1308600	Fructose-bisphosphate aldolase 2	7	11	4	6	1	3	22	0,45
Q4YV89_PLABA	PBANKA_0404700	glutaredoxin 1	5	7	9	2	3	3	21	0,38
Q4Z6Z6_PLABA	PBANKA_1221200	60S ribosomal protein L34	5	8	7	1	3	5	20	0,45
Q4YQA4_PLABA	PBANKA_1201900	40S ribosomal protein S20e	3	6	11	2	3	4	20	0,45
Q4YVB8_PLABA	PBANKA_1008200	cGMP-dependent protein kinase	3	10	6	2	3	2	19	0,37
Q4YN28_PLABA	PBANKA_0417500	60S ribosomal protein L32	4	7	8	6	1	1	19	0,42
Q4YQC6_PLABA	PBANKA_1234200	40S ribosomal protein S24	5	7	7	5	2	2	19	0,47
Q4YYD0_PLABA	PBANKA_1445400	protein transport protein SEC13, putative	8	5	5			2	18	0,11
Q4YZJ7_PLABA	PBANKA_1301400	proteasome subunit alpha type-1	3	8	7	3	1	3	18	0,39
Q4YHQ4_PLABA	PBANKA_0938300	heat shock protein	3	9	5	2	1	3	17	0,35

Tableau 4 (suite) : Protéines sous-exprimées dans le mutant *PbtRip-KO*

Uniprot	PplasmDB	fonction prédite	Spectres WT			Spectres KO			nombre total spectres wt	ratio KO/WT
			WT-1	WT-2	WT-3	KO-1	KO-2	KO-3		
Q4Z092_PLABA	PBANKA_0916400	ubiquitin-like protein	6	6	5	2	3	1	17	0,35
Q4Z7S7_PLABA	PBANKA_1039600	26S proteasome regulatory subunit RPN6	2	7	7	3	2	2	16	0,44
Q4YWBO_PLABA	PBANKA_0605300	eukaryotic translation initiation factor 5	2	9	5	5	1	2	16	0,50
Q4YE38_PLABA	PBANKA_0316200	Plasmodium exported protein	3	6	6	2	3		15	0,33
Q4YVB5_PLABA	PBANKA_1008000	?	3	6	6		1	5	15	0,40
Q4YYR0_PLABA	PBANKA_1313800	signal recognition particle subunit SRP54	1	9	4	1	2	1	14	0,29
Q4YVI7_PLABA	PBANKA_1225700	GTPase-activating protein	2	5	7	1		4	14	0,36
Q4Z710_PLABA	PBANKA_1426700	hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase	1	7	6	1	2	3	14	0,43
Q4Z763_PLABA	PBANKA_0903900	coatamer subunit gamma, putative (SEC21)	2	6	6	1	2	4	14	0,50
Q4YZH7_PLABA	PBANKA_1138200	RuvB-like helicase 3	4	8	2	3	1	3	14	0,50
Q4YS66_PLABA	PBANKA_0811300	Ran-binding protein	1	6	7	2	3	2	14	0,50
Q4YZR1_PLABA	PBANKA_0804500	rhostry-associated membrane antigen, putative	10	2	1	1			13	0,07
Q4YHJ5_PLABA	PBANKA_1328100	ATP synthase (C/AC39) subunit	2	5	6		1	2	13	0,23
Q4Z034_PLABA	PBANKA_1431050	10 kDa chaperonin	4	6	3	4			13	0,31
Q4Z0B9_PLABA	PBANKA_1011400	DNA topoisomerase 2	7	4	2	1		4	13	0,38
Q4YZB0_PLABA	PBANKA_1231500	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	4	5	4		1	4	13	0,38
Q4YB34_PLABA	PBANKA_1131900	serine/threonine protein phosphatase 5	3	6	4	3	1	2	13	0,46
Q4YP38_PLABA	PBANKA_0403800	membrane protein	3	5	5		1	5	13	0,46
Q4YB66_PLABA	PBANKA_1349200	MSP7-like protein (MSRP1)	5	3	4	1	1	1	12	0,25
Q4YP07_PLABA	PBANKA_0928800	splicing factor U2AF small subunit	3	4	5	1	1	1	12	0,25
Q4YYS8_PLABA	PBANKA_1425000	RNA-binding protein	3	5	4		3		12	0,25
Q4YPF3_PLABA	PBANKA_0610200	DNA replication licensing factor MCM5	4	4	4	2	1	1	12	0,33
Q4YRE8_PLABA	PY00463	mitochondrial phosphate carrier protein	2	6	4	3		1	12	0,33
Q4YQD9_PLABA	PBANKA_1113400	secreted ookinete protein	5	3	4	3	1	1	12	0,42
Q4YQ62_PLABA	PBANKA_1341500	RNA-binding protein	2	6	4	1	2	3	12	0,50
Q4YFJ9_PLABA	PBANKA_1234500	?	2	5	5				12	WT only
Q4Z3Y9_PLABA	PBANKA_0905000	40S ribosomal protein S21, putative (RPS21)	5	2	4		1		11	0,09
Q4YT95_PLABA	PBANKA_0414500	HVA22/TB2/DP1 family protein	3	4	4			2	11	0,18
Q4YGE2_PLABA	PBANKA_1463000	osmiophilic body protein (G377)	3	4	4	2	1		11	0,27
Q4YAW3_PLABA	PBANKA_1358600	isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	5	5	1	3	1		11	0,36
Q4YZN6_PLABA	PBANKA_1200800	RNA-binding protein	4	3	4	1	2	2	11	0,45
Q4YWZ0_PLABA	PBANKA_0602700	nucleosome assembly protein	3	5	3	3	1	1	11	0,45
Q4YJY0_PLABA	PBANKA_0501100	early transcribed membrane protein (SEP3)	4	4	3				11	WT only
Q4YR5_PLABA	PBANKA_0314200	calcium-dependent protein kinase 1 (CDPK1)	3	4	3			1	10	0,10
Q4Z7F8_PLABA	PBANKA_1321000	?	2	4	4	1		1	10	0,20
Q4YMZ7_PLABA	PBANKA_0401800	HAD superfamily protein	3	3	4	1		1	10	0,20
Q4YZ34_PLABA	PBANKA_1451600	SUMO-activating enzyme subunit 2	3	5	2	1	1	1	10	0,30
Q4YQZ6_PLABA	PBANKA_0103300	?	3	4	3	1	2		10	0,30
Q4Z5G1_PLABA	PBANKA_1116300	malate:quinone oxidoreductase	2	4	4	2	1		10	0,30
Q4YPD4_PLABA	PBANKA_0808900	ATP-dependent protease ATPase subunit ClpY	2	4	4	1		2	10	0,30
Q4YSH6_PLABA	PBANKA_1202700	RNA-binding protein	3	4	3	1		2	10	0,30
Q4Z2K7_PLABA	PBANKA_0205200	?	3	3	4	2	1	1	10	0,40
Q4YSM5_PLABA	PBANKA_0912200	signal recognition particle subunit SRP72	1	4	5	3	2		10	0,50
Q4YK6_PLABA	PBANKA_0316000	replication factor C subunit 1	7	2	1				10	WT only
Q4YJC2_PLABA	PBANKA_1127000	choline/ethanolaminephosphotransferase	1	4	5				10	WT only

protéines impliquées dans la traduction

aaRSs

N>20%

N>15%

(iii) Protéines sous-exprimées dans le mutant tRip-KO

Comme attendu, on ne détecte pas tRip dans le protéome KO et de nombreuses protéines sont sous-exprimées par rapport au protéome du parasite WT (**Tableau 4**). Ceci peut être la conséquence de deux processus : inhibition de la traduction et/ou inhibition de l'expression de certains gènes spécifiques.

Il est intéressant de voir que les protéine MSP-1 (Q4Z273_PLABA, KO/WT = 0,44), MSP-7 (Q4YB67_PLABA, KO/WT = 0,36), MSRP-1 (Q4YB66_PLABA, KO/WT = 0,25) et MSRP-2 (Q4YB68_PLABA, KO/WT = 0,08) figurent parmi les protéines sous-exprimées dans le mutant tRip-KO. Ces protéines localisent à la membrane plasmique du futur mérozoïte et lui permettent d'établir le contact primaire avec l'érythrocyte (Holder *et al.*, 1992). Bien que d'autres protéines participent à cette fonction, il est possible que la baisse d'expression de ces MSP soit en partie à l'origine de l'anomalie observée dans le stade sanguin, en diminuant la capacité d'établir le contact primaire.

(iv) Aminoacyl-ARNt synthétases

Parmi les 20 aaRS cytosoliques existantes, on détecte au total 17 aaRS (**Tableau 5**). Malheureusement, pour la plupart d'entre elles, elles ne sont pas suffisamment abondantes dans les échantillons analysés pour passer le seuil strict que nous avons choisi. Cependant, il semble que leur expression soit globalement stimulée dans la souche KO. C'est particulièrement vrai pour les LysRS, AspRS et TyrRS, surexprimées 10,5, 5 et 9 fois respectivement. Les deux exceptions sont la MetRS qui est stable et surtout la GluRS qui elle est 4 fois moins représentée dans le KO que dans le WT. L'AsnRS quant à elle, n'est pas détectable dans le parasite WT et n'est retrouvée que chez le KO, suggérant là aussi qu'elle est surexprimée.

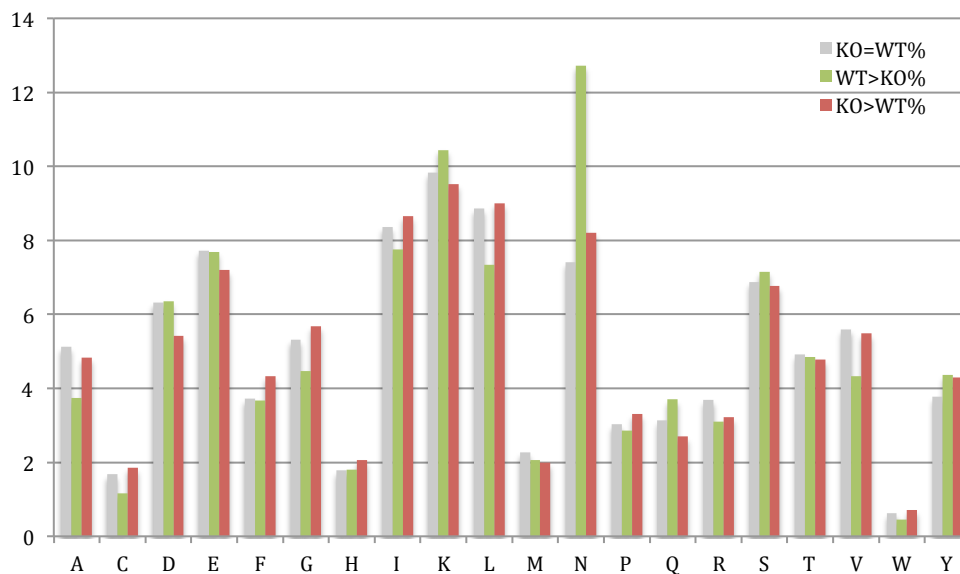
Tableau 5 : Expressions différentielles des aaRS de *Plasmodium*.

Uniprot	PplasmDB	fonction préd	Spectres WT			Spectres KO			ratio KO/WT
			WT-1	WT-2	WT-3	KO-1	KO-2	KO-3	
Q4Z2V5_PLABA	PBANKA_092230C	ThrRS				2	1	1	KO only
Q4YQ23_PLABA	PBANKA_030860C	AsnRS				3	6		KO only
Q4Z6F9_PLABA	PBANKA_020380C	PheRSa				1		1	KO only
Q4Z600_PLABA	PBANKA_130890C	HisRS					1	1	KO only
Q4YVH0_PLABA	PBANKA_102280C	GlyRS				2			KO only
Q4YBC3_PLABA	PBANKA_143420C	ArgRS					1		KO only
Q4YTR2_PLABA	PBANKA_142960C	ProRS	1	9	3	10	9	11	2,3
Q4YVD0_PLABA	PBANKA_061540C	SerRS	1	1		3	1	2	2,5
Q4YSN0_PLABA	PBANKA_136290C	LysRS		3	1	22	8	12	10,5
Q4YNK4_PLABA	PBANKA_021020C	AspRS		1	1	4	4	2	5
Q4YR88_PLABA	PBANKA_122280C	TyrRS			1	5	3	1	9
Q4YYC6_PLABA	PBANKA_094290C	PheRSb			1	1	3	1	5
Q4YYY6_PLABA	PBANKA_132560C	ValRS			2	3	1		2
Q4YVD4_PLABA	PBANKA_051870C	MetRS	2	9	7	4	6	9	1,05
Q4Z3M2_PLABA	PBANKA_114360C	AlaRS	9	15	11	13	7	9	0,82
Q4Z2Y7_PLABA	PBANKA_112170C	LeuRS	6	9	7	5	4	5	0,63
Q4Z1Z6_PLABA	PBANKA_136200C	GluRS	11	22	22	4	5	6	0,27
Q4YR89_PLABA	PBANKA_135070C	TrpRS			1				WT only

d. Usage des acides aminés

Afin de déterminer la proportion de protéines qui sont directement affectées dans leur synthèse, la composition en acides aminés des protéines sous-exprimées dans le parasite KO (WT>KO) a été comparée à la composition en acides aminés des protéines non affectées (KO = WT, données non montrées) et surexprimées (KO>WT). On observe que l'utilisation des acides aminés est globalement la même dans les trois catégories de protéines à l'exception de l'asparagine (réduite de 30% dans le parasite KO) (**Figure 27A**). Cette utilisation différentielle d'asparagine est encore plus importante si on considère les répétitions d'asparagine (**Figure27B**).

A



B

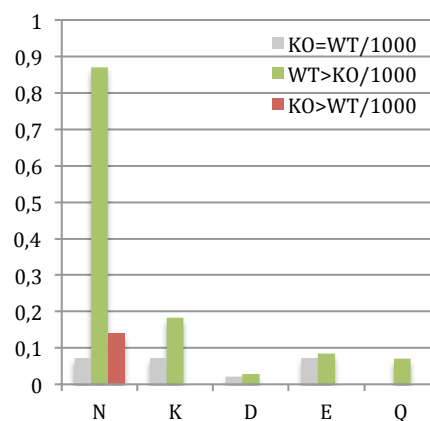


Figure 27 : Utilisation des acides aminés dans les protéines de *P. berghei* WT et tRip-KO. (A) Usage des acides aminés en pourcentage dans les protéines dont l'expression n'est pas affectée (WT = KO, gris), est inhibée (WT>KO, en vert) ou est stimulée (KO>WT, en rouge) dans le parasite tRip-KO par rapport au WT. (B) Fréquence des répétitions d'acides aminés dans les différents groupes de protéines (nombre de répétition de 5 acides aminés ou plus par 1000 acides aminés).

En effet, le nombre de protéines contenant au moins 5 asparagines successives sont considérablement réduites dans le KO (plus de 80% de réduction, ces protéines sont surlignées en gris dans le **Tableau 4**). Ceci suggère que ces protéines sont sous-exprimées en conséquence d'une traduction inefficace, au moins localement.

Il est maintenant nécessaire de compléter ces résultats avec des expériences de RT-qPCR sur certains ARNm. Ces expériences permettront de vérifier si les protéines dont l'expression varie significativement sont inhibées au niveau de la traduction (les quantités d'ARNm ne devraient alors pas varier entre le WT et le KO), ou au niveau des ARNm.

3. Identification des interactants protéiques de tRip

a. Co-immunoprécipitation

Pour identifier les partenaires de tRip, j'ai effectué des co-immunoprécipitations en utilisant un anticorps anti-tRip purifié, dirigé contre la partie C-terminale de la protéine. Cet anticorps est idéal pour cette expérience puisqu'*in vivo*, c'est la partie N-terminale de tRip qui est intracellulaire et donc potentiellement en interaction avec d'autres protéines intracellulaires. La fixation de l'anticorps n'est donc pas inhibée par la présence d'un complexe et *vice versa*.

Les extraits protéiques ont été préparés à partir d'un mélange des différents stades sanguins du parasite (**Figure 28**). Cette option offre la possibilité d'obtenir beaucoup de parasites en une fois et de travailler extemporanément. Même si nous n'avons pas démontré l'import d'ARNt spécifiquement dans les stades érythrocytaires, le phénotype observé *in vivo* correspond à une situation pertinente pour identifier les interactants potentiels de tRip.

Des souris ont été infectées par *Pb* WT et tRip-KO et les infections se sont développées sur plusieurs jours. Le sang est ponctionné puis filtré sur filtre Plasmodipur afin d'éliminer les leucocytes des souris. Les membranes des globules rouges sont lysées puis les protéines des parasites libres ont été extraites. C'est sur cet extrait protéique qu'est réalisée la co-immunoprécipitation de tRip à l'aide du kit μ MACS™ (Miltenyi Biotec). Les protéines retenues par l'anticorps anti-tRip puis éluées sont précipitées et analysées par spectrométrie de masse (**Tableau 6**). Le contrôle négatif est réalisé en parallèle avec la souche tRip-KO, ce qui m'a permis d'écartier de mes analyses les protéines présentes dans ces échantillons.

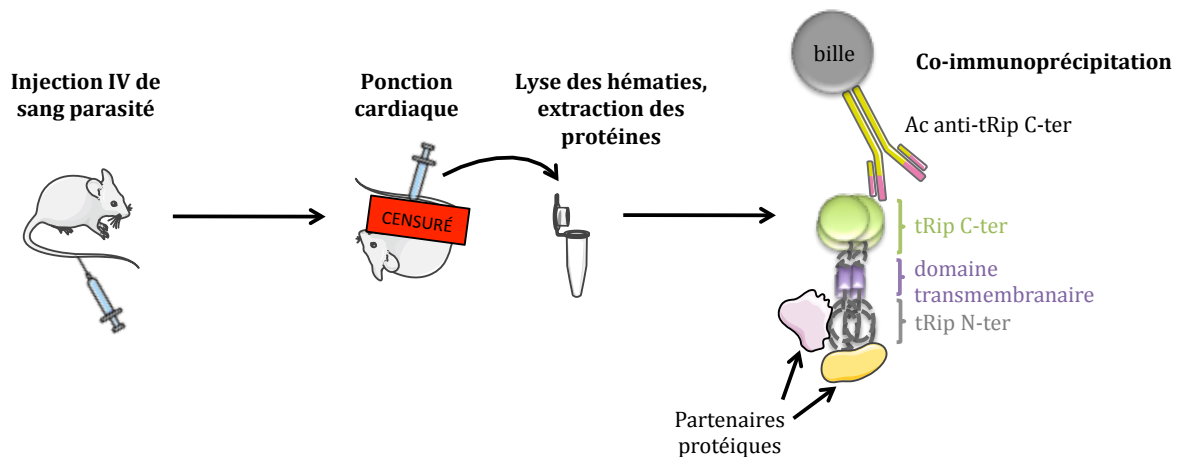


Figure 28 : Protocole de co-immunoprécipitation de tRip à partir de sang infecté par *P. berghei*. Deux groupes de souris sont infectés : l'un avec la souche WT, l'autre avec la souche tRip-KO (utilisée comme contrôle négatif). L'infection se développe durant plusieurs jours, le temps d'atteindre 10% de parasitémie. Le sang des souris est alors ponctionné, les érythrocytes sont lysés, puis les protéines des parasites sont extraites. La co-immunoprécipitation de tRip est réalisée avec un anticorps anti-C-ter et permet d'isoler des partenaires protéiques spécifiques du domaine N-ter de tRip.

Les étapes de préparation des échantillons sont globalement les mêmes dans les différents réplicats, sauf les méthodes de lyse des érythrocytes. J'ai testé trois techniques différentes : le chlorure de calcium (échantillon 1), la saponine (échantillon 2) ainsi que la streptolysine O (échantillon 3 et 4). J'ai aussi utilisé deux types de billes magnétiques pour lier l'anticorps : soit recouvertes de protéine A (échantillons 1, 2 et 3), soit recouvertes de la protéine G (échantillon 4). Toutes les deux ont une grande affinité pour l'anticorps de lapin (voir le paragraphe B. 6. dans le Matériel et Méthodes). Par comparaison, l'échantillon 2 a permis d'obtenir moins de spectres que les trois autres échantillons.

b. Analyse des résultats

Comme attendu, tRip (Q4Z3W3_PLABA) n'est présente que dans les échantillons préparés à partir de parasites sauvages, et absente dans le contrôle négatif. L'identité et la fonction des protéines annotées dans la banque Uniprot ont été vérifiées dans la banque EupathDB. En effet, par exemple, les protéines tRip et Pus7 sont indiquées comme étant toutes les deux une MetRS, et la GlnRS n'est pas annotée dans Uniprot.

Dans le **Tableau 6**, la GluRS est la seule à être présente systématiquement dans l'échantillon WT et absente dans l'échantillon KO. La PUS-7 et la GlnRS sont aussi de bonnes candidates, car présentes dans 3 réplicats sur 4 et jamais retrouvées dans les éluions KO. La PUS-7, pour pseudouridine synthase, est une enzyme de modification des ARNt, en particulier le nucléotide U13 dans le bras D (Behm-Ansmant *et al.*, 2003). Les autres protéines sont soit

présentes aussi dans l'échantillon KO (L18-2, NOP-5, L12) ou avec une localisation cellulaire qui a priori ne peut pas permettre leur présence dans le complexe (Dihydrolipoamine succinyltransférase, nuclear preribosomal assembly protein et NOP5).

Tableau 6 : Identification de partenaires protéiques de la protéine tRip de *P. berghei* aux stades sanguins.

réplicats	Unipro	EupathDB	fonction	élution WT/scores				élution KO	localisation cellulaire
				1	2	3	4		
1, 2, 3, 4	Q4Z3W3_PLABA	PBANKA_1306200	tRip	711,3	373,2	601,5	422,2	jamais	cytosol
1, 2, 3, 4	Q4Z1Z6_PLABA	PBANKA_1362000	GluRS	942,8	199,5	443,5	365	jamais	cytosol
1, 3, 4	Q4YVD4_PLABA	PBANKA_0518700	PUS-7	353,7	-	133,1	158,3	jamais	cytosol
1, 3, 4	Q4Z065_PLABA	PBANKA_1346600	GlnRS	197	-	145,4	74,1	jamais	cytosol
1, 2, 3, 4	Q4YD28_PLABA	PBANKA_1354500	L18-2	387,1	89,9	305,4	186,1	201 (4)	cytosol
1, 3	Q4YQ19_PLABA	PBANKA_1442400	fonction inconnue	133,2	-	96,2	-	jamais	cytosol
1, 3	Q4YRY6_PLABA	PBANKA_1406800	S27	112,1	-	64,8	-	jamais	cytosol
1, 4	Q4YUU4_PLABA	PBANKA_1419100	Dihydrolipoamide succinyltransferase	112,1	-	-	39	jamais	Mitochondrie
1, 3	Q4YW26_PLABA	PBANKA_0923500	nuclear preribosomal assembly protein	616,4	-	137,9	-	jamais	Noyau
1, 3, 4	Q4Z166_PLABA	PBANKA_1207000	NOP5	369	-	104,3	92,9	143,9 (4)	Noyau
1, 3, 4	Q4YTR8_PLABA	PBANKA_1432000	SRP 19	402,2	-	75,8	79,9	128 (4)	cytosol
1, 2, 4	Q4YYJ3_PLABA	PBANKA_1231800	L12	342,6	72,1	-	200,6	242,3 (4)	cytosol

Liste des protéines détectées par spectrométrie de masse présentes dans les éluions WT et absentes dans les éluions KO. Les protéines en rouge sont celles systématiquement présentes dans les extraits WT et absentes dans les extraits KO des 4 expériences répétées et en orange dans 3 expériences sur 4. GluRS : Glutamate-ARNt synthétase ; Pus7 : Pseudouridine synthase 7 ; GlnRS : Glutamine-ARNt synthétase.

GluRS, GlnRS et PUS-7 possèdent une particularité dans leur structure : un domaine additionnel à leur extrémité N-terminale (**Figure 29**). Chacun contient au moins une LCR et, chez la GluRS, un domaine GST-like est également présent. Ce type de domaine, souvent impliqué dans des interactions protéine/protéine, pourrait être le site de contact avec la partie N-terminale de tRip. Selon les prédictions informatiques (NCBI et Predictprotein.org), la GluRS et la PUS-7 contiendraient également un domaine transmembranaire. Ces observations suggèrent que, comme tRip, la GluRS et la PUS-7 seraient localisées à la membrane plasmique du parasite au stade sanguin.

Ces résultats confirment ce qui est déjà connu pour les protéines qui contiennent un domaine de liaison aux ARNt homologue à celui de tRip. Celles-ci sont souvent impliquées dans la formation de complexes multisynthétasiques, comme la protéine Arc1 qui ancre la MetRS et la GluRS dans le cytosol de *S. cerevisiae* (Simos *et al.*, 1998). Mais c'est la première fois qu'on trouve une enzyme de modification des ARNt dans ce type de complexe. Ces résultats suggèrent que certains ARNt importés pourraient être modifiés par les enzymes plasmodiales correspondantes, puis être utilisés dans la synthèse protéique du parasite. Il est intéressant de noter aussi que les ARNt^{Glu} et ARNt^{Gln} substrats des GluRS et GlnRS respectivement sont également des substrats

potentiels de l'enzyme Pus-7. En effet, ils possèdent un U en position 13 susceptible d'être modifié par cette enzyme (Behm-Ansmant *et al.*, 2003).

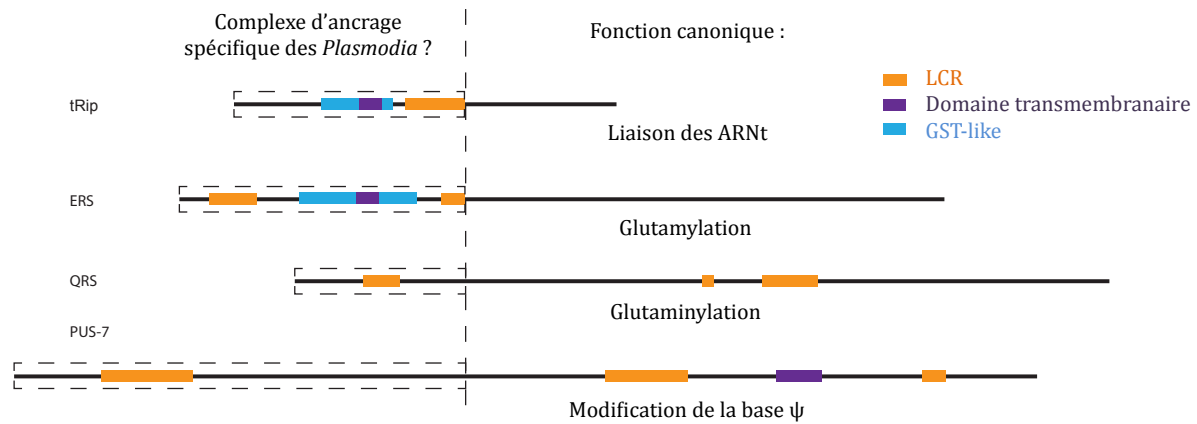


Figure 29 : Représentation schématique des protéines trouvées en complexe avec tRip au stade sanguin chez *P. berghei*. Les régions de faibles complexité (LCR, orange), les domaines transmembranaires prédits par Predictprotein (violet, <https://predictprotein.org/>) et les domaines GST-like prédits (bleu, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) sont indiqués. Les domaines N-terminaux des protéines, spécifiques à *Plasmodium*, sont encadrés en pointillés.

c. Etude préliminaire de la GluRS de P. berghei

Pour initier un nouveau volet de mon travail, j'ai entrepris l'étude de la GluRS. Mon but premier était de tester si les ARNt^{Glu} de la souris étaient aminoacylables par l'enzyme plasmodiale. La GluRS est une aminoacyl-ARNt synthétase de classe I. Dans les différents génomes de *Plasmodia*, cette protéine contient des domaines supplémentaires aux domaines catalytique et de liaison à l'anticodon. J'ai choisi de travailler avec l'enzyme de *P. berghei* (803 acides aminés, 94 kDa) car celle-ci contient des séquences LCR plus courtes que ses homologues des autres espèces de *Plasmodium*, réduisant ainsi potentiellement les difficultés à la surproduire.

La séquence du gène de la GluRS de *P. berghei* a été clonée dans un plasmide pCDNA3.1 modifié, qui permet de produire la protéine chez *E.coli* avec un tag histidine à l'extrémité C-terminale. Après purification sur colonne Ni-NTA et analyse sur gel (**Figure 30**), on détecte une bande d'intensité faible vers 100 kDa, qui après analyse par spectrométrie de masse s'avère être effectivement la GluRS entière (94 kDa). Cependant, j'obtiens majoritairement une forme clivée, autour de 65-70 kDa. La spectrométrie de masse a montré que cette protéine correspond bien à la GluRS et qu'elle serait dépourvue des 250 premiers résidus. Ainsi, la forme tronquée de la protéine obtenue correspond uniquement à son domaine catalytique et son domaine de liaison à l'ARNt (**Figure 29**). La purification a été refaite en présence d'inhibiteurs de protéases dans tous

les tampons, mais cela n'a pas permis d'empêcher la protéolyse. Le cœur catalytique de la protéine étant présent, j'ai tout de même testé cette forme clivée de l'enzyme en aminoacylation.

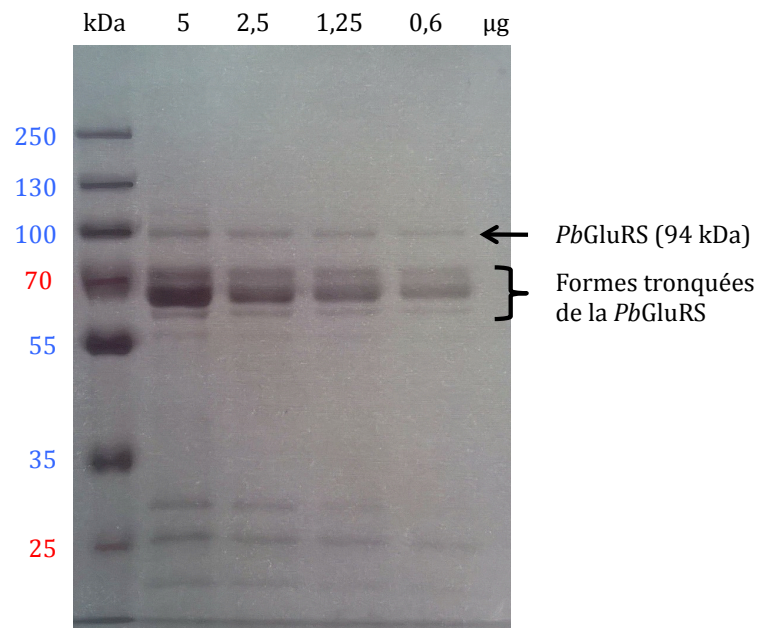


Figure 30 : Production de la protéine *PbGluRS* recombinante. Le gel (10%) présente le profil de migration de la *PbGluRS* purifiée sur colonne Ni-NTA. La forme majoritaire obtenue est clivée

Tableau 7 : Plateaux de charge obtenus avec différents ARN par la glutamyl-ARNt synthétase (*GluRS*) recombinante de *P. berghei*.

ARN total		ARNt total		transcrits	
Plasmodium	80%			Glu(TTC)	48%
				Glu(CTC)	1%
foie souris	6%	foie souris	50%	Glu(TTC)	65%
		Hepa 1-6	40%	Glu(CTC)	—
Cos-7	30%				
		S. cerevisaie	5%		
		E. coli	3%		

Les résultats sont exprimés en % d'ARNt^{Glu} théoriquement disponible dans les différents échantillons testés (0,75% dans l'ARN total, 15 % dans l'ARNt total, 100% des transcrits). Cos7 : fibroblastes de singe ; Hepa 1-6 : hépatocytes murins. Moyenne de 3 expériences indépendantes. Le faible taux d'aminocyclation du transcrit de l'ARNt^{Glu} (CTC) de *Plasmodium* indique que celui-ci est certainement mal replié.

Pour tester l'activité d'aminocyclation de la *PbGluRS* *in vitro*, j'ai utilisé des ARNt^{Glu} d'origines diverses (**Tableau 7**) : *Plasmodium*, souris (*M. musculus*), singe (*Chlorocebus*), levure (*S. cerevisiae*) et bactérie (*E. coli*), préparés de différentes façons (ARN total contenant environ 15% d'ARNt ou ARNt total). J'ai également produit les quatre transcrits d'ARNt correspondant

aux deux isoaccepteurs ARNt^{Glu} (TTC) et (CTC) de *P. berghei* et de souris. J'ai obtenu trois des quatre transcrits d'ARNt voulus. Dans la quatrième séquence qui correspond à l'ARNt^{Glu} (CTC) de souris, le transzyme ne clive pas malgré les différentes conditions de coupure testées.

Ces expériences ont permis de mettre en évidence que la GluRS de *P. berghei*, même tronquée, est active en glutamylation *in vitro*. En effet, l'ARNt^{Glu} théoriquement présent dans l'ARN total de *Plasmodium* est aminoacylé à 80%. La GluRS de *Plasmodium* est spécifique puisque les ARNt^{Glu} présents dans l'ARNt total de levure (*S. cerevisiae*) et de bactérie (*E. coli*) ne sont que très peu chargés. On observe également des différences d'efficacité avec les ARN de souris. Les ARNt^{Glu} présents dans les ARN isolés à partir de foie de souris sont aminoacylés seulement à 6 % (30% pour les cellules Cos-7, d'origine simienne). Il est intéressant de noter qu'en l'absence des ARNr et ARNm, les ARNt^{Glu} de foie souris sont aminoacylés plus efficacement en passant de 6 à 50 % (40 % des ARNt^{Glu} issus de cellules de foie de souris en culture Hepa 1-6), suggérant que la GluRS aurait peu d'affinité ou de spécificité pour ces ARNt^{Glu} de vertébrés. Enfin, cette discrimination *Plasmodium*/vertébré semble disparaître lorsqu'on utilise des transcrits purs d'ARNt^{Glu}, indiquant que les bases modifiées des ARNt de vertébrés (absentes dans les transcrits) pourraient être impliquées. L'ensemble de ces expériences sont à reproduire dans des conditions différentes (concentrations en substrats et enzyme) afin de déterminer si ces premières observations sont correctes.

C. Implication des ARNt importés dans la physiologie du parasite au stade sporozoïte

1. Pourquoi je n'ai pas pu identifier les interactants de tRip et comparer les protéomes au stade sporozoïte

Les sporozoïtes obtenus après dissection des glandes salivaires de moustiques infectés (*P. berghei* WT ou tRip-KO) sont contaminés par des micro-organismes ainsi que par des cellules provenant de l'hôte (notamment des bouts de cuticule). Une étape de purification est indispensable pour augmenter nos chances de détecter les protéines de sporozoïtes par spectrométrie de masse. Nous (Nassira Mahmoudi-Kaïdi, Marta Cela et moi-même) avons fourni beaucoup d'efforts dans la mise au point de trois méthodes différentes de purification des sporozoïtes (voir le matériel et méthodes pour le descriptif de ces trois protocoles). J'ai pu tester deux préparations en spectrométrie de masse.

Les protéines de sporozoïtes purifiés par la méthode au Percoll® sont fortement contaminées par des protéines de moustiques. La comparaison des résultats de triplicats montre que cette technique n'est pas reproductible.

Les protéines de sporozoïtes purifiés sur colonne échangeuse d'anions sont contaminées par la BSA présente dans les tampons. Malgré les lavages, la BSA reste collée au parasite et est retrouvée en grande majorité parmi les peptides identifiés. Cette trop forte contamination n'a pas permis de traiter le peu de données obtenues.

Enfin, la troisième et dernière technique de purification utilisant de l'Accudenz (Kennedy *et al.*, 2012) a donné trop peu de sporozoïtes purifiés.

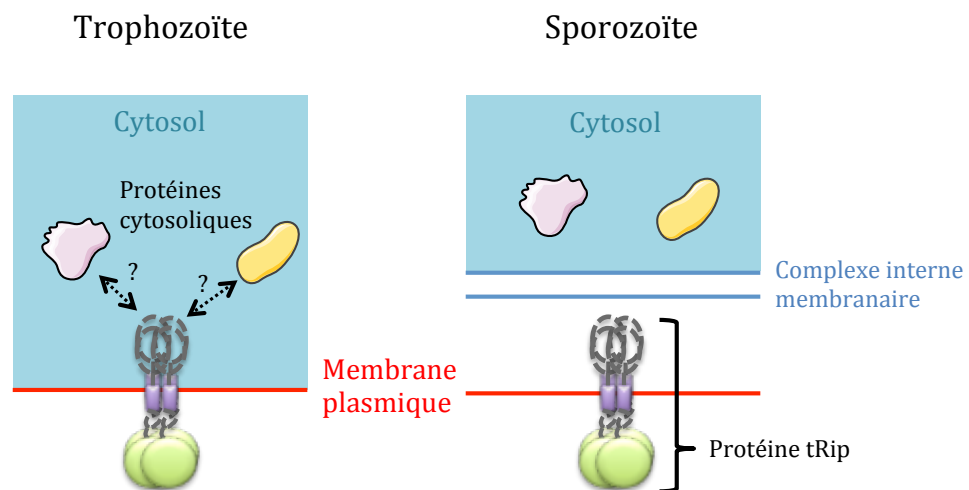
Il faut noter que nous nous sommes rendu compte, tardivement, que les vitesses de centrifugation utilisées dans ces protocoles sont trop élevées (12000 rpm), et détruisent une grande proportion des sporozoïtes.

J'ai également réalisé plusieurs co-immunoprécipitations de tRip en prenant en considération l'agencement particulier des membranes du sporozoïte (**Figure 31A**). J'ai consacré beaucoup de temps à mettre au point cette expérience. En effet, le sporozoïte possède un système endomembranaire retrouvé juste sous la membrane plasmique : l'IMC (« Inner Membrane Complex ») (Morrissette et Sibley, 2002 ; Harding et Meissner, 2014). Ensemble, la membrane plasmique et l'IMC forment une triple couche membranaire qui est appelée la pellicule du parasite. L'IMC confère leur stabilité structurale aux cellules, il est important pour la mobilité et l'invasion du parasite et il intervient dans le développement des cellules filles lors des phases de division (Beck *et al.*, 2010 ; Poulin *et al.*, 2013). Il est composé de sacs membranaires aplatis, appelés alvéoles, reliés entre eux par des « particules » intramembranaires de 9 nm de diamètre (Morrissette *et al.*, 1997). Les alvéoles sont soutenues

du côté cytoplasmique par le cytosquelette (Morrisette *et al.*, 1997) et par des protéines des filaments intermédiaires du réseau sous-pelliculaire (Kudryashev *et al.*, 2010). L'IMC disparaît quand le sporozoïte envahit un hépatocyte (Poulin *et al.*, 2013) ou quand le mérozoïte infecte un érythrocyte (Kono *et al.*, 2012).

La protéine tRip étant ancrée dans la membrane plasmique du sporozoïte, elle est donc isolée du cytosol par l'IMC. Ainsi, on peut s'attendre à identifier des interactants spécifiques du stade sporozoïte qui ne sont pas des protéines cytosoliques. En conséquence, j'ai veillé, au cours

A



B

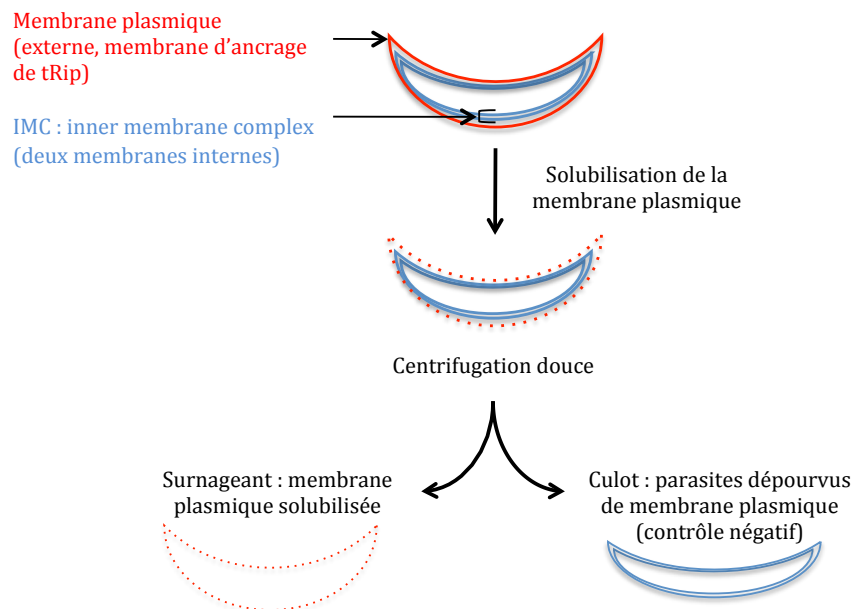


Figure 31 : Schéma des membranes de *Plasmodium* aux stades sanguins et sporozoïte. (A) La protéine tRip peut interagir directement avec des partenaires cytosoliques seulement aux stades sanguins. La présence du complexe interne de membranes l'en empêche au stade sporozoïte. **(B)** Protocole de séparation de la membrane plasmique du reste du sporozoïte.

de l'expérience, à ne jamais mettre tRip en contact avec des protéines cytosoliques. Pour ce faire, j'ai préparé deux types d'échantillons à partir des sporozoïtes : (a) un échantillon contenant les membranes plasmiques et l'espace inter-membranaire et (ii) un échantillon contenant l'IMC et le cytoplasme qu'il contient (**Figure 31B**). Cette stratégie n'a pas abouti. En effet, la limite majeure de cette expérience est la quantité et la qualité des sporozoïtes utilisés. Pour partir d'un grand nombre de sporozoïtes, j'ai regroupé des culots de parasites provenant de plusieurs dissections congelés à -80°C. Les échantillons ont certainement été fragilisés. Pour éviter ce problème, il faudrait procéder avec des sporozoïtes fraîchement disséqués. Cependant, il est difficile non seulement d'obtenir les quantités suffisantes de sporozoïtes en une seule préparation, mais aussi de faire la dissection et la co-immunoprécipitation en une seule journée (pour utiliser des parasites frais).

2. Transmigration

La vacuole parasitophore est absente chez les formes mobiles du parasite, c'est-à-dire le zygote, le mérozoïte, l'oocinète et le sporozoïte. En théorie, cette situation est favorable aux échanges entre le parasite et l'hôte. Dans le cadre de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'étape de la traversée cellulaire effectuée par les sporozoïtes, une des rares étapes où le parasite est en contact direct avec le cytosol de l'hôte (**Figure 32**).

Cette étape est initiée dès la sortie des sporozoïtes des ookystes du moustique, lorsqu'ils doivent traverser les cellules acineuses des glandes salivaires pour en atteindre les canaux. Lors d'une piqûre infestante de moustique, ils poursuivent leur migration en quittant le site de la piqûre (Ménard *et al.*, 2000 ; Amino *et al.*, 2008 ; Moreira *et al.*, 2008 ; Ejigiri *et al.*, 2009, Ménard *et al.*, 2013 ; Tavares *et al.*, 2013). C'est une étape importante durant laquelle ils traversent de nombreuses cellules en direction du foie. Cette étape se fait en deux temps : d'abord au niveau de la peau, pour rejoindre un vaisseau sanguin ou lymphatique, puis au niveau du foie, où les sporozoïtes migrent des capillaires sanguins hépatiques jusqu'à l'hépatocyte final. Le transport entre ces deux étapes est passif, dû au flux de circulation du sang ou de la lymphe (Douglas *et al.*, 2015).

Au niveau du foie, les sporozoïtes quittent le flux sanguin en traversant les cellules de Küpffer (Baer *et al.*, 2007) et les cellules endothéliales sinusoidales (Tavares *et al.*, 2013). La traversée cellulaire a différents rôles : outre celui d'amener les sporozoïtes d'un point à un autre, elle leur permet d'éviter la phagocytose par les macrophages résidents dans le derme (Amino *et al.*, 2007), et elle permet leur « activation » pour infecter les hépatocytes (Mota *et al.*, 2002). En moyenne, quatre hépatocytes sont traversés avant que les sporozoïtes se s'installent dans un hépatocyte final (Mota *et al.*, 2001 ; Mota *et al.*, 2002 ; Risco-Castillo *et al.*, 2015).

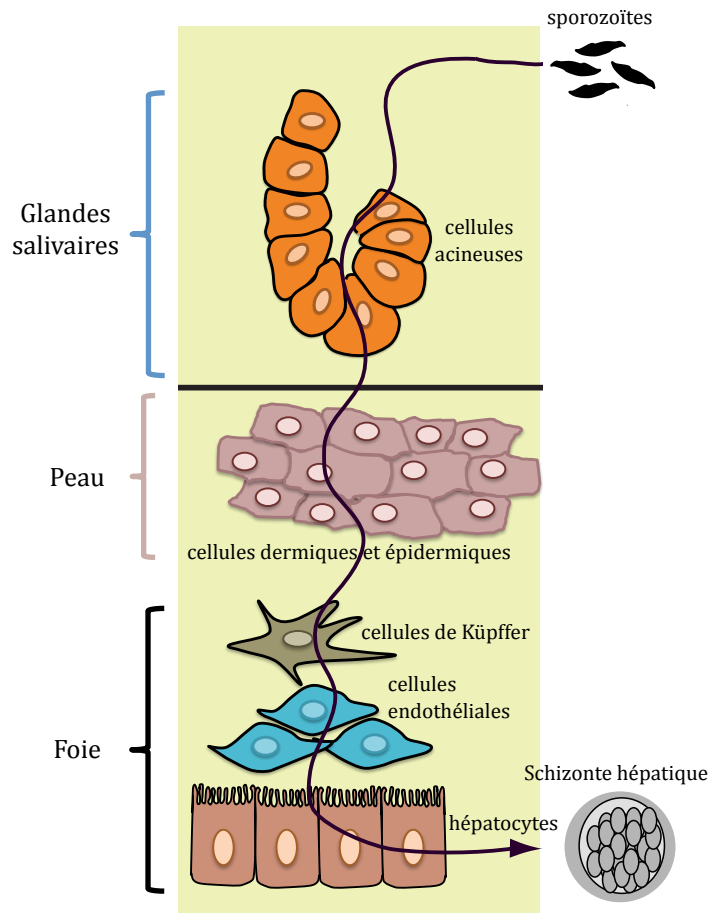


Figure 32 : Itinéraire des sporozoïtes, de l'hémolymph du moustique jusqu'à l'hépatocyte final de l'hôte vertébré. Les sporozoïtes traversent de nombreux types cellulaires différents avant de se multiplier et de former un schizonte hépatique : les cellules acineuses (cellules sécrétrices des glandes salivaires), les cellules de la peau de l'hôte vertébré, les cellules de Küpffer (macrophages qui bordent les vaisseaux capillaires du foie), les cellules endothéliales et enfin, les hépatocytes.

Afin de vérifier si l'import des ARNt est impliqué dans la traversé cellulaire, j'ai réalisé des tests comparatifs entre les sporozoïtes WT et des sporozoïtes tRip-KO. Il est possible de reconstituer et de quantifier cette étape de migration cellulaire *in vitro* (**Figure 33A**). Bien que les expériences réalisées pour l'article (Kapps *et al.*, 2016) montrent que les souche WT et tRip-KO produisent autant de sporozoïtes dans les glandes salivaires des moustiques infectés et que ceux-ci produisent le même nombre de schizontes hépatiques, cette expérience met en évidence un comportement différent des sporozoïtes WT et tRip-KO lors de la traversée cellulaire. En un temps donné, les sporozoïtes tRip-KO traversent plus d'hépatocytes que les sporozoïtes WT (**Figure 33B**). Cela suggère que les sporozoïtes tRip-KO soit traversent les hépatocytes plus efficacement que les sporozoïtes WT, soit qu'ils ont des difficultés à s'installer.

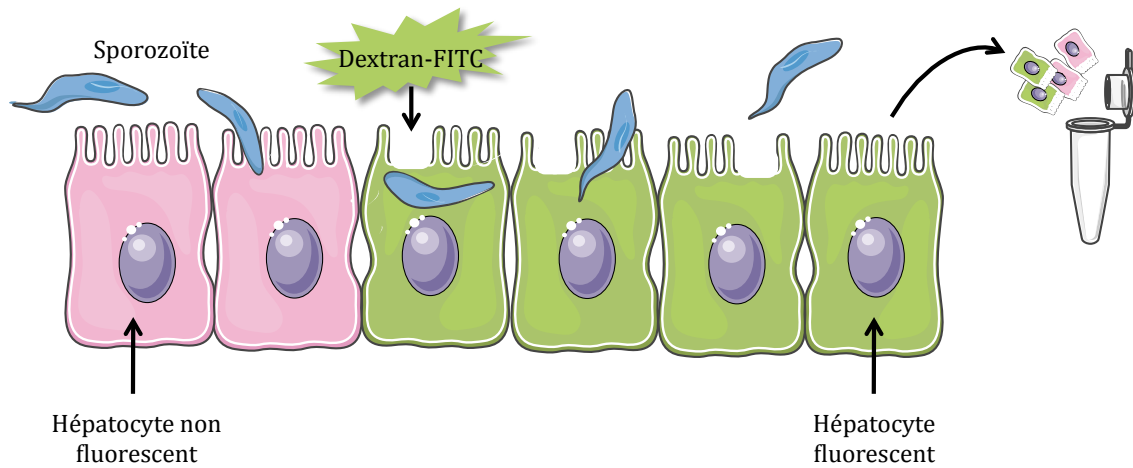
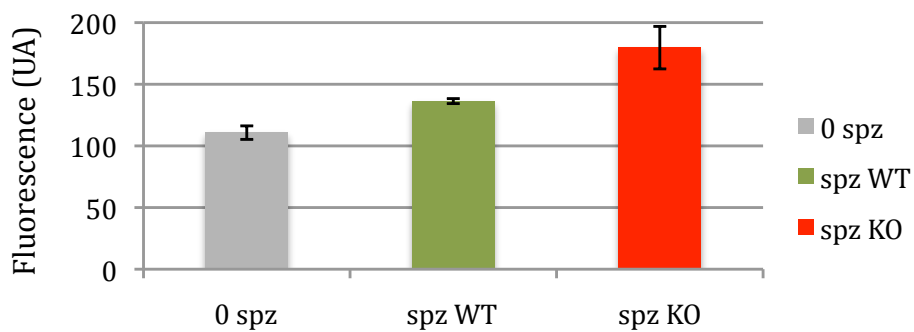
A**B**

Figure 33 : Mesure de la traversée cellulaire des sporozoïtes WT et tRip-KO de *P. berghei*. (A) Principe de la mesure du nombre d'hépatocytes traversés (80000 Hepa 1-6/puits en plaque 24 puits). Les sporozoïtes sont déposés sur les hépatocytes et les traversent. Des pores se forment aux sites d'entrée et de sortie des hépatocytes traversés, ce qui permet l'entrée du Dextran-FITC fluorescent. Les pores se referment rapidement, ce qui piège le Dextran-FITC dans les hépatocytes, permettant ainsi de les quantifier par cytométrie en flux. (B) Intensité de fluorescence moyenne des hépatocytes : incubés sans sporozoïtes (spz), avec sporozoïtes WT (spz WT) et sporozoïtes tRip-KO (spz tRip-KO) pendant 1 h. Le résultat est représentatif de trois expériences indépendantes, réalisées en triplicats.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A. Conclusions

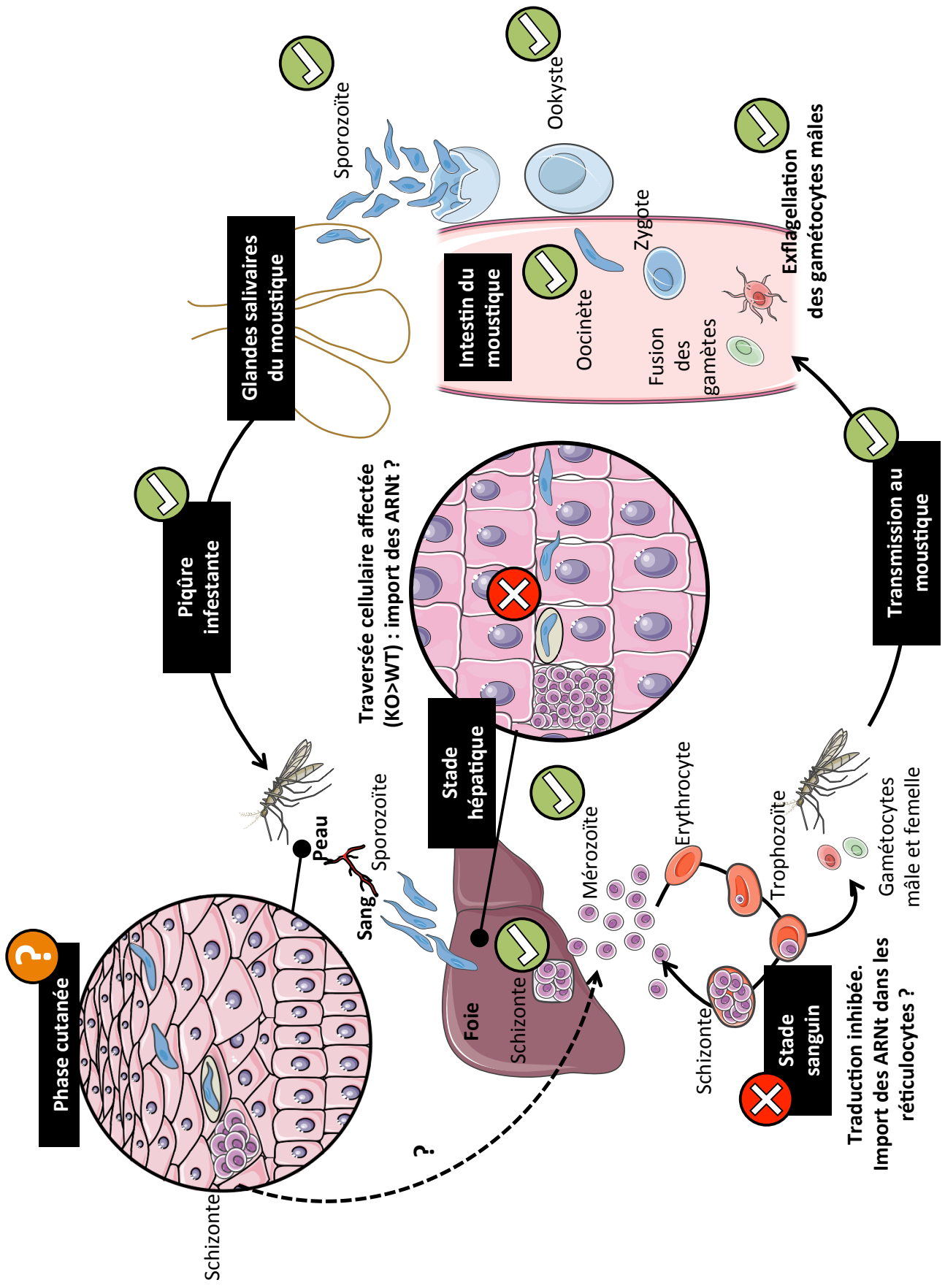
Au cours de ma thèse, mes collègues et moi-même avons mis en évidence une nouvelle interaction hôte pathogène unique dans le parasite responsable du paludisme. Les résultats sont récapitulés dans la **Figure 34**.

Les parasites du genre *Plasmodium*, et plus largement les *Apicomplexa*, possèdent un gène unique codant pour une protéine de liaison aux ARNt, homologue à la protéine chaperonne bactériale Trbp111. Il s'agit du gène PF3D7_1442300 chez *P. falciparum* et PBANKA_1306200 chez *P. berghei*, notre organisme d'étude. Ce gène code pour une protéine que nous avons appelée tRip. Elle n'est pas essentielle et est exprimée tout au long du cycle de vie du parasite. Son domaine transmembranaire central la localise à la membrane plasmique du parasite, tandis que les domaines N-terminal et C-terminal de part et d'autre sont intracellulaire et extracellulaire, respectivement. Son domaine extracellulaire reconnaît la structure tridimensionnelle des ARNt et permet aux sporozoïtes d'importer les ARNt étrangers *in vitro*.

Nous ne savons pas à quel moment du cycle l'import a lieu *in vivo*, mais nous avons montré que le développement du parasite, que ce soit dans le moustique ou au cours de la phase hépatique chez l'hôte vertébré, n'est pas modifié significativement. Il semble cependant que la délétion de tRip augmente la traversée cellulaire du sporozoïte KO, suggérant que l'import d'ARNt accélérerait l'établissement des sporozoïtes dans les hépatocytes pour initier la formation des schizontes hépatiques.

Le stade principalement affecté par l'import d'ARNt est le stade sanguin. Les parasites KO sont caractérisés par une multiplication plus lente et une synthèse protéique réduite. D'une part, j'ai pu montrer que le domaine N-terminal de tRip permet son interaction avec trois protéines cytosoliques du parasite : la GluRS, la GlnRS, et la Pus-7. Toutes les trois ont les ARNt comme substrat. La présence de deux aaRSs indique que les ARNt correspondant (ARNt^{Glu} et ARNt^{Gln}) pourraient jouer un rôle primordial dans la physiologie du parasite. Quelle que soit leur origine (parasite ou hôte), l'aminocyclation ou la modification post-transcriptionnelle des ARNt^{Glu} et ARNt^{Gln} pourraient être dépendante de la formation et de la localisation cellulaire de ce complexe. La GluRS, a été surproduite dans *E. coli* et en dehors du complexe montre une efficacité d'aminocyclation limitée vis-à-vis des ARNt^{Glu} de souris.

D'autre part, l'analyse protéomique comparative des souches WT et tRip-KO au stade schizonte sanguin montre que l'expression de la majorité des protéines n'est pas modifiée. C'est le cas par exemple pour les facteurs de la traduction ainsi que les protéines ribosomales. Cependant, un certain nombre de protéines sont sous-exprimées dans le parasite KO. Parmi elles, on trouve certaines protéines importantes pour l'invasion des érythrocytes qui pourraient être à l'origine, au moins partiellement, d'une multiplication ralentie au stade sanguin. De plus, l'incorporation de l'asparagine dans les protéines du parasite pourrait jouer un rôle central dans



les variations observées, puisque l'expression des protéines qui contiennent des insertions riches en répétitions d'asparagine, abondantes chez *Plasmodium*, est particulièrement réduite en l'absence de tRip.

Enfin, de façon inattendue, certaines protéines sont surexprimées, suggérant que des processus moléculaires autres que la synthèse protéique sont touchés par l'absence d'import des ARNt. C'est notamment le cas des enzymes de la glycolyse. Cela pourrait indiquer que le parasite adapte son apport énergétique pour compenser une synthèse protéique globalement réduite. De même, les aaRS, qui sont directement concernées par une variation dans la concentration intracellulaire des ARNt, sont globalement surexprimées, probablement pour compenser un déficit en ARNt aminoacylés, à l'origine de la synthèse protéique réduite chez le parasite tRip-KO. Ces observations nous confortent dans l'idée que certains des ARNt importés dans le parasite pourraient participer à la régulation de l'expression génique en contrôlant la synthèse des protéines en amont du décodage ribosomique.

Figure 34 : Schéma « bilan » de mon travail de thèse sur le rôle de l'import des ARNt de l'hôte chez *P. berghei*. Le cycle du paludisme est représenté comme support à l'illustration du travail accompli : Le sigle ☺ indique l'absence d'anomalie observée en comparant la souche *P. berghei* tRip-KO à la souche WT de référence. Dans le moustique, la capacité des gamétocytes mâles à exflageller a été contrôlée, ainsi que la taille des oocinètes et des ookystes, la morphologie et le nombre de sporozoïtes formés. Concernant le stade hépatique, la quantité de schizontes ainsi que la quantité et la taille des mérozoïtes ont été vérifiées. Enfin, la transmission du parasite de l'hôte vertébré vers le moustique, et *vice versa*, se déroule normalement. En revanche, deux étapes sont affectées par l'absence de la protéine tRip (☹) : les sporozoïtes tRip-KO traversent plus de cellules que les sporozoïtes de référence ; Au stade sanguin, les parasites tRip-KO sont morphologiquement identiques aux parasites WT, cependant, ils se développent plus lentement et leur synthèse protéique est réduite. Enfin, la phase cutanée aboutissant à la formation de schizontes dermiques, dont la participation à l'établissement d'une parasitémie est controversée, n'a pas été testée (❓).

B. Perspectives

En nous basant sur les résultats obtenus au cours de ma thèse, il apparaît qu'en important les ARNt de l'hôte, *Plasmodium* pourrait compenser un déficit en ARNt endogène. Cependant, nous devons encore répondre à de nombreuses questions concernant l'origine de ces ARNt, la fonction moléculaire de tRip et le rôle des ARNt importés dans le parasite.

1. Origine des ARNt importés

a. Est-ce que l'import se fait *in vivo* ?

Dans cette étude nous avons décidé de travailler avec des sporozoïtes de *Plasmodium* pour démontrer l'import des ARNt. En conséquence, la démonstration de l'import a été faite uniquement chez le sporozoïte et *in vitro*. *In vivo*, nous sommes confrontés à des obstacles majeurs. En effet, comment faire la différence entre la présence d'ARNt de l'hôte à l'intérieur des parasites et une contamination due à une purification imparfaite des parasites ? Au stade hépatique, nous n'avons pas trouvé de protocole nous permettant de purifier efficacement les sporozoïtes après la traversée cellulaire ou les schizontes hépatiques. En revanche, au niveau du stade sanguin, la purification des parasites semble plus accessible. C'est donc à ce stade que nous essayerons de démontrer la présence des ARNt de l'hôte dans *Plasmodium* (soit par Northern blot, à condition de concevoir des sondes spécifiques soit par RNA seq).

b. Quelle est la source des ARNt importés ?

En l'absence de vacuole parasitophore, le sporozoïte est un des rares stades extracellulaires du parasite (avec les oocinètes) qui est à un moment donné en contact direct avec le cytosol, donc avec les ARNt des cellules hôtes (traversée cellulaire). De plus, la forme infectieuse sporozoïte est spécifique des *Apicomplexa*, et est donc corrélée à la présence du gène codant pour tRip. Enfin, un sporozoïte produit 5000 à 30000 mérozoïtes selon l'espèce, ce qui implique une multiplication massive du parasite et donc une traduction intense qui requiert beaucoup d'ARNt. Découvrir que la souche tRip-KO se développe moins bien seulement dans le cycle sanguin a été une surprise. En effet, contrairement aux cellules de la peau ou du foie traversées par le sporozoïte, les globules rouges matures sont des cellules *a priori* pauvres en ARNt, puisqu'elles ne possèdent plus de noyau et ne sont plus actives en synthèse protéique. De plus, la présence d'une vacuole parasitophore (Ward *et al.*, 1993) qui isole le parasite du cytosol de l'hôte n'est pas forcément propice à l'import des ARNt. Cette situation nous a fait envisager deux hypothèses principales : (i) le sporozoïte importe les ARNt et les conséquences ne sont détectables qu'au cours du stade sanguin, ou (ii) l'import a lieu dans les érythrocytes à travers la vacuole parasitophore. Dans le cas d'un import érythrocytaire, les réticulocytes, c'est-à-dire les jeunes érythrocytes tout juste produits par la moelle osseuse, constituent une source plausible

d'ARNt. En effet ces cellules représentent environ 2 % des cellules érythrocytaires, et sont préférentiellement infectées par certaines espèces plasmodiales. Ainsi, *P. berghei* est caractérisé par une affinité 150 fois plus élevée pour les réticulocytes que pour les érythrocytes matures (Cromer *et al.*, 2006). Ces cellules sont de bonnes sources de nutriments pour le parasite (Srivastava *et al.*, 2015) et sont particulièrement riches en ARNt. Par exemple, chez le lapin, on dénombre environ 400000 ARNt par réticulocyte (Smith et McNamara, 1971 ; Smith *et al.*, 1980). Si c'est le cas, l'augmentation du taux de réticulocytes dans une souris infectée devrait favoriser le développement des parasites WT, mais pas celui des parasites tRip-KO.

2. Fonctions moléculaires de tRip

a. Est-ce que tRip est un transporteur ou un récepteur ?

Pour répondre à cette question, nous étudions la structure de tRip (cristallographie et SAXS).

(i) Un transporteur ?

Nos premiers résultats indiquent que tRip multimérise *in vitro* (4 à 6 sous-unités) et fixe un seul ARNt par multimère. On pourrait imaginer dans ces conditions que tRip forme tout simplement un pore dans la membrane plasmique du parasite, spécialisé dans le passage des ARNt.

A priori, notre travail montre que l'import d'ARNt dans les sporozoïtes se déroule *in vitro* sans l'intervention de facteurs cellulaires de l'hôte. Cependant, il faut être prudent, puisque les mitochondries de plantes sont également capables d'importer les ARNt *in vitro* (Delage *et al.*, 2003 ; Salinas *et al.*, 2005 ; Salinas *et al.*, 2006) alors qu'*in vivo*, les aaRS jouent un rôle essentiel dans ce transport (Dietrich *et al.*, 1996).

(ii) Un récepteur ?

L'autre possibilité est que tRip est un récepteur, qui en liant les ARNt de l'hôte déclenche une endocytose. Dans ce cas, on peut imaginer que d'autres molécules pourraient être importées *via* tRip. Comme cela a été montré pour Trbp111 (tRNA^{Ile}/IleRS) (Nomanbhoy *et al.*, 2001), tRip peut se lier sur un ARNt qui est déjà complexé à une aaRS (tRNA^{Asp}/AspRS) (Kapps *et al.*, 2016). Ainsi on ne peut pas exclure que tRip puisse médier l'import non seulement d'ARNt seuls, mais aussi d'ARNt liés à leur aaRS homologue. Ceci n'est pas sans rappeler la voie d'import des ARNt de type A mitochondriale où l'ARNt est co-importé avec le précurseur de la LysRS mitochondriale (Tarassov *et al.*, 1995).

b. Quel est le rôle du complexe protéique organisé autour de tRip ?

L'identification d'un complexe contenant tRip, la GluRS, la GlnRS et Pus-7 dans le stade sanguin met en évidence un rôle important de tRip dans l'aminocyclation du parasite. Il faudra dans un premier temps étudier chacune de ces protéines individuellement et leur organisation dans le complexe. Ainsi, il est important de vérifier si les domaines N-terminaux de ces protéines sont bien traduits dans le parasite. En effet, la présence de codons initiateurs à l'intérieur de ces séquences suggère que l'initiation de la traduction pourrait avoir lieu en aval de l'AUG prédit. Il nous faut également déterminer si la prédiction des domaines transmembranaires est correcte. Si c'est le cas, il faudra prendre en considération les localisations intra- ou extra-cellulaires des différents domaines pour identifier ceux qui sont présents dans le même compartiment et peuvent potentiellement interagir et engager la formation du complexe.

Dans un deuxième temps, nous testerons les capacités d'aminocyclation ou de modification des ARNt des enzymes isolées ou dans le complexe. Il est intéressant de noter qu'en se basant sur les séquences des ARNt^{Glu} et ARNt^{Gln} du parasite et de la souris, ceux-ci sont potentiellement substrats de la Pus-7, à l'exception de l'ARNt^{Glu}(UUC) de *Plasmodium*. Celui-ci présente une insertion dans la boucle D qui diffère de la séquence consensus déterminée dans (Behm-Ansmant *et al.*, 2003) chez *S. cerevisiae*. Or, cet ARNt^{Glu}(UUC) est l'ARNt^{Glu} le plus utilisé pour décoder les protéines de *Plasmodium* (7,32 % des codons, contre 1,02 % pour l'autre ARNt^{Glu}(CUC)). On peut se demander si la coopération entre la GluRS et Pus-7 pourrait favoriser la modification de cet ARNt spécifique qui est *a priori* compromise.

De même, l'ARNt^{Glu}(UUC) de souris est un substrat pour la GluRS de *Plasmodium in vitro*. Cependant, son taux de charge baisse considérablement lorsque cet ARNt est en présence d'autres ARN compétiteurs (ARNt total ou ARN total de souris). On peut se demander si la présence de la GluRS dans le complexe permet de capter efficacement l'ARNt^{Glu} de l'hôte, dès son entrée dans le parasite.

c. Est-ce que tous les ARNt sont importés avec la même efficacité ?

La reconnaissance entre tRip et l'ARNt est basée sur la conformation tridimensionnelle de celui-ci, plus précisément au niveau du coude de l'ARNt (Kapps *et al.*, 2016). Cela supposerait que tous les ARNt sont importés avec la même efficacité. Ceci dit, il est tout à fait possible que certaines séquences d'ARNt soient préférentiellement liées et transportées dans le parasite. La présence ou l'absence d'une base ou d'une modification en particulier pourrait être à l'origine d'une meilleure affinité pour un ARNt donné par rapport à d'autres, à la manière des déterminants et des anti-déterminants des ARNt vis-à-vis des aaRS. Cette étude a été initiée par Marta Cela dans le laboratoire en collaboration avec l'équipe du Dr Renaud Geslain à Charleston (Etats Unis). La mise en évidence d'une sélection de certains ARNt représenterait une source

d'information essentielle pour mieux comprendre le rôle des ARNt importés dans la physiologie du parasite.

3. Devenir des ARNt importés

a. Rôle canonique dans la traduction

Les ARNt importés de l'hôte dans le parasite, ou certains d'entre eux, participent au décodage des codons dans la synthèse protéique. C'est ce que suggèrent mes résultats montrant que la structure des ARNt est intacte suite à leur interaction avec tRip, que certaines aaRS plasmodiales interagissent avec tRip au stade sanguin, ou encore que la traduction est globalement réduite dans le parasite tRip-KO (plus spécifiquement au niveau des protéines riches en asparagines) suggérant qu'au moins certains ARNt de l'hôte sont pris en charge par la machinerie traductionnelle du parasite.

b. Est-ce que les ARNt de l'hôte pourraient être une source d'ARN régulateur ?

Dans plusieurs organismes, des études récentes suggèrent que les ARNt ou des fragments d'ARNt, seraient pourvus de propriétés « siRNA-like » (small interfering RNA) (e.g. Kawaji *et al.*, 2008). Des siRNA sont trouvés chez des protozoaires comme *Tetrahymena thermophila*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania braziliensis*, *Toxoplasma gondii* (Djikeng *et al.*, 2001; Mochizuki et Gorovsky, 2004, Peacock *et al.*, 2007 ; Ullu *et al.*, 2004). Toutefois, ce n'est pas le cas pour *Plasmodium*, puisque l'analyse bioinformatique du génome montre l'absence de gènes codants pour des siRNA ou pour Dicer et Argonaute, deux composants essentiels de la machinerie siRNA (Coulson *et al.*, 2004 ; Hall, 2005 ; Rathjen *et al.*, 2006 ; Xue *et al.*, 2008 ; Baum *et al.*, 2009), mais certains chercheurs pensent qu'il existe un système non canonique (Schwentke *et al.*, 2012). Dans ce contexte, les ARNt de l'hôte représenteraient un réservoir d'ARN régulateurs «stade-spécifiques» pour le parasite, soit en activant l'expression spécifique des ARNm «en attente de traduction» stockés dans les granules soit en inhibant directement leur traduction comme le font les siRNAs dans d'autres organismes (Filipowicz *et al.*, 2008). Pour exercer de telles fonctions, les ARNt impliqués doivent échapper à la machinerie traductionnelle du parasite. C'est possible en clivant l'ARNt ou lorsque l'ARNt n'est pas aminoacylable par la synthétase du parasite.

(i) tRFs ?

Les ARNt peuvent être clivés pour former des fragments d'ARNt ou tRF (Kumar *et al.*, 2016). Les tRF ont été détectés chez *Trypanosoma* (Garcia-Silva *et al.*, 2010), *Leishmania* (Lambertz *et al.*, 2015), *Toxoplasma* et *Plasmodium* (Galizi *et al.*, 2013). Leur production est liée au taux de multiplication et à la différenciation des parasites. Le clivage des ARNt est notamment

augmenté chez *T. gondii* et *P. berghei* dans leurs formes extracellulaires (Galizi *et al.*, 2013). Nos expériences d'import d'ARNt radioactifs (Kapps *et al.*, 2016) montrent que les ARNt importés sont toujours intacts après import dans le parasite (environ 30 minutes), cependant, ils pourraient être clivés ultérieurement et participer à la régulation de l'expression génique du parasite.

(ii) siRNA ?

J'ai montré que l'ARNt^{Glu} (UUC) de souris n'est pas un substrat efficace de la GluRS de *Plasmodium* dans des conditions de compétitions *in vitro* (conditions qui simulent les conditions *in vivo*). Le complexe formé par tRip/GluRS/GlnRS/Pus-7 identifié dans le stade sanguin, *a priori* ne peut pas exister dans le sporozoïte à cause du complexe membranaire interne qui isole le contenu cytosolique de la membrane plasmique. Ainsi, si l'ARNt^{Glu}(UUC) entre dans le sporozoïte, il a peu de chance d'être aminoacylé. En nous basant sur ce postulat, nous avons recherché des cibles potentielles de cette séquence d'ARNt dans une banque d'ARNm polyadénylés (banque EST « short single-read transcript sequences ») de *P. berghei*. Deux ARNm cibles, partiellement complémentaires à la séquence de l'ARNt^{Glu}(UUC) de souris ont été identifiées (**Figure 35**) : l'ARNm de la protéine PBANKA_050120 non caractérisée, dont la transcription est stimulée dans les sporozoïtes infectieux et l'extrémité 3' d'un ARNm contenant la séquence de l'ARNt^{Pro}(CGC) de *P. berghei*. Cette dernière séquence est retrouvée en aval du gène de la protéine PLP2 (« perforin-like protein 2 ») et couvrirait une partie de son UTR 3' (860 nucléotides au total).

Les protéines de la famille des perforines (10 gènes au total), sont impliquées dans la rupture de la membrane de l'hôte (elles sont aussi appelées MACP pour « membrane attack complex proteins »). Le rôle de PLP2 a été démontré concernant la perméabilisation de la membrane de l'érythrocyte hôte par les gamétocytes, dans l'intestin du moustique, pour permettre la fusion formant le zygote (Deligianni *et al.*, 2013 ; Wirth *et al.*, 2014). Je n'ai pas trouvé d'information quant à son implication, parallèlement à PLP1 (Kaiser *et al.*, 2004 ; Ishino *et al.*, 2005), dans la traversée cellulaire des sporozoïtes. Si c'est le cas, cette observation est en accord avec mes données expérimentales montrant que le sporozoïte WT traverse moins de cellules que le parasite KO, suggérant que les enzymes impliquées dans la traversée cellulaire seraient inhibées plus efficacement dans un parasite capable d'importer les ARNt de l'hôte.

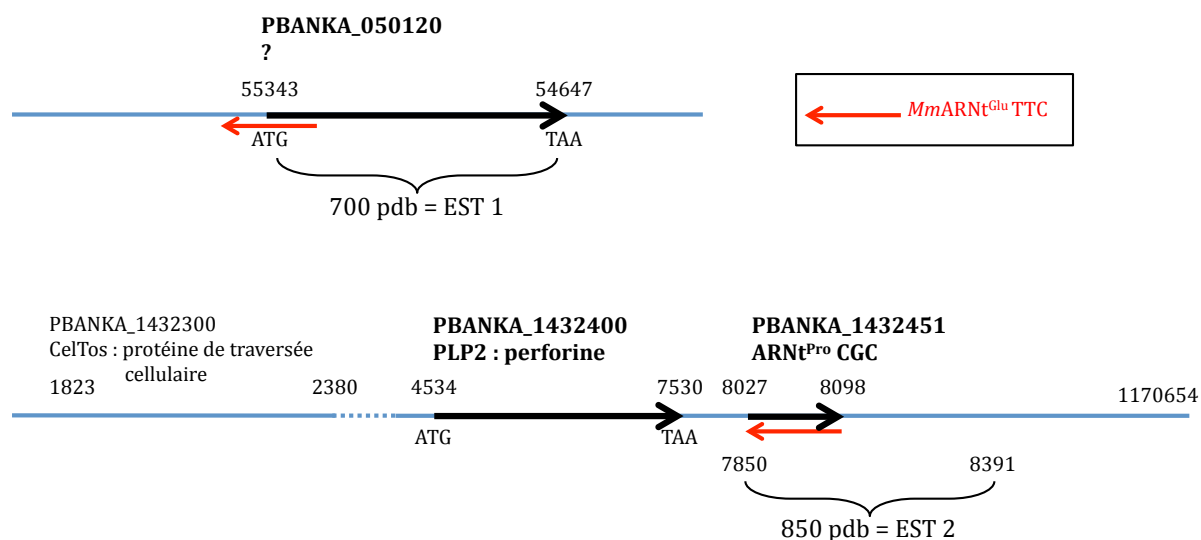


Figure 35 : Cibles potentielles de l'ARNt^{Glu} de souris dans le transcriptome de *P. berghei*. (A) L'ARNt^{Glu}(UUC) de souris (*MmARNt^{Glu} TTC*, en rouge) pourrait s'hybrider au niveau du codon initiateur de l'ARNm de la protéine PBANKA_050120, dont le rôle n'est pas connu mais qui est surexprimée au stade sporozoïte. La séquence de l'ARNt^{Glu}(UUC) est également partiellement complémentaire (18 nucléotides consécutifs complémentaires) à la séquence de l'ARNt^{Pro}(CGC), a priori localisé dans l'UTR 3' du gène codant pour la perforine PLP2. De plus ce gène est localisé directement en aval d'une autre protéine (CelTos) impliquée dans la traversée cellulaire.

4. Quelles autres fonctions que l'import d'ARNt pour tRip ?

Plasmodium libère chez ses hôtes diverses protéines, comme la CSP, dont le rôle est important voire primordial dans l'établissement du cycle de vie (Singh *et al.*, 2007). Localisée à la membrane, tRip pourrait être elle aussi excrétée et agir sur l'hôte à distance. Ce mécanisme rappellerait celui observé chez *Entamoeba histolytica*, une amibe dont le clivage de la LysRS libère chez l'hôte un domaine semblable à Trbp111 doté de propriétés cytokines (Castro de Moura *et al.*, 2011). Les auteurs proposent que cette excrétion est un mécanisme de protection de l'agent pathogène contre l'inflammation de l'hôte. Cependant, le motif de migration cellulaire impliqué n'est pas conservé dans la tRip de *Plasmodium*.

Enfin, nous ne pouvons exclure que tRip ait d'autres propriétés au sein de *Plasmodium* ou chez les autres *Apicomplexa*. Notamment, chez *Toxoplasma*, la présence continue de l'IMC implique un système différent que celui identifié dans ce travail chez *P. berghei*. La protéine homologue chez *T. gondii*, appelée Tgp43, a été détectée dans un complexe multisynthétasique et sa délétion n'entraîne aucun déficit de pathogénèse (Van Rooyen *et al.*, 2014). Ces données démontrent que certaines fonctions de cette protéine unique semblent conservées, alors que d'autres sont perdues chez d'autres organismes de l'embranchement des Apicomplexes.

MATERIEL ET METHODES

A. Matériel

1. Produits chimiques

[$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP	Amersham Pharmacia
Accudenz	Gentauro
Ampicilline	Sigma-Aldrich
ARN ^{tPhe}	Sigma-Aldrich
β -mercaptoéthanol	Carl Roth
Bleu de Coomassie	Expedeon
Bromure d'éthidium	ICN
Dextran-FITC	Sigma-Aldrich
DMEM	GIBCO
DTE	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
EDTA	Euromedex
Glutamate	Amersham
Imidazole	Sigma-Aldrich
IPTG	Fisher Scientific
Kanamycine	Sigma-Aldrich
Méthionine [S^{35}]	Perkin Elmer
Néomycine	Sigma
NP-40	Sigma-Aldrich
Pénicilline-Streptomycine	GIBCO
Percoll	GE Healthcare
Rotiphorèse Gel 30/40	Carl Roth
Sérum de veau foetal	Eurobio
Sérumalbumine bovine (BSA)	Euromedex
TBE	Euromedex
TCA	Carl Roth
TEMED	Fisher Scientific
Tris-base	Sigma-Aldrich
Tri-Reagent	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Carl Roth
Trypsine	GIBCO

2. Macromolécules commerciales

a. Enzymes

BamHI, BglII, BstNI, EcoRI	Thermo Fisher Scientific
HindIII	Fermentas
Dynazyme EXT polymérase	Thermo Fisher Scientific
Fast AP (phosphatase alcaline)	Thermo Fisher Scientific
T4 ADN ligase	Thermo Fisher Scientific
T4 PNK (polynucléotide kinase)	Thermo Fisher Scientific
RNase T1	Fermentas
VDE (phosphodiesterase de venin de cobra)	USB

b. Anticorps

Anti-MSP-1 : anticorps primaire dirigé contre la protéine de surface MSP-1 de *P. falciparum*, produit chez la souris. Santa Cruz Biotechnology

Anti-aldolase : anticorps primaire dirigé contre l'aldolase cytosolique de *P. falciparum*, produit chez la souris. Santa Cruz Biotechnology

Anti-lapin : anticorps secondaire dirigé contre les anticorps de lapin, produit chez la chèvre. Il est conjugué à la peroxidase de raifort. BioRad

Anti-souris : anticorps secondaire dirigé contre les anticorps de souris, produit chez le mouton. Il est conjugué à la peroxydase de raifort. GE Healthcare

Anti-lapin couplé au FITC : anticorps secondaire dirigé contre les anticorps de lapin, produit chez la chèvre et couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine. Sigma-Aldrich

3. Macromolécules non commerciales

a. Enzymes

CCAse : ATP, CTP ARNt nucléotidyl-transférase permettant d'ajouter le CCA 3' terminal à un ARNt en absence de matrice. Elle a été purifiée au laboratoire (par le Dr Anne Théobald-Dietrich) à partir de cultures d'*E. coli* selon le protocole établi par (Cudny et Deutscher, 1986).

b. ARNt

ARNt total d'*E. coli* : voir B. Méthodes, paragraphe 9.

ARNt^{Asp} natif de levure *S. cerevisiae* : il a été purifié au laboratoire selon le protocole mis au point dans (Dock, 1984).

c. Anticorps

Anti-CSP : anticorps primaire monoclonal dirigé contre la protéine circumsporozoïte de *P. berghei*. Il a été obtenu par immunisation de souris injectées avec des sporozoïtes atténués par irradiation. Cet anticorps nous a été gracieusement donné par le Pr Nathalie Boulanger.

Anti-AMA1 : anticorps primaire monoclonal dirigé contre la protéine « Apical Membrane Antigen 1 ». L'anticorps a été produit chez Eurogentec contre le peptide CRASHTTPVLMQKPY.

Anti-*PftRip* (214-402) : anticorps primaire polyclonal dirigé contre l'extrémité C-terminale de *tRip*. Il a été produit chez le lapin puis purifié par affinité. L'anticorps a été produit chez GeneCust Europe, Luxembourg.

4. Les plasmides

a. Les plasmides d'expression bactérienne

pQE30 : ce plasmide a été utilisé pour exprimer la protéine *tRip* harmonisée de *P. falciparum* (voir B. Méthodes, paragraphe 8.a.).

pUC119 : ce plasmide a été utilisé pour la synthèse des transcrits d'ARN^{t_{Glu}} de *P. berghei* et de souris (voir B. Méthodes, paragraphe 9.d.).

b. Les plasmides d'expression eucaryote

pCDNA 3.1 : la *GluRS* de *P. berghei* a été clonée dans ce plasmide (voir B. Méthodes, paragraphe 8.b.). Nous y avons ajouté un motif Shine-Dalgarno (AGGAGGUA) afin de pouvoir l'utiliser non seulement dans les cellules de mammifère en culture, mais aussi dans les bactéries.

pUC18 : c'est le plasmide qui a été utilisé pour obtenir la souche *Pb tRip-KO*, par transgénèse (détaillée dans B. Méthodes, section 4). Il comporte au préalable les gènes de résistance (*hDHFR*) et de protéine fluorescente (*mCherry*).

5. Souches bactériennes et cellules compétentes

a. Souches bactériennes

TOP10 : ces bactéries ont été utilisées pour le clonage de la protéine *tRip* de *P. falciparum* (voir B. Méthodes, paragraphe 8.a.). Génotype : F *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ø80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1* *araD139*, Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

BL21 RIL : Ces bactéries ont été utilisées pour le clonage de la *GluRS* de *P. berghei* (voir B. Méthodes, paragraphe 8.b.). Génotype : F- *ompT* *hsdS*(*rB-* *mB-*) *dcm+* *TetR* *gal* *endA* *Hte* [*argU* *ileY* *leuW* *CamR*] *metA::Tn5*(*KanR*)

TG1 : Ces bactéries ont été utilisées pour la production des transcrits d'ARN^{t_{Glu}} (voir B. Méthodes, paragraphe 9.d.). Génotype : *supE* *thi-1* Δ(*lac-proAB*) Δ(*mcrB-hsdSM*)5 (*rK* - *mK* -) [*F'* *traD36* *proAB* *lacIq* Δ*M15*]

DH5α : Ce sont les bactéries utilisées pour le clonage du plasmide pour la génération de la souche *Pb tRip-KO* (voir B. Méthodes, section 4.). Génotype : F- Φ80*lacZ*Δ*M15* Δ(*lacZYA-argF*) *U169* *recA1* *endA1* *hsdR17* (*rK-*, *mK+*) *phoA* *supE44* λ- *thi-1* *gyrA96* *relA1*

b. Production de bactéries électrocompétentes

Afin de rendre les bactéries électrocompétentes, une colonie de bactéries DH5 α est mise en préculture dans du milieu LB supplémenté des antibiotiques adaptés. Cette préculture est utilisée pour ensemer du milieu LB qui est incubé sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une A_{600nm} entre 0,37 et 0,6. Toutes les étapes suivantes sont faites à 4°C. Les cellules sont centrifugées pendant 15 min à 4000 rpm, lavées avec (i) 1 volume de 1 mM HEPES-NaOH froid, (ii) 0,5 volume de 1 mM HEPES-NaOH froid et (iii) 20 mL de glycérol 10% froid. Le culot est enfin repris dans 1,2 mL de glycérol 10% par litre de culture initiale, les cellules sont aliquotées et sont stockées à -80°C.

c. Production de bactéries chimiocompétentes

Une préculture de TG1 est utilisée pour ensemer 25 mL de milieu LB jusqu'à atteindre une A_{600nm} avoisinant 0,6. Les bactéries sont alors centrifugées 10 min à 4000 rpm à 4°C et resuspendues dans 15 mL de solution 50 mM CaCl₂ froid. Après une incubation de 30 min sur glace, les bactéries sont centrifugées 15 min à 1500 rpm à 4°C et reprises délicatement dans 2 mL de solution 50 mM CaCl₂. Les bactéries sont prêtes à être transformées.

6. Animaux et parasites

La culture de parasites *P. berghei* se fait dans des hôtes vivants : les moustiques *Anopheles* et les souris. La production de parasites nécessite donc un insectarium et une animalerie.

a. Les souris

Deux souches de souris ont été utilisées : les souris Swiss et les souris C57BL/6. Les souris Swiss sont indiquées pour l'infection des moustiques et la réalisation de stocks. Les souris C57BL/6 sont plus sensibles à l'infection par *P. berghei*. Elles développent notamment la forme cérébrale du paludisme et sont plus rapidement malades que les souris Swiss. Elles sont donc utilisées pour des expériences plus précises de phénotypage, afin de détecter une différence de virulence entre deux souches par exemple.

En travaillant avec une souche sauvage du parasite, il est possible d'infecter des souris âgées de 8 semaines ou plus ; l'éthique recommande l'utilisation de souris adultes. Cependant, la virulence amoindrie de la souche tRip-KO générée pour mon projet ne permet pas d'infecter efficacement des souris adultes. Pour cette raison, j'ai choisi de travailler avec des souris âgées de 4 à 6 semaines au maximum car leurs défenses immunitaires sont moins développées et permettent donc une infection efficace par *Pb* tRip-KO.

Les souris que j'ai utilisées ont été achetées chez Janvier LABS. Elles sont généralement

commandées à l'âge de 3 semaines et utilisées au plus tôt âgées de 4 semaines. Elles disposent de nourriture et d'eau à volonté.

b. Les moustiques

L'espèce de moustique utilisée est *Anopheles stephensi*, qui permet d'atteindre des charges parasitaires très élevées (jusqu'à 100000 sporozoïtes/moustique). Ils sont élevés par nos soins dans l'insectarium (voir **Figure 36** dans B. Méthodes, section 1.) dans des conditions standards : 28°C, 75-80% d'humidité, cycles jour/nuit de 12h/12h.

Pour faire pondre les moustiques et ainsi entretenir la lignée, les moustiques femelles doivent prendre un repas sanguin. Une souris Swiss naïve est pesée puis anesthésiée par injection intrapéritonéale de 10 µL d'anesthésiant par gramme (PBS 100 mg/mL de kétamine et 10 mg/mL de xylazine). L'anesthésie est vérifiée par pincements des pattes, qui ne doivent pas produire de sursauts, puis la souris est déposée sur la cage sur l'abdomen, en veillant à bien placer les pattes. Les yeux sont humidifiés par dépôt d'une goutte de PBS sur chaque œil. La souris est laissée sur la cage le temps suffisant pour permettre, idéalement, à l'ensemble des moustiques femelles de la cage de se gorger. Habituellement, l'ensemble des moustiques d'une cage peut se nourrir en une quinzaine de minutes. On peut accélérer la procédure en attirant les moustiques vers la souris par de la chaleur (en déposant contre la souris un petit coussin légèrement chauffé au micro-ondes), ou par du dioxyde de carbone (en soufflant en direction de la souris après avoir retenu sa respiration quelques secondes). A la fin du repas sanguin, la souris est retirée et remise dans sa cage. Sa prochaine anesthésie sera faite au plus tôt un mois plus tard.

Trois jours suivant le repas sanguin, un pondoïr est déposé dans la cage des moustiques et les œufs sont récoltés le lendemain. Les œufs sont mis à éclore dans de l'eau déionisée, où les larves grandissent. Elles sont nourries avec de la nourriture pour poisson finement broyée (TetraMin) matin et soir en fonction de leur nombre dans chaque bac et de leur âge. Les larves sont diluées au fur et à mesure de leur croissance et les bacs d'eau sont multipliés. La métamorphose des larves en pupes survient huit à dix jours après l'éclosion. Les pupes sont récoltées à la main, regroupées dans des bols d'eau qui sont placés dans les cages à moustique. L'émergence (sortie du moustique adulte de la cuticule de la pupa) a lieu environ 24 heures suivant la transformation en pupa. Des cotons imbibés d'eau déionisée contenant 10% de saccharose sont mis à disposition des moustiques. Les cotons sont régulièrement réhumidifiés. Quand une cage de moustiques n'est plus utile, elle est placée au congélateur et lavée ultérieurement.

c. Les souches plasmodiales

Différentes souches de *Plasmodium berghei* ont été utilisées, selon les besoins de l'expérience planifiée.

Pb GFP@EF-1 α : souche de *P. berghei* exprimant constitutivement la protéine GFP sous le contrôle du promoteur du facteur d'élongation eucaryote 1 α (Franke-Fayard *et al.*, 2004). L'intensité de fluorescence est moyenne.

Pb GFP@hsp70 : souche de *P. berghei* exprimant constitutivement la protéine GFP sous le contrôle du promoteur de la protéine hsp70. L'intensité de fluorescence est forte.

Pb tRip-KO mCherry : il s'agit de la souche mutante, délétée du gène codant pour tRip, obtenue grâce à notre collaboration avec l'équipe du Dr. Robert Ménard de l'Institut Pasteur de Paris. Nous avons quatre clones appelés : V3, V4, V5 et R7. Le clone V4 est celui qui a été le plus fréquemment utilisé. Pour des confirmations de résultats d'expériences, les clones V3 et V5 ont été ponctuellement testés. L'obtention de cette souche est détaillée dans la section B. 4..

B. Méthodes

1. Infection des animaux et production de parasites

Une vue d'ensemble de l'élevage des moustiques, de l'infection de moustiques et de souris est donnée dans la **Figure 36** et détaillée dans les paragraphes suivants.

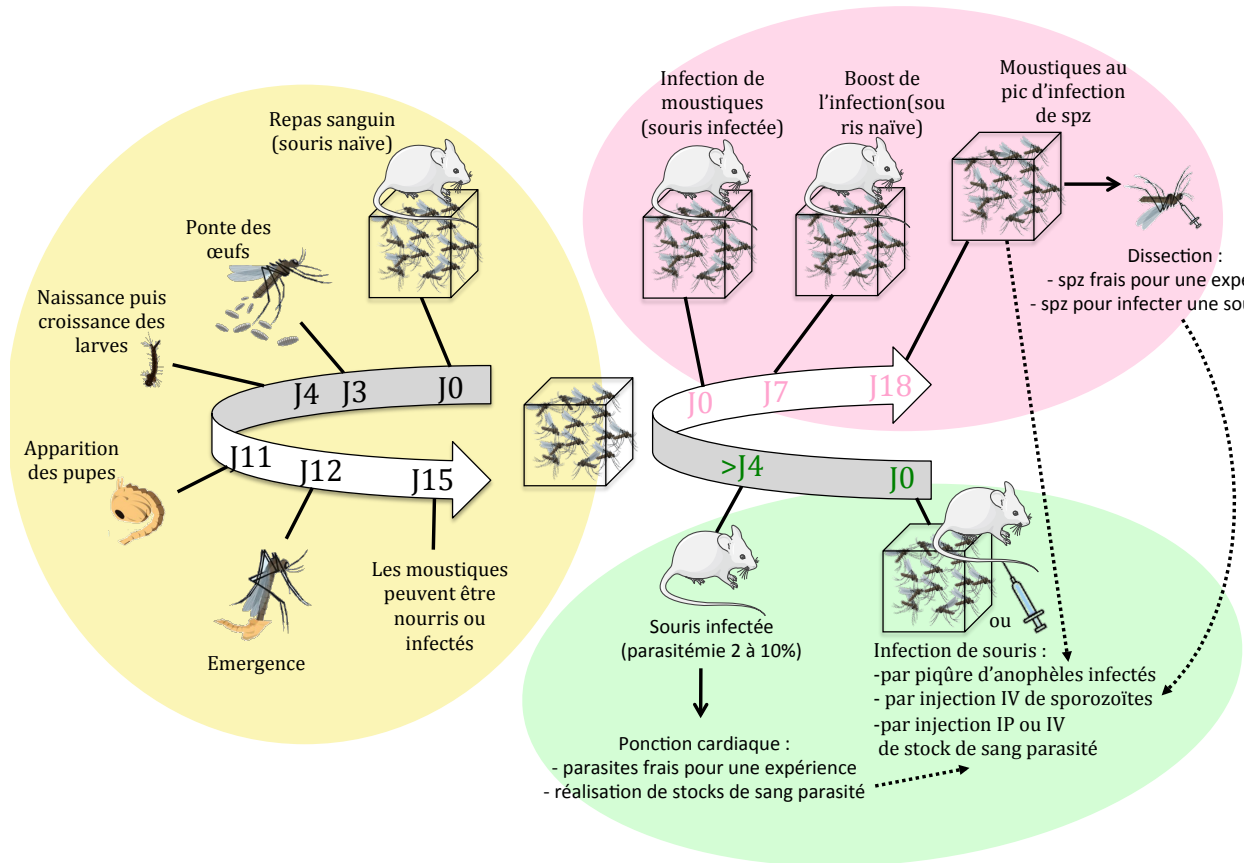


Figure 36 : Schéma global de la production de parasites *P. berghei*. Sur fond jaune, rose et vert sont représentées les étapes nécessaires à l'élevage des anophèles, l'infection de moustiques et l'infection de souris, respectivement. Spz : sporozoïte, IV : intraveineuse, IP : intrapéritonéale. L'ensemble de la procédure, de la ponte des œufs (futurs moustiques à infecter) jusqu'à l'obtention des parasites au stade sporozoïte prend 33 jours en moyenne.

a. Souris

Les souris peuvent être infectées par *P. berghei* de plusieurs manières, dans trois buts différents : la production de sporozoïtes (via l'infection de moustiques, expliquée dans la section suivante), la production de parasites aux stades sanguins (sans passer par le stade hépatique) et la préparation de stocks de sang parasité.

(i) Injection de sporozoïtes

L'infection la plus proche de ce qui se produit dans la nature est celle par piqûre d'anophèles infectés, donc par injection de sporozoïtes dans la peau de la souris. Il suffit de

déposer une souris naïve, Swiss ou C57BL/6, anesthésiée sur la cage de moustiques infectés (comme expliqué dans la section 6. b. de la partie Matériel).

Pour maîtriser cette étape en infectant les souris avec un nombre de sporozoïtes précis, on dissèque des glandes salivaires de moustiques infectés, dilue les sporozoïtes comme souhaité pour les injecter aux souris par voie intraveineuse (dans un volume de l'ordre de 100 μ L) : de 5000 sporozoïtes pour une expérience de phénotypage, à 100000 sporozoïtes au maximum pour faire des stocks de sang parasité. J'ai habituellement procédé avec 10000 à 50000 sporozoïtes pour réaliser mes stocks.

(ii) Injection de sang parasité

Il est aussi possible d'infecter une souris en lui injectant du sang parasité. Ce transfert de sang est appelé « passage » et il est possible d'en faire plusieurs. Cela permet de ne pas devoir entretenir le cycle d'infection constamment. Le sang d'une souris est dit « P0 » quand celle-ci a été infectée par des sporozoïtes ; son sang est transféré à un groupe de souris dont le sang est alors appelé « P1 », etc. Cependant, il est important de ne pas effectuer un trop grand nombre de ces « passages » pour éviter toute dérive génétique du parasite. En effet, dans ces conditions, il est possible que le parasite se délèste des gènes impliqués dans le reste du cycle de développement (infection du moustique et stade hépatique chez l'hôte vertébré). Ainsi, afin d'éviter tout biais dans nos résultats, le stade « P3 » n'a jamais été dépassé dans nos expériences.

(iii) Suivi des infections

Si la souris est infectée par des sporozoïtes, la maladie commence par le stade hépatique et se poursuit par l'infection des érythrocytes. Le pourcentage de globules rouges infectés, appelé la parasitémie, peut être mesuré par deux techniques : (1) si la souche de *Plasmodium* utilisée exprime un marqueur de fluorescence, par exemple la GFP, il est possible de quantifier la parasitémie par cytométrie en flux ; (2) la parasitémie des souris peut également être évaluée par comptage manuel sur frottis sanguin coloré. Cette méthode est moins quantitative que la cytométrie en flux (environ 1000 cellules versus 60000 cellules comptées), mais elle a l'avantage de permettre une évaluation qualitative des parasites (taille, présence des différents stades parasitaires, présence de vacuoles). Pour ce faire, une goutte de sang est prélevée d'une souris en coupant moins d'un millimètre du bout de sa queue. La goutte est déposée sur une lame de microscopie puis étalée. La lame est séchée à l'air libre puis fixée au méthanol 100% quelques secondes. Les frottis sont colorés (Diff-Quick®, Medion Diagnostics), nettoyés, séchés, et observés au microscope (Leitz Diaplan) à l'objectif X100 dans une goutte d'huile à immersion. Le nombre d'hématies parasitées est déterminé sur plus de 1000 cellules comptées au total (à l'aide d'une grille dans l'oculaire) et permet ainsi d'établir la parasitémie. Si la souris a été infectée par

injection de sporozoïtes, la présence de parasites dans les érythrocytes apparaît en moyenne 7 à 10 jours après l'injection. La détection de la parasitémie est plus rapide par injection de sang parasité, entre 3 à 5 jours.

L'évolution de la parasitémie est suivie quotidiennement. Quand la parasitémie atteint le niveau souhaité, la souris est utilisée pour infecter les moustiques ou est ponctionnée pour en récolter le sang qui est soit directement utilisé (voir B. Méthodes, section 6.) soit mis en culture pour synchroniser les parasites au stade schizonte (voir B. Méthodes, section 7.).

b. Moustiques

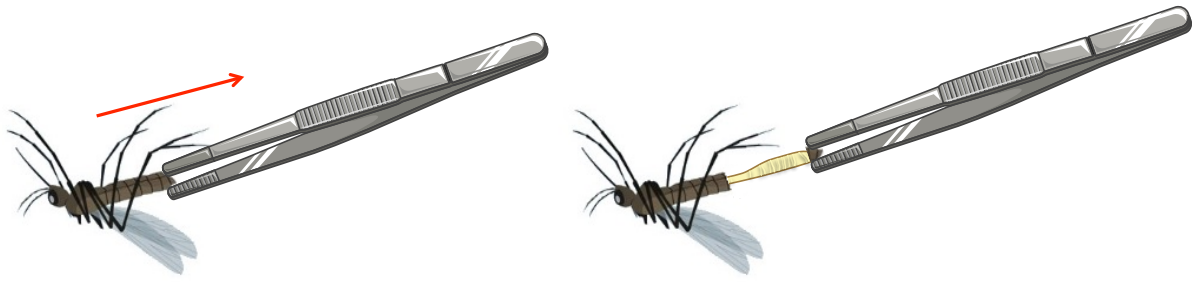
(i) Infection des moustiques

Les anophèles sont obligatoirement infectés par le biais d'une souris impaludée (voir le paragraphe précédent, B. Méthodes 1. a.). La parasitémie de celle-ci doit être comprise entre 2% et 10% (idéalement vers 2-3%). La qualité et la quantité des gamétocytes sont particulièrement importantes et doivent être évaluées lors de l'examen du frottis sanguin en amont. L'absence de gamétocytes, la présence de gamétocytes de petite taille ou contenant de grandes vacuoles irrégulières ne permettent pas d'infecter efficacement les moustiques. La souris choisie est alors anesthésiée, déposée sur la cage contenant les moustiques à infecter et laissée jusqu'à ce que tous les anophèles femelles soient gorgés de sang. La souris est sacrifiée par dislocation des vertèbres cervicales et l'arrêt respiratoire et cardiaque est vérifié. La cage de moustiques est ensuite placée dans un incubateur (Percival) à 21°C jusqu'à dissection des moustiques. Entre temps, entre J+6 et J+8 après le repas sanguin infectieux, un deuxième repas sanguin, appelé « boost » est donné aux moustiques infectés. Il est fait à l'aide d'une souris naïve Swiss dans le but de produire un nombre plus important de parasites (Ramakrishnan *et al.*, 2013).

(ii) Observation des ookystes

Pour vérifier le succès de l'infection des moustiques, les intestins de quelques moustiques sont disséqués 7 jours après le repas sanguin infectieux afin de s'assurer de la présence d'ookystes. Pour ce faire, les moustiques sont endormis au dioxyde de carbone et placés dans une grosse goutte de PBS, dans le couvercle d'une boîte de Pétri. Le moustique est maintenu à l'aide d'une pince, puis, à l'aide d'une deuxième pince, l'intestin est extrait du moustique en saisissant et en tirant la partie terminale de l'abdomen (**Figure 37A**). Les intestins sont observés au microscope à fluorescence pour visualiser les ookystes (AZ100, Nikon, Tokyo, Japon ; **Figure 37B**).

A



B

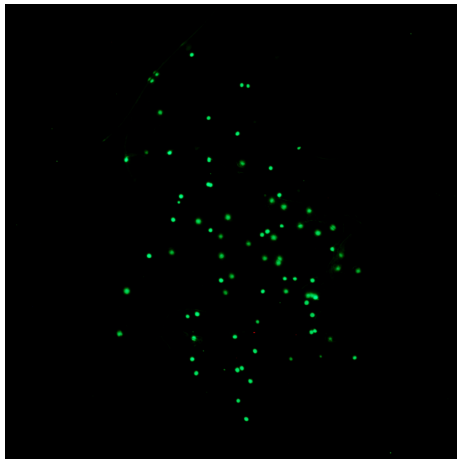


Figure 37 : Méthode de dissection des intestins de moustiques infectés pour la visualisation d'ookystes de *P. berghei*. (A) Le moustique endormi est placé dans une goutte de PBS. Il est maintenu par une première pince (non représentée sur le schéma). A l'aide d'une deuxième pince, l'intestin est isolé en tirant sur l'extrémité de l'abdomen. (B) Les ookystes (souche *Pb* GFP@EF-1 α) sont observés dans l'intestin (placé entre lame et lamelle) au microscope à fluorescence (AZ100, Nikon, Tokyo, Japon). La photo a été prise à l'aide du logiciel NIS Element.

(iii) Récupération des sporozoïtes

Les sporozoïtes sont obtenus après dissection des glandes salivaires des anophèles infectés (**Figure 38**). Pour récupérer le maximum de sporozoïtes dans les glandes salivaires, la dissection est réalisée entre J+18 et J+21 après le repas sanguin infectieux. Tous les moustiques de la cage sont aspirés, endormis au dioxyde de carbone et placés dans un tube Falcon de 50 mL. Le tube est capuchonné et secoué vigoureusement pour assommer les moustiques et permettre l'ouverture du capuchon sans qu'ils ne s'échappent. Les moustiques sont ensuite imbibés d'éthanol 70% pendant 10 à 20 secondes au maximum pour les endormir, puis lavés quatre fois dans du milieu DMEM supplémenté de 2% d'antibiotiques pénicilline-streptomycine et 1% de néomycine (noté DMEM, 2% pen-strep, 1% néo). Ils sont ensuite disposés en deux lignes de 15 moustiques sur des lames de microscopie conservées sur la glace avant dissection. Pour éviter leur dessèchement, les moustiques sont régulièrement imbibés de DMEM, 2% pen-strep, 1% néo en attendant d'être disséqués. La dissection est faite sous loupe binoculaire (Zeiss Stemi™ 2000/C).

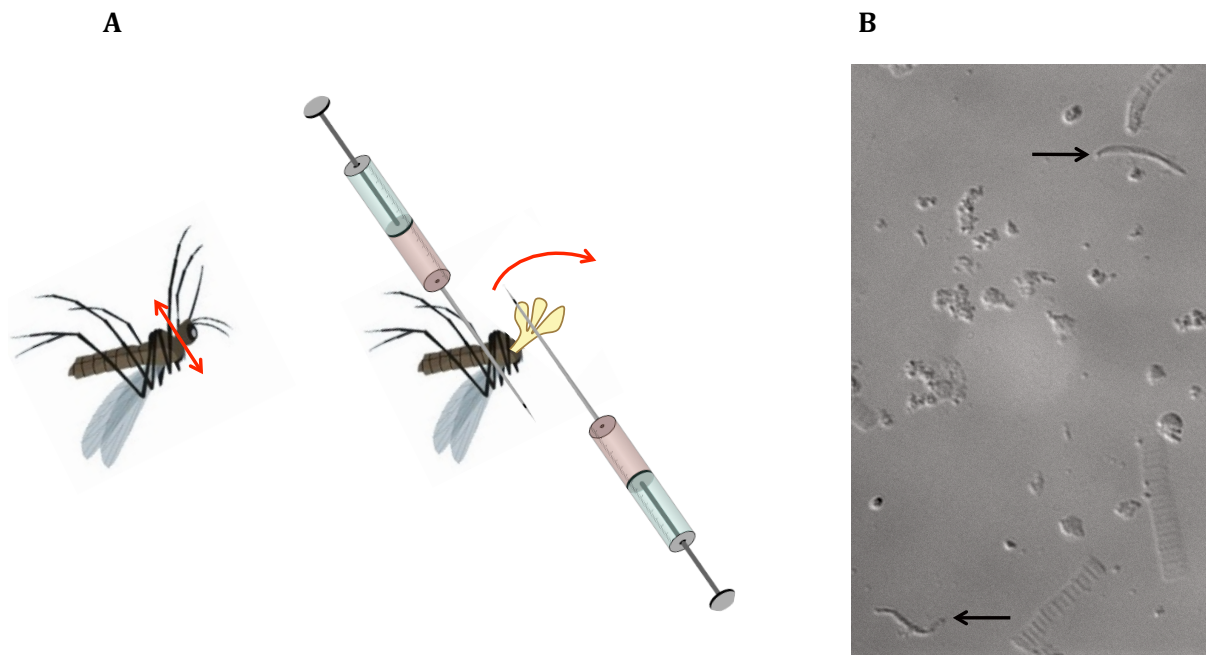


Figure 38 : Méthode de dissection des glandes salivaires et observation de sporozoïtes de *Plasmodium*. (A) La tête du moustique est coupée à l'aide du biseau d'une aiguille. Puis, avec l'aiguille de deux seringues, le thorax est pressé et les glandes sortant sont détachées du corps. (B) Les sporozoïtes sont dilués par 10, puis comptés sur une lame de Kova au microscope inversé (Nikon Diaphot 300) à l'objectif X40. Au minimum, 27 divisions de la lame sont comptées pour déterminer le nombre de sporozoïtes dans l'échantillon. La photo a été prise par N. Mahmoudi-Kaïdi (LSM780, Zeiss, objectif X60).

La tête des moustiques est d'abord coupée à l'aide du biseau d'une aiguille, puis, à l'aide de deux seringues, les glandes salivaires sont extraites du thorax par deux mouvements simultanés : une pression à la base du thorax et d'un mouvement de balayage pour extraire les glandes salivaires. Les glandes sont aspirées à la pipette dans du DMEM, 2% pen-strep, 1% néo, puis placées dans un potter (tube en verre borosilicaté) dans la glace. Elles sont ensuite broyées à l'aide du piston (dont l'embout est en PTFE) par une quinzaine d'allers-retours et l'ensemble est filtré sur un tamis de diamètre 45 μm .

2. Préparation de stocks de parasites

Chaque souche de *Plasmodium* est conservée à -80°C (ou dans l'azote liquide) sous la forme de sang parasité dilué au tiers dans du PBS contenant 30% de glycérol. Pour préparer ces tubes, il faut donc infecter une ou plusieurs souris. Elles peuvent être infectées par l'injection de sporozoïtes, soit par injection de sang infecté (voir B. Méthodes, paragraphe 1. a.). La parasitémie est suivie quotidiennement et, lorsque celle-ci se situe entre 4 et 10%, le sang est prélevé par une ponction cardiaque. Un volume de sang est dilué dans 2 volumes de PBS 30% glycérol stérile. Le sang dilué est homogénéisé et placé en tubes de congélation par aliquotes de 500 μL . Chaque tube doit être rigoureusement annoté avec les informations suivantes : nom

complet de la souche, la date, la parasitémie de la souris ponctionnée, et le passage. Le capuchon est aussi identifié de la souche et du passage. Si la souris ponctionnée a été infectée par des sporozoïtes, il s'agit d'un « P0 », si elle a été infectée par injection de sang « P1 », il s'agit d'un « P2 », etc. La ponction, la dilution et la distribution en cryotubes doit être la plus rapide possible pour limiter le stress cellulaire. Les tubes sont placés sur de la glace en attendant d'être tous remplis, puis sont rapidement placés à -80°C. Un tube stock permet d'injecter 2 à 3 souris en IV à raison de 150 µL/souris.

3. Purification des sporozoïtes

Dans certaines de nos expériences, la purification de sporozoïtes s'est avérée nécessaire afin d'éliminer les cellules du moustiques ou les bactéries contaminantes (notamment pour l'import d'ARNt radioactifs dans les parasites ou lors des tentatives de détermination de protéomes). Nous avons testé trois protocoles différents de purification des sporozoïtes (Moser *et al.*, 1978 ; Kennedy *et al.*, 2012 ; protocole non publié du Dr Nassira Mahmoudi-Kaïdi). Ces trois techniques nous ont donné des résultats non reproductibles, en particulier concernant le taux de sporozoïtes vivants récupérés en fin d'expérience.

a. Purification sur coussin de Percoll

Les sporozoïtes issus de la dissection (dans le DMEM, 2% pen-strep) sont centrifugés 4 min à 12000 rpm à 4°C et la partie supérieure du surnageant est jetée. Ils sont repris dans 600 µL de DMEM, 2% pen-strep. Un premier coussin peu dense constitué de 600 µL de Percoll isotonique (GE Healthcare ; 9 mL de Percoll + 1 mL de PBS 10X) dilué à 40% dans du DMEM, 2% pen-strep est formé précautionneusement en dessous des sporozoïtes. Les tubes sont alors centrifugés 6 min à 15000 rpm à 4°C dans un rotor à angle fixe, sans frein : les sporozoïtes traversent le coussin et s'accumulent dans le culot. Le culot est repris dans 600 µL de DMEM, 2% pen-strep. Un deuxième coussin de 600 µL de Percoll isotonique dilué à 80% dans du DMEM, 2% pen-strep est déposé délicatement en dessous. Les tubes sont centrifugés 6 min à 15000 rpm dans un rotor à angle fixe à 4°C. Les sporozoïtes restent en surface. Les fractions supérieures des tubes sont transférées, diluées avec du DMEM, 2% pen-strep et centrifugées 5 min à 12000 rpm à 4°C, deux fois de suite, pour enlever le Percoll résiduel. Enfin, les sporozoïtes sont quantifiés sur lame de Kova et le taux de purification est évalué. Cette technique est particulièrement traumatisante pour les parasites, à cause d'une part des fortes vitesses de centrifugation, et d'autre part de la présence de Percoll, produit toxique pour le parasite et difficile à éliminer.

b. Purification sur colonne échangeuse d'anions

Le principe de cette technique (Moser *et al.*, 1978) est de purifier les sporozoïtes,

recouverts de charges négatives, sur une colonne DEAE. Avant son utilisation, la résine DEAE est lavée 6 fois dans 10 mL de tampon d'équilibration (72,4 mM Tris-HCl, 13,9 mM Na₂H₂PO₄.H₂O, 85,5 mM NaCl, 99 mM glucose, pH ajusté à 8,2).

Les sporozoïtes issus de la dissection (dans 1 mL de DMEM, 2% pen-strep) sont débarrassés des gros débris par centrifugation 5 min à 60 g. Le surnageant est récupéré, transféré dans un autre tube Eppendorf 2 mL puis centrifugé de nouveau 30 min à 700 g à 4°C. Le culot de sporozoïtes est alors repris dans 1 mL DMEM contenant 17,5% de BSA et les parasites sont incubés 30 min dans la glace, puis 10 minutes à température ambiante. Un volume équivalent (1 mL) de tampon d'équilibration est ajouté, le mélange est homogénéisé et incubé à température ambiante avec 7 mL de résine lavée. Les sporozoïtes sont élués dans un premier temps avec 10 mL de tampon d'éluion « 1 » (74,3 mM Tris-HCl, 13,4 mM Na₂H₂PO₄.H₂O, 184 mM NaCl, 49,9 mM glucose, pH ajusté à 8,2), puis 10 mL de tampon d'éluion « 2 » (idem que le tampon d'éluion « 1 » mais contenant 300 mM NaCl). Les deux éluions sont centrifugées séparément 30 min à 700 g à 4°C. Les sporozoïtes sont repris dans du DMEM, 2% pen-strep, comptés, et leur purification est évaluée. Cette technique a l'avantage d'être moins brutale que la précédente mais la présence de BSA à la surface des parasites est une limite pour leur utilisation dans les expériences d'import ou de protéomique.

c. Technique du coussin d'Accudenz modifiée

Au cours de nos expériences, nous avons remarqué que le taux de récupération des sporozoïtes vivants était étroitement lié aux vitesses de centrifugation qui leur étaient imposées. Ainsi, nous avons choisi de modifier le protocole de Kennedy *et al.*, 2012 en utilisant un seul coussin de densité constitué d'Accudenz 17% (moins toxique que le Percoll : Sbracia *et al.*, 1996 ; Long et Kulkarni, 2004) et en réduisant les vitesses de centrifugation.

Le protocole mis au point est le suivant : 3 mL d'Accudenz 17% sont déposés dans un tube Falcon 15 mL, puis les sporozoïtes contenus dans 600 µL de DMEM-2% pen-strep 1% néo déposés délicatement par dessus. Le tube est centrifugé pendant 30 min à 300 g à température ambiante, dans un godet mobile. L'interphase rose clair est récupérée et diluée dans 2 mL de DMEM-2% pen-strep 1% néo. Le tout est mis à dialyser contre du DMEM-2% pen-strep 1% néo pendant 3 h 30 min à 4°C en agitation douce pour bien retirer l'Accudenz. Les sporozoïtes dialysés sont récupérés et quantifiés. Ils sont ensuite centrifugés une première fois à 150 g pendant 30 min à 4°C. Ce premier culot est conservé. Le surnageant est alors recentrifugé à 300 g pendant 20 min à 4°C et ce deuxième culot regroupé avec le premier. Avec ce protocole, les parasites ne sont que partiellement purifiés, mais restent motiles. Ces préparations ont été utilisées en particulier pour faire des essais de protéomes sur les sporozoïtes.

4. Génération de la souche *Pb* tRip-KO

L'obtention de la souche *Pb* tRip-KO comporte plusieurs étapes : (i) la construction du plasmide contenant le transgène qui servira à intégrer la mutation dans le génome de *P. berghei*, (ii) la préparation des parasites receveurs du plasmide, (iii) la transfection, et (iv) le clonage de la souche mutée. Ces trois dernières étapes ont été faites chez nos collaborateurs, l'équipe du Dr. Robert Ménard à l'Institut Pasteur de Paris, selon la procédure détaillée dans la publication de Ménard et Janse, 1997.

a. Construction du plasmide

La mutation est apportée dans un génome sauvage par double recombinaison homologue. Afin de cibler le locus d'intérêt, deux séquences, l'une en amont et l'autre en aval du gène codant pour tRip (appelées respectivement la séquence « 5' » et la séquence « 3' »), ont été amplifiées à partir d'ADN génomique de *P. berghei* (**Figure 39A, B**). Elles ont ensuite été insérées dans le plasmide comme schématisé dans la **Figure 39C**). Le plasmide utilisé comporte les deux gènes qui remplaceront la séquence codant pour tRip : le gène de la dihydrofolate réductase humaine (hDHFR) et le gène de la protéine fluorescente mCherry. La présence du premier gène confère aux parasites une résistance à la pyriméthamine qui est utilisée comme agent de sélection. La protéine mCherry est le marqueur de fluorescence constitutif qui nous permet (i) de détecter le parasite tRip-KO au microscope à fluorescence, et (ii) de le différencier de la souche sauvage qui exprime la GFP.

L'amplification par PCR des séquences « 5' » et « 3' » est effectuée en utilisant 100 ng d'ADN génomique dans 50 mM Tris-HCl pH=9 ; 15 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100, 50 mM MgCl₂, 1 μM de chacune des amorces, 120 μM de dATP, 120 μM de dTTP, 40 μM de CTP et 40 μM de dGTP (le mélange de dNTP est adapté à la composition riche en A et T du génome de *P. berghei*) et 2 μL de Dynazyme Ext (1 U/μl). La réaction est soumise à 25 cycles de PCR : 1 min à 95°C, 1 min à 55°C, 1 min à 65°C. Les fragments d'ADN sont alors digérés par les enzymes appropriées, purifiés sur gel acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) 6% et insérées dans le plasmide préparés (digestion et déphosphorylation avec l'enzyme FastAP). Après transformation dans des cellules DH5α, la présence de l'insert est vérifiée par PCR sur colonie, par digestion et analyse sur gel d'agarose 1%, et par séquençage complet des inserts. L'ADN plasmidique est extrait (Midiprep Kit, Sigma-Aldrich) et linéarisé par l'enzyme EcoRI pour les besoins de la transfection.

A

```

GTGAGCATCTATATATTTGTTTCACGTATCATATTTTAAAAAATGTAATATATACATATCCTATTTTGCATAAAGGAATATATTTTTTTTCAT
ATTTTTTTAAATAATAATAAAGTAAATATAATAAGTTCTTTACAAGTTAATTAATATATCTCTCAGTTTTGGTAAAAATATAGAGAAAAATA
AATAGTAACTTTTAAAGTTATATTTTGATTATATGTAATCCCAATAAAAAAAATAATTTTTATATACCTATAACACATGTATACGTAATA
AGAAAAAGCAAAAATATTAAGGATATATGACAAAAAATATATCTTAAAAAATATGTAAGTTTTATTTAAATAAAAAACATATATAAGAAGTAAC
TTTAAATATATTTTATGAAAAAATATACCATCATACATAATCTCATAGATTTAGCGAATAAATATGTTATTTTTTTTCGAAACAAAAATATAAAA
TATAACGAAAATGATAAAACAGGAATACTACAATTTTTGTGATAACAAAAAAGTAAATTAAGCATTACACACATATATATAATATTCGA
TATTATATTCCTCCCAACTTTTTAAATAAAAATATATTTGTTGAAAAGATGTTGACTTTAACTTGGTTGAGAATGATATTAATCAGATATAT
TGAAATGGCTCTGATTTTATTAACCTAATATAGTAGAAAAATGATGATAACGTGGTTTTTCCAGAGATAAAAATATGGCCAGTAAAAAAT
TGCACTTATACTTATGCCTTAATTTCTATATTTTAGTGCATTTTGTATGCATATGCTTCACAATCTAATTATGTATAAAAACGTGTAAGTTAT
ATTTTTAAATAAAAAATATAATAATACTAATAATTTATTTTTCTAATGATAGTTGATTTTAAAAATCTACAGTTCTTAATGATGCATATGT
ACATATTTTTTAATTACATAGTTCCAAAAATTTTTTTTTTGTGTTCATATTTAAAAATTTTGGAGAATTTTTAATTTTTTTGTTTTATAGAAAA
TCCTATGAACATAACAAAAAACATAATAAGAGTTTTTTTTGTTCTCTTATGCTATAATCGATACTTATAATGCTACAGTCAGTTTTTTTTGT
GAAAATGAAGACAAAGTAAGCGAGAGTGAAGAATTTATTTTTAACCTAGCTAGCGACAAGTTAAATTAACCTCTAGATAAGAAGCATTG
AATGATATATTAAGAGAAAGATCCTATATGCTCTCGGATAAACATGCATCTTTAGTAGATATATTTTATTTCTGTTGCGTTTATAAAATATTA
AAACCAATGACGGCAAAGGAAAAAGTAGAATATATCATATTTGTAAGTGTATATACATCTCAAGAAACATTGATATGCGATTTTTGTTAAA
TTACACAAACTAGATATACGAAGTGGTGTGAAAGCTTGCATAAATAGTGGAAATCGTAACATGCACAATGAAAAAGCAAGCAATGAGCAAGTG
GGATCAAGAATAGATAAAGCTAATAAAAAAATTCAGATTCAAAAGATAAATAATGAAAAAATAAAAAAGAAAGTAATAATCGAGAAATAAAA
GATGCAGAAGACTCTAGAAGTTTAGATGATATACGAGATTAATATTTGTTGTTGGATATGTAGAAAAGTGTGGAATTCACCTCAGGAGCTGAC
ACATTTGATTTGTTTAAAGTAAATGTAGGTGAAAAATCAATTAAGAGATAATGTCAGTGGCTTACGAAATAAAAAAATCCAGAAGATTTATTA
AATAAATATGTTTTAGTTTTAGCAAATTTAAAGAAAAATCATTAAAGAGGACGAAAAAGTTTTGGTATGATTTTATGTGGATCTTTGAAGAA
AGATAGAAATTACTTACTCCACCCTGGTGTAAAAATGGGGAAGAAATACATTCGAAAAATAGAACACAAATAGTTTTACCTGATAAAAACG
TTAAGCTCTGTTAAAGAGAAAAATGCATCTTTCTTATCAACCAAAATTTAGTTATAAAACAATGGAGTTGCTTTTTATAAAAAATAACAAATGG
TTATCATCGCAAGGCGAAATAACATGTATGATAGAACCGGAACAATATCATAAATTTTACACGTGAAATAGCATGCATATGTATATATATAA
TTAAACCATTTAGATATATTTCTAAATATGTTAGTTGGAAAACGAGGTTATTTAGCTCTGTATAATATCCGACAACTTGCAGAGAAATAGGAG
ATTATTAGGATTATGCATATTTTCACATATACTCATATGCATTTGTAAGAAGAAATAAATTCATTATTTACATGGAAAATGTTTTTTTTTTAT
TTTTTTTTTACGTTTGATAAATTTTTTAAATATATCATGCTTATTGAATAATCATCCATCGCTTTGATAAATGCTATTTATAAGTGTATA
TTTGTATATATATTTTTCCCTTATATGATTAACAACATAAACACAAAAAATACACATTAATTATAAATACTTTTTAATATGTGCCTTAAT
CTGGTACAATTTTATTTAAAAAATAGTAAAATCGCAATCCACAAAGGATACTACTATTTAAAAAATCATGCACAATGGTAGAAGGTGATTTTCC
CAATTTCCCAACGATAAG
  
```

B

```

Amorce n° 985 : ggtaccGTGAGCATCTATATATTTGTTTCACGTATCATATTTTAAAAAATG
Amorce n° 986 : ctcgagTTGGGGGAATATAATATCGAATATTATATATATGCTGTGAAATGC
Amorce n° 987 : agatctGTTAGTTGGAAAACGAGGTTATTTAGCTCTGTATAATATCCGAC
Amorce n° 988 : gaattcCTTATCGTTGGTGAATTTGGGAAAATCACCTTCTACCATTGTGCATG
  
```

C

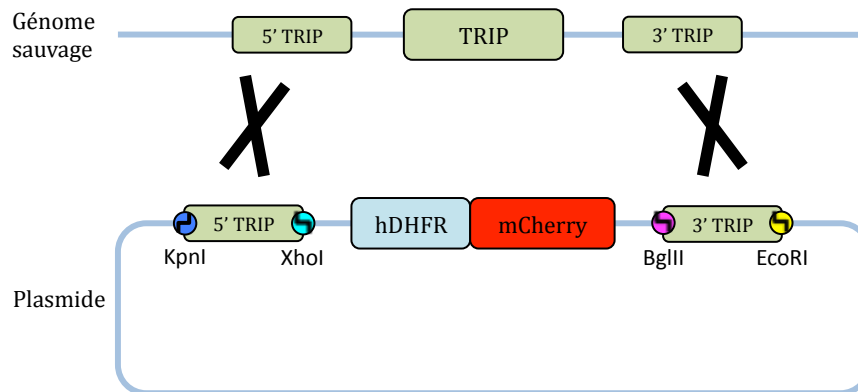
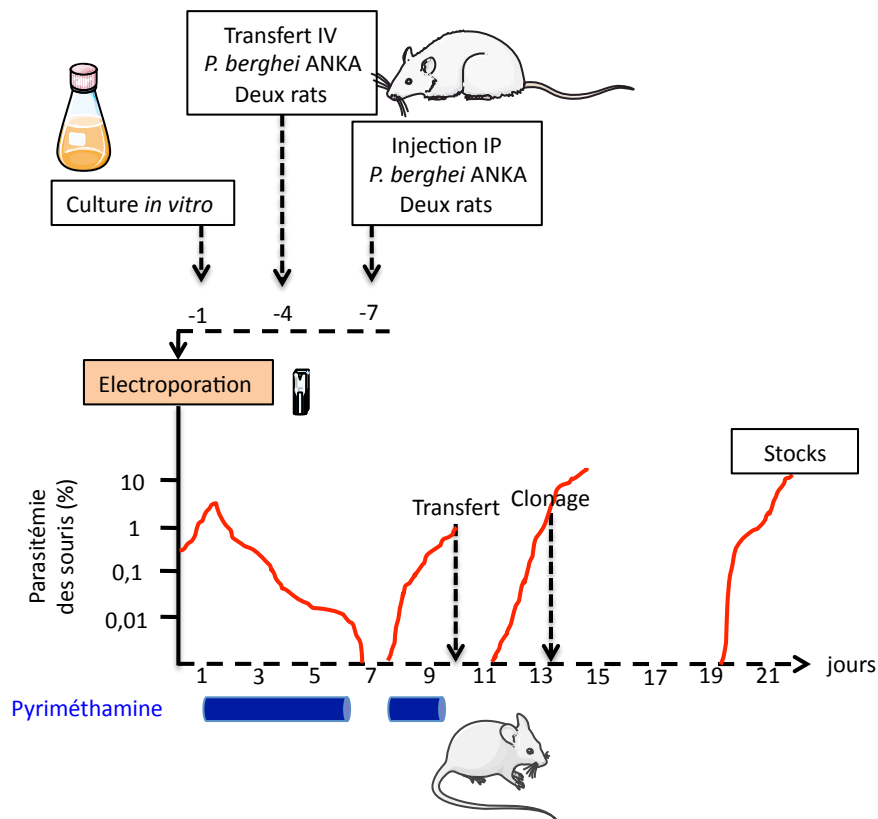


Figure 39 : Construction du plasmide permettant l'obtention de la souche *Pb* tRip-KO. (A) Séquence génomique au locus du gène TRIP. La séquence codante pour tRip est en noir, l'intron est en gris. Les séquences surlignées en bleu foncé et bleu clair sont celles choisies pour la conception des amorces qui permettent d'amplifier la séquence en 5' de TRIP (575 nt). Les séquences surlignées en rose et jaune sont celles choisies pour la conception des amorces qui permettent d'amplifier la séquence en 3' de TRIP (455 nt). (B) Séquences des deux couples d'amorces. Les bases en minuscules correspondent aux sites de restriction utilisés. (C) Schéma de la double recombinaison homologue entre le génome du parasite sauvage et le plasmide transfecté.

b. Préparation des parasites receveurs

L'ensemble des étapes est résumé dans la **Figure 40A**.

A



B

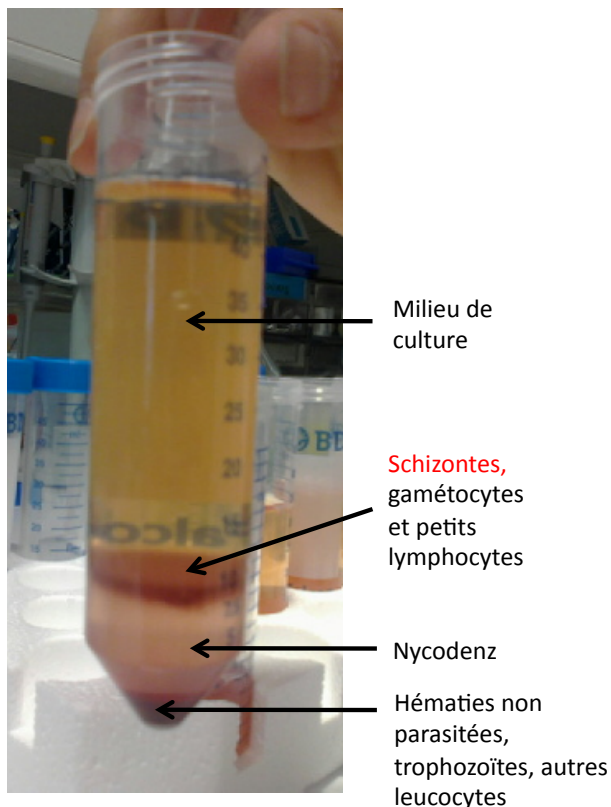


Figure 40 : Schéma du protocole de transfection de *P. berghei*.

(A) Les parasites sauvages receveurs sont préparés par deux cultures successives chez le rat puis une culture *in vitro* du sang ponctionné. Les parasites sont électroporés en présence du plasmide linéarisé puis injectés à un groupe de souris « parentales ». Le sang des souris parentales est transféré à un deuxième groupe de souris « transfert » pour amplifier les parasites, et enfin clonés par injection dans un troisième groupe de souris. La figure est adaptée de la publication de Ménard et Janse, 1997. (B) Aperçu de l'échantillon après centrifugation de la culture *in vitro* sur coussin dense de Nycodenz. Les schizontes à transférer se situent entre le Nycodenz et le milieu de culture.

Deux rats ont été injectés par voie intrapéritonéale avec le parasite *P. berghei* ANKA sauvage. Trois jours plus tard, la parasitémie est mesurée par lecture de frottis sanguin et le sang infecté est transféré à deux nouveaux rats par voie intraveineuse. Trois jours plus tard, la parasitémie des rats est évaluée (elle doit se situer entre 1 et 4% de parasitémie), puis le sang est ponctionné et mis en culture *in vitro* à 37°C pendant 16 h (RPMI1640, 25 mM HEPES). 30 mL de culture sont transférés en tube Falcon 50 mL et un coussin de 10 mL de Nycodenz 55% est délicatement déposé sous la culture. Après avoir centrifugé 20 min à 1450 g sans frein, l'interface entre le milieu de culture et le Nycodenz est prélevée (**Figure 40B**), puis les schizontes sont centrifugés 8 min à 1500 g et repris dans 1 mL de milieu de culture. Ensuite, après une centrifugation de quelques secondes (vitesse maximum d'une centrifugeuse de paillasse), le surnageant est jeté et les schizontes sont repris dans 100 µL de solution Nucleofector™ (Amaxa kit) et 5 µL du plasmide linéarisé (1 µg/µL). Le mélange schizontes/ADN/solution de transfection est placé en cuvette d'électroporation et sont électroporé (Amaxa Gene Pulser, programme U33).

c. Sélection des parasites recombinants

Les parasites transfectés sont rapidement injectés par la voie intraveineuse dans deux souris dites « parentales ». L'eau des biberons des souris est supplémentée en pyriméthamine, contre laquelle, seuls les parasites mutants sont résistants. Quand la parasitémie des souris parentales atteint 1% environ, la culture de parasites mutants est amplifiée par injection de leur sang à de nouvelles souris appelées « transfert ». De la même façon, on laisse l'infection se développer jusqu'à atteindre environ 1% avant l'étape de clonage.

d. Clonage

Le but de cette étape est d'obtenir des clones, c'est à dire des populations de parasites mutants dérivant d'un seul et même parasite initial. A partir d'une souris « transfert », une dilution limitante est préparée, c'est-à-dire qu'elle va permettre d'injecter à de nouvelles souris soit aucun parasite, soit un seul parasite. Trente souris ont été ainsi injectées et ont permis d'obtenir cinq clones de la souche *P. berghei* tRip-KO : V3, V4, V5, V8 et R7. Ultérieurement, il s'est avéré que le clone V8 ne permettait pas d'aboutir à la production de sporozoïtes. Il est possible qu'il possède une autre mutation qui ne le rende pas viable tout au long du cycle.

e. Génotypage

La présence de la mutation dans le génome a été vérifiée avant l'étape de clonage par PCR et Southern Blot, et de nouveau par PCR après le clonage (**Figure 41**, seuls les résultats du Southern Blot et de la PCR après clonage sont montrés).

Pour réaliser le Southern Blot, 4 µg d'ADNg extrait sont digérés par FspI 37°C pendant 16 h. Après précipitation à l'isopropanol, l'ADN est déposé sur un gel d'agarose 1%, la migration s'effectue à 35 V pendant 14 h. L'ADN est transféré sur une membrane de nylon pendant 4 h puis la membrane est lavée 10 min dans SSC 2X à température ambiante puis 10 min dans le tampon de détection (DIG Easy Hyb Kit, Roche) à 42°C. La sonde dénaturée est ajoutée dans le tampon et incubée pendant 16 h à 42°C. La membrane est lavée et bloquée selon le protocole du kit. Finalement, 25 µL d'anticorps anti-DIG (1/12000) sont ajoutés dans la solution de blocage. L'anticorps est incubé 30 min à température ambiante sous agitation douce. La membrane est lavée puis révélée pendant 2 h (**Figure 41A**).

Pour la PCR, environ 300 µL de sang des souris de l'étape de clonage sont prélevés par ponction rétro-orbitale et les globules rouges sont lysés à la saponine 0,1%. Plusieurs lavages dans du PBS sont réalisés à 4000 rpm pendant 10 min pour éliminer l'hémoglobine. L'ADNg est

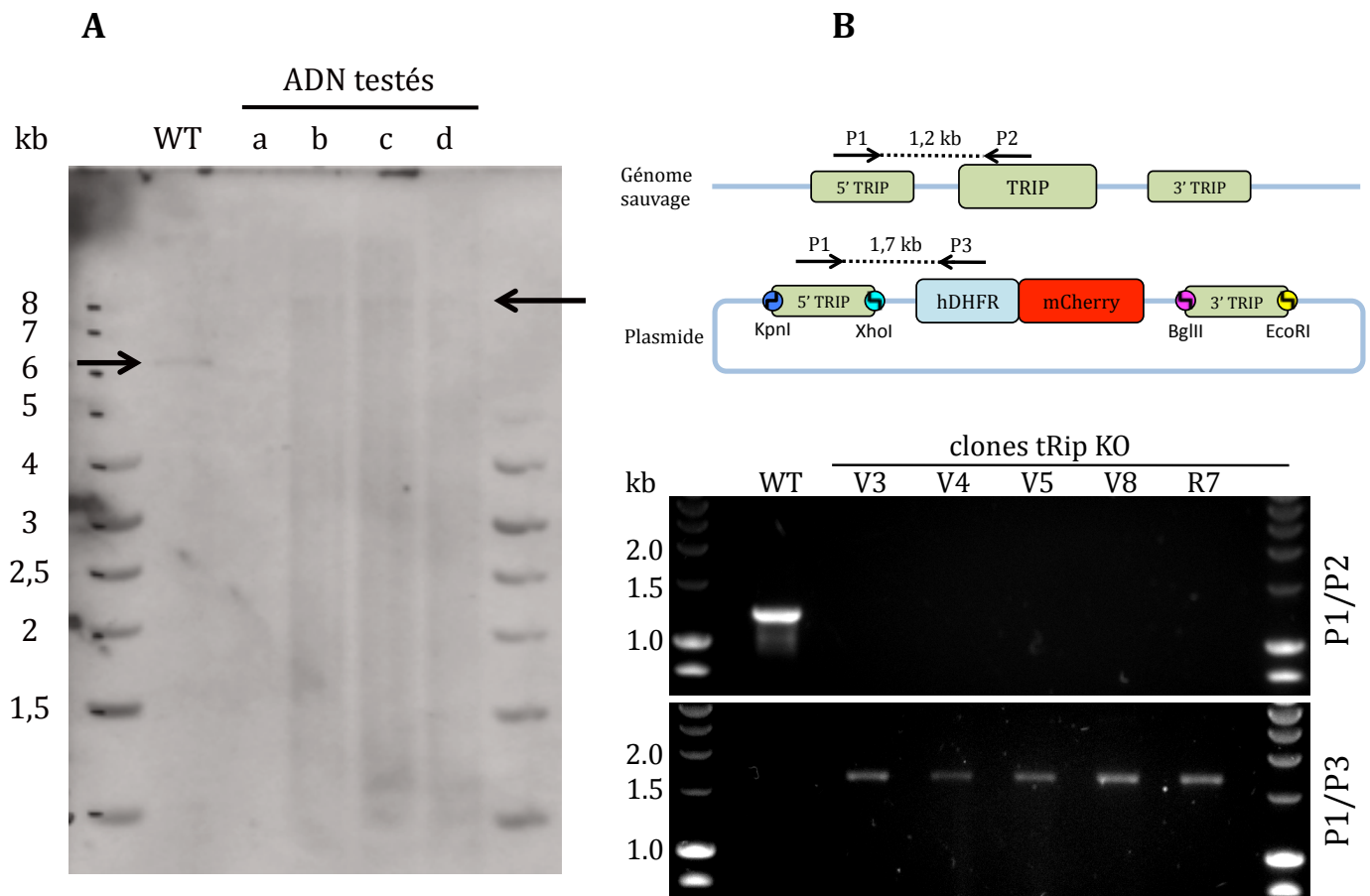


Figure 41: Vérifications de la présence de parasites *Pb* tRip-KO. (A) Analyse par Southern blot. Le locus sauvage (5,9 kb) est détecté dans la piste WT ; le locus mutant (8,8 kb) est détecté dans les pistes b, c, et d des quatre échantillons testés. (B) Analyse par PCR. Deux couples d'amorces ont été utilisés : P1/P2 qui permet l'amplification d'une séquence spécifique au parasite sauvage (1,2 kb), et P1/P3 qui permet l'amplification d'une séquence spécifique aux parasites recombinants (1,7 kb).

extrait (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen), puis élué dans 100 µL d'eau. La concentration en ADN est quantifiée et la PCR est réalisée dans 25 µL de milieu réactionnel, contenant 2,5 µL de tampon Taq polymérase Takara 10X, 2 µL dNTP (2,5 mM de chaque), 0,2 µL de Taq polymérase Takara (5 U/µL), 1 µL de chaque amorce (10 µM). Deux couples d'amorce ont été utilisés (**Figure 41B**) : P1/P2 qui permet d'amplifier le locus sauvage (1,2 kb) et P1/P3 qui permet d'amplifier le locus mutant.

Le sang des cinq souris correspondantes au résultat de la PCR de la **Figure 41B** a été ponctionné pour préparer des stocks à partir desquels j'ai travaillé dans notre laboratoire. Les étapes de clonage et génotypage ont été effectuées par le Dr. Daniel Bargieri (Institut Pasteur, Paris).

5. Phénotypage de la souche *Pb* tRip-KO

Afin de caractériser la souche *Pb* tRip-KO en la comparant avec une souche sauvage, différentes expériences ont été menées *in vitro* et *in vivo*. Une partie de ces expériences figurent dans la publication Kapps *et al.*, 2016 et ont été réalisées avec Sabine Thiberge (Institut Pasteur, Paris). J'ai mené deux expériences au sein de notre laboratoire : l'évaluation du développement de la souche délétée dans le sang chez la souris, ainsi que l'évaluation de la traversée cellulaire des sporozoïtes tRip-KO.

a. Suivi qualitatif du développement du parasite *Pb* tRip-KO in vivo

J'ai entrepris la culture de la souche tRip-KO (V4) pour vérifier la présence et la morphologie normale de chacun des stades. Après injection par voie intraveineuse de plusieurs souris Swiss, j'ai pu observer trois jours plus tard sur frottis sanguins colorés des parasites ne présentant aucune anomalie apparente. Les trophozoïtes, schizontes et gamétocytes observés ressemblaient en tout point à ceux d'une souche sauvage et sont présents dans les proportions habituelles : environ 80-90% de trophozoïtes (formes jeunes en anneaux et trophozoïtes matures), 15-20% de schizontes et jusqu'à 5% de gamétocytes.

L'infection de moustique s'est déroulée normalement. La dissection des intestins d'une quinzaine de moustiques m'a permis de vérifier la présence d'oocinètes et d'ookystes, 24 heures et 7 jours après le repas sanguin infectieux, respectivement (la visualisation des oocinètes se fait de la même façon que celle des ookystes, voir B. Méthodes, paragraphe 1. b. (ii). Elle est plus difficile étant donné que le sang non digéré dans les intestins des moustiques gêne leur observation et qu'ils sont plus petits que les ookystes).

b. Etude comparative du développement de Pb tRip-KO et de la souche sauvage chez la souris

Afin de comparer le développement des deux souches, des expériences de co-infection de souris ont été menées : un même nombre de parasites sauvages et de parasites tRip-KO ont été injectés à des souris C57BL/6, en utilisant soit des sporozoïtes, soit du sang infecté. Les sporozoïtes (5000 de chaque) et les parasites sanguins (0,005% de parasitémie finale chez les souris receveuses) ont été injectés par voie intraveineuse à des souris C57BL/6. La parasitémie a été suivie quotidiennement (par comptage manuel sur frottis sanguin), ainsi que la proportion de chaque parasite (sauvage GFP et KO mCherry) en observant une goutte de sang d'une souris infectée entre lame et lamelle au microscope à fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Mes résultats ont été ultérieurement confirmés par nos collaborateurs qui ont pu procéder à un comptage plus quantitatif au cytomètre en flux.

c. Mesure de la traversée cellulaire par cytométrie en flux

La capacité des sporozoïtes à traverser des hépatocytes avant de former un schizonte hépatique peut être mesurée *in vitro*. Le principe de l'expérience repose sur la diffusion d'un composé fluorescent, le Dextran-FITC, qui pénètre uniquement les cellules traversées grâce à la présence de brèches membranaires créées lors de l'entrée des sporozoïtes. Les brèches se referment rapidement, ce qui piège le Dextran-FITC dans les cellules qui peuvent alors être détectées et comptées par cytométrie en flux. La quantité de cellules fluorescentes corrèle avec la capacité des sporozoïtes à traverser les cellules. Chaque test est réalisé en triplicats et l'expérience répétée trois fois, en utilisant des parasites issus de différentes infections et dissections.

La veille de l'expérience, les cellules Hepa 1-6 sont distribuées en plaques 24 puits. En règle général, ces cellules adhérentes ne nécessitent pas de collagène pour adhérer au plastique, cependant, nous avons observé un meilleur étalement des cellules en présence de collagène. La solution de collagène de type I (BD Biosciences ; 0,04 mg/mL, HCl 0,01 N) est déposée dans chaque puits et laissée 1 h à température ambiante, et les puits sont lavés deux fois avec du PBS. Chaque puits reçoit 80000 Hepa 1-6 dans 500 μ L de DMEM 10% sérum 1% pen-strep. Le nombre de puits préparés prend en compte : les puits sans sporozoïte, avec sporozoïtes sauvages, avec sporozoïtes tRip-KO, ainsi que les contrôles correspondants avec du milieu sans Dextran-FITC. Le dépôt des parasites doit être fait 24 h après la distribution des cellules \pm 4 h, en vérifiant que leur confluence ait atteint environ 80%.

L'expérience doit être faite le même jour que la dissection pour travailler avec des sporozoïtes frais. Lors de la dissection, il faut veiller à recueillir les sporozoïtes dans le plus petit volume possible de DMEM, 2% pen-strep, 1% néo pour pouvoir les diluer et éviter de les

centrifuger.

Chaque condition, testée en triplicat, est préparée de la façon suivante : 480000 sporozoïtes sont dilués dans 1,6 mL de DMsEM, 2% pen-strep, 1% néo, 10% de sérum et 2 mg/mL de Dextran-FITC (2X). 500 µL de ce mélange sont ajoutés aux puits contenant les cellules dans 500 µL de milieu complet. Chaque puits contient donc les cellules dans 1 ml de milieu complet, 150000 sporozoïtes 1 mg/mL Dextran-FITC. Les plaques sont centrifugées 6 min à 300 g pour sédimenter les sporozoïtes et sont incubées 1 h ou 3 h à 37°C 5% CO₂. A la fin de l'incubation, le milieu est doucement aspiré et les cellules sont délicatement lavées avec 1 mL de PBS. Les cellules sont alors décollées précautionneusement par cinq cycles d'aspirations/refoulement dans 1 mL de PBS. Le décollement des cellules est vérifié sous microscope et les échantillons sont transférés dans des tubes Eppendorf 1,5 mL. Les cellules sont lavées trois fois dans 1 mL de PBS par centrifugations de 6 min à 300 g. Le culot cellulaire est repris dans une solution de conservation (PBS, 2% sérum, 1% formaldéhyde) et sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à lecture au cytomètre en flux. Elles peuvent être conservées de la sorte jusqu'à quatre jours. Pour chaque échantillon, l'intensité de fluorescence est mesurée. Les triplicats effectués permettent de calculer les moyennes et les écarts types dans nos expériences.

6. Identification de partenaires protéiques de tRip par spectrométrie de masse

a. Préparation des échantillons

Les billes magnétiques et micro-colonnes utilisées proviennent du kit MultiMaCS™ Protein A/G MicroBeads (Miltenyi Biotec). L'affinité des billes recouvertes de protéine A est excellente pour les anticorps de lapin (notée +++) et très bonne pour les billes recouvertes de protéine G (notée ++). Notre protocole a été établi en combinant les protocoles du kit et ceux des publications de Jones *et al.*, 2006 et de Goel *et al.*, 2003 .

(i) A partir des stades sanguins des souches sauvage et tRip-KO

Le protocole comporte trois étapes : la lyse des érythrocytes pour libérer les parasites, l'extraction des protéines parasitaires et enfin la co-immunoprécipitation.

Nous avons travaillé avec 1 mL de sang d'une souris dont la parasitémie est d'environ 20% ou le sang de deux souris à 10% de parasitémie. Le sang est centrifugé 10 min à 450 g à température ambiante afin de retirer une grande partie des leucocytes en jetant le surnageant. Le sang est de nouveau centrifugé 5 min à 2000 g à température ambiante, le surnageant est jeté alors que le culot contient principalement les globules rouges. Les érythrocytes (parasités ou non) ont été lysés de différentes manières (i) par ajout d'un tampon de lyse contenant (150 mM NH₄Cl, 100 mM KHCO₃ et 10 mM EDTA) pendant 5 min dans la glace, (ii) par ajout de saponine

0,1% final suivi d'une incubation de 5 min sur de la glace, ou (iii) par ajout de streptolysine O (6000 U en présence de 100 mM DTT) pendant 15 min à 37°C. Le temps de lyse doit être rigoureusement respecté pour que les parasites ne soient pas lysés en même temps. Après incubation, les tubes sont centrifugés 8 min à 2000 g. La totalité du surnageant est retiré. Le culot est repris dans 1 mL de PBS et les tubes sont centrifugés 2 min à 95 g. Les débris (en particulier les globules rouges intacts) sont culottés alors que les parasites libres restent dans le surnageant. Cette opération est renouvelée trois à quatre fois, jusqu'à totale élimination des débris cellulaires contaminants.

Les parasites sont ensuite culottés pendant 8 min à 2000 g puis sont repris dans 1 mL de tampon d'extraction froid (50 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM DTT et 1/50 inhibiteur de protéases (cOmplete Tablets EDTA-free, Roche)) et incubés pendant 1 h dans la glace. Les tubes sont passés au vortex de temps en temps (toutes les 10 min environ). Le lysat cellulaire est centrifugé pendant 15 min à 10000 g afin d'éliminer les membranes.

Les protéines du parasite, présentes dans le surnageant, sont incubées avec les billes magnétiques recouvertes de protéine A ou G (50 µL/mL, les deux types de billes ont permis d'obtenir les mêmes résultats) pendant 30 min, sous agitation douce et à 4°C. Cette étape permet d'éliminer les protéines qui se fixent de manière aspécifique aux billes.

Après élimination des billes, l'échantillon (1 ml) est incubé avec l'anticorps anti-tRip (12 µL à 0,5 µg/µL) et 50 µL de billes pendant 1 heure sous agitation douce à 4°C. L'extrait est déposé sur micro-colonne en présence d'un champ magnétique et l'éluat est récupéré. Des lavages successifs sont réalisés (toutes les fractions sont récupérées) : deux lavages de 200 µL avec le tampon sans sel (50 mM Tris-HCl pH=8, 1% NP-40), un lavage de 200 µL avec le tampon intermédiaire en sels (50 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 1% NP-40), un lavage de 200 µL avec le tampon concentré en sels (50 mM Tris-HCl pH=8, 500 mM NaCl, 1% NP-40) et un dernier lavage de 400 µL avec le tampon sans sel (ce qui évite d'avoir trop de sels dans nos échantillons après élution). Les protéines décrochées au cours du dernier lavage (500 mM de NaCl) sont précipitées en présence de 100 µL de TCA 100% pendant 10 min à 4°C et centrifugées 15 min à 12000 rpm. Le culot est lavé deux fois dans 200 µL d'acétone froid, séché 5 min à 95°C et repris dans 20 µL de tampon de charge pour les protéines (50 mM Tris-HCl pH=6,8, 50 mM DTT, 1% SDS, 0,025% bromophénol et 10% glycérol) et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

Enfin, les protéines toujours fixées aux anticorps anti-tRip sont décrochées en deux étapes (avec le tampon chauffé à 95°C) : en déposant 20 µL de tampon d'élution, laissé 5 min, puis en ajoutant 120 µL de tampon d'élution (50 mM Tris-HCl pH=6,8, 50 mM DTT, 1% SDS, 0,025% bromophénol et 10% glycérol).

L'ensemble des échantillons est confié à la plateforme de protéomique de l'IBMC pour analyse.

(ii) A partir de sporozoïtes des souches sauvage et tRip-KO

Etant donné le fort taux d'expression de tRip au stade sporozoïte, nous avons utilisé 4 millions de sporozoïtes purifiés par test (voir la production de sporozoïtes dans B. Méthodes, paragraphe 1. b., et leurs tentatives de purification au paragraphe 3.). La préparation des échantillons et les différentes étapes de co-immunoprécipitations ont été faites dans les mêmes conditions que celles décrites pour le stade sanguin. En revanche, l'étape d'extraction des protéines tient compte des différences de membranes entre le parasite au stade sanguin et les sporozoïtes.

Deux extraits cellulaires distincts ont été préparés à partir de culots de sporozoïtes purifiés et conservés à sec à -20°C. Dans un premier temps, seule la membrane plasmique est détruite pour libérer essentiellement les protéines présentes dans la membrane et dans l'espace intermembranaire. Pour cela, les parasites sont repris délicatement dans 200 µL de tampon d'extraction froid (50 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 10 mM DTT et 1/50 inhibiteur de protéases) et incubés en présence de 1% Triton X-100 pendant 10 min sur glace. Dans ces conditions, seule la membrane plasmique externe est solubilisée. Les sporozoïtes sont alors centrifugés 30 min à 150 g pour séparer le surnageant contenant les protéines de la membrane plasmique et de l'espace intermembranaire du culot contenant les sporozoïtes « nus ».

Dans un deuxième temps, les sporozoïtes sans membrane plasmique sont soumis à une étape supplémentaire de lyse en présence de 200 µL du même tampon d'extraction pendant 50 min sur la glace. Comme ces sporozoïtes n'ont plus membrane plasmique, ils ne contiennent plus tRip et sont donc utilisés comme contrôle négatif dans notre expérience.

Les extraits sont centrifugés 15 min à 15000 g à 4°C et les surnageants sont utilisés comme extraits protéiques dans les expériences de co-immunoprécipitation.

b. Analyse des échantillons

Les protéines éluées ont été précipitées selon le protocole décrit dans la publication Chicher *et al.*, 2015. Brièvement, les protéines sont éluées par l'ajout de méthanol 100% et 0,1 M d'acétate d'ammonium. Après une étape de réduction et d'alkylation en présence de 5 mM DTT et de 10 mM iodoacétamide, respectivement. Les protéines sont ensuite digérées pendant 16 h en présence de trypsine 1/25 p/v dans 50 mM de bicarbonate d'ammonium à température ambiante. Les protéines sont séchées, reprises dans de l'eau 0,1% formaldéhyde puis injectées dans l'appareil de nanoLC-MS/MS (NanoLC-2DPlus system avec un module nanoFlex ChiP (Eksigent, ABSciex, Concord, Ontario, Canada), couplé à un spectromètre de masse TripleTOF 5600 mass (ABSciex)). Les peptides sont élués de la colonne analytique C-18 (75 µm ID x 15 cm ChromXP, Eksigent) avec un gradient de 5% à 40% d'acétonitrile durant 90 min.

Les séquences obtenues ont été recherchées dans UniProt (*Plasmodium berghei* et *Mus musculus*) et identifiées à l'aide de l'algorithme Mascot (version 2.2, Matrix Science, Londres, Royaume-Uni).

7. Protéomique comparative des parasites au stade schizonte sanguin

a. Maturation des parasites

Des souris sont infectées et ponctionnées comme expliqué dans la section B. 1. a.. Le sang (environ 1 mL) d'une souris infectée à plus de 5% de parasitémie est centrifugé pendant 5 min à 600 g. Le surnageant est retiré et le culot globulaire est mis en culture en flasque T75 dans 12 mL de milieu RPMI contenant 10% de sérum sous agitation à 37°C CO₂ 5% pendant 22 h (*Pb* sauvage) ou 44 h (*Pb* tRip-KO, lorsque les milieux sont bruns foncés). Cette culture permet de synchroniser les différents stades de parasites présents dans le sang et de n'obtenir que le stade « schizonte sanguin ».

b. Purification des parasites

Le contenu des flasques est récupéré et filtré sur filtre Plasmodipur (Europroxima) pour éliminer les leucocytes de la souris. Les globules rouges récupérés (infectés ou pas) sont centrifugés pendant 10 min à 450 g repris dans suffisamment de RPMI pour obtenir un volume total de 4 mL. Un coussin constitué de 7,2 mL de Percoll 60% isotonique est délicatement déposé à la pipette Pasteur sous les globules rouges. Le tube est centrifugé 20 min à 1450 g (godets mobiles), ce qui permet de séparer les globules rouges infectés qui se retrouvent à l'interface Percoll/RPMI des globules rouges non infectés qui sont présents au fond du tube (**Figure 42A**). Les globules rouges parasités sont récupérés puis centrifugés pendant 10 min à 450 g et lavés 3 fois dans 1 mL de PBS. Ils sont finalement repris dans 200 µL de PBS et lysés en ajoutant 200 µL de PBS contenant saponine 0,04% (0,02% final). La lyse se déroule pendant 5 min dans la glace. Pour arrêter la lyse, les parasites libres sont culottés pendant 5 min à 2000 g puis lavés dans 500

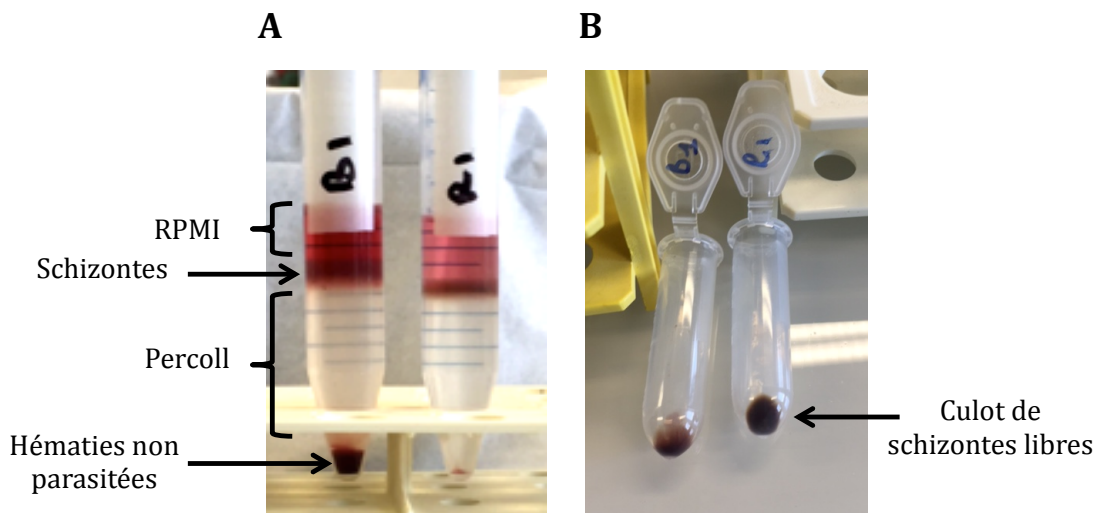


Figure 42: Echantillons au cours de la purification de schizontes de *P. berghei*. (A) Après centrifugation de la culture sur coussin de Percoll, les schizontes se trouvent à l'interface entre le Percoll et le milieu de culture. (B) Aperçu des culots de schizontes obtenus après lyse des érythrocytes.

µL de PBS. Le culot de parasites (**Figure 42B**) est repris dans 50 µL de tampon de charge pour les protéines et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse. Une aliquote est analysée sur gel SDS PAGE 12% afin d'évaluer la qualité d'extraction et la concentration des protéines dans les échantillons. L'expérience a été faite une fois en triplicats.

8. Production de protéines recombinantes

a. tRip de P. falciparum (PftRip)

Notre article Kapps *et al.*, 2016 détaille la production et la purification de tRip à partir d'un gène dont la séquence a été optimisée pour une expression dans *E. coli*. J'ai travaillé pour ma part sur une version harmonisée (en respectant les codon rares et fréquents) de ce gène pour faire les tests de dénaturation des ARNt. Le protocole de purification a été mis au point par le Dr Anne Théobald-Dietrich.

Le gène codant pour la protéine entière a été cloné entre les sites de restrictions BamHI et HindIII du vecteur d'expression pQE-30 (Qiagen) afin de produire une protéine fusionnée à une séquence 6 His en N-terminal. La protéine est exprimée dans des cellules bactériennes Top10.

(i) Culture des cellules surproductrices

Une colonie fraîchement transformée avec le clone 1303 estensemencée dans 50 mL de LB contenant 2% de glucose et 0,1 mg/mL d'ampicilline pendant 16 h à 30°C. Le lendemain, 10 mL de la préculture sont dilués dans 500 mL de LB, 2% glucose 20%, 0,1 mg/mL amplicilline, la culture est incubée à 30°C jusqu'à obtenir une absorbance comprise entre 0,6 et 0,8. Les cellules sont centrifugées et transférées dans 500 mL de LB en présence d'ampicilline et de 0,1 mM IPTG. La culture est poursuivie pendant 18h à 16°C sous agitation.

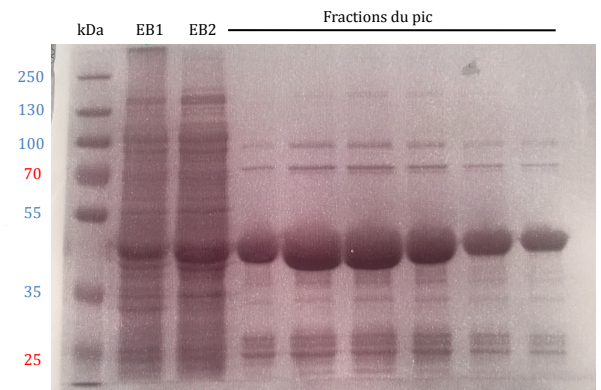
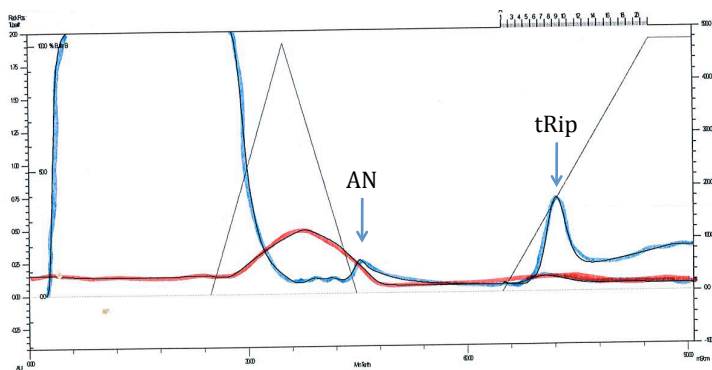
Les cellules sont centrifugées 15 min à 4000 rpm à 4°C, lavées dans 50 mL de PBS et stockées à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

(ii) Purification de PftRip

Un culot de cellules correspondant à 500 mL de culture est repris dans 25 mL de tampon A (50 mM Na₁Na₂ pH=8, 300 mM NaCl, 0,1% DDM, 10% glycérol, 5 mM β-mercaptoéthanol). Les cellules sont lysées par sonication 7 min à 150 V (sonde moyenne), dans de la glace. L'extrait est centrifugé pendant 30 min à 35000 rpm à 4°C. Le surnageant est

recupéré et est chargé sur une colonne Ni-NTA (2 mL) préalablement équilibrée avec le tampon A. La résine est lavée avec 5 mL de tampon A. Un gradient de NaCl (10 mL de 300mM à 2M) suivi du gradient inverse (10 mL de 2M à 300 mM) permet d'éliminer les acides nucléiques qui sont fixés sur tRip. La résine est lavée avec 20 mL de tampon B (50 mM HEPES-NaOH pH=8, 0,005% DDM, 10% glycérol, 5 mM β -mercaptoéthanol) pour éliminer les traces de sels. tRip est alors

A



B

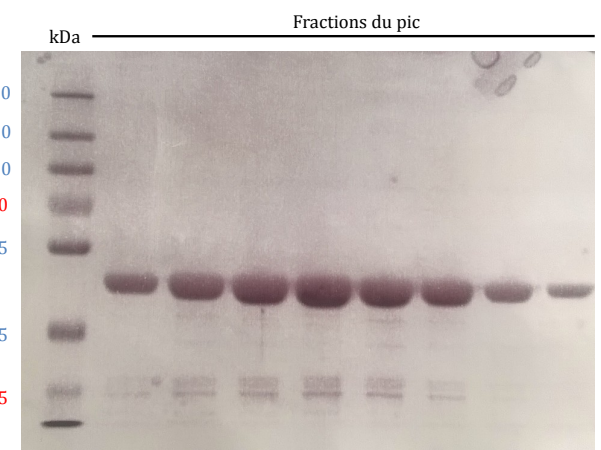
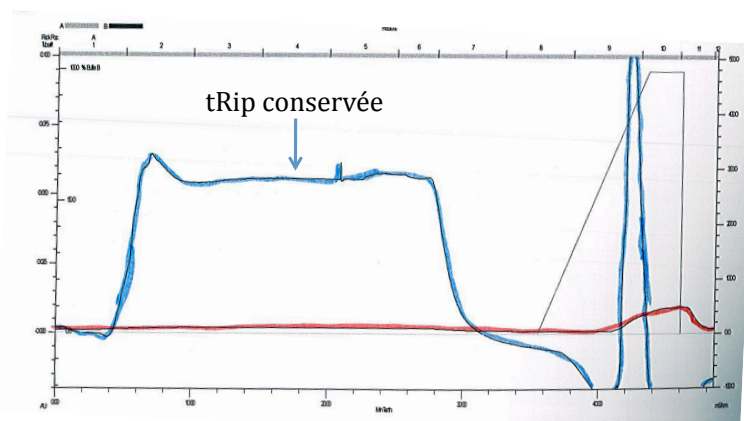


Figure 43: Purification de la protéine tRip. (A) Première étape de purification sur colonne Ni-NTA : chromatogramme et gel. AN : acides nucléiques (B) Deuxième étape de purification sur colonne UnoQ : chromatogramme et gel. On distingue deux populations de tRip. La première correspond à la forme de la protéine capable de lier les ARNt, c'est celle qui est conservée. Pendant l'éluion, une deuxième forme de tRip est décrochée : elle n'est pas capable de lier les ARNt. Elle n'est pas utilisée. Le gel montre la protéine conservée. L'absorbance et la conductivité sont données par la courbe bleue et la courbe rouge respectivement. AN : acides nucléiques.

éluée avec un gradient d'imidazole (20 mL de 0 à 250 mM). Une aliquote des fractions de l'éluion est analysée sur gel. Celles présentant un minimum de contaminations sont rassemblées pour être chargées sur une colonne UnoQ (1 mL, BioRad). La chromatographie se fait dans le même tampon B que précédemment. L'échantillon est chargé, la colonne lavée avec 10 mL de tampon B et la protéine retenue sur la résine est éluée grâce à un gradient en sels (10 mL de 0 à 500 mM de NaCl dans le tampon B). Au cours de cette deuxième étape, deux lots de

tRip sont obtenus : le premier ne se lie pas à la résine échangeuse d'anions, mais lie les ARNt *in vitro*, alors que le deuxième lot qui est retenu sur la résine n'a pas la capacité de lier les ARNt. En conséquence, les fractions correspondant uniquement à la charge de la colonne sont regroupées et conservées. La protéine est alors concentrée et dialysée durant 16 h contre 500 mL le tampon : 50 mM Na₁Na₂ pH=8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM β-mercaptoéthanol, 0,005% DDM et 50% glycérol. Cette étape permet d'éliminer les dernière traces d'imidazole et de transférer la protéine dans un tampon qui permet de la conserver à -80°C. Les chromatogrammes et gels correspondant à chaque étape de purification sont indiqués dans la **Figure 43**.

b. Glutamyl-ARNt synthétase de P. berghei (PbGluRS)

(i) Clonage

Le gène synthétique codant pour la GluRS de *P. berghei* a été commandé chez GenScript. La séquence a été optimisée pour une traduction efficace dans les cellules humaines. Le gène a été inséré dans le plasmide d'expression pCDNA 3.1 entre les sites de restriction BamHI et EcoRI. Ce plasmide a été modifié, il possède une séquence Shine & Delgarno situé entre le promoteur de transcription T7 et l'ATG initiateur de la protéine et une séquence codant pour un 6-His localisée à l'extrémité 3' du gène d'intérêt. Ainsi grâce à ce plasmide modifié, nous pouvons exprimer de la GluRS dans les cellules de mammifère en culture mais également dans des bactéries. Dans le cas présent, j'ai utilisé les bactéries *E. coli* BL21.

(ii) Purification

Les cellules surproductrices ont été cultivées dans les mêmes conditions que précédemment (voir B. Méthodes, paragraphe 8. a.(i)). Un culot de cellules correspondant à 500 mL de culture est repris dans 25 mL de tampon A (50 mM Na₁Na₂ pH=8, 300 mM NaCl, 0,1% DDM, 10% glycérol, 5 mM β-mercaptoéthanol). Les cellules sont lysées par sonication pendant 7 min à 150 V (sonde moyenne), dans de la glace. L'extrait est centrifugé pendant 45 min à 35000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré et est chargé sur une colonne Ni-NTA 2 mL préalablement équilibrée avec le tampon A. La résine est lavée avec 20 mL de tampon A et la GluRS est éluée avec un gradient d'imidazole (20 mL de 0 à 250 mM) (**Figure 44A**). Une aliquote des fractions de l'éluion est analysée sur gel (**Figure 44B**). Celles présentant un minimum de contaminations sont rassemblées pour être dialysées contre le tampon : 50 mM Na₁Na₂ pH=8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM β-mercaptoéthanol, 0,005% DDM et 50% glycérol. La protéine obtenue est tronquée. Nous avons vérifié par spectrométrie de masse qu'il s'agissait bien d'une forme clivée de la *PbGluRS*, que nous avons utilisée. Elle peut être conservée à -20°C.

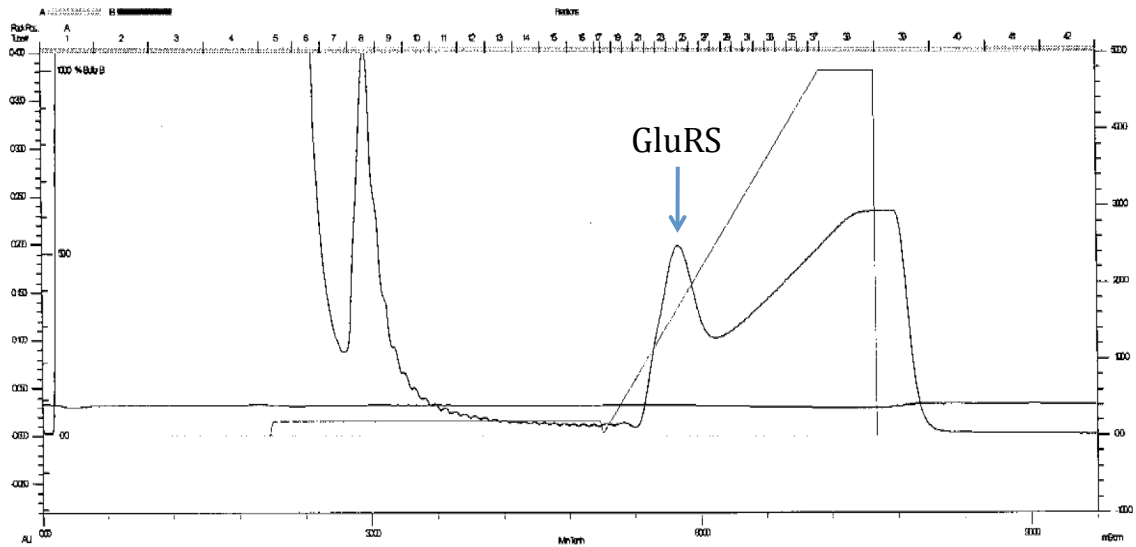
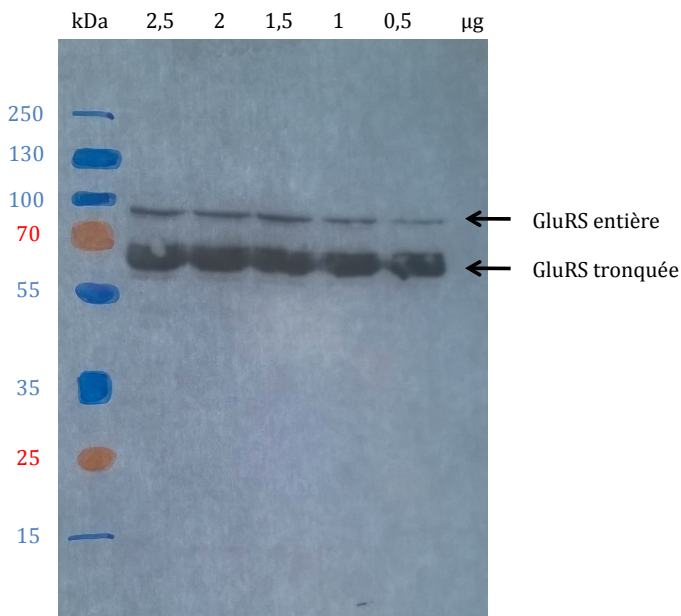
A**B**

Figure 44: Purification de la protéine *PbGluRS* sur colonne Ni-NTA. (A) Chromatogramme montrant le pic de la protéine d'intérêt en début de gradient d'éluion. **(B)** Western Blot révélant deux formes de la GluRS purifiée par l'utilisation d'un anticorps primaire anti-6His (tag en C-terminal de la protéine). La forme majoritaire est tronquée (environ 65 kDa au lieu de 94 kDa).

9. Préparations d'ARN

a. Extraction d'ARN total

(i) ARN de bactéries ou de cellules de mammifères

Les cellules sont resuspendues dans du TriReagent (Sigma-Aldrich) délicatement (6 mL pour 80 millions d'Hepa 1-6, ou 6 mL pour le culot d'une culture de 100 mL d'*E. coli*).

L'extraction de l'ARN total est effectuée selon les indications du fabricant. La concentration en ARN est évaluée par lecture de l'absorbance à 260 nm. Les quantités de cellules indiquées précédemment permettent d'obtenir environ 2 mg d'ARN total.

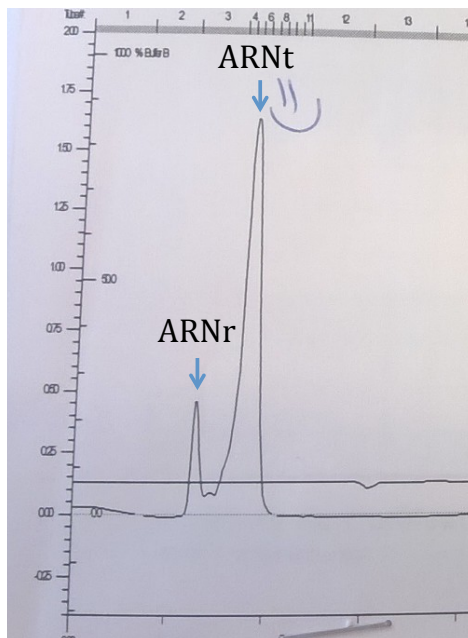
(ii) A partir de foie de souris

La souris est anesthésiée, disséquée et le foie est prélevé. Il est découpé en plusieurs échantillons dont les masses varient de 150 à 450 mg qui sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Un morceau de foie est placé dans un tube contenant des billes de broyage (Fast RNA Green Kit MP). Sous la hotte, 1 mL de TriReagent est ajouté dans le tube pour 100 mg de tissu. Le tissu est broyé pendant 40 secondes, setting 6 (Appareil MP FastPrep-24, MP Biomedicals). Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 12000 g à 4°C. 1 mL de surnageant contenant l'ARN est transféré dans un tube propre et est purifié selon le protocole établi par le fournisseur du TriReagent (Sigma-Aldrich). La détermination de la concentration est faite par mesure de l'absorbance à 260 nm. 160 mg de foie permet d'extraire environ 1 mg d'ARN total.

b. Purification d'ARNt total à partir d'ARN total

Les ARNt sont séparés des autres ARN cellulaires (ARN ribosomiques et ARNm) par HPLC sur colonne Superdex 75 (GE Healthcare) (**Figure 45**).

A



B

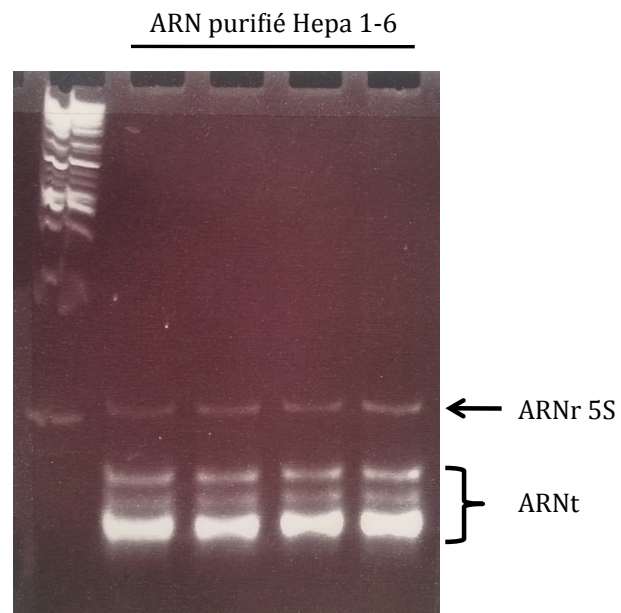


Figure 45 : Purification d'ARNt à partir d'ARN total. (A) Chromatogramme de purification selon la taille des ARN, sur Superdex 75. (B) Gel d'acrylamide 12% urée 8M montrant ce qui a été purifié. On distingue différentes tailles d'ARNt, selon la longueur de leur domaine variable, ainsi que l'ARNr 5S.

Le tampon utilisé est 50 mM HEPES-KOH, 150 mM KCl. Les différentes fractions sont analysées sur gel, celles contenant des ARNt sont regroupées, mises à précipiter à l'éthanol en présence d'acétate de sodium et l'ARNt est quantifié par absorbance. 1 mg d'ARN total de foie permet de purifier environ 90 µg d'ARNt ; 1,8 mg de cellules Hepa 1-6 permet de purifier environ 100 µg d'ARNt ; 1,8 mg d'ARN total d'*E. coli* permet de purifier environ 1 mg d'ARNt.

c. Marquage radioactif d'ARNt en 3'

Les ARNt sont marqués en deux étapes : d'abord, le CCA est enlevé, puis reconstitué en présence de CTP froid, d'ATP radioactif P³² et de CCase d'*E.coli*. Dans un volume de 25 µL, 100 pmoles d'ARNt sont incubées dans 250 mM de Tris-HCl pH=8, 10 mM de MgCl₂ et 2 µg de VDE. Le tube est incubé 10 min à 20°C et la réaction est arrêtée par une extraction phénolique suivie d'une précipitation à l'éthanol. Le culot d'ARNt est repris dans 40 µL de milieu réactionnel contenant 45 mM de Tris-HCl pH=8, 10 mM de MgCl₂, 50 µM de CTP, 5 µCi d'[α³²P]-ATP et 1 µL de CCase d'*E. coli* à 3,3 mg/mL. La réaction se fait durant 30 min à 37°C. L'ARNt marqué est purifié sur colonne NAP5 et est précipité à l'éthanol en présence d'1 µL de glycogène (1 µg/µL).

d. Génération de transcrits d'ARNt^{Glu}

Quatre transcrits correspondants aux deux ARNt isoaccepteurs glutamate de *P. berghei* et de souris : ARNt^{Glu} (TTC) et ARNt^{Glu} (CTC) ont été synthétisés. Parce que les séquences 5' des ARNt ne sont pas favorables à la transcription *in vitro* par la T7 ARN polymérase, nous avons choisi d'utiliser la méthode du transzyme pour générer ces molécules selon le protocole de la publication Fechter *et al.*, 1998.

Vingt-trois oligonucléotides ont été synthétisés pour permettre la reconstitution des gènes d'ARNt par cassettes (**Figure 46**). Les gènes ont été insérés dans le plasmide pUC119 entre les sites HindIII et BamHI. Un site BstNI ou NsiI a été introduit à l'extrémité 3' du gène afin de produire une extrémité CCA après digestion.

10. Gel retard

tRip a été testée pour sa capacité à lier les ARNt selon le même protocole que celui utilisé dans l'article Kapps *et al.*, 2016. Brièvement, les ARNt radiomarqués (voir B. Méthodes, paragraphe 9. c.) à 1000 cpm/µL sont incubés 20 min dans la glace dans un tampon 25 mM HEPES-KOH pH=7,5, 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycérol, ainsi que 20 ng/µL oligo-dT et une concentration croissante de protéine PftRip (de 0 à 2 µM). A la fin de l'incubation, les différents échantillons sont mis à migrer sur un gel natif (200X200X1,5 mm³) 6% d'acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) dans du TBE pendant 2 h 30 min à 140 V. Le gel est alors séché et exposé contre un film autoradiographique.

Transcrit A : TTC *P. berghei*

HindIII **GlutZ-1** **GlutZ-2** **GlutZ-3** **GlutZ-4** *BstNI*
AGCTT AATAAGACTTCACCTATAAGGAGAGGGA *GTGATGAGTTCGGTGGAGAGAAAGGGTACCCGGTACCGT* TCCACCGTAGTCTAGACGGTTAGGATATTCGGCT *TTC* ACCCAACGACCCGGTTGAGTCCGGCGTGGAA *CCG*
CCGGCGTGGAA *CCAG* *ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTCCCTGACTACTCAGGCACTCCCTGCTTTGGCCATGGCCCATGGCAAGGGGTGCATCA* GATCTGCCAATCCCTATAAAGCCGAAAGTGGCTTGCTGGCC *CAA* GCTCAG
GGCCCGACCC *TGGTCTAG* **GlutZ-5** **GlutZ-6** **GlutZ-7** **GlutZ-8** *BamHI*

Transcrit B : TTC *M. musculus*

HindIII **GlutZ-1** **GlutZ-2** **GlutZ-9** **GlutZ-10** *NsiI*
AGCTT AATAAGACTTCACCTATAAGGAGAGGGA *GTGATGAGTTCGGTGGAGAGAAAGGGTACCCGGTACCGT* TCCACATGGTCTAGCCGGTTAGGATTCCTGGT *TTC* ACCCAGCCGGCCCGGGTTGACTCC
CGGTGGGAACCATGCAT *G* *CGTGTGGGAAACCATGCAT* *G* *GTGATGAGTTCGGTGGAGAGAAAGGGTACCCGGTACCGT* TCCACATGGTCTAGCCGGTTAGGATTCCTGGT *TTC* ACCCAGCCGGCCCGGGTTGACTCC
GCCACACCCCTGGTACGTA *CTAG* **GlutZ-5** **GlutZ-11** **GlutZ-12** **GlutZ-13** *BamHI*

Transcrit C : CTC *P. berghei*

HindIII **GlutZ-1** **GlutZ-2** **GlutZ-14** **GlutZ-15** *BstNI*
AGCTT AATAAGACTTCACCTATAAGGAGAGGGA *GTGATGAGTTCGGTGGAGAGAAAGGGTACCCGGTACCGT* TCCACCGTAGTCTAGTGGCTTAGGATATTCGGCT *CTC* ACCCGAAAGCCCGGGTTCAATTCC
CGGCGTGGAA *CCAG* *ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTCCCTGACTACTCAGGCACTCCCTGCTTTGGCCATGGCCCATGGCAAGGGGTGCACCA* GATCACCGA TCCCTATAAGCCGAGAGTGGGCTTCCGGGCC *CAA* GCTTAAG
GCCACACCCCTGGTACGTA *CTAG* **GlutZ-5** **GlutZ-16** **GlutZ-17** **GlutZ-18** *BamHI*

Transcrit D : CTC *M. musculus*

HindIII **GlutZ-1** **GlutZ-2** **GlutZ-19** **GlutZ-20** *NsiI*
AGCTT AATAAGACTTCACCTATAAGGAGAGGGA *GTGATGAGTTCGGTGGAGAGAAAGGGTACCCGGTACCGT* TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGGCC *TCTC* ACCGCCCGGGCCGGGTTGATTC
CGGTCAAGGAA *CCATGCAT* *G* *ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTCCCTGACTACTCAGGCACTCCCTGCTTTGGCCATGGCCCATGGCAAGGGGTGCACCA* GATCACCAA TCCCTAAAGCCGAGAGTGGCCGGCCCGGCC *CAA* GCTTAAG
GCCAGTCCCTGGTACGTA *CTAG* **GlutZ-5** **GlutZ-21** **GlutZ-22** **GlutZ-23** *BamHI*

Figure 46 : Construction des gènes à partir desquels sont synthétisés les différents ARN^{cm} de *P. berghei* et *M. musculus*. Les sites de restrictions sont indiqués en italique. Les surlignages vert et jaune correspondent à la séquence apportant le site de coupure du transzyme et l'anticodon, respectivement.

11. Tests d'aminocyclation de *PbGluRS*

La capacité d'aminocyclation de la *PbGluRS* (voir B. Méthodes, paragraphe 8. b.) a été testée (i) avec les transcrits d'ARNt^{Glu} synthétisés *in vitro* (voir B. Méthodes, paragraphe 9. d.) et (ii) avec de l'ARN total de *P. berghei*, de foie de souris, de cellules Cos7, de l'ARNt total de foie de souris, de cellules Hepa 1-6, de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* (voir B. Méthodes, paragraphe 9), en respectant la même concentration finale en ARNt dans les tests. La réaction se fait dans 50 µL contenant : l'ARN, 5 µL de L-Glu C¹⁴ (253 mCi/mmol), 0,5 µM *PbGluRS* et 10 µL de tampon *PbGluRS* 5X (2 50 mM HEPES-KOH pH=7,4, 75 mM MgCl₂, 50 mM ATP et 150 mM KCl). Le mélange est pré-incubé 2 min à 37°C et la réaction est initiée par l'ajout d'enzyme *PbGluRS* à 0,5 µM finale. Aux temps 5, 10 et 15 min, des prélèvements de 15 µL sont effectués, déposés sur papier 3MM et l'ARN est précipité dans du TCA 5% froid. Après trois lavages au TCA 5%, les étiquettes sont lavées à l'éthanol, séchées puis comptées. Les cpm obtenus permettent de calculer le taux d'ARNt^{Glu} chargé.

12. Test de structure des ARNt liés à *PftRip*

Les deux protocoles décrits ci-après ont été réalisés dans le but de tester si l'interaction entre ARNt et tRip modifie la conformation tridimensionnelle des ARNt. Les deux approches consistent en deux étapes : les ARNt sont incubés avec tRip, récupérés et analysés soit par gel retard (première approche), soit par cartographie en solution (deuxième approche).

a. Incubation préalable

L'ARNt^{Phe} de levure radiomarqué (200000 cpm par tube) est incubé (i) seul, en présence (ii) BSA 2 µM, (iii) de tRip 250 nM et (iv) de tRip 2µM dans un volume final de 180 µL en présence de tampon (50 mM HEPES pH=7,5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20% glycérol). Les tubes sont incubés 20 min dans la glace, puis les ARNt sont isolés par extraction phénolique. Les ARNt sont concentrés en deux étapes : par l'utilisation de microcons 10K jusqu'à arriver à un volume d'environ 100 µL, puis précipités à l'éthanol et repris dans 11 µL d'eau. La radioactivité est dosée pour 1 µL d'ARNt de chaque échantillon.

b. Gel retard

Identique à la section 10.

c. Cartographie en solution

(i) Clivages enzymatiques

La structure de l'ARN peut être caractérisée au moyen de sondes enzymatiques, des endoribonucléases (RNases) qui reconnaissent spécifiquement les régions simples brins ou les

régions appariées et structurées J'ai utilisé la RNase T1 qui clive les régions simples brins.

Les ARNt (ARNt^{Asp} de levure) sont dans un premier temps dénaturés par chauffage à 85°C pendant 2 min puis renaturés par une incubation de 10 min à température ambiante. Le milieu réactionnel de 20 µL contenant du tampon (50 mM HEPES-NaOH pH=7,5, 10 mM MgCl₂ et 25 mM KCl), 70000 cpm d'ARNt marqué et 1 µM d'ARNt non marqué est incubé 5 min à 25°C. La sonde enzymatique est ajoutée (16 mU de nucléase T1, et 1 mM de ZnCl₂) et le milieu est incubé 10 min à 25°C. La réaction est arrêtée par addition d'un volume de stop mix (0,6 M AcONa pH=5, 3 mM EDTA, 0,1 mg/mL d'ARNt total d'*E.coli*). La réaction est arrêtée par extraction phénolique.

Afin de visualiser d'éventuelles coupures spontanées de l'ARNt au cours des manipulations, des contrôles sont également effectués sans sonde enzymatique.

L'échelle alcaline est réalisée dans 10 µL de milieu réactionnel contenant 35 mM de NaHCO₃ pH=9, 70000 cpm d'ARNt marqué, 1 µM d'ARNt non marqué pendant 4 min à 80°C puis plongé dans la glace.

L'échelle de guanosine est effectuée dans 10 µL de milieu contenant 10 mM Na₃C₆H₅O₇ pH=4,5, 3,2 M d'urée, 0,4 mM d'EDTA, 70000 cpm d'ARNt marqué, 1 µM d'ARNt non marqué. Le milieu est incubé 5 min à 60°C puis additionné de 2 U de ribonucléase T1 et incubé 4 min à 60°C. La réaction est arrêtée dans la glace.

Pour l'ensemble de ces réactions, les produits de clivages sont additionnés de 0,2 volume de glycogène (1 µg/µL) et précipités à l'éthanol avant d'être repris dans 10 µL de solution de dépôt (80% formamide, 10 mM EDTA pH=8, 0,025% bromophénol, 0,025% xylène cyanol).

La séparation des produits de clivage se fait sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. La migration des fragments en présence d'urée et à haute température permet un dépliage des molécules d'ARN et donc une séparation selon leur taille sur gel de polyacrylamide. La migration est réalisée sur un gel 12% (19/1, Rotiphorese Gel 40) en présence d'urée 8 M à 1600 V, 55 mA et 50 W jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 10 cm du bas de la plaque. Le gel est ensuite démoulé et révélé par autoradiographie.

(ii) Clivage au plomb

La réaction de clivage au plomb est réalisée dans un volume final de 10 µL contenant : l'ARNt^{Asp} radioactif (20000 cpm), 2 µM d'ARNt^{Phe} froid, 2 µL de tampon plomb 5X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 50 % de glycérol) et 0, 0,5 ou 1 µL de plomb (100 mM). Les tubes sont incubés 10 min à 25°C. La réaction est arrêtée avec 16 µL de « stop mix » (5 µL d'EDTA 0,1 M, 1 µL de glycogène et 10 µL de « stop mix A » contenant 0,6 M AcNa pH=5, 3 mM EDTA, 0,1 µg/µL ARNt total *E. coli*). En parallèle, une hydrolyse en condition dénaturante à la ribonucléase T1 est effectuée sur l'ARNt afin d'assigner les bandes, ainsi qu'un hydrolyse alcaline pour obtenir une échelle.

REFERENCES

A

- Adhya, S. (2008). "*Leishmania* mitochondrial tRNA importers." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(12): 2681-2685.
- Adhya, S., T. Ghosh, A. Das, S. K. Bera and S. Mahapatra (1997). "Role of an RNA-binding protein in import of tRNA into *Leishmania* mitochondria." *J Biol Chem* **272**(34): 21396-21402.
- AhYoung, A. P., A. Koehl, D. Cascio and P. F. Egea (2015). "Structural mapping of the ClpB ATPases of *Plasmodium falciparum*: Targeting protein folding and secretion for antimalarial drug design." *Protein Sci* **24**(9): 1508-1520.
- Alexandrov, A., I. Chernyakov, W. Gu, S. L. Hiley, T. R. Hughes, E. J. Grayhack and E. M. Phizicky (2006). "Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications." *Mol Cell* **21**(1): 87-96.
- Alkatib, S., T. T. Fleischmann, L. B. Scharff and R. Bock (2012). "Evolutionary constraints on the plastid tRNA set decoding methionine and isoleucine." *Nucleic Acids Res* **40**(14): 6713-6724.
- Aly, A. S., A. M. Vaughan and S. H. Kappe (2009). "Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host." *Annu Rev Microbiol* **63**: 195-221.
- Amino, R., D. Giovannini, S. Thiberge, P. Gueirard, B. Boisson, J. F. Dubremetz, M. C. Prévost, T. Ishino, M. Yuda and R. Ménard (2008). "Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver." *Cell Host Microbe* **3**(2): 88-96.
- Amino, R., S. Thiberge, S. Blazquez, P. Baldacci, O. Renaud, S. Shorte and R. Ménard (2007). "Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host." *Nat Protoc* **2**(7): 1705-1712.
- Antony, H. A. and S. C. Parija (2016). "Antimalarial drug resistance: An overview." *Trop Parasitol* **6**(1): 30-41.
- Arisue, N., T. Hashimoto, H. Mitsui, N. M. Palacpac, A. Kaneko, S. Kawai, M. Hasegawa, K. Tanabe and T. Horii (2012). "The *Plasmodium* apicoplast genome: conserved structure and close relationship of *P. ovale* to rodent malaria parasites." *Mol Biol Evol* **29**(9): 2095-2099.
- Augagneur, Y., L. Jaubert, M. Schiavoni, N. Pachikara, A. Garg, S. Usmani-Brown, D. Wesolowski, S. Zeller, A. Ghosal, E. Cornillot, H. M. Said, P. Kumar, S. Altman and C. Ben Mamoun (2013). "Identification and functional analysis of the primary pantothenate transporter, PfPAT, of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *J Biol Chem* **288**(28): 20558-20567.
- Auxilien, S., P. F. Crain, R. W. Trewyn and H. Grosjean (1996). "Mechanism, specificity and general properties of the yeast enzyme catalysing the formation of inosine 34 in the anticodon of transfer RNA." *J Mol Biol* **262**(4): 437-458.

B

- Baer, K., M. Roosevelt, A. B. Clarkson, N. van Rooijen, T. Schnieder and U. Frevort (2007). "Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver." *Cell Microbiol* **9**(2): 397-412.
- Baker, K. P. and G. Schatz (1991). "Mitochondrial proteins essential for viability mediate protein import into yeast mitochondria." *Nature* **349**(6306): 205-208.
- Baleva, M., A. Gowher, P. Kamenski, I. Tarassov, N. Entelis and B. Masquida (2015). "A Moonlighting Human Protein Is Involved in Mitochondrial Import of tRNA." *Int J Mol Sci* **16**(5): 9354-9367.
- Baragaña, B., *et al.*, (2015). "A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis." *Nature* **522**(7556): 315-320.
- Baum, J., A. T. Papenfuss, G. R. Mair, C. J. Janse, D. Vlachou, A. P. Waters, A. F. Cowman, B. S. Crabb and T. F. de Koning-Ward (2009). "Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites." *Nucleic Acids Res* **37**(11): 3788-3798.
- Beck, J. R., I. A. Rodriguez-Fernandez, J. C. de Leon, M. H. Huynh, V. B. Carruthers, N. S. Morrisette and P. J. Bradley (2010). "A novel family of *Toxoplasma* IMC proteins displays a hierarchical organization and functions in coordinating parasite division." *PLoS Pathog* **6**(9): e1001094.
- Behm-Ansmant, I., A. Urban, X. Ma, Y. T. Yu, Y. Motorin and C. Branlant (2003). "The *Saccharomyces cerevisiae* U2 snRNA:pseudouridine-synthase Pus7p is a novel multisite-multisubstrate RNA:Psi-synthase also acting on tRNAs." *RNA* **9**(11): 1371-1382.

- Bhattacharyya, S. N., S. Chatterjee, S. Goswami, G. Tripathi, S. N. Dey and S. Adhya (2003). "'Ping-pong' interactions between mitochondrial tRNA import receptors within a multiprotein complex." *Mol Cell Biol* **23**(15): 5217-5224.
- Bhattacharyya, S. N., S. Mukherjee and S. Adhya (2000). "Mutations in a tRNA import signal define distinct receptors at the two membranes of *Leishmania* mitochondria." *Mol Cell Biol* **20**(19): 7410-7417.
- Billker, O., V. Lindo, M. Panico, A. E. Etienne, T. Paxton, A. Dell, M. Rogers, R. E. Sinden and H. R. Morris (1998). "Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito." *Nature* **392**(6673): 289-292.
- Billker, O., M. K. Shaw, G. Margos and R. E. Sinden (1997). "The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro." *Parasitology* **115** (1): 1-7.
- Biswas, S., E. E. Lim, A. Gupta, U. Saqib, S. S. Mir, M. I. Siddiqi, S. A. Ralph and S. Habib (2011). "Interaction of apicoplast-encoded elongation factor (EF) EF-Tu with nuclear-encoded EF-Ts mediates translation in the *Plasmodium falciparum* plastid." *Int J Parasitol* **41**(3-4): 417-427.
- Black, F. T., I. L. Wildfang and K. Borgbjerg (1985). "Activity of fusidic acid against *Plasmodium falciparum* in vitro." *Lancet* **1**(8428): 578-579.
- Bour, T. (2009) « Exploration au cœur de la machinerie traductionnelle de *Plasmodium falciparum* : étude de domaines de liaison aux ARN de transfert. » Thèse de l'Université de Strasbourg, pages 29-30
- Bousema, T., L. Okell, S. Shekalaghe, J. T. Griffin, S. Omar, P. Sawa, C. Sutherland, R. Sauerwein, A. C. Ghani and C. Drakeley (2010). "Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs." *Malar J* **9**: 136.
- Bouyer, G., L. Reininger, G. Ramdani, L. D Phillips, V. Sharma, S. Egee, G. Langsley and E. Lasonder (2016). "*Plasmodium falciparum* infection induces dynamic changes in the erythrocyte phospho-proteome." *Blood Cells Mol Dis* **58**: 35-44.
- Bouzaidi-Tiali, N., E. Aeby, F. Charrière, M. Pusnik and A. Schneider (2007). "Elongation factor 1a mediates the specificity of mitochondrial tRNA import in *T. brucei*." *EMBO J* **26**(20): 4302-4312.
- Bruske, E. I., F. Sendfeld and A. Schneider (2009). "Thiolated tRNAs of *Trypanosoma brucei* are imported into mitochondria and dethiolated after import." *J Biol Chem* **284**(52): 36491-36499.
- Bunnik, E. M., D. W. Chung, M. Hamilton, N. Ponts, A. Saraf, J. Prudhomme, L. Florens and K. G. Le Roch (2013). "Polysome profiling reveals translational control of gene expression in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Genome Biol* **14**(11): R128.

C

- Cannarozzi, G., G. Cannarozzi, N. N. Schraudolph, M. Faty, P. von Rohr, M. T. Friberg, A. C. Roth, P. Gonnet, G. Gonnet and Y. Barral (2010). "A role for codon order in translation dynamics." *Cell* **141**(2): 355-367.
- Carter, N. S., C. Ben Mamoun, W. Liu, E. O. Silva, S. M. Landfear, D. E. Goldberg and B. Ullman (2000). "Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from *Plasmodium falciparum*." *J Biol Chem* **275**(14): 10683-10691.
- Castro de Moura, M., F. Miro, J. M. Han, S. Kim, A. Celada and L. Ribas de Pouplana (2011). "*Entamoeba* lysyl-tRNA synthetase contains a cytokine-like domain with chemokine activity towards human endothelial cells." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(11): e1398.
- Celada, A., A. Cruchaud and L. H. Perrin (1983). "Assessment of immune phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. A method for visualizing infected red blood cells ingested by phagocytes." *J Immunol Methods* **63**(2): 263-271.
- Chan, P. P. and T. M. Lowe (2009). "GtRNADB: a database of transfer RNA genes detected in genomic sequence." *Nucleic Acids Res* **37**: D93-97.
- Chatterjee, S., P. Home, S. Mukherjee, B. Mahata, S. Goswami, G. Dhar and S. Adhya (2006). "An RNA-binding

- respiratory component mediates import of type II tRNAs into *Leishmania* mitochondria." J Biol Chem **281**(35): 25270-25277.
- Chaubey, S., A. Kumar, D. Singh and S. Habib (2005). "The apicoplast of *Plasmodium falciparum* is translationally active." Mol Microbiol **56**(1): 81-89.
- Chernyakov, I., J. M. Whipple, L. Kotelawala, E. J. Grayhack and E. M. Phizicky (2008). "Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5'-3' exonucleases Rat1 and Xrn1." Genes Dev **22**(10): 1369-1380.
- Chicher, J., A. Simonetti, L. Kuhn, L. Schaeffer, P. Hammann, G. Eriani and F. Martin (2015). "Purification of mRNA-programmed translation initiation complexes suitable for mass spectrometry analysis." Proteomics **15**(14): 2417-2425.
- Christie, K. R., S. Weng, R. Balakrishnan, M. C. Costanzo, K. Dolinski, S. S. Dwight, S. R. Engel, B. Feierbach, D. G. Fisk, J. E. Hirschman, E. L. Hong, L. Issel-Tarver, R. Nash, A. Sethuraman, B. Starr, C. L. Theesfeld, R. Andrada, G. Binkley, Q. Dong, C. Lane, M. Schroeder, D. Botstein and J. M. Cherry (2004). "Saccharomyces Genome Database (SGD) provides tools to identify and analyze sequences from *Saccharomyces cerevisiae* and related sequences from other organisms." Nucleic Acids Res **32**: D311-314.
- Chu, H. Y. and A. K. Hopper (2013). "Genome-wide investigation of the role of the tRNA nuclear-cytoplasmic trafficking pathway in regulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome and proteome." Mol Cell Biol **33**(21): 4241-4254.
- Coppi, A., R. Natarajan, G. Pradel, B. L. Bennett, E. R. James, M. A. Roggero, G. Corradin, C. Persson, R. Tewari and P. Sinnis (2011). "The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host." J Exp Med **208**(2): 341-356.
- Coulson, R. M., N. Hall and C. A. Ouzounis (2004). "Comparative genomics of transcriptional control in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Genome Res **14**(8): 1548-1554.
- Crausaz Esseiva, A., L. Maréchal-Drouard, A. Cosset and A. Schneider (2004). "The T-stem determines the cytosolic or mitochondrial localization of trypanosomal tRNAsMet." Mol Biol Cell **15**(6): 2750-2757.
- Cromer, D., K. J. Evans, L. Schofield and M. P. Davenport (2006). "Preferential invasion of reticulocytes during late-stage *Plasmodium berghei* infection accounts for reduced circulating reticulocyte levels." Int J Parasitol **36**(13): 1389-1397.
- Cudny, H. and M. P. Deutscher (1986). "High-level overexpression, rapid purification, and properties of *Escherichia coli* tRNA nucleotidyltransferase." J Biol Chem **261**(14): 6450-6453.
- Cui, L., S. Lindner and J. Miao (2015). "Translational regulation during stage transitions in malaria parasites." Ann N Y Acad Sci **1342**: 1-9.

D

- Dahl, E. L. and P. J. Rosenthal (2008). "Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics." Trends Parasitol **24**(6): 279-284.
- de Koning-Ward, T. F., P. R. Gilson, J. A. Boddey, M. Rug, B. J. Smith, A. T. Papenfuss, P. R. Sanders, R. J. Lundie, A. G. Maier, A. F. Cowman and B. S. Crabb (2009). "A newly discovered protein export machine in malaria parasites." Nature **459**(7249): 945-949.
- Delage, L., A. Dietrich, A. Cosset and L. Maréchal-Drouard (2003). "In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into mitochondria of *Solanum tuberosum*." Mol Cell Biol **23**(11): 4000-4012.
- Deligianni, E., R. N. Morgan, L. Bertuccini, C. C. Wirth, N. C. Silmon de Monerri, L. Spanos, M. J. Blackman, C. Louis, G. Pradel and I. Siden-Kiamos (2013). "A perforin-like protein mediates disruption of the erythrocyte membrane during egress of *Plasmodium berghei* male gametocytes." Cell Microbiol **15**(8): 1438-1455.
- DePristo, M. A., M. M. Zilversmit and D. L. Hartl (2006). "On the abundance, amino acid composition, and evolutionary dynamics of low-complexity regions in proteins." Gene **378**: 19-30.

- Desai, S. A., D. J. Krogstad and E. W. McCleskey (1993). "A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite." *Nature* **362**(6421): 643-646.
- Dietrich, A., I. Small, A. Cosset, J. H. Weil and L. Maréchal-Drouard (1996). "Editing and import: strategies for providing plant mitochondria with a complete set of functional transfer RNAs." *Biochimie* **78**(6): 518-529.
- Djikeng, A., H. Shi, C. Tschudi and E. Ullu (2001). "RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs." *RNA* **7**(11): 1522-1530.
- Dock, A.-C. (1984). « Contribution à l'étude structurale de l'ARN de transfert : étude du tRNA^{Asp} de levure. » Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Douglas, R. G., R. Amino, P. Sinnis and F. Frischknecht (2015). "Active migration and passive transport of malaria parasites." *Trends Parasitol* **31**(8): 357-362.
- Dörner, M., M. Altmann, S. Pääbo and M. Mörl (2001). "Evidence for import of a lysyl-tRNA into marsupial mitochondria." *Mol Biol Cell* **12**(9): 2688-2698.

E

- Ejigiri, I. and P. Sinnis (2009). "*Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte." *Curr Opin Microbiol* **12**(4): 401-407.
- Elsworth, B., K. Matthews, C. Q. Nie, M. Kalanon, S. C. Charnaud, P. R. Sanders, S. A. Chisholm, N. A. Counihan, P. J. Shaw, P. Pino, J. A. Chan, M. F. Azevedo, S. J. Rogerson, J. G. Beeson, B. S. Crabb, P. R. Gilson and T. F. de Koning-Ward (2014). "PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites." *Nature* **511**(7511): 587-591.
- Entelis, N., I. Brandina, P. Kamenski, I. A. Krasheninnikov, R. P. Martin and I. Tarassov (2006). "A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* **20**(12): 1609-1620.
- Esseiva, A. C., A. Naguleswaran, A. Hemphill and A. Schneider (2004). "Mitochondrial tRNA import in *Toxoplasma gondii*." *J Biol Chem* **279**(41): 42363-42368.
- Eswara, M. B., A. T. McGuire, J. B. Pierce and D. Mangroo (2009). "Utp9p facilitates Msn5p-mediated nuclear reexport of retrograded tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **20**(23): 5007-5025.

F

- Feagin, J. E. (2000). "Mitochondrial genome diversity in parasites." *Int J Parasitol* **30**(4): 371-390.
- Fechter, P., J. Rudinger, R. Giegé and A. Théobald-Dietrich (1998). "Ribozyme processed tRNA transcripts with unfriendly internal promoter for T7 RNA polymerase: production and activity." *FEBS Lett* **436**(1): 99-103.
- Feng, W. and A. K. Hopper (2002). "A Los1p-independent pathway for nuclear export of intronless tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8): 5412-5417.
- Fichera, M. E. and D. S. Roos (1997). "A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites." *Nature* **390**(6658): 407-409.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya and N. Sonenberg (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" *Nat Rev Genet* **9**(2): 102-114.
- Filisetti, D., A. Théobald-Dietrich, N. Mahmoudi, J. Rudinger-Thirion, E. Candolfi and M. Frugier (2013). "Aminoacylation of *Plasmodium falciparum* tRNA(Asn) and insights in the synthesis of asparagine repeats." *J Biol Chem* **288**(51): 36361-36371.
- Florens, L., M. P. Washburn, J. D. Raine, R. M. Anthony, M. Grainger, J. D. Haynes, J. K. Moch, N. Muster, J. B. Sacci, D. L. Tabb, A. A. Witney, D. Wolters, Y. Wu, M. J. Gardner, A. A. Holder, R. E. Sinden, J. R. Yates and D. J. Carucci (2002). "A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle." *Nature* **419**(6906): 520-526.
- Foth, B. J. and G. I. McFadden (2003). "The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other

- Apicomplexan parasites." *Int Rev Cytol* **224**: 57-110.
- Foth, B. J., S. A. Ralph, C. J. Tonkin, N. S. Struck, M. Fraunholz, D. S. Roos, A. F. Cowman and G. I. McFadden (2003). "Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Science* **299**(5607): 705-708.
- Francis, S. E., I. Y. Gluzman, A. Oksman, D. Banerjee and D. E. Goldberg (1996). "Characterization of native falcipain, an enzyme involved in *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation." *Mol Biochem Parasitol* **83**(2): 189-200.
- Franke-Fayard, B., H. Trueman, J. Ramesar, J. Mendoza, M. van der Keur, R. van der Linden, R. E. Sinden, A. P. Waters and C. J. Janse (2004). "A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle." *Mol Biochem Parasitol* **137**(1): 23-33.
- Frugier, M., T. Bour, M. Ayach, M. A. Santos, J. Rudinger-Thirion, A. Théobald-Dietrich and E. Pizzi (2010). "Low Complexity Regions behave as tRNA sponges to help co-translational folding of plasmodial proteins." *FEBS Lett* **584**(2): 448-454.

G

- Galizi, R., F. Spano, M. A. Giubilei, B. Capuccini, A. Magini, L. Urbanelli, T. Ogawa, J. P. Dubey, R. Spaccapelo, C. Emiliani and M. Di Cristina (2013). "Evidence of tRNA cleavage in apicomplexan parasites: Half-tRNAs as new potential regulatory molecules of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium berghei*." *Mol Biochem Parasitol* **188**(2): 99-108.
- Garcia-Silva, M. R., M. Frugier, J. P. Tosar, A. Correa-Dominguez, L. Ronalte-Alves, A. Parodi-Talice, C. Rovira, C. Robello, S. Goldenberg and A. Cayota (2010). "A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules." *Mol Biochem Parasitol* **171**(2): 64-73.
- Gardner, M. J., S. J. Shallom, J. M. Carlton, S. L. Salzberg, V. Nene, A. Shoaibi, A. Ciecko, J. Lynn, M. Rizzo, B. Weaver, B. Jarrahi, M. Brenner, B. Parvizi, L. Tallon, A. Moazzez, D. Granger, C. Fujii, C. Hansen, J. Pederson, T. Feldblyum, J. Peterson, B. Suh, S. Angiuoli, M. Perlea, J. Allen, J. Selengut, O. White, L. M. Cummings, H. O. Smith, M. D. Adams, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman and C. M. Fraser (2002). "Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14." *Nature* **419**(6906): 531-534.
- Geslain, R., E. Aeby, T. Guitart, T. E. Jones, M. Castro de Moura, F. Charrière, A. Schneider and L. Ribas de Pouplana (2006). "Trypanosoma seryl-tRNA synthetase is a metazoan-like enzyme with high affinity for tRNA^{Sec}." *J Biol Chem* **281**(50): 38217-38225.
- Ghosh, A., T. Ghosh, S. Ghosh, S. Das and S. Adhya (1994). "Interaction of small ribosomal and transfer RNAs with a protein from *Leishmania donovani*." *Nucleic Acids Res* **22**(9): 1663-1669.
- Giegé, R., F. Jühling, J. Pütz, P. Stadler, C. Sauter and C. Florentz (2012). "Structure of transfer RNAs: similarity and variability." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**(1): 37-61.
- Giegé, R. and M. Frugier (2003). « Transfer RNA structure and identity. » in *Translation mechanisms* (ed. J. Lapointe and L. Brakier-Gringas), pp. 1-24. Landes Sciences, Georgetown, TX.
- Goel, V. K., X. Li, H. Chen, S. C. Liu, A. H. Chishti and S. S. Oh (2003). "Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5164-5169.
- Goldberg, D. E. (2005). "Hemoglobin degradation." *Curr Top Microbiol Immunol* **295**: 275-291.
- Goodyer, I. D., D. J. Hayes and R. Eisenthal (1997). "Efflux of 6-deoxy-D-glucose from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes via two saturable carriers." *Mol Biochem Parasitol* **84**(2): 229-239.
- Green, N. J., F. J. Grundy and T. M. Henkin (2010). "The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule." *FEBS Lett* **584**(2): 318-324.
- Grosshans, H., E. Hurt and G. Simos (2000). "An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast." *Genes Dev* **14**(7): 830-840.
- Gupta, A., S. S. Mir, K. E. Jackson, E. E. Lim, P. Shah, A. Sinha, M. I. Siddiqi, S. A. Ralph and S. Habib (2013b). "Recycling factors for ribosome disassembly in the apicoplast and mitochondrion of *Plasmodium*

- falciparum*." Mol Microbiol **88**(5): 891-905.
- Gupta, A., S. S. Mir, U. Saqib, S. Biswas, S. Vaishya, K. Srivastava, M. I. Siddiqi and S. Habib (2013a). "The effect of fusidic acid on *Plasmodium falciparum* elongation factor G (EF-G)." Mol Biochem Parasitol **192**(1-2): 39-48.
- Gupta, A., P. Shah, A. Haider, K. Gupta, M. I. Siddiqi, S. A. Ralph and S. Habib (2014). "Reduced ribosomes of the apicoplast and mitochondrion of *Plasmodium* spp. and predicted interactions with antibiotics." Open Biol **4**(5): 140045.
- Guttery, D. S., M. Roques, A. A. Holder and R. Tewari (2015). "Commit and Transmit: Molecular Players in *Plasmodium* Sexual Development and Zygote Differentiation." Trends Parasitol **31**(12): 676-685.

H

- Haider, A., S. M. Allen, K. E. Jackson, S. A. Ralph and S. Habib (2015). "Targeting and function of proteins mediating translation initiation in organelles of *Plasmodium falciparum*." Mol Microbiol **96**(4): 796-814.
- Hall, T. M. (2005). "Structure and function of argonaute proteins." Structure **13**(10): 1403-1408.
- Hancock, K., A. J. LeBlanc, D. Donze and S. L. Hajduk (1992). "Identification of nuclear encoded precursor tRNAs within the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **267**(33): 23963-23971.
- Harding, C. R. and M. Meissner (2014). "The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium*." Cell Microbiol **16**(5): 632-641.
- Hartl, F. U., N. Pfanner, D. W. Nicholson and W. Neupert (1989). "Mitochondrial protein import." Biochim Biophys Acta **988**(1): 1-45.
- Hellmuth, K., D. M. Lau, F. R. Bischoff, M. Künzler, E. Hurt and G. Simos (1998). "Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA." Mol Cell Biol **18**(11): 6374-6386.
- Helm, M., H. Brulé, F. Degoul, C. Cepanec, J. P. Leroux, R. Giegé and C. Florentz (1998). "The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA." Nucleic Acids Res **26**(7): 1636-1643.
- Hikosaka, K., K. Kita and K. Tanabe (2013). "Diversity of mitochondrial genome structure in the phylum *Apicomplexa*." Mol Biochem Parasitol **188**(1): 26-33.
- Holder, A. A., M. J. Blackman, P. A. Burghaus, J. A. Chappel, I. T. Ling, N. McCallum-Deighton and S. Shai (1992). "A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function." Mem Inst Oswaldo Cruz **87 Suppl 3**: 37-42.
- Hopper, A. K. (2013). "Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **194**(1): 43-67.
- Hopper, A. K. and H. Y. Huang (2015). "Quality Control Pathways for Nucleus-Encoded Eukaryotic tRNA Biosynthesis and Subcellular Trafficking." Mol Cell Biol **35**(12): 2052-2058.
- Hopper, A. K. and H. H. Shaheen (2008). "A decade of surprises for tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics." Trends Cell Biol **18**(3): 98-104.
- Hruz, P. W. and M. M. Mueckler (2001). "Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review)." Mol Membr Biol **18**(3): 183-193.
- Huang, H. Y. and A. K. Hopper (2015). "In vivo biochemical analyses reveal distinct roles of β -importins and eEF1A in tRNA subcellular traffic." Genes Dev **29**(7): 772-783.
- Hughes, A. L. (2004). "The evolution of amino acid repeat arrays in *Plasmodium* and other organisms." J Mol Evol **59**(4): 528-535.
- Hurt, D. J., S. S. Wang, Y. H. Lin and A. K. Hopper (1987). "Cloning and characterization of LOS1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that affects tRNA splicing." Mol Cell Biol **7**(3): 1208-1216.
- Hurto, R. L., A. H. Tong, C. Boone and A. K. Hopper (2007). "Inorganic phosphate deprivation causes tRNA nuclear accumulation via retrograde transport in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **176**(2): 841-852.

I

Ishino, T., Y. Chinzei and M. Yuda (2005). "A *Plasmodium* sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection." *Cell Microbiol* **7**(2): 199-208.

J

Jackson, K. E., S. Habib, M. Frugier, R. Hoen, S. Khan, J. S. Pham, L. Ribas de Pouplana, M. Royo, M. A. Santos, A. Sharma and S. A. Ralph (2011). "Protein translation in *Plasmodium* parasites." *Trends Parasitol* **27**(10): 467-476.

Johnson, R. A., G. I. McFadden and C. D. Goodman (2011). "Characterization of two malaria parasite organelle translation elongation factor G proteins: the likely targets of the anti-malarial fusidic acid." *PLoS One* **6**(6): e20633.

Jones, M. L., E. L. Kitson and J. C. Rayner (2006). "*Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: a conserved myosin associated complex." *Mol Biochem Parasitol* **147**(1): 74-84.

Josling, G. A. and M. Llinás (2015). "Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit." *Nat Rev Microbiol* **13**(9): 573-587.

K

Kadaba, S., A. Krueger, T. Trice, A. M. Krecic, A. G. Hinnebusch and J. Anderson (2004). "Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNAMet in *S. cerevisiae*." *Genes Dev* **18**(11): 1227-1240.

Kaiser, K., N. Camargo, I. Coppens, J. M. Morrissey, A. B. Vaidya and S. H. Kappe (2004). "A member of a conserved *Plasmodium* protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites." *Mol Biochem Parasitol* **133**(1): 15-26.

Kamenski, P., O. Kolesnikova, V. Jubenot, N. Entelis, I. A. Krashennikov, R. P. Martin and I. Tarassov (2007). "Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol." *Mol Cell* **26**(5): 625-637.

Kaneko, T., T. Suzuki, S. T. Kapushoc, M. A. Rubio, J. Ghazvini, K. Watanabe and L. Simpson (2003). "Wobble modification differences and subcellular localization of tRNAs in *Leishmania tarentolae*: implication for tRNA sorting mechanism." *EMBO J* **22**(3): 657-667.

Kapps, D., T. Bour, N. Mahmoudi, S. Thiberge, D. Bargieri, R. Ménard and M. Frugier (2016). "*Apicomplexa*-specific tRip facilitates import of exogenous tRNAs into malaria parasites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(17): 4717-4722.

Karlin, S., L. Brocchieri, A. Bergman, J. Mrazek and A. J. Gentles (2002). "Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 333-338.

Kawaji, H., M. Nakamura, Y. Takahashi, A. Sandelin, S. Katayama, S. Fukuda, C. O. Daub, C. Kai, J. Kawai, J. Yasuda, P. Carninci and Y. Hayashizaki (2008). "Hidden layers of human small RNAs." *BMC Genomics* **9**: 157.

Kennedy, M., M. E. Fishbaugher, A. M. Vaughan, R. Patrapuvich, R. Boonhok, N. Yimamnuaychok, N. Rezakhani, P. Metzger, M. Ponpuak, J. Sattabongkot, S. H. Kappe, J. C. Hume and S. E. Lindner (2012). "A rapid and scalable density gradient purification method for *Plasmodium* sporozoites." *Malar J* **11**: 421.

Khan, S. (2016). "Recent advances in the biology and drug targeting of malaria parasite aminoacyl-tRNA synthetases." *Malar J* **15**(1): 203.

Kim, S. H., F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. Wang, N. C. Seeman and A. Rich (1974). "Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA." *Science* **185**(4149): 435-440.

Kirk, K. and K. J. Saliba (2007). "Targeting nutrient uptake mechanisms in *Plasmodium*." *Curr Drug Targets* **8**(1): 75-88.

Klonis, N., D. J. Creek and L. Tilley (2013). "Iron and heme metabolism in *Plasmodium falciparum* and the

- mechanism of action of artemisinins." *Curr Opin Microbiol* **16**(6): 722-727.
- Koch, M. and J. Baum (2016). "The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution." *Cell Microbiol* **18**(3): 319-329.
- Kono, M., S. Herrmann, N. B. Loughran, A. Cabrera, K. Engelberg, C. Lehmann, D. Sinha, B. Prinz, U. Ruch, V. Heussler, T. Spielmann, J. Parkinson and T. W. Gilberger (2012). "Evolution and architecture of the inner membrane complex in asexual and sexual stages of the malaria parasite." *Mol Biol Evol* **29**(9): 2113-2132.
- Krugliak, M., J. Zhang and H. Ginsburg (2002). "Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins." *Mol Biochem Parasitol* **119**(2): 249-256.
- Kudryashev, M., S. Lepper, R. Stanway, S. Bohn, W. Baumeister, M. Cyrklaff and F. Frischknecht (2010). "Positioning of large organelles by a membrane-associated cytoskeleton in *Plasmodium* sporozoites." *Cell Microbiol* **12**(3): 362-371.
- Kumar, P., C. Kuscu and A. Dutta (2016). "Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs)." *Trends Biochem Sci.* **41**(8) : 679-689.

L

- Lambertz, U., M. E. Oviedo Ovando, E. J. Vasconcelos, P. J. Unrau, P. J. Myler and N. E. Reiner (2015). "Small RNAs derived from tRNAs and rRNAs are highly enriched in exosomes from both old and new world *Leishmania* providing evidence for conserved exosomal RNA Packaging." *BMC Genomics* **16**: 151.
- Landfear, S. M. (2011). "Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa." *Eukaryot Cell* **10**(4): 483-493.
- Le Roch, K. G., J. R. Johnson, L. Florens, Y. Zhou, A. Santrosyan, M. Grainger, S. F. Yan, K. C. Williamson, A. A. Holder, D. J. Carucci, J. R. Yates and E. A. Winzeler (2004). "Global analysis of transcript and protein levels across the *Plasmodium falciparum* life cycle." *Genome Res* **14**(11): 2308-2318.
- Lim, L. and G. I. McFadden (2010). "The evolution, metabolism and functions of the apicoplast." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1541): 749-763.
- Long, J. A. and G. Kulkarni (2004). "An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen." *Poult Sci* **83**(9): 1594-1601.
- Lund, E. and J. E. Dahlberg (1998). "Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus." *Science* **282**(5396): 2082-2085.

M

- Mahapatra, S. and S. Adhya (1996). "Import of RNA into *Leishmania* mitochondria occurs through direct interaction with membrane-bound receptors." *J Biol Chem* **271**(34): 20432-20437.
- Mahapatra, S., S. Ghosh, S. K. Bera, T. Ghosh, A. Das and S. Adhya (1998). "The D arm of tRNA^{Tyr} is necessary and sufficient for import into *Leishmania* mitochondria in vitro." *Nucleic Acids Res* **26**(9): 2037-2041.
- Mair, G. R., J. A. Braks, L. S. Garver, J. C. Wiegant, N. Hall, R. W. Dirks, S. M. Khan, G. Dimopoulos, C. J. Janse and A. P. Waters (2006). "Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression." *Science* **313**(5787): 667-669.
- Marck, C. and H. Grosjean (2002). "tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features." *RNA* **8**(10): 1189-1232.
- Marin, M. (2008). "Folding at the rhythm of the rare codon beat." *Biotechnol J* **3**(8): 1047-1057.
- Martin, R. P., J. M. Schneller, A. J. Stahl and G. Dirheimer (1979). "Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria." *Biochemistry* **18**(21): 4600-4605.
- Maréchal-Drouard, L., J. H. Weil and P. Guillemaut (1988). "Import of several tRNAs from the cytoplasm into

- the mitochondria in bean *Phaseolus vulgaris*." *Nucleic Acids Res* **16**(11): 4777-4788.
- McCleverty, C. J., M. Hornsby, G. Spraggon and A. Kreuzsch (2007). "Crystal structure of human Pus10, a novel pseudouridine synthase." *J Mol Biol* **373**(5): 1243-1254.
- McConkey, G. A., M. J. Rogers and T. F. McCutchan (1997). "Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton." *J Biol Chem* **272**(4): 2046-2049.
- McFadden, G. I. and D. S. Roos (1999). "Apicomplexan plastids as drug targets." *Trends Microbiol* **7**(8): 328-333.
- McGuire, A. T. and D. Mangroo (2007). "Cex1p is a novel cytoplasmic component of the *Saccharomyces cerevisiae* nuclear tRNA export machinery." *EMBO J* **26**(2): 288-300.
- Meireles, P., J. Sales-Dias, C. M. Andrade, J. Mello-Vieira, L. Mancio-Silva, J. P. Simas, H. M. Staines and M. Prudêncio (2016). "GLUT1-mediated glucose uptake plays a crucial role during *Plasmodium* hepatic infection." *Cell Microbiol*. [ahead of print]
- Miao, J., Q. Fan, D. Parker, X. Li, J. Li and L. Cui (2013). "Puf mediates translation repression of transmission-blocking vaccine candidates in malaria parasites." *PLoS Pathog* **9**(4): e1003268.
- Miao, J., J. Li, Q. Fan, X. Li and L. Cui (2010). "The Puf-family RNA-binding protein PfPuf2 regulates sexual development and sex differentiation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *J Cell Sci* **123**(7): 1039-1049.
- Milani, K. J., T. G. Schneider and T. F. Taraschi (2015). "Defining the morphology and mechanism of the hemoglobin transport pathway in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *Eukaryot Cell* **14**(4): 415-426.
- Mochizuki, K. and M. A. Gorovsky (2005). "A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase." *Genes Dev* **19**(1): 77-89.
- Molitor, I. M., S. Knöbel, C. Dang, T. Spielmann, A. Alléra and G. M. König (2004). "Translation initiation factor eIF-5A from *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol* **137**(1): 65-74.
- Morales, A. J., M. A. Swairjo and P. Schimmel (1999). "Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*." *EMBO J* **18**(12): 3475-3483.
- Moreira, C. K., T. J. Templeton, C. Lavazec, R. E. Hayward, C. V. Hobbs, H. Kroeze, C. J. Janse, A. P. Waters, P. Sinnis and A. Coppi (2008). "The *Plasmodium* TRAP/MIC2 family member, TRAP-Like Protein (TLP), is involved in tissue traversal by sporozoites." *Cell Microbiol* **10**(7): 1505-1516.
- Morrisette, N. S., J. M. Murray and D. S. Roos (1997). "Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." *J Cell Sci* **110**(1): 35-42.
- Morrisette, N. S. and L. D. Sibley (2002). "Cytoskeleton of apicomplexan parasites." *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(1): 21-38
- Moser, G., F. H. Brohn, H. D. Danforth and R. S. Nussenzweig (1978). "Sporozoites of rodent and simian malaria, purified by anion exchangers, retain their immunogenicity and infectivity." *J Protozool* **25**(1): 119-124.
- Mota, M. M., J. C. Hafalla and A. Rodriguez (2002). "Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection." *Nat Med* **8**(11): 1318-1322.
- Mota, M. M., G. Pradel, J. P. Vanderberg, J. C. Hafalla, U. Frevert, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig and A. Rodriguez (2001). "Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection." *Science* **291**(5501): 141-144.
- Mukherjee, S., S. Basu, P. Home, G. Dhar and S. Adhya (2007). "Necessary and sufficient factors for the import of transfer RNA into the kinetoplast mitochondrion." *EMBO Rep* **8**(6): 589-595.
- Murthi, A., H. H. Shaheen, H. Y. Huang, M. A. Preston, T. P. Lai, E. M. Phizicky and A. K. Hopper (2010). "Regulation of tRNA bidirectional nuclear-cytoplasmic trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **21**(4): 639-649.
- Ménard, R. (2000). "The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way." *Microbes Infect* **2**(6): 633-642.
- Ménard, R. and C. Janse (1997). "Gene targeting in malaria parasites." *Methods* **13**(2): 148-157.

- Ménard, R., J. Tavares, I. Cockburn, M. Markus, F. Zavala and R. Amino (2013). "Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity." *Nat Rev Microbiol* **11**(10): 701-712.
- Mörl, M. and A. Marchfelder (2001). "The final cut. The importance of tRNA 3'-processing." *EMBO Rep* **2**(1): 17-20.
- Müller, K., K. Matuschewski and O. Silvie (2011). "The Puf-family RNA-binding protein Puf2 controls sporozoite conversion to liver stages in the malaria parasite." *PLoS One* **6**(5): e19860.

N

- Nomanbhoy, T., A. J. Morales, A. T. Abraham, C. S. Vörtler, R. Giegé and P. Schimmel (2001). "Simultaneous binding of two proteins to opposite sides of a single transfer RNA." *Nat Struct Biol* **8**(4): 344-348.
- Nozawa, K., R. Ishitani, T. Yoshihisa, M. Sato, F. Arisaka, S. Kanamaru, N. Dohmae, D. Mangroo, B. Senger, H. D. Becker and O. Nureki (2013). "Crystal structure of Cex1p reveals the mechanism of tRNA trafficking between nucleus and cytoplasm." *Nucleic Acids Res* **41**(6): 3901-3914.

P

- Paris, Z., H. Hashimi, S. Lun, J. D. Alfonzo and J. Lukeš (2011). "Futile import of tRNAs and proteins into the mitochondrion of *Trypanosoma brucei evansi*." *Mol Biochem Parasitol* **176**(2): 116-120.
- Paris, Z., M. A. Rubio, J. Lukes and J. D. Alfonzo (2009). "Mitochondrial tRNA import in *Trypanosoma brucei* is independent of thiolation and the Rieske protein." *RNA* **15**(7): 1398-1406.
- Peacock, C. S., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabbinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith and M. Berriman (2007). "Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease." *Nat Genet* **39**(7): 839-847.
- Pham, J. S., K. L. Dawson, K. E. Jackson, E. E. Lim, C. F. Pasaje, K. E. Turner and S. A. Ralph (2014). "Aminoacyl-tRNA synthetases as drug targets in eukaryotic parasites." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **4**(1): 1-13.
- Phizicky, E. M. and A. K. Hopper (2010). "tRNA biology charges to the front." *Genes Dev* **24**(17): 1832-1860.
- Pino, P., E. Aeby, B. J. Foth, L. Sheiner, T. Soldati, A. Schneider and D. Soldati-Favre (2010). "Mitochondrial translation in absence of local tRNA aminoacylation and methionyl tRNA Met formylation in *Apicomplexa*." *Mol Microbiol* **76**(3): 706-718.
- Pizzi, E. and C. Frontali (2001). "Low-complexity regions in *Plasmodium falciparum* proteins." *Genome Res* **11**(2): 218-229.
- Poulin, B., E. M. Patzewitz, D. Brady, O. Silvie, M. H. Wright, D. J. Ferguson, R. J. Wall, S. Whipple, D. S. Guttery, E. W. Tate, B. Wickstead, A. A. Holder and R. Tewari (2013). "Unique apicomplexan IMC sub-compartment proteins are early markers for apical polarity in the malaria parasite." *Biol Open* **2**(11): 1160-1170.
- Preiser, P., D. H. Williamson and R. J. Wilson (1995). "tRNA genes transcribed from the plastid-like DNA of *Plasmodium falciparum*." *Nucleic Acids Res* **23**(21): 4329-4336.
- Pütz, J., C. Florentz, F. Bensele and R. Giegé (1994). "A single methyl group prevents the mischarging of a tRNA." *Nat Struct Biol* **1**(9): 580-582.
- Pütz, J., R. Giegé and C. Florentz (2010). "Diversity and similarity in the tRNA world: overall view and case study on malaria-related tRNAs." *FEBS Lett* **584**(2): 350-358.
- Pütz, J., J. D. Puglisi, C. Florentz and R. Giegé (1991). "Identity elements for specific aminoacylation of yeast tRNA(Asp) by cognate aspartyl-tRNA synthetase." *Science* **252**(5013): 1696-1699.

Q

- Quan, X., R. Rassadi, B. Rabie, N. Matusiewicz and U. Stochaj (2004). "Regulated nuclear accumulation of the yeast hsp70 Ssa4p in ethanol-stressed cells is mediated by the N-terminal domain, requires the nuclear carrier Nmd5p and protein kinase C." *FASEB J* **18**(7): 899-901.
- Quashie, N. B., D. Dorin-Semblat, P. G. Bray, G. A. Biagini, C. Doerig, L. C. Ranford-Cartwright and H. P. De Koning (2008). "A comprehensive model of purine uptake by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: identification of four purine transport activities in intraerythrocytic parasites." *Biochem J* **411**(2): 287-295.
- Quashie, N. B., L. C. Ranford-Cartwright and H. P. de Koning (2010). "Uptake of purines in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes is mostly mediated by the human equilibrative nucleoside transporter and the human facilitative nucleobase transporter." *Malar J* **9**: 36.

R

- Raina, M. and M. Ibba (2014). "tRNAs as regulators of biological processes." *Front Genet* **5**: 171.
- Ramakrishnan, C., M. J. Delves, K. Lal, A. M. Blagborough, G. Butcher, K. W. Baker and R. E. Sinden (2013). "Laboratory maintenance of rodent malaria parasites." *Methods Mol Biol* **923**: 51-72.
- Rathjen, T., C. Nicol, G. McConkey and T. Dalmay (2006). "Analysis of short RNAs in the malaria parasite and its red blood cell host." *FEBS Lett* **580**(22): 5185-5188.
- Reddy, B. P., S. Shrestha, K. J. Hart, X. Liang, K. Kemirembe, L. Cui and S. E. Lindner (2015). "A bioinformatic survey of RNA-binding proteins in *Plasmodium*." *BMC Genomics* **16**: 890.
- Rich, A. and U. L. RajBhandary (1976). "Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties." *Annu Rev Biochem* **45**: 805-860.
- Rinehart, J., B. Krett, M. A. Rubio, J. D. Alfonzo and D. Söll (2005). "*Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion." *Genes Dev* **19**(5): 583-592.
- Risco-Castillo, V., S. Topçu, C. Marinach, G. Manzoni, A. E. Bigorgne, S. Briquet, X. Baudin, M. Lebrun, J. F. Dubremetz and O. Silvie (2015). "Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles." *Cell Host Microbe* **18**(5): 593-603.
- Rogalski, M., D. Karcher and R. Bock (2008). "Superwobbling facilitates translation with reduced tRNA sets." *Nat Struct Mol Biol* **15**(2): 192-198.
- Roobsoong, W., S. Roytrakul, J. Sattabongkot, J. Li, R. Udomsangpetch and L. Cui (2011). "Determination of the *Plasmodium vivax* schizont stage proteome." *J Proteomics* **74**(9): 1701-1710.
- Roos, D. S. (1999). "The apicoplast as a potential therapeutic target in *Toxoplasma* and other apicomplexan parasites: some additional thoughts." *Parasitol Today* **15**(1): 41.
- Roth, E. F. (1987). "Malarial parasite hexokinase and hexokinase-dependent glutathione reduction in the *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocyte." *J Biol Chem* **262**(32): 15678-15682.
- Roy, A., R. A. Cox, D. H. Williamson and R. J. Wilson (1999). "Protein synthesis in the plastid of *Plasmodium falciparum*." *Protist* **150**(2): 183-188.
- Rubio, M. A. and A. K. Hopper (2011). "Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**(6): 802-817.
- Rubio, M. A., J. J. Rinehart, B. Krett, S. Duvezin-Caubet, A. S. Reichert, D. Söll and J. D. Alfonzo (2008). "Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(27): 9186-9191.
- Rudinger-Thirion, J., A. Lescure, C. Paulus and M. Frugier (2011). "Misfolded human tRNA isodecoder binds and neutralizes a 3' UTR-embedded Alu element." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(40): E794-802.

S

- Saliba, K. J., I. Ferru and K. Kirk (2005). "Provitamin B5 (pantothenol) inhibits growth of the intraerythrocytic malaria parasite." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(2): 632-637.
- Saliba, K. J., H. A. Horner and K. Kirk (1998). "Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(12): 3533-3538.

- J Biol Chem **273**(17): 10190-10195.
- Salinas, T., A. M. Duchêne, L. Delage, S. Nilsson, E. Glaser, M. Zaepfel and L. Maréchal-Drouard (2006). "The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18362-18367.
- Salinas, T., A. M. Duchêne and L. Maréchal-Drouard (2008). "Recent advances in tRNA mitochondrial import." Trends Biochem Sci **33**(7): 320-329.
- Salinas, T., C. Schaeffer, L. Maréchal-Drouard and A. M. Duchêne (2005). "Sequence dependence of tRNA(Gly) import into tobacco mitochondria." Biochimie **87**(9-10): 863-872.
- Salinas-Giegé, T., R. Giegé and P. Giegé (2015). "tRNA biology in mitochondria." Int J Mol Sci **16**(3): 4518-4559.
- Sanders, P. R., G. T. Cantin, D. C. Greenbaum, P. R. Gilson, T. Nebl, R. L. Moritz, J. R. Yates, A. N. Hodder and B. S. Crabb (2007). "Identification of protein complexes in detergent-resistant membranes of *Plasmodium falciparum* schizonts." Mol Biochem Parasitol **154**(2): 148-157.
- Sarkar, S., A. K. Azad and A. K. Hopper (1999). "Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14366-14371.
- Sarkar, S. and A. K. Hopper (1998). "tRNA nuclear export in *saccharomyces cerevisiae*: in situ hybridization analysis." Mol Biol Cell **9**(11): 3041-3055.
- Sbracia, M., N. Sayme, J. Grasso, L. Vigue and G. Huszar (1996). "Sperm function and choice of preparation media: comparison of Percoll and Accudenz discontinuous density gradients." J Androl **17**(1): 61-67.
- Schneider, A. (2011). "Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation." Annu Rev Biochem **80**: 1033-1053.
- Schwentke, A., M. Krepstakies, A. K. Mueller, C. Hammerschmidt-Kamper, B. A. Motaal, T. Bernhard, J. Hauber and A. Kaiser (2012). "In vitro and in vivo silencing of plasmodial dhs and eIF-5a genes in a putative, non-canonical RNAi-related pathway." BMC Microbiol **12**: 107.
- Seidman, D., D. Johnson, V. Gerbasi, D. Golden, R. Orlando and S. Hajduk (2012). "Mitochondrial membrane complex that contains proteins necessary for tRNA import in *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **287**(12): 8892-8903.
- Senger, B., G. Simos, F. R. Bischoff, A. Podtelejnikov, M. Mann and E. Hurt (1998). "Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p." EMBO J **17**(8): 2196-2207.
- Shaheen, H. H. and A. K. Hopper (2005). "Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11290-11295.
- Shaheen, H. H., R. L. Horetsky, S. R. Kimball, A. Murthi, L. S. Jefferson and A. K. Hopper (2007). "Retrograde nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in rat hepatoma cells in response to amino acid deprivation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(21): 8845-8850.
- Sharma, A., and A. Sharma (2015). "*Plasmodium falciparum* mitochondria import tRNAs along with an active phenylalanyl-tRNA synthetase." Biochem J **465**(3): 459-469.
- Shaw, P. J., N. Ponmee, N. Karoonuthaisiri, S. Kamchonwongpaisan and Y. Yuthavong (2007). "Characterization of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* eIF4E homologue and mRNA 5' cap status." Mol Biochem Parasitol **155**(2): 146-155.
- Shears, M. J., C. Y. Botté and G. I. McFadden (2015). "Fatty acid metabolism in the *Plasmodium* apicoplast: Drugs, doubts and knockouts." Mol Biochem Parasitol **199**(1-2): 34-50.
- Shen, Y., J. Wang, Y. Huang, J. Liang, X. Liu, D. Wu, H. Jiang, Y. Zhao and Y. Li (2016). "Analysis of the immune response of a new malaria vaccine based on the modification of cryptic epitopes." Parasitol Res **115**(5): 1907-1913.
- Simos, G., A. Sauer, F. Fasiolo and E. C. Hurt (1998). "A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases." Mol Cell **1**(2): 235-242.
- Simpson, A. M., Y. Suyama, H. Dewes, D. A. Campbell and L. Simpson (1989). "Kinetoplastid mitochondria contain functional tRNAs which are encoded in nuclear DNA and also contain small minicircle and maxicircle transcripts of unknown function." Nucleic Acids Res **17**(14): 5427-5445.
- Singh, A. P., C. A. Buscaglia, Q. Wang, A. Levay, D. R. Nussenzweig, J. R. Walker, E. A. Winzeler, H. Fujii, B. M.

- Fontoura and V. Nussenzweig (2007). "*Plasmodium* circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite." *Cell* **131**(3): 492-504.
- Singh, G. P., B. R. Chandra, A. Bhattacharya, R. R. Akhouri, S. K. Singh and A. Sharma (2004). "Hyper-expansion of asparagines correlates with an abundance of proteins with prion-like domains in *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol* **137**(2): 307-319.
- Singha, U. K., E. Peprah, S. Williams, R. Walker, L. Saha and M. Chaudhuri (2008). "Characterization of the mitochondrial inner membrane protein translocator Tim17 from *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **159**(1): 30-43.
- Siregar, J. E., D. Syafruddin, H. Matsuoka, K. Kita and S. Marzuki (2008). "Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo(2)) of the cytochrome b gene." *Parasitol Int* **57**(2): 229-232.
- Smith, D. W. and A. L. McNamara (1971). "Specialization of rabbit reticulocyte transfer RNA content for hemoglobin synthesis." *Science* **171**(3971): 577-579.
- Smith, D. W., R. F. Randazzo and A. L. McNamara (1980). "The tRNA content of non-hemoglobinized red cell precursors: evidence that tRNA content is controlled by tRNA utilization." *Biochem Biophys Res Commun* **95**(1): 468-473.
- Solyakov, L., J. Halbert, M. M. Alam, J. P. Semblat, D. Dorin-Semblat, L. Reininger, A. R. Bottrill, S. Mistry, A. Abdi, C. Fennell, Z. Holland, C. Demarta, Y. Bouza, A. Sicard, M. P. Nivez, S. Eschenlauer, T. Lama, D. C. Thomas, P. Sharma, S. Agarwal, S. Kern, G. Pradel, M. Graciotti, A. B. Tobin and C. Doerig (2011). "Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Nat Commun* **2**: 565.
- Spielmann, T., G. N. Montagna, L. Hecht and K. Matuschewski (2012). "Molecular make-up of the *Plasmodium* parasitophorous vacuolar membrane." *Int J Med Microbiol* **302**(4-5): 179-186.
- Srivastava, A., D. J. Creek, K. J. Evans, D. De Souza, L. Schofield, S. Müller, M. P. Barrett, M. J. McConville and A. P. Waters (2015). "Host reticulocytes provide metabolic reservoirs that can be exploited by malaria parasites." *PLoS Pathog* **11**(6): e1004882.
- Strub, B. R., M. B. Eswara, J. B. Pierce and D. Mangroo (2007). "Utp8p is a nucleolar tRNA-binding protein that forms a complex with components of the nuclear tRNA export machinery in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **18**(10): 3845-3859.
- Sun, M., W. Li, K. Blomqvist, S. Das, Y. Hashem, J. D. Dvorin and J. Frank (2015). "Dynamical features of the *Plasmodium falciparum* ribosome during translation." *Nucleic Acids Res* **43**(21): 10515-10524.
- Suyama, Y. (1967). "The origins of mitochondrial ribonucleic acids in *Tetrahymena pyriformis*." *Biochemistry* **6**(9): 2829-2839.

T

- Takano, A., T. Endo and T. Yoshihisa (2005). "tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast." *Science* **309**(5731): 140-142.
- Takano, A., T. Kajita, M. Mochizuki, T. Endo and T. Yoshihisa (2015). "Cytosolic Hsp70 and co-chaperones constitute a novel system for tRNA import into the nucleus." *Elife* **4**.
- Takebe, S., W. H. Witola, B. Schimanski, A. Günzl and C. Ben Mamoun (2007). "Purification of components of the translation elongation factor complex of *Plasmodium falciparum* by tandem affinity purification." *Eukaryot Cell* **6**(4): 584-591.
- Tan, T. H., R. Pach, A. Crausaz, A. Ivens and A. Schneider (2002). "tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import." *Mol Cell Biol* **22**(11): 3707-3717.
- Tarassov, I., N. Entelis and R. P. Martin (1995). "Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases." *EMBO J* **14**(14): 3461-3471.
- Tarassov, I., P. Kamenski, O. Kolesnikova, O. Karicheva, R. P. Martin, I. A. Krasheninnikov and N. Entelis (2007). "Import of nuclear DNA-encoded RNAs into mitochondria and mitochondrial translation."

Cell Cycle **6**(20): 2473-2477.

- Tavares, J., P. Formaglio, S. Thiberge, E. Mordelet, N. Van Rooijen, A. Medvinsky, R. Ménard and R. Amino (2013). "Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection." *J Exp Med* **210**(5): 905-915.
- Tiller, N. and R. Bock (2014). "The translational apparatus of plastids and its role in plant development." *Mol Plant* **7**(7): 1105-1120.
- Trotta, C. R., F. Miao, E. A. Arn, S. W. Stevens, C. K. Ho, R. Rauhut and J. N. Abelson (1997). "The yeast tRNA splicing endonuclease: a tetrameric enzyme with two active site subunits homologous to the archaeal tRNA endonucleases." *Cell* **89**(6): 849-858.
- Tsai, C. J., Z. E. Sauna, C. Kimchi-Sarfaty, S. V. Ambudkar, M. M. Gottesman and R. Nussinov (2008). "Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima." *J Mol Biol* **383**(2): 281-291.
- Tschopp, F., F. Charrière and A. Schneider (2011). "In vivo study in *Trypanosoma brucei* links mitochondrial transfer RNA import to mitochondrial protein import." *EMBO Rep* **12**(8): 825-832.
- Tufet-Bayona, M., C. J. Janse, S. M. Khan, A. P. Waters, R. E. Sinden and B. Franke-Fayard (2009). "Localisation and timing of expression of putative *Plasmodium berghei* rhoptry proteins in merozoites and sporozoites." *Mol Biochem Parasitol* **166**(1): 22-31.
- Tuller, T., A. Carmi, K. Vestsigian, S. Navon, Y. Dorfan, J. Zaborske, T. Pan, O. Dahan, I. Furman and Y. Pilpel (2010b). "An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation." *Cell* **141**(2): 344-354.
- Tuller, T., Y. Y. Waldman, M. Kupiec and E. Ruppin (2010a). "Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3645-3650.

U

- Ullu, E., C. Tschudi and T. Chakraborty (2004). "RNA interference in protozoan parasites." *Cell Microbiol* **6**(6): 509-519.

V

- Vaishya, S., V. Kumar, A. Gupta, M. I. Siddiqi and S. Habib (2016). "Polypeptide release factors and stop codon recognition in the apicoplast and mitochondrion of *Plasmodium falciparum*." *Mol Microbiol*.
- van Dooren, G. G. and B. Striepen (2013). "The algal past and parasite present of the apicoplast." *Annu Rev Microbiol* **67**: 271-289.
- van Rooyen, J. M., J. B. Murat, P. M. Hammoudi, S. Kieffer-Jaquinod, Y. Coute, A. Sharma, H. Pelloux, H. Belrhali and M. A. Hakimi (2014). "Assembly of the novel five-component apicomplexan multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex is driven by the hybrid scaffold protein Tg-p43." *PLoS One* **9**(2): e89487.
- Vanáčová, S., J. Wolf, G. Martin, D. Blank, S. Dettwiler, A. Friedlein, H. Langen, G. Keith and W. Keller (2005). "A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control." *PLoS Biol* **3**(6): e189.
- Vembar, S. S., D. Droll and A. Scherf (2016). "Translational regulation in blood stages of the malaria parasite *Plasmodium* spp.: systems-wide studies pave the way." *Wiley Interdiscip Rev RNA*.

W

- Ward, G. E., L. H. Miller and J. A. Dvorak (1993). "The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes." *J Cell Sci* **106**(1): 237-248.
- Ward, P., L. Equinet, J. Packer and C. Doerig (2004). "Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote." *BMC Genomics* **5**: 79.
- Watanabe, Y. and M. W. Gray (2000). "Evolutionary appearance of genes encoding proteins associated with box H/ACA snoRNAs: cbf5p in *Euglena gracilis*, an early diverging eukaryote, and candidate Gar1p and Nop10p homologs in archaeobacteria." *Nucleic Acids Res* **28**(12): 2342-2352.

- Waters, A. P., C. Syin and T. F. McCutchan (1989). "Developmental regulation of stage-specific ribosome populations in *Plasmodium*." *Nature* **342**(6248): 438-440.
- Whitney, M. L., R. L. Hurto, H. H. Shaheen and A. K. Hopper (2007). "Rapid and reversible nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in response to nutrient availability." *Mol Biol Cell* **18**(7): 2678-2686.
- Wirth, C. C., S. Glushakova, M. Scheuermayer, U. Repnik, S. Garg, D. Schaack, M. M. Kachman, T. Weißbach, J. Zimmerberg, T. Dandekar, G. Griffiths, C. E. Chitnis, S. Singh, R. Fischer and G. Pradel (2014). "Perforin-like protein PPLP2 permeabilizes the red blood cell membrane during egress of *Plasmodium falciparum* gametocytes." *Cell Microbiol* **16**(5): 709-733.
- Wolfe, C. L., A. K. Hopper and N. C. Martin (1996). "Mechanisms leading to and the consequences of altering the normal distribution of ATP(CTP):tRNA nucleotidyltransferase in yeast." *J Biol Chem* **271**(9): 4679-4686.
- Wong, W., X. C. Bai, A. Brown, I. S. Fernandez, E. Hanssen, M. Condrón, Y. H. Tan, J. Baum and S. H. Scheres (2014). "Cryo-EM structure of the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine." *Elife* **3**.
- Woodrow, C. J., J. I. Penny and S. Krishna (1999). "Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* expresses a high affinity facilitative hexose transporter." *J Biol Chem* **274**(11): 7272-7277.

X

- Xue, X., Q. Zhang, Y. Huang, L. Feng and W. Pan (2008). "No miRNA were found in *Plasmodium* and the ones identified in erythrocytes could not be correlated with infection." *Malar J* **7**: 47.

Y

- Yoshihisa, T., C. Ohshima, K. Yunoki-Esaki and T. Endo (2007). "Cytoplasmic splicing of tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Cells* **12**(3): 285-297.
- Yoshihisa, T., K. Yunoki-Esaki, C. Ohshima, N. Tanaka and T. Endo (2003). "Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria." *Mol Biol Cell* **14**(8): 3266-3279.

Z

- Zhang, G., M. Hubalewska and Z. Ignatova (2009). "Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding." *Nat Struct Mol Biol* **16**(3): 274-280.
- Zhang, J. and A. R. Ferré-D'Amaré (2016). "The tRNA Elbow in Structure, Recognition and Evolution." *Life (Basel)* **6**(1).
- Zhang, M., C. Fennell, L. Ranford-Cartwright, R. Sakthivel, P. Gueirard, S. Meister, A. Caspi, C. Doerig, R. S. Nussenzweig, R. Tuteja, W. J. Sullivan, D. S. Roos, B. M. Fontoura, R. Ménard, E. A. Winzeler and V. Nussenzweig (2010). "The *Plasmodium* eukaryotic initiation factor-2alpha kinase IK2 controls the latency of sporozoites in the mosquito salivary glands." *J Exp Med* **207**(7): 1465-1474.
- Zhang, M., B. R. Joyce, W. J. Sullivan and V. Nussenzweig (2013a). "Translational control in *Plasmodium* and toxoplasma parasites." *Eukaryot Cell* **12**(2): 161-167.
- Zhang, M., S. Mishra, R. Sakthivel, B. M. Fontoura and V. Nussenzweig (2016). "UIS2: A Unique Phosphatase Required for the Development of *Plasmodium* Liver Stages." *PLoS Pathog* **12**(1): e1005370.
- Zhang, M., S. Mishra, R. Sakthivel, M. Rojas, R. Ranjan, W. J. Sullivan, B. M. Fontoura, R. Ménard, T. E. Dever and V. Nussenzweig (2012). "PK4, a eukaryotic initiation factor 2alpha(eIF2alpha) kinase, is essential for the development of the erythrocytic cycle of *Plasmodium*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(10): 3956-3961.
- Zhang, Y., N. Jiang, H. Lu, N. Hou, X. Piao, P. Cai, J. Yin, M. Wahlgren and Q. Chen (2013b). "Proteomic analysis of *Plasmodium falciparum* schizonts reveals heparin-binding merozoite proteins." *J Proteome Res* **12**(5): 2185-2193.

Zilversmit, M. M., S. K. Volkman, M. A. DePristo, D. F. Wirth, P. Awadalla and D. L. Hartl (2010). "Low-complexity regions in *Plasmodium falciparum*: missing links in the evolution of an extreme genome." *Mol Biol Evol* **27**(9): 2198-2209.

Rôle de l'import des ARN de transfert de l'hôte dans le développement de *Plasmodium*

Résumé

La protéine tRip de *Plasmodium*, l'agent du paludisme, fait l'objet de mon travail de thèse. Identifiée au laboratoire, elle est localisée à la membrane plasmique de *P. berghei*, le modèle murin étudié *in vivo*. Elle permet l'import d'ARNt exogènes à l'intérieur du parasite.

La génération et l'étude d'une souche *P. berghei* tRip-KO m'ont permis d'explorer l'importance de ce mécanisme et l'implication de tRip dans un complexe multiprotéique.

J'ai démontré que la multiplication de *P. berghei* est très réduite lors du stade sanguin chez la souche tRip-KO. Par protéomique, j'ai montré qu'en l'absence de tRip, de nombreuses protéines sont sous-exprimées, en particulier celles riches en asparagines. Enfin, j'ai identifié trois partenaires protéiques de tRip, dont le substrat est l'ARNt.

Ces résultats suggèrent que les ARNt importés par *Plasmodium* via tRip pourraient être substrat de protéines plasmodiales et acteurs de la synthèse protéique du parasite.

Le transport d'ARNt étrangers dans une cellule est un mécanisme inconnu en dehors de cette étude. Il révèle une interaction inédite entre un hôte et son parasite intracellulaire, propice au développement de ce dernier.

Mots-clés : *Plasmodium*, ARNt, import d'ARNt, synthèse protéique

Résumé en anglais

The organism studied in this work is *Plasmodium*, the malaria parasite. The laboratory identified a membrane protein, called tRip for tRNA import protein, displaying a tRNA binding domain exposed outside of the parasite. *In vivo*, in *P. berghei* which is the murine model used, tRip mediates the import of exogenous tRNAs into the parasite cytosol.

My PhD work began with the construction of a tRip-KO strain of *P. berghei* to investigate the role of tRNA import and the putative involvement of tRip within a proteic complex.

The phenotype of the tRip-KO strain is significantly modified compared to the wild-type parasite during the blood stage: its rate of multiplication is much lower. By proteomic analyses, I showed that many proteins are under-regulated in the tRip-KO strain, especially those very rich in asparagines. Moreover, I identified three protein partners for tRip, being tRNA aminoacylation or modification enzymes.

These results suggest that host imported tRNAs could be taken in charge by parasitic enzymes and take part to *Plasmodium* protein synthesis.

This work reveals a new host pathogen interaction and is the first example showing exogenous tRNA import into a cell.

Keywords: *Plasmodium*, tRNA, tRNA import, protein synthesis