



**HAL**  
open science

# Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de deux nouveaux partenaires potentiels de la protéine phosphatase de type 1 (PP1) chez plasmodium falciparum

Astrid Lenne

► **To cite this version:**

Astrid Lenne. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de deux nouveaux partenaires potentiels de la protéine phosphatase de type 1 (PP1) chez plasmodium falciparum. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S016 . tel-01674208v2

**HAL Id: tel-01674208**

**<https://theses.hal.science/tel-01674208v2>**

Submitted on 2 Jan 2018

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

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

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE  
Ecole Doctorale Biologie-Santé  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

N° d'ordre

**THESE**

Pour l'obtention du titre de

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

Discipline : Biologie moléculaire et structurale, biochimie

Spécialité : Parasitologie

Présentée et soutenue publiquement par

Astrid LENNE

Le 30 septembre 2016

**Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de deux  
nouveaux partenaires potentiels de la Protéine Phosphatase  
de type 1 (PP1) chez *Plasmodium falciparum*.**

Devant le jury composé de :

Professeur El Moukhtar ALIOUAT

Président

Docteur José-Juan LOPEZ-RUBIO

Rapporteur

Docteur Olivier SILVIE

Rapporteur

Docteur Angelita REBOLLO GARCIA

Examineur

Docteur Jamal KHALIFE

Examineur

Docteur Christine PIERROT

Directrice de thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille  
Université Lille Nord de France – INSERM U1019 – CNRS UMR 8204 – Institut Pasteur de Lille  
1 rue du Professeur Calmette 59019 Lille Cedex, FRANCE







## Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier le Dr. Camille Locht qui m'a permis de réaliser mes stages de master ainsi que ces trois années de thèse au sein du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille.

Je remercie le Dr. José-Juan Lopez-Rubio, le Dr. Olivier Silvie et le docteur Angelita Rebollo Garcia d'avoir accepté d'évaluer les travaux que j'ai réalisés durant ma thèse, ainsi que le Dr. Martine Duterque et le Dr. Eric Adriaenssens d'avoir suivi l'évolution de ces travaux, pour leurs suggestions et les discussions engendrées lors des comités de suivi de thèse. Et je remercie également le Pr. El Moukhtar Aliouat pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse, d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse et d'avoir continué à suivre mes travaux après avoir rejoint notre équipe.

Je souhaite remercier nos collaborateurs : le Pr. Jean-François Bodart, le Dr. Katia Cailliau, le Dr. Alain Martoriati pour la réalisation des expériences en ovocytes de Xénope, et le Dr. Pierre Gosset et Baptiste Delaire pour avoir réalisé les expériences de localisation par immunohistochimie. Ces différentes collaborations nous ont permis de mener à bien ce projet et de le faire évoluer.

Je remercie le Dr. Jamal Khalife de m'avoir accueillie dans son équipe durant ces cinq années. Merci pour ces nombreuses discussions qui nous ont permis de faire évoluer ce projet de thèses au fil des mois, et d'avoir partagé vos connaissances.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr. Christine Pierrot pour m'avoir encadrée durant ces années de master et de thèse, de m'avoir encouragée et motivée surtout durant les derniers mois qui ont été chargés ! Merci pour ces nombreux entretiens qui ont fait évoluer ce projet au long de ces trois années de thèse.

Merci aux membres de l'équipe 2 : Raymond, Colette, Manu, Jacques, Alejandro, Anne.

Je souhaite remercier Caroline et Sophia pour m'avoir transmis leur savoir, pour m'avoir appris à prendre soin des animaux et des parasites, et pour m'avoir apporté de l'aide lorsque j'en avais besoin. Un grand merci !

Bien évidemment je remercie mes voisins, actuels ou anciens, de bureau/paillasse : Julien, Stéphanie, Audrey, Marion, Thomas, Lucile et Bénédicte, pour votre aide, nos discussions et nos fous rires ! Et bien sûr, un grand merci à Géraldine qui m'a eu dans les pattes dès le début de mon master 2 alors qu'elle débutait sa thèse. Merci Gégé d'avoir été là quand j'en avais besoin, d'avoir partagé les bons comme les mauvais moments, et d'avoir eu la patience de m'apprendre tout ce que tu sais. Finalement, vous êtes bien plus que de simples collègues ! Je suis très heureuse de vous compter parmi mes amis et j'espère que cela durera !

Un grand merci à mes amis : Romain, Hortense, Charlotte, Antoine-Marie, Dominique, Loïc, Alexandra... pour m'avoir écoutée, encouragée, soutenue. Maintenant ça y est, je suis au bout de la fameuse dernière ligne droite ! Une pensée particulière à Romain qui se retrouve dans cette même dernière ligne droite.

Bien sûr tout cela n'aurait pas été possible sans le soutien de mes parents, frères et sœur. Merci de m'avoir donné les moyens de réaliser mes études, de m'avoir poussée à dépasser mes limites. Me voilà Docteur et c'est grâce à vous !

Et pour finir, un merci particulier à Gaëtan, mon futur époux, pour avoir été à mes côtés durant ces trois années, pour t'être intéressé à mon projet de recherche même si au départ tu n'y comprenais rien, et pour avoir relu et corrigé mon manuscrit. Merci d'avoir géré le quotidien pour me permettre de me concentrer sur l'écriture de ce mémoire, sans toi je n'y serais pas arrivée. Je t'aime tout plein beaucoup à la folie !







## Résumé

*Plasmodium falciparum* (Pf) est un parasite intracellulaire capable d'infecter l'Homme. Dans les 48 heures après l'invasion des érythrocytes, il passe par le stade d'une cellule géante multinucléée qui se divise en 16 à 32 parasites. Cette multiplication rapide nécessite des mécanismes spécifiques de régulation très subtilement orchestrés. Parmi les modifications post-traductionnelles décrites chez les cellules eucaryotes, la phosphorylation réversible des protéines par les kinases/phosphatases est une des voies majeures dans la transduction des signaux cellulaires. Chez *Plasmodium*, des études de génétique inverse ont démontré que PfPP1, phosphatase majeure du parasite, est essentielle pour sa survie. L'activité de PP1 est connue pour être contrôlée par divers régulateurs endogènes. Cependant, malgré leur importance dans le ciblage de l'holoenzyme à un compartiment subcellulaire spécifique et/ou dans la régulation de son activité, peu de recherches ont été consacrées à l'identification de partenaires de PP1 chez Pf.

Dans le but d'approfondir nos connaissances sur la régulation de PfPP1 et son impact sur la biologie de Pf, nous étudions les partenaires de cette enzyme qui seraient impliqués dans le contrôle de la phosphatase. Nos recherches récentes, basées sur des études de génomique comparative, ont permis d'identifier quatre régulateurs de PfPP1 : PflRR1, Pfl3, Pfl2 et PflIF2 $\beta$ . Au-delà de la capacité de ces protéines à contrôler la fonction de PP1 *in vitro*, nous avons montré par génétique inverse que leur rôle est vital pour Pf. En parallèle, nous avons entrepris une démarche plus globale pour la recherche de nouveaux partenaires/régulateurs de PfPP1. Nous avons notamment réalisé un criblage par double hybride de levure (Y2H) où PfPP1 est utilisé comme appât.

Dans la première partie de ma thèse, nous avons analysé les clones obtenus en criblage Y2H et initié la caractérisation de plusieurs d'entre eux. La confirmation de leur interaction avec PfPP1 en Y2H, a permis d'isoler deux partenaires potentiels intéressants. Il s'agit de PF3D7\_0919900 et PF3D7\_1202600. PF3D7\_1202600 est un orthologue de Caliban chez la Drosophile, nous l'avons nommé CLP pour Caliban-Like Protein. Sa séquence protéique présente dix-sept motifs RVxF, connus pour être impliqués dans l'interaction avec PP1, et dont sept se situent dans le fragment obtenu suite au criblage (CLPf). Puis nous avons confirmé l'interaction de PfPP1 avec CLPf par différentes approches. Finalement, le rôle de CLPf sur l'activité de la phosphatase de PfPP1 a été étudié, et les résultats obtenus suggèrent que CLP serait un partenaire non régulateur de PfPP1.

Dans une seconde partie, nous avons caractérisé au niveau moléculaire et fonctionnel, la protéine PF3D7\_0919900, protéine spécifique du parasite. L'analyse de la séquence a montré la présence d'un motif RVxF, et de motifs RCC1 connus pour interagir avec des protéines. Ainsi elle a été nommée RCC-PIP pour Regulator of Chromosome Condensation - Phosphatase Interacting Protein. Nous avons confirmé la capacité du fragment de RCC-PIP (RCC-PIP<sub>fc</sub>) à interagir avec PfPP1, et montré que le motif RVxF est impliqué dans cette interaction. L'étude du rôle de RCC-PIP sur l'activité phosphatase de PP1 a révélé que RCC-PIP modulerait différemment cette activité lorsque celle-ci est testée *in vitro* ou dans un contexte cellulaire. Nous avons étudié les motifs RCC1 et leur interactome par la réalisation d'un criblage Y2H en utilisant ces motifs comme appât. Une kinase a été ainsi identifiée (PfCDPK7) suggérant que RCC-PIP aurait un rôle de plateforme capable d'interagir avec deux enzymes antagonistes. L'étude du rôle de RCC-PIP chez le parasite est actuellement en cours. La réalisation d'un Knock-In a démontré l'accessibilité du locus. Un Knock-Out a également été effectué, mais l'absence d'intégration du plasmide indique que RCC-PIP serait essentielle au parasite. Pour confirmer cette observation, un Knock-Out conditionnel chez *P. berghei* est en cours d'étude.

## Abstract

*Plasmodium falciparum* is an intracellular parasite that evolves in several stages of development in the vertebrate host. Within 48 h after the invasion of erythrocytes, it goes through the stage of a multinucleated giant cell which divides into as many parasites as nuclei (16-32 parasites). This fast cellular division requires specific regulatory mechanisms which are finely tuned. Reversible protein phosphorylation, regulated by the activity of several kinases and phosphatases, is one of the main post-translational modifications described in eukaryotic cells. In *Plasmodium*, PP1 is predicted to catalyze the majority of protein dephosphorylation events, and has been shown to be essential in its survival using reverse genetic approaches. The activity of PP1 is known to be tightly controlled by various endogenous regulators. However, despite their importance in targeting the holoenzyme to a specific subcellular compartment and/or regulating its activity, little has been devoted to identify PP1 partners in the parasite.

In order to increase our understanding on the regulation of PfPP1 and its impact on the biology of *Plasmodium*, we study the molecular partners of this enzyme which may be involved in the control of the location, specificity and activity of PfPP1. Based on comparative genomics, we have recently identified four regulators of PfPP1, namely PfLRR1, Pfl3, Pfl2 and PflF2 $\beta$ . In addition, since *Plasmodium* has a particular cell cycle and the function of PP1 should be adapted, we have undertaken a more global approach to search for new partners/regulators of PfPP1 using yeast two-hybrid (Y2H) screening where PfPP1 was used as bait.

In the first part of my thesis, several clones initially obtained in the Y2H screening were analyzed and characterized. The interaction between PfPP1 and two interesting potential partners, namely PF3D7\_0919900 Regulator of Chromosome Condensation - Phosphatase Interacting Protein (RCC-PIP) and PF3D7\_1202600 Caliban-Like Protein (CLP), was confirmed. Subsequently, we analyzed the CLP protein sequence, the ortholog of Caliban protein expressed by *Drosophila*, and designated it as Caliban-Like Protein (PfCLP). This protein has 17 potential RVXF binding motif, which is often involved in the interaction with PfPP1, and 7 of them are located in the fragment (CLPf) obtained following the Y2H screening. Then, using GST pull-down and immunoprecipitation, we confirmed the interaction between PfPP1 and CLPf. Finally, we investigated the phosphatase activity of PfPP1 with CLPf using pNPP *in vitro* assay, and results suggest that CLP would not be a PfPP1 regulator.

In the second part of the thesis, we have characterized the protein RCC-PIP, a parasite-specific protein. Like PfCLP, RCC-PIP shows the canonical binding motif RVXF, known to be involved in the interaction with PP1, and present on the fragment obtained following the Y2H screening. The sequence also has RCC1 motifs known to be involved in protein-protein interactions. The interaction between the fragment of RCC-PIP (RCC-PIPf) and PfPP1 was confirmed and the RVxF motif was found to be involved in this interaction. The study of the role of RCC-PIP on PP1 phosphatase activity showed that RCC-PIP may regulate PP1 activity differentially according to methodological approach used (in vitro vs in cellular context). We then tried to identify the partners of RCC1 domain by screening a cDNA library of *P. falciparum* using RCC1-containing protein as bait. We showed that RCC1 motifs of RCC-PIP are able to interact with a kinase (PfCDPK7) suggesting that RCC-PIP may act as a molecular platform since it is able to interact with two enzymes with opposed activities. Analysis of the role of RCC-PIP in the parasite is currently underway. The production of a Knock-In demonstrated the accessibility of the locus. A Knock-Out was also carried out, but the lack of integration of the plasmid suggests that RCC-PIP is essential to the parasite. To confirm this observation, a conditional Knock-Out of this gene in *P. berghei* is in progress.





## Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I. Le paludisme</b>	<b>3</b>
<b>A. Épidémiologie</b>	<b>3</b>
<b>B. L'agent responsable</b>	<b>3</b>
1) Découverte	3
2) Phylogénie et espèces de <i>Plasmodium</i> infectant l'Homme	4
3) Organisation du parasite	5
4) Génome, transcriptome et protéome	7
5) Cycle de développement et transmission du parasite	11
6) Symptômes et risques	17
7) Immunité acquise	19
8) Contournement du système immunitaire	20
9) Diagnostic	21
<b>C. La lutte contre le paludisme</b>	<b>22</b>
1) Eviter la transmission à l'Homme	23
2) Traitements curatifs	26
3) Les candidats vaccins	28
<b>D. Actions mondiales contre le paludisme.</b>	<b>31</b>
<b>II. La régulation post-traductionnelle chez Plasmodium</b>	<b>33</b>
<b>A. Différents mécanismes de régulation post-traductionnelle</b>	<b>33</b>
1) N- et O-glycosylation	33
2) Sumoylation	34
3) Ubiquitylation	35
4) Nitrosation	36
5) Glutathionylation	36
6) Acétylation	37
7) Méthylation	39
8) Lipidation	39
9) Phosphorylation	42
<b>B. Les kinases</b>	<b>43</b>
1) Les ePKs	43
2) Les aPKs	53
3) Les kinases spécifiques des apicomplexes	53
<b>C. Les phosphatases</b>	<b>53</b>
1) Les métallophosphatases	54
2) Les HaloAcide Déhalogénase-like	57
3) Les protéines tyrosine-phosphatases	58
4) Les Phosphatases Exonucléase-Endonucléases	59
5) Les histidines-phosphatases	59
6) Les protéines tyrosine-phosphatases-like	59
7) Les phosphatases orphelines	60
<b>III. PfPPP1 et ses partenaires/régulateurs</b>	<b>62</b>
<b>A. PfPPP1</b>	<b>62</b>
<b>B. Les régulateurs de PfPPP1</b>	<b>63</b>
1) PflRR1	63
2) Pfl2	64
3) Pfl3	65
4) PflF2β	65

<b>Cadre et objectifs</b>	<b>71</b>
<b>Résultats</b>	<b>75</b>
<b>I. Identification des partenaires de PfPP1 et caractérisation de CLP</b>	<b>77</b>
<b>A. Identification de l'interactome de PfPP1 par criblage en double hybride de levure</b>	<b>77</b>
1) Analyse globale de l'interactome de PfPP1	77
2) Analyse des interactions RVxF dépendantes choisies	80
3) Analyse des interactions RVxF indépendantes choisies	80
4) Confirmation de l'interaction en double hybride de levure	81
<b>B. Initiation de la caractérisation de PF3D7_1202600</b>	<b>82</b>
1) Analyse de la séquence de PF3D7_1202600	82
2) Etude de l'interaction de CLP avec PfPP1	83
3) Rôle de CLP sur l'activité phosphatase de PP1	89
<b>II. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de PF3D7_0919900, nouveau partenaire de PfPP1</b>	<b>92</b>
<b>A. Analyse et confirmation de la séquence de PF3D7_0919900</b>	<b>92</b>
1) Analyse de la séquence	92
2) Confirmation de la séquence codante	94
<b>B. Interaction de RCC-PIPf avec PfPP1, et implication du motif RVxF</b>	<b>95</b>
1) Etude de l'interaction en double hybride de levure	95
2) Etude de l'interaction avec PfPP1 par GST pull-down	98
3) Immunoprécipitation	99
4) Test de type ELISA <i>in vitro</i>	101
<b>C. Fonction de RCC-PIPfc sur la phosphatase et implication du motif RVxF</b>	<b>103</b>
1) Test pNPP	103
2) L'ovocyte de Xénope	103
<b>D. Identification de l'interactome des motifs RCC1</b>	<b>105</b>
1) Criblage de banque en double hybride de levure	105
2) Analyse de la séquence protéique de CDPK7	106
3) Confirmation de l'interaction entre les motifs RCC1 de RCC-PIP et PfCDPK7f par GST pull-down	106
<b>E. Etude de RCC-PIP chez le parasite</b>	<b>108</b>
1) Knock-In chez <i>P. falciparum</i>	108
2) Knock-Out chez <i>P. falciparum</i>	109
3) Knock-Out conditionnel chez <i>P. berghei</i>	110
<b>F. Etude de la localisation de RCC-PIP chez Plasmodium</b>	<b>113</b>
1) Localisation de RCC-PIP chez <i>P. falciparum</i>	113
2) Localisation de RCC-PIP chez <i>P. berghei</i>	115
<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>119</b>
<b>I. Matériel</b>	<b>121</b>
<b>A. Plasmides</b>	<b>121</b>
<b>B. Amorces et constructions</b>	<b>121</b>
<b>C. Anticorps</b>	<b>126</b>
<b>II. Méthodes</b>	<b>126</b>
<b>A. Réalisation des constructions</b>	<b>126</b>
1) Les sources d'ADN	126
2) Réalisation des constructions par recombinaison homologue	127
3) Clonage en kit TOPO TA-cloning	127

4)	Mutagenèse dirigée par PCR _____	127
<b>B.</b>	<b>Double hybride de levure _____</b>	<b>128</b>
1)	Souches de levures, constructions et transformation _____	128
2)	Criblage de la banque d'ADNc de <i>P. falciparum</i> , et séquençage des clones obtenus _____	128
3)	Interaction en double hybride de levure _____	129
4)	Vérification de la production des protéines _____	129
<b>C.</b>	<b>Expression des protéines recombinantes _____</b>	<b>130</b>
1)	Protéines tagguées 6His _____	130
2)	Protéines tagguées GST _____	131
3)	Production sérums dirigés contre RCC-PIP et CLP _____	132
<b>D.</b>	<b>Tests d'interactions _____</b>	<b>133</b>
1)	En bactérie _____	133
2)	GST pull-down _____	133
3)	Immunoprécipitation _____	133
4)	Test de type ELISA _____	134
<b>E.</b>	<b>Activité sur la phosphatase _____</b>	<b>135</b>
1)	Test pNPP _____	135
2)	En ovocytes de Xénope _____	135
<b>F.</b>	<b>Génétique inverse _____</b>	<b>136</b>
1)	<i>P. falciparum</i> _____	136
2)	<i>P. berghei</i> _____	137
<b>G.</b>	<b>Localisation chez le parasite _____</b>	<b>139</b>
1)	Par l'utilisation d'un vecteur épisomal _____	139
2)	Par immunohistochimie _____	139
3)	Par immunofluorescence _____	140
	<b>Discussion et Perspectives _____</b>	<b>143</b>
<b>I.</b>	<b>Identification des partenaires de PfPP1 _____</b>	<b>147</b>
<b>A.</b>	<b>Analyse des interactions RVXF indépendantes _____</b>	<b>147</b>
<b>B.</b>	<b>Analyse des interactions RVXF dépendantes _____</b>	<b>148</b>
<b>C.</b>	<b>Etude de Caliban-Like Protein _____</b>	<b>149</b>
1)	Analyse de la séquence et potentiel rôle de CLP sur PfPP1 _____	149
2)	Fonction de CLPf sur l'activité de la phosphatase _____	151
<b>II.</b>	<b>Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de RCC-PIP _____</b>	<b>152</b>
<b>A.</b>	<b>Caractérisation moléculaire de RCC-PIP _____</b>	<b>152</b>
1)	Analyse <i>In silico</i> _____	152
2)	Vérification de l'existence du transcrit de RCC-PIP chez <i>Plasmodium</i> _____	154
<b>B.</b>	<b>Etude de l'interaction RCC-PIP/PfPP1 et implication du motif RVxF _____</b>	<b>154</b>
<b>C.</b>	<b>Fonction de RCC-PIP sur l'activité de PfPP1, et implication du motif RVxF _____</b>	<b>156</b>
<b>D.</b>	<b>Interactome des motifs RCC1 _____</b>	<b>157</b>
<b>E.</b>	<b>Le rôle de RCC-PIP chez <i>Plasmodium</i> et sa localisation _____</b>	<b>160</b>
1)	Chez <i>P. falciparum</i> _____	160
2)	Chez <i>P. berghei</i> _____	162
<b>F.</b>	<b>Localisation chez <i>Plasmodium</i> _____</b>	<b>164</b>
	<b>Bibliographie _____</b>	<b>169</b>
	<b>Annexes _____</b>	<b>199</b>



## Liste des figures

Figure 1: Représentation du nombre de cas de paludisme pour 1 000 habitants dans le monde (OMS, RAPPORT DE 2014) .....	3
Figure 2: Organisation d'un mérozoïte de <i>Plasmodium falciparum</i> (COWMAN ET CRABB 2006). 6	
Figure 3: Cycle complet de <i>Plasmodium</i> (tiré du site internet de CDC Safer Healthier people) .....	11
Figure 4 : Cycle asexué de <i>P. falciparum</i> .....	14
Figure 5 : Les différents stades de développement des gamétocytes (d'après (JOSLING ET LLINAS 2015)). .....	15
Figure 6 : Schématisation de la glycosylation. A) N-glycosylation. B) O-glycosylation (JASPARD, 2005). .....	33
Figure 7 : Schématisation de la sumoylation (ISSAR ET AL. 2008). .....	35
Figure 8: Schématisation d l'ubiquitylation (source: Wikipédia). .....	36
Figure 9: Schématisation de la S-glutathionylation (source dbGSH). .....	37
Figure 10 : Schématisation du rôle des HAT et HDAC connues chez <i>P. falciparum</i> . .....	38
Figure 11 : Schématisation de la phosphorylation (source: UC Davis Chemwiki) .....	42
Figure 12 : Vérification de la production en levure des six partenaires potentiels de PfPP1 et de PfPP1 elle-même .....	82
Figure 13 : Schéma de la protéine PF3D7_1202600 ou CLP .....	83
Figure 14 : Interaction entre CLPf et PfPP1 par co-expression en bactérie.....	84
Figure 15 : Production de CLPf-6His et CLPf-GST .....	85
Figure 16: Interaction entre CLPf et PfPP1 par GST pull-down.....	86
Figure 17: Vérification de la reconnaissance de la protéine recombinante CLPf par le sérum anti-CLPf .....	87
Figure 18 : Immunoprécipitation de CLPf et PfPP1 .....	88
Figure 19: Tests d'interaction in vitro de type ELISA entre PfPP1 et la protéine CLPf.....	89
Figure 20 : Test d'activité de type pNPP in vitro. Rôle de CLPf sur l'activité phosphatase de PfPP1 en fonction de la quantité de protéine CLPf.....	90
Figure 21: Effet de CLPf sur la GVBD des ovocytes de Xénope .....	90
Figure 22: Analyse de la séquence protéique de PF3D7_0919900.....	92
Figure 23: Alignements des séquences consensus des motifs RCC1 et RCC1_2 avec ceux de la protéine PF3D7_0919900. ....	93
Figure 24: Modélisation des motifs RCC1 et RCC1_2 de PF3D7_0919900 (AA 140 à 424), à partir de la structure des motifs RCC1 de la protéine RCC1 humaine (NC_000001.11) ( <a href="https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi">https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi</a> ).....	93
Figure 25: Vérification de la séquence codante du gène RCC-PIP par la réalisation de PCRs par chevauchement sur une RT de <i>P. falciparum</i> . ....	95
Figure 26: Implication du motif RVxF dans l'interaction entre RCC-PIPf et PfPP1 en double hybride de levure .....	97
Figure 27: Vérification de l'expression des protéines PfPP1, RCC-PIPf WT et RCC-PIPf- <sup>980</sup> KSASA <sup>984</sup> en levure. ....	97

Figure 28: Production des protéines recombinants RCC-PIPfc tagguées -6His ou -GST.....	98
Figure 29: Interaction entre RCC-PIPfc et PfPP1 par GST pull-down .....	99
Figure 30 : Reconnaissance des protéines recombinantes RCC-PIPfc WT et mutée par le sérum anti-RCC-PIPfcf .....	100
Figure 31: Interaction entre RCC-PIPfc et PfPP1, et implication du motif RVxF par immunoprécipitation. ....	101
Figure 32 : Test d'interaction de type ELISA entre PfPP1 et RCC-PIPfc WT ou RCC-PIPfc- <sup>980</sup> KSASA <sup>984</sup> .....	101
Figure 33: Test d'interaction de type ELISA entre PfPP1 et les différentes protéines de RCC-PIPfc.....	102
Figure 34 : Rôle de RCC-PIPfc- <sup>980</sup> KSASA <sup>984</sup> sur l'activité phosphatase de PfPP1 par test pNPP .....	103
Figure 35: Effet de RCC-PIPf sur la GVBD des ovocytes de Xénope. ....	104
Figure 36: Interaction entre PfCDPK7 et les motifs RCC1 (RCC) de RCC-PIP.....	106
Figure 37 : Schéma des différents domaines de PfCDPK7 .....	106
Figure 38: Expression des protéines RCC-6His et CDPK7f-GST. ....	107
Figure 39 : Interaction entre RCC et PfCDPK7 par GST pull-down.....	107
Figure 40 : Knock-In de RCC-PIP chez <i>P. falciparum</i> . ....	109
Figure 41 : Knock-Out de RCC-PIP chez <i>P. falciparum</i> . ....	110
Figure 42 : Réalisation du Knock-Out conditionnel de RCC-PIP chez <i>P. berghei</i> .....	112
Figure 43: Localisation de RCC-PIP par immunohistochimie chez <i>P. falciparum</i> .....	114
Figure 44: Localisation de RCC-PIP chez <i>P. falciparum</i> .....	114
Figure 45: Localisation de RCC-PIP chez <i>P. berghei</i> par immunofluorescence.....	115
Figure 46 : Schéma de fonctionnement de l'interaction en double hybride de levure.....	129
Figure 47 : Principe du test de type ELISA.....	135
Figure 48: Modélisation 3D des motifs RCC1 .....	153
Figure 49: Lien entre RCC-PIP et ses partenaires .....	159
Figure 50 : Systèmes de Knock-Out conditionnel chez <i>P. falciparum</i> .....	161
Figure 51 : Knock-Out par CRISPR-Cas9. Pour cela, deux plasmides sont transfectés. ....	162
Figure 52 : Système GOMO chez <i>P. berghei</i> .....	164

## Liste des tableaux

Tableau 1: Familles et nom des différents insecticides utilisés pour éradiquer le vecteur du paludisme. ....	24
Tableau 2: Chimio prophylaxies disponibles pour les voyageurs. ....	26
Tableau 3: Les différentes classes d'antipaludiques (adapté de (ANTONY ET PARIJA 2016)). ..	27
Tableau 4: Les protéines kinases putatives de <i>P. falciparum</i> . ....	52
Tableau 5: Les différentes phosphatases de <i>P. falciparum</i> . En gras sont représentées les phosphatases caractérisées (GUTTERY ET AL. 2014). ....	61
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des clones issus du criblage en double hybride de levure d'une banque d'ADNc en utilisant PfPP1 comme appât, et dont l'étude a été initiée.....	79
Tableau 7: Confirmation des interactions observées lors du criblage de la banque d'ADNc de <i>P. falciparum</i> avec PfPP1 comme appât en double hybride de levure.....	81
Tableau 8 : Liste des amorces utilisées durant ces travaux .....	122

## Liste des annexes

Annexe 1 : Analysis of the interactome of the Ser/Thr Protein Phosphatase type 1 in <i>Plasmodium falciparum</i> .....	199
Annexe 2 : Séquence protéique de CLP.....	216
Annexe 3 : Alignement entre CLP et Caliban.....	217
Annexe 4 : Séquence protéique de RCC-PIP.....	218
Annexe 5 : Positionnement des amorces pour la réalisation des PR par chevauchement sur de l'ADN rétro-transcrit.....	219
Annexe 6 : Alignement entre PfRCC-PIP et PbRCC-PIP.....	222





# Introduction



## I. Le paludisme

### A. Épidémiologie

Le paludisme, encore appelé malaria, est la première endémie parasitaire au monde. En 2015, elle a causé environ 214 millions de cas et 438 000 décès dans le monde. Il est à noter que 25 % des décès des enfants de moins de 5 ans en Afrique sont dus au paludisme. Cette parasitose touche essentiellement l'Afrique subsaharienne, et dans une moindre mesure l'Asie et l'Amérique du Sud (**Figure 1**). Un parallèle a été établi entre le revenu par habitant et l'incidence du paludisme. En effet, les pays ayant un faible revenu par habitant sont les plus touchés. Cela s'explique par le fait que ces populations n'ont peu ou pas accès aux mesures préventives. Ainsi, à ce jour, presque la moitié de la population mondiale présente un risque d'être infectée par le parasite (**RAPPORTS DE L'OMS 2014 ET 2015**).

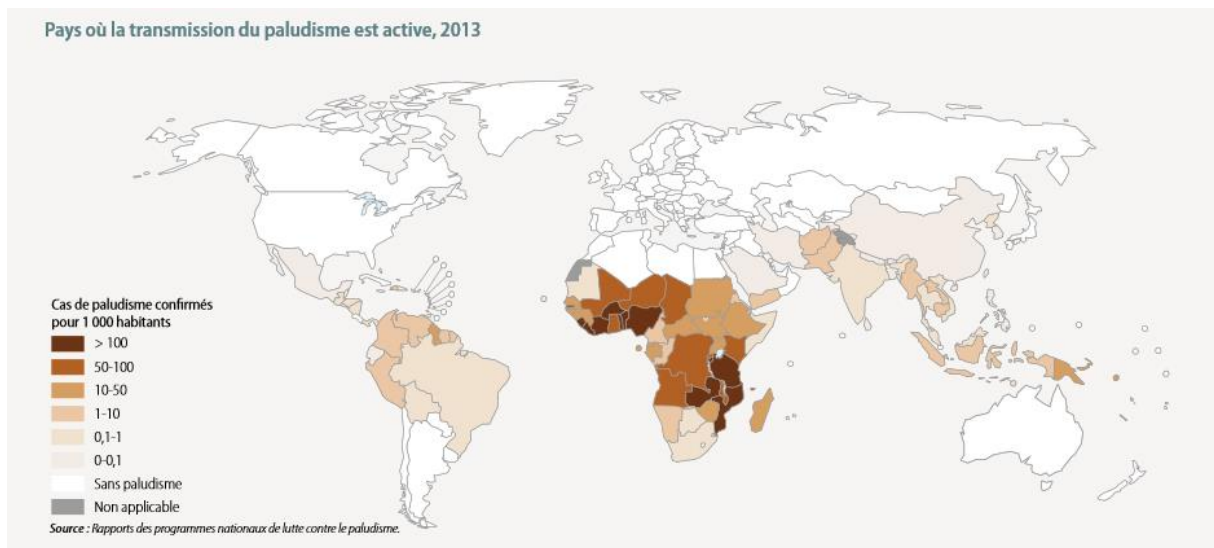


Figure 1: Représentation du nombre de cas de paludisme pour 1 000 habitants dans le monde (OMS, RAPPORT DE 2014)

### B. L'agent responsable

#### 1) Découverte

L'observation de fortes fièvres, souvent mortelles, remonte à plusieurs siècles. Elles auraient provoqué la mort de personnages célèbres tels que Toutankhamon (1 327 avant J.C) (**HAWASS ET AL. 2010**), ou Alexandre le Grand en 323 avant J.C. Au IV<sup>ème</sup> siècle avant J.C, Hippocrate de Cos fit les premières observations sur les symptômes de cette maladie. Il décrit, entre autres, les fièvres intermittentes, l'affaiblissement de l'organisme et la splénomégalie. Il pensait que ces symptômes étaient causés par le mauvais air des marais. Ainsi cette maladie est nommée malaria, qui provient de la fusion de deux mots italiens : *mala* et *aria* qui signifient respectivement mauvais et air, ou encore paludisme, terme apparu en 1857, qui tient son origine du latin *palus* qui se traduit par marais.



Au fil des siècles, l'air putride des marais persista dans les esprits comme étant la cause du paludisme. Dans les années 1800, J.C Boudin propose même de nommer les fièvres intermittentes du paludisme : intoxication des marais. Ce n'est qu'en 1880 que le français Charles Laveran observe que les fièvres palustres sont dues à la présence dans le sang d'un parasite. Il y consacra d'ailleurs un ouvrage intitulé : *Traité des fièvres palustres*, qu'il publia en 1884. Le parasite responsable du paludisme sera classé dans le genre *Plasmodium* en 1883 (VAUCCEL ET FERON 1968). Les deux noms associés à cette parasitose : malaria et paludisme, ne désignent donc pas la cause de la maladie mais l'origine de celle-ci.

Une fois la cause de la maladie déterminée, les chercheurs se sont penchés sur le mode de transmission du parasite dans le but de pouvoir lutter contre celui-ci. En 1897, le Dr Ronald Ross découvre que *Plasmodium* est inoculé à l'Homme via le moustique. Puis le Pr Giovanni Battista Grassi observe en 1899, que seuls les moustiques du genre *Anopheles* sont capables de transmettre le parasite à l'Homme (TUTEJA 2007). Cela lui vaudra d'ailleurs le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1902.

## 2) Phylogénie et espèces de *Plasmodium* infectant l'Homme

*Plasmodium* appartient à l'embranchement des *apicomplexa* qui sont des protozoaires unicellulaires appartenant au règne des *chromalveata* et au sous-règne des alvéolés. Parmi les apicomplexes, parasites intracellulaires obligatoires, sont retrouvés les agents responsables de la toxoplasmose, de la cryptosporidiose et du paludisme (ADL ET AL. 2005; ADL ET AL. 2007; DACKS, WALKER, ET FIELD 2008).

Il existe des centaines d'espèces de *Plasmodium* capables d'infecter différents organismes tels que les reptiles, les oiseaux et les mammifères. Cinq d'entre elles sont transmissibles à l'Homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* sont les quatre espèces majoritaires. A celles-ci s'ajoute *P. knowlesi* qui a été montrée, depuis peu, comme étant capable d'infecter l'Homme dans le sud-est de l'Asie. Habituellement *P. knowlesi* est observé chez les macaques à longue queue et les macaques à queue de cochon (AHMED ET COX-SINGH 2015). Ces cinq espèces de *Plasmodium* diffèrent au niveau de leur distribution géographique, de leur morphologie, de la réaction immunitaire qu'elles provoquent, de leur réponse aux traitements, etc... (TUTEJA 2007). Il est à noter que *P. falciparum* est l'espèce la plus virulente et la plus répandue en Afrique, tandis que *P. vivax* est l'espèce possédant la plus grande prévalence en dehors du continent africain.

Cependant, quelle que soit l'espèce de *Plasmodium*, le parasite est transmis uniquement par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Quatre-cent soixante-quatre espèces de ce moustique sont recensées et seules soixante-huit sont capables de transmettre le paludisme à l'Homme. Parmi celles-ci, trente sont majoritaires, notamment *Anopheles gambiae* qui est responsable de la plupart des cas de malaria en Afrique (TUTEJA 2007).

### 3) Organisation du parasite

Les apicomplexes se caractérisent par la présence d'un apicoplaste, qui représente le vestige de l'endosymbiose d'une algue rouge par l'ancêtre des apicomplexes (**Figure 2**). Il serait, en fait, l'homologue du chloroplaste des plantes et algues (**GARDNER ET AL. 2002; KEELING 2009; SATO 2011**). Cet organite est impliqué dans la synthèse des isoprénoïdes précurseurs (**JOMAA ET AL. 1999**), de l'hème (**SATO ET WILSON 2002**), des complexes de sulfure de fer (**NAGARAJ ET AL. 2009**), ainsi que des voies anaboliques de la synthèse des acides gras (**GORNICKI 2003**). D'ailleurs, l'inhibition de cette synthèse entraîne une inhibition de la croissance de *Plasmodium in vitro* et *in vivo* (**SUROLIA ET SUROLIA 2001**). L'apicoplaste semble avoir également un rôle clé pour les apicomplexes puisque l'inhibition de la synthèse des protéines plastidiales est létale pour *Toxoplasma* (**FICHERA ET ROOS 1997**). De plus, McConkey et collaborateurs ont démontré que le génome plastidial est essentiel au stade érythrocytaire de *Plasmodium* par l'utilisation d'inhibiteur de la synthèse des protéines plastidiales (**McCONKEY, ROGERS, ET MCCUTCHAN 1997**).

Par ailleurs, le phylum des apicomplexa se différencie des autres organismes par la présence, entre autres, d'organites sécréteurs tels que les rhoptries, les micronèmes et les granules denses qui se trouvent au pôle apical du parasite (**Figure 2**). Il apparaît que chacun de ces organites possède un rôle particulier. Cependant, malgré le fait que ces organites soient conservés chez les apicomplexes, leur contenu est totalement différent d'une espèce à l'autre (**BAUM ET AL. 2008**). Par exemple, les micronèmes de *Plasmodium* participent à la mobilité du parasite ainsi qu'à la reconnaissance et l'adhésion à la cellule hôte, tandis que la paire de rhoptries intervient dans l'infection de la cellule hôte et la formation de la vacuole parasitophore. Ces deux organites ont également un rôle dans la protection du parasite vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte (**TUTEJA 2007**). En effet, les récepteurs impliqués dans l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes infectieux ainsi que l'invasion du foie par les sporozoïtes, sont contenus dans les micronèmes ou les rhoptries, avant d'être exposés à la surface du parasite lors du contact avec la cellule cible. Le fait que les récepteurs soient contenus dans ces organites le plus longtemps possible permet au parasite d'échapper au système immunitaire en limitant l'exposition aux anticorps (**TUTEJA 2007**).

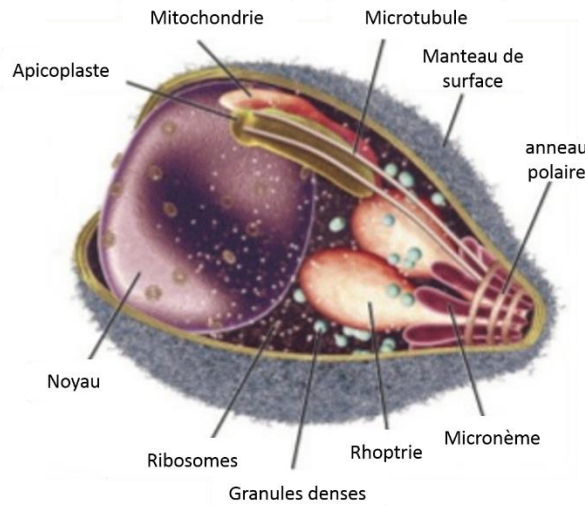


Figure 2: Organisation d'un mérozoïte de *Plasmodium falciparum* (COWMAN ET CRABB 2006).

Le troisième organite retrouvé chez les apicomplexes correspond aux granules denses (Figure 2). Ils sont présents en grand nombre, environ une cinquantaine, et uniquement pendant l'invasion de la cellule hôte, puisqu'ils sont excrétés après celle-ci. Ils sont impliqués dans l'établissement et le développement de la vacuole parasitophore et le remodelage de la cellule hôte (BAUM ET AL. 2008). Chez *Toxoplasma*, il semblerait que les granules denses soient le lieu d'une voie de sécrétion constitutive de protéines. Celle-ci se déroule au pôle apical du parasite, au niveau de la fusion de la membrane de la granule dense avec celle de la vacuole parasitophore (BAUM ET AL. 2008). Néanmoins, ce n'est pas la seule période de sécrétion des protéines de cet organite puisqu'elle est également observée lors de la formation de la vacuole parasitophore. Les protéines de *Toxoplasma* et *Plasmodium*, excrétées par les granules denses, possèdent un peptide signal qui permet de les adresser à la vacuole parasitophore. Et il a été démontré que la présence de ce peptide signal permet à n'importe quelle protéine soluble, y compris celles qui proviennent d'autres organites, d'être ciblée à la vacuole parasitophore (BURGHAUS ET LINGELBACH 2001).

Depuis peu, un quatrième organite sécréteur chez *Plasmodium* a été identifié, il s'agit de l'exonème qui est présent au moins au stade mérozoïte du parasite (YEOH ET AL. 2007; JANSE ET WATERS 2007). Il ressemble aux granules denses, mais il est excrété dans la vacuole parasitophore afin de participer à la rupture du globule rouge infecté. La sortie du mérozoïte implique l'action de protéases qui se trouvent dans l'exonème, dont SUB1. Cette dernière est exprimée uniquement lors de la libération des mérozoïtes. Pour cela, elle est d'abord activée dans l'exonème avant d'être exportée dans la vacuole parasitophore où elle digère et stimule d'autres protéases (YEOH ET AL. 2007; JANSE ET WATERS 2007).

Les apicomplexes se démarquent du reste des alvéolés par différentes caractéristiques. La première est leur façon de se mouvoir. En effet, les alvéolés utilisent un flagelle ou des cils, tandis que les apicomplexes se déplacent par glissement grâce à ce que l'on appelle le glidosome (FRANCIA, DUBREMETZ, ET MORRISSETTE 2015). Ce type de mouvement permet au parasite de traverser les différentes barrières biologiques et d'entrer dans le globule rouge sans provoquer la lyse de celui-ci, puis d'en ressortir (KEELEY ET SOLDATI

2004). Le glissement impliquant le glidéosome entraîne : l'assemblage/désassemblage du complexe moteur de myosine, la polymérisation de courts filaments d'actine, et un apport en énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate) (DAHER ET SOLDATI-FAVRE 2009).

Une autre particularité de *Plasmodium* concerne l'absence de centriole, mais qui est compensée par la présence des centres d'organisation des microtubules (MTOC= MicroTubule Organizing Centers) qui vont mettre en place les fuseaux mitotiques. Les MTOC sont connus comme étant la plaque centriolaire qui se situe dans l'enveloppe nucléaire, où ils vont permettre la constitution de l'unique flagelle de *Plasmodium* observé au stade de gamécyte. Celui-ci est constitué de neuf doublets de microtubules en périphérie et d'une paire centrale de microtubules (FRANCIA, DUBREMETZ, ET MORRISSETTE 2015).

#### 4) Génome, transcriptome et protéome

##### a) Le génome

Le génome de *P. falciparum* a été entièrement séquencé en 2002 par Gardner et collaborateurs (GARDNER ET AL. 2002). Cela ne s'est pas fait sans difficulté du fait de la grande richesse du génome en Adénine et Thymidine, qui représentent 80.6 % des nucléotides. Ce nombre peut s'élever jusqu'à 90 % dans les régions intergéniques et les introns. Le génome de *Plasmodium* est haploïde et est constitué de 22.8 mégabases (Mb) réparties sur quatorze chromosomes de tailles variables (entre 0.643 Mb et 3.29 Mb). Sur ces chromosomes se trouvent 5 300 gènes codant pour des protéines, et 54 % d'entre eux possèdent des introns (HALL ET AL. 2005). Environ 60 % des gènes possèdent des orthologues parmi les espèces de *Plasmodium*. Les gènes les plus conservés semblent se situer principalement sur les régions centrales des chromosomes, tandis que les gènes codant pour des protéines spécifiques se situent essentiellement sur les régions sub-téломériques. C'est le cas des gènes appartenant aux familles de gènes *var*, *rif* et *stevor*, qui codent pour des variants d'antigène de surface qui seront exportés à la surface des globules rouges (HALL ET CARLTON 2005).

En supplément du génome nucléaire, *Plasmodium* possède un génome mitochondrial linéaire d'environ 6 kb mais qui ne code pas pour des ARN de transfert (ARNt). Ainsi la mitochondrie est dans l'obligation d'importer les ARNt nécessaires à la synthèse de protéines à partir du cytoplasme (GARDNER ET AL. 2002).

Enfin, le parasite contient également un génome plastidial circulaire de 35 kb (GARDNER ET AL. 2002). Il y aurait soixante ORFs (Open Reading Frame) (LLINAS ET DERISI 2004) mais selon Gardner et al, seulement trente protéines seraient produites. La faible quantité de protéines produites n'est pas due à un défaut d'ARNt puisque le génome de l'apicoplaste semble coder pour suffisamment d'ARNt pour synthétiser les protéines qui lui sont nécessaires (GARDNER ET AL. 2002). Pour pallier à cette faible quantité de protéines produites, environ huit-cents protéines codées par le noyau seraient destinées à l'apicoplaste, soit 10 % des protéines nucléaires. Ces protéines diffèrent de celles restant dans le noyau par le fait qu'elles possèdent une pré-séquence bipartite en Nt constituée d'un peptide signal et d'un

peptide de transit. Ces peptides sont spécifiques et indispensables et permettent de cibler ces protéines à l'apicoplaste, mais seront clivés une fois que la protéine sera arrivée à destination (WALLER ET AL. 2000).

## b) Le transcriptome

Chez *Plasmodium*, les génomes nucléaire, plastidial et mitochondrial sont transcrits en ARN, néanmoins, il n'y a que la transcription du génome nucléaire et plastidial qui soit étudiée.

### o La régulation de la transcription

Les gènes nucléaires sont séparés par des régions intergéniques non transcrites (UTR) en 5' et 3', ainsi que des régions promotrices putatives situées en amont de la région 5'UTR. Cette organisation est typique d'une transcription monocistronique des gènes. Ce mécanisme implique des ARN polymérases de type I, II et III qui sont similaires à celles des eucaryotes, et il semblerait que le processus se déroule de la même manière. Cependant, la régulation de la transcription fonctionne différemment de celle des eucaryotes (HUGHES ET AL. 2010).

Il est à noter que 80 % des ORFs présentent un changement au niveau de l'abondance de leur transcrit pendant la maturation du parasite dans le globule rouge (BEN MAMOUN ET AL. 2001; BOZDECH ET AL. 2003; LE ROCH ET AL. 2003). De cette façon, les gènes sont uniquement activés lorsque leur fonction biologique est nécessaire et dans un ordre précis. Les premiers gènes transcrits sont impliqués dans les processus cellulaires comme la synthèse des protéines, tandis que les derniers gènes transcrits ont plutôt un rôle dans les fonctionnalités spécifiques de *P. falciparum*, notamment dans l'invasion des globules rouges. L'expression stade-spécifique des gènes est valable pour la grande majorité d'entre eux, la minorité restante est constituée de gènes exprimés constitutivement (BOZDECH ET AL. 2003). Par ailleurs, Llinàs et collaborateurs ont démontré que l'expression des gènes se faisait en une cascade continue qui se déroule sur une période de 48 h, ce qui correspond au temps nécessaire au déroulement d'un cycle de multiplication de *P. falciparum* (LLINAS ET DERISI 2004). Il se pourrait que, durant le cycle de développement du parasite, les promoteurs de gènes soient occupés par des complexes de pré-initiation de la transcription « en attente » afin d'être en mesure de la démarrer au moment voulu (HUGHES ET AL. 2010).

La régulation de la transcription se fait à plusieurs niveaux. Tout d'abord, le faible nombre de promoteurs identifiés chez *P. falciparum* suggère que des facteurs de transcription avec des sites de chevauchement spécifiques apportent un caractère mécanique de contrôle de la transcription (HALL ET CARLTON 2005). A cela s'ajoute le fait qu'il y ait peu de facteurs de transcription retrouvés chez le parasite. Il existe néanmoins une famille de facteurs de transcription spécifiques des Apicomplexes, la famille ApiAP2, qui semble impliquée dans la régulation de l'expression des gènes à tous les stades de développement du parasite (PAINTER, CAMPBELL, ET LLINAS 2011). La régulation de la transcription peut aussi s'effectuer grâce à des modifications de la chromatine et plus particulièrement des histones. En effet, les histones sont responsables de la compaction de la chromatine grâce à la

formation de nucléosomes. Lorsque l'ADN est compacté, c'est-à-dire sous forme d'hétérochromatine, il est inaccessible aux facteurs de transcription, tandis que sa forme décondensée, l'euchromatine, permet la fixation de ces facteurs à l'ADN et donc la transcription des gènes. La régulation de l'expression des gènes par changement de la condensation de la chromatine implique deux mécanismes différents. Le premier mécanisme consiste à modifier épigénétiquement la queue N terminale des histones par modifications post-traductionnelles, dont certaines sont décrites dans la partie II. A. de l'introduction de cette thèse. Le second mécanisme de modification de la condensation de la chromatine s'effectue par l'incorporation de variants (COLEMAN ET DURASINGH 2008). L'exemple le plus décrit est celui des gènes *var* qui sont exprimés de manière mutuellement exclusive. Ces gènes sont constitutivement silencieux, et l'activation de l'un tout comme la répression des autres sont effectuées grâce à la modification post-traductionnelle des queues Nt des Histones dans les régions 5' UTR en amont du gène, ainsi que dans le premier intron (GUIZETTI ET SCHERF 2013). Ce type de régulation est également retrouvé pour certains gènes de la famille des antigènes *rifins*. Il est tout de même à noter qu'une partie du génome de *P. falciparum* est maintenu dans un état euchromatique, potentiellement permissif pour la transcription et l'hétérochromatine semble avoir un rôle spécialisé pour la régulation des gènes codant pour les variants d'antigènes (DUFFY ET AL. 2012).

En ce qui concerne la transcription des gènes plastidiaux, très peu de choses sont connues à leur sujet chez *Plasmodium* (NISBET ET MCKENZIE 2016). Néanmoins, les cinq sous-unités de l'ARN polymérase plastidiale ont été identifiées, il s'agit de deux *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* et *rpoD*. Il s'avère que la transcription des gènes de l'apicoplaste est polycistronique, d'ailleurs, le plus long transcrit observé a une taille de 15 kb, soit 45 % du génome de l'apicoplaste. Les premières transcriptions permettent l'ARN des sous-unités ribosomique et des ARN de transfert.

#### o La régulation post-transcriptionnelle

Le second niveau de régulation du taux d'expression des protéines se situerait au niveau post-transcriptionnel. Cette régulation peut être due au fait qu'il n'y ait qu'un petit nombre de protéines associées à la transcription des ARNm (HALL ET CARLTON 2005). La régulation post-transcriptionnelle se fait via la répression traductionnelle des ARNm pendant le développement sexuel. Et il semblerait qu'un motif de 47 bases en 3' dans la région non transcrite soit impliqué dans ce processus (HALL ET AL. 2005).

Cette régulation post-transcriptionnelle implique également la stabilité des ARNm qui permet à la traduction d'avoir lieu quand cela est nécessaire (VEMBAR, DROLL, ET SCHERF 2016). Il a été démontré que la demi-vie des ARNm varie entre 1 et 138 min, avec une période qui est de plus en plus longue au fur et à mesure de l'avancée du cycle de multiplication du parasite. La stabilité de l'ARNm dépend notamment de la coiffe qui est ajoutée en 5' de l'ARN et est indispensable à la traduction de celui-ci, et par l'ajout d'une queue polyA en 3'. L'absence de la queue polyA entraîne une dégradation de l'ARNm par l'exosome, dont les



membres ne sont pas encore bien définis chez *Plasmodium*. La stabilité de l'ARNm pourrait également être régulée par d'autres facteurs trans-activateurs tels que les régulateurs d'épissage (PfSR1 Serine/Arginine-rich protein 1) dont le mécanisme d'action n'est pas connu.

### c) Le protéome

L'étude du génome de *Plasmodium* par Gardner et al prédisait l'existence de 5 268 protéines, dont 51 % seraient des protéines hypothétiques. Et pour 60 % d'entre elles, il n'y aurait pas d'homologue chez les autres organismes, ce qui ne permet pas de leur assigner une fonction (GARDNER ET AL. 2002). L'étude du protéome de *Plasmodium* a mis en évidence que 5 % des protéines ont des similarités significatives avec des protéines hypothétiques d'autres organismes, que 31 % des protéines possèdent un ou plusieurs domaines transmembranaires, et que 17.3 % ont un peptide signal ou d'ancrage putatif. Sur les 5 268 protéines prédites, environ 14 % sont identifiées comme étant des enzymes, ce qui est assez peu comparé aux 25 % ou 33 % des bactéries et archées. Mais il se peut qu'elles ne soient pas toutes identifiées (GARDNER ET AL. 2002).

Les protéomes des différents stades de *Plasmodium* ont été étudiés par Florens et al en 2002 (FLORENS ET AL. 2002). Il est ressorti de leurs recherches que le protéome des sporozoïtes est différent de celui des autres stades puisque la moitié des protéines exprimées sont spécifiques à ce stade. En revanche, pour les autres stades (mérozoïtes, trophozoïtes et gamétocytes), il y a entre 20 et 30 % de protéines stade-spécifiques. Cependant, il n'y a que 6 % des protéines qui soient exprimées constitutivement, et ce sont essentiellement des protéines ribosomales, des facteurs de transcription, des histones et des protéines du cytosquelette (FLORENS ET AL. 2002).

*Plasmodium* requière une traduction des protéines à un temps précis. Pour cela, la traduction est finement régulée par différents mécanismes. Le premier mécanisme implique les ARN ribosomiaux (ARNr). En effet, le parasite ne possède pas de longues répétitions en tandem d'ARNr, mais plusieurs unités uniques d'ARNr 18S, 5.8S et 28S, disséminées sur plusieurs chromosomes. Du fait des différences présentes entre chaque ARNr, leur transcription va dépendre du stade de développement du parasite. Par conséquent, ces ARNr pourront traduire les protéines nécessaires au développement du parasite à un moment précis (GARDNER ET AL. 2002).

Il n'est pas rare d'observer un délai de 11 à 18 h entre le pic d'ARNm et le taux de protéine correspondant (VEMBAR, DROLL, ET SCHERF 2016). En effet pour 30 % des 2 584 gènes étudiés un délai été observé, et la moitié d'entre eux sont maintenus dans un état traductionnellement inactif jusqu'à ce que la synthèse des protéines soit requise. Pour jouer sur la stabilité de l'ARNm et réprimer la synthèse des protéines, chez *P. berghei*, un réprésome de l'ARNm maternel a été identifié : DOZI-CITH. Chez *P. falciparum*, des composants putatifs de ce réprésome ont été identifiés, mais peu de choses sont connues sur le fonctionnement de ce complexe.

Ainsi, l'expression des gènes de *Plasmodium* est finement régulé que ce soit au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel. Il existe également une régulation post-traductionnelle qui sera détaillée par la suite. Ces différents niveaux de régulation sont mis en place par le parasite qui va subir de nombreux changements morphologiques et rencontrer des environnements différents tout au long de son développement.

### 5) Cycle de développement et transmission du parasite

Les cinq espèces de *Plasmodium* infectant l'Homme ont un cycle de développement extrêmement complexe à deux hôtes. Le premier est l'anophèle qui est l'hôte définitif où le parasite effectue son cycle sexué, et le second est l'Homme, où se déroule son cycle érythrocytaire qui lui permet de se multiplier. Pour cela, l'expression de protéines stade-spécifiques est nécessaire à sa survie que ce soit chez son hôte vertébré ou invertébré.

Le cycle de *Plasmodium* comporte trois phases majeures de développement. La première est la phase sexuée qui se déroule chez le moustique. Les deux autres ont lieu chez l'Homme, ce sont les phases hépatocytaire et intra-érythrocytaire (**Figure 3**).

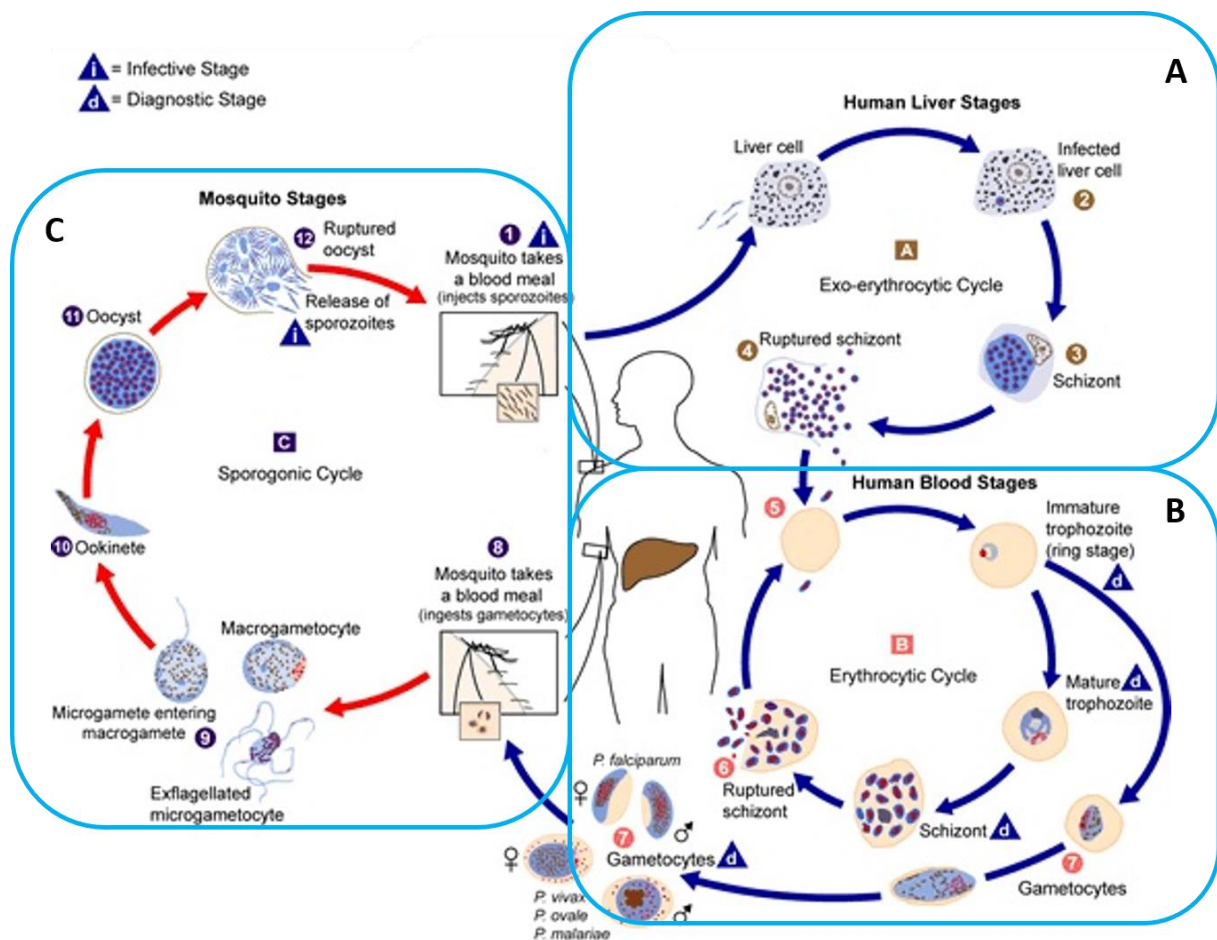


Figure 3: Cycle complet de Plasmodium (tiré du site internet de CDC Safer Healthier people)



### a) Le cycle hépatocytaire

Lorsque le moustique se nourrit de sang, le parasite se trouvant sous forme de sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique est injecté à l'Homme (**Figure 3. A**). Au niveau de la piqûre, 75 % des parasites présentent une augmentation de leur motilité, ce qui leur permet de glisser dans le derme en à peine dix secondes (**AMINO ET AL. 2006**). A l'approche des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, leur vitesse se réduit ; cependant les parasites continuent de se déplacer le long de ces vaisseaux. Grâce aux anticoagulants présents dans la salive de l'anophèle, les sporozoïtes pourront atteindre la circulation sanguine en approximativement une minute. Il a été observé qu'au cours de l'heure post-infection, environ la moitié des sporozoïtes ont infecté les vaisseaux sanguins (dans 70 % des cas) ou lymphatiques (dans 30 % des cas). L'autre moitié se déplace dans le derme, s'immobilise, et finit par mourir. Sept heures après l'infection, il ne reste que quelques rares parasites sur le lieu de l'inoculation. Les sporozoïtes ayant rejoint la circulation lymphatique seront, pour la plupart, phagocytés par les cellules dendritiques. Cependant, une petite proportion d'entre eux pourra se développer partiellement en forme exo-érythrocytaire et excréter des antigènes avant d'être dégradés (**AMINO ET AL. 2006**).

Une fois la circulation sanguine atteinte, le sporozoïte rejoint le foie où il restera huit à vingt-cinq jours pour *P. falciparum*. Pour atteindre les hépatocytes, les sporozoïtes doivent tout d'abord traverser les cellules sinusoidales du foie, et préférentiellement les cellules de Kupffer. Pour cela, le parasite s'entoure d'une vacuole parasitophore qui lui permet de se protéger de la phagocytose (**PRADEL ET FREVERT 2001**). Les sporozoïtes se retrouvent alors dans l'espace de Disse, et vont ensuite poursuivre leur chemin en traversant plusieurs cellules hépatiques avant d'atteindre un hépatocyte où ils débiteront leur reproduction asexuée (**Figure 3. A**). La traversée de ces hépatocytes ne dure que quelques secondes et n'entraîne pas de dommage de la cellule hôte, ni la création de la vacuole parasitophore. Cette étape semble indispensable au bon déroulement du cycle de développement du parasite mais son but est encore inconnu (**MOTA ET AL. 2001**). Suite à ces traversées, le sporozoïte entre dans un hépatocyte, cette fois entouré d'une vacuole parasitophore. La multiplication asexuée qui s'y met en place permet la formation des mérozoïtes qui sont les formes infectieuses des globules rouges. Un seul sporozoïte peut donner cent à deux-cents mérozoïtes qui sont libérés par paquets entourés d'une membrane provenant de la cellule hôte (**Figure 3. A**). C'est ce que l'on appelle le mérosome. La plupart des mérozoïtes sont intacts lorsqu'ils quittent le foie, et cette structure leur permet d'atteindre les poumons sans dommages. Les mérosomes sont ensuite désintégrés au niveau des capillaires pulmonaires, ce qui permettra aux mérozoïtes de rejoindre la circulation sanguine et d'envahir facilement les érythrocytes (**BAER ET AL. 2007**).

Le passage par le foie est une étape nécessaire à la survie du parasite puisque qu'elle lui confère une protection contre le système immunitaire de l'hôte, en inhibant l'expression de phosphatidyle sérine à la surface des globules rouges qui sert habituellement de signal pour la phagocytose (**STURM ET AL. 2006**).

## b) Le cycle intra-érythrocytaire

Le cycle de reproduction asexuée, encore appelé cycle érythrocytaire, est responsable des symptômes caractéristiques du paludisme. Il débute lors de l'invasion des hématies par les mérozoïtes (**Figure 3. B**). L'entrée du mérozoïte dans la cellule hôte se fait de façon tout à fait passive et peut se découper en quatre phases :

- La reconnaissance et l'attachement du mérozoïte à la membrane érythrocytaire : cette première étape nécessaire à l'invasion se fait grâce à la reconnaissance de la cellule cible par des récepteurs présents à la surface du parasite. Ensuite, le mérozoïte s'attache à la membrane du globule rouge via une jonction serrée ou de mouvement (**BAUM ET AL. 2008**). Cette liaison est rapide et provoque la déformation de l'érythrocyte pendant cinq à dix secondes (**DVORAK ET AL. 1975; GILSON ET CRABB 2009**). Cependant, cet ancrage est réversible et il arrive que quelques secondes après le premier contact, le mérozoïte soit de nouveau libre. Dans ce cas, les vagues de déformation provenant du lieu de contact vont persister pendant quelques secondes avant que l'érythrocyte ne retrouve son état initial (**GILSON ET CRABB 2009**).
- La réorientation et la formation de la jonction entre le pôle apical du mérozoïte et la paroi érythrocytaire (**GILSON ET CRABB 2009**) : Il est nécessaire que le contact entre le mérozoïte et l'érythrocyte s'opère via le pôle apical du parasite puisque c'est à ce niveau que se trouvent les organites participant à l'invasion du globule rouge. Ce sont les rhoptries et micronèmes qui vont, lors de cette phase, libérer des substances impliquées dans la formation de la vacuole parasitophore par mouvement de la jonction actine-myosine (**MILLER ET AL. 2002**).
- L'invagination de la membrane de l'érythrocyte autour du mérozoïte qui perd alors ses protéines de surface (**LANGRETH ET AL. 1978; DVORAK ET AL. 1975**).
- La fermeture de la vacuole parasitophore et des membranes érythrocytaires après l'invasion complète du mérozoïte : La création de cette vacuole nécessite du matériel membranaire qui sera fourni par les rhoptries. Son rôle est de protéger le parasite de la réponse immunitaire de l'hôte et, ainsi, de lui permettre de se répliquer sans difficulté (**KEELEY ET SOLDATI 2004**). Une fois le mérozoïte internalisé, l'érythrocyte se déforme à nouveau pendant une période de dix à quinze minutes, avant de reprendre sa forme initiale. A la fin de cette étape, les organites du mérozoïte ne sont plus visibles (**DVORAK ET AL. 1975**).

Après l'attachement du mérozoïte à la membrane de l'érythrocyte, il ne faudra environ que trente secondes au parasite pour être internalisé (**GILSON ET CRABB 2009**).

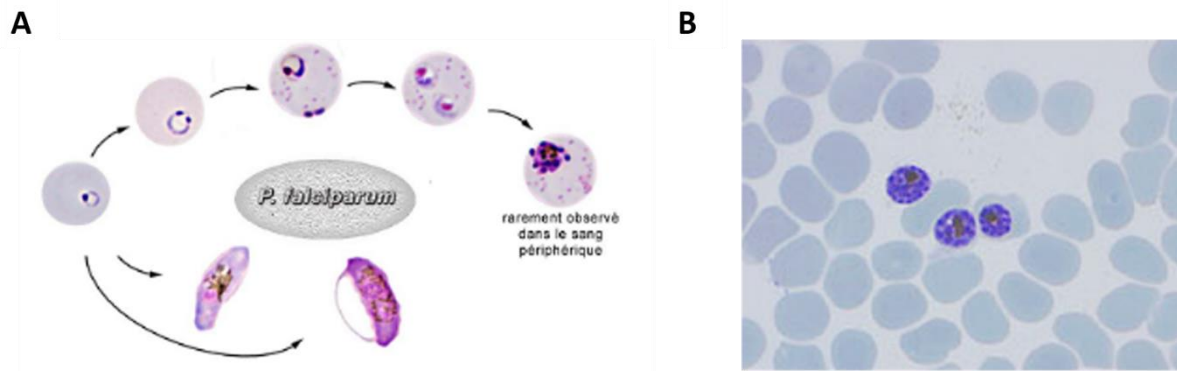


Figure 4 : Cycle asexué de *P. falciparum*. A) Cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum* (ANOFEL, 2002). B) Représentation de schizontes en forme de « fleur » (www.scripps.edu)

Une fois internalisé, le mérozoïte peut débuter sa division asexuée (Figure 3. B et Figure 4. A). Vingt-quatre heures après, il évolue en un trophozoïte précoce qui ressemble à un anneau. Il va ensuite s'élargir afin de devenir un trophozoïte tardif. Cette croissance s'accompagne d'une augmentation de l'activité métabolique telle que la glycolyse, l'ingestion du cytoplasme de l'hôte ou encore la protéolyse de l'hémoglobine. Il est à noter que l'hème est potentiellement toxique pour le parasite ; ainsi, ce dernier polymérise l'hème libre en hémozoïne, c'est ce que l'on appelle le pigment malarique. A la fin du stade trophozoïte de *P. falciparum*, soit trente-six heures après le début du cycle érythrocytaire, le noyau subit de multiples divisions mais sans cytokinèse (Figure 4. A). Le parasite est alors sous forme de schizonte. Et chaque schizonte donnera huit à trente-deux mérozoïtes qui seront libérés dans la circulation sanguine après éclatement de la cellule hôte et qui pourront infecter de nouveaux globules rouges (BAUM ET AL. 2008).

Le processus de rupture de l'hématie est assez bien décrit. Il semblerait que quelques secondes avant l'éclatement, le diamètre du schizonte augmente légèrement, et que les mérozoïtes deviennent de plus en plus distincts les uns des autres, ce qui donne un aspect en forme de fleur au parasite (Figure 4. B) (GLUSHAKOVA ET AL. 2005; GILSON ET CRABB 2009). La libération des mérozoïtes est également précédée par la fusion des pigments malariques en une seule unité (DVORAK ET AL. 1975), ainsi que par la rupture de la vacuole parasitophore grâce à l'action de protéases, ce qui permet aux parasites d'occuper tout l'espace du globule rouge (GLUSHAKOVA ET AL. 2005). Par la suite, des bourgeonnements au niveau de la membrane érythrocytaire sont observés, l'hématie gonfle jusqu'à augmenter son volume de 20 % (DVORAK ET AL. 1975; GILSON ET CRABB 2009). Les bourgeonnements et l'augmentation du volume de l'érythrocyte combinés au fait que les mérozoïtes sont de plus en plus mobiles vont permettre l'éclatement de la cellule hôte, et le plus souvent dans le sens des bourgeonnements (GILSON ET CRABB 2009). En tout et pour tout, il ne faudra en moyenne qu'une minute pour que les mérozoïtes sortent de leur cellule hôte (DVORAK ET AL. 1975).

Les mérozoïtes sont libérés de façon quasi synchronisée, et sont capables d'infecter l'érythrocyte voisin directement. La rupture des hématies est la cause des pics de température caractéristiques du paludisme. Le reste des symptômes est dû à la stimulation

de la production des facteurs de nécrose tumoraux et d'autres cytokines lors de la libération du contenu des érythrocytes.

La durée du cycle érythrocytaire de *Plasmodium* varie selon l'espèce. Il faudra quarante-huit heures à *P. falciparum* pour effectuer un cycle complet, et il en est de même pour *P. ovale* et *P. vivax*, alors que pour *P. malariae* il faudra soixante-douze heures (TUTEJA 2007), et pour *P. knowlesi*, vingt-quatre heures seront suffisantes (AHMED ET COX-SINGH 2015).

### c) La gamétocytogénèse

Parmi les mérozoïtes libérés, une petite quantité d'entre eux se différencie en macro ou micro-gamétocytes (femelle ou mâle respectivement) qui sont les formes sexuées du parasite (Figure 3. B). Ces formes ne sont pas actives chez l'Homme, mais elles seront essentielles à la transmission du parasite au moustique, lieu de leur reproduction sexuée.

Il existe cinq stades de la différenciation sexuée de *P. falciparum* (Figure 5):

- stade I : il débute juste après le stade anneau. A ce moment-là, le gamétocyte ne peut pas être distingué d'un trophozoïte, hormis au niveau de la distribution des pigments qui est alors granulaire. Ce stade est visible zéro à deux jours après l'infection.
- stade II : le parasite prend une forme allongée au bout de un à quatre jours post-infection.
- stade III : deux à huit jours après l'infection, le globule rouge se déforme légèrement. A partir de ce stade, les gamétocytes mâles et femelles sont distinguables lors de la coloration au Giemsa. Les mâles apparaîtront roses tandis que les femelles seront plutôt bleues.
- stade IV : le parasite est allongé et mince et l'érythrocyte est déformé six à dix jours après le début du cycle. Les mâles présentent des pigments malariques relativement dispersés par rapport aux femelles dont les pigments sont plus denses.
- stade V : Le parasite s'épaissit et présente des extrémités arrondies neuf à vingt-trois jours post-infection. Le sexe des gamétocytes est toujours observable grâce à la différence de répartition des pigments malariques (TALMAN ET AL. 2004).

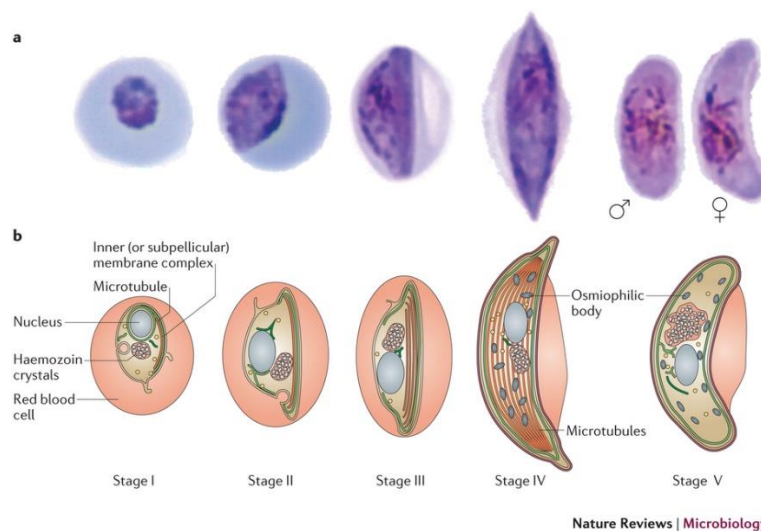


Figure 5 : Les différents stades de développement des gamétocytes (d'après (JOSLING ET LLINAS 2015)).

Lors de la maturation des gamétocytes, les globules rouges infectés sont séquestrés préférentiellement dans la rate et la moëlle osseuse, ce qui permet au parasite d'éviter la phagocytose. Une fois la maturation terminée, les érythrocytes contenant des gamétocytes de stade V retournent dans la circulation sanguine où ils pourront infecter l'anophèle lors d'un prochain repas sanguin (BAKER 2010).

Chez *P. falciparum*, la différenciation sexuée prend généralement dix à douze jours, quand elle en prend quinze chez *P. vivax* et *P. ovale* et cinq à vingt-trois chez *P. malariae* (TUTEJA 2007).

Le choix de cette voie est prédéterminé. Ainsi, soit le schizonte entame une reproduction asexuée, soit il entre dans la différenciation sexuée. Si la voie de la gamétocytogénèse est choisie, les mérozoïtes issus d'un même schizonte vont donner des gamétocytes du même sexe. Par ailleurs, le sexe du gamétocyte est déterminé au même moment que celui du choix de la différenciation sexuée, soit avant la maturation du schizonte (SILVESTRINI, ALANO, ET WILLIAMS 2000).

Ce choix de débiter la gamétocytogénèse ne dépend pas d'un changement brutal de l'environnement (pH, composition en sels, température, etc...), contrairement aux cycles de reproduction sexuée ou asexuée (BAKER 2010). Mais il est influencé par d'autres facteurs. *In vitro*, il a été montré que l'ajout de lysats de globules rouges, la présence de sérum et de lymphocytes humains, un taux élevé de réticulocytes ou encore des inhibiteurs de synthèse d'acides nucléiques, comme les antifolates ou la chloroquine, augmentent le nombre de parasites empruntant la voie de la gamétocytogénèse (BAKER 2010). *In vivo*, cela correspond entre autres aux symptômes hématologiques comme la lyse des érythrocytes, l'anémie, la dysérythropoïèse et réticulocytose (TRAGER 2005). La parasitémie semble également jouer un rôle sur le nombre de gamétocytes observés. En effet, Bruce et al ont montré que lorsque la parasitémie est faible, il y a peu de schizontes qui entrent en gamétocytogénèse. En revanche, si la parasitémie est élevée, une majorité de schizontes choisit cette voie (BRUCE ET AL. 1990).

#### d) Le cycle sexué

Le cycle se poursuit ensuite par l'ingestion de gamétocytes lors du repas sanguin du moustique (Figure 3. C). Une fois dans son gros intestin, les changements de pH et de température, associés à la production d'acide xanthurénique par le moustique entraînent la métamorphose des gamétocytes. Les gamétocytes femelles, correspondant aux macrogamétocytes, deviennent alors des macrogamètes. Et les microgamétocytes, c'est-à-dire les gamétocytes mâles perdent leur flagelle et deviennent des microgamètes. Par la suite, les gamètes mâles et femelles fusionnent et se fertilisent afin de former des zygotes. Ceux-ci vont évoluer et devenir des oocinètes qui traverseront alors les cellules épithéliales de l'estomac du moustique. Le passage de ces cellules s'effectue du pôle apical vers le pôle basal, et permet aux parasites d'atteindre la lame basale. Lors de cette étape, le système immunitaire de l'hôte entre en action et provoque une diminution importante du nombre d'oocinètes. Les survivants entament une nouvelle métamorphose et deviennent des oocystes. Ils entameront alors leur division, et après éclatement, libéreront plusieurs

sporozoïtes. Ces derniers ont pour but d'atteindre les glandes salivaires du moustique (ALY, VAUGHAN, ET KAPPE 2009; TUTEJA 2007). Cependant, lors de leur migration, les sporozoïtes vont subir de nombreuses pertes. Ils disposent d'une fenêtre de temps d'environ huit heures après l'infection pour envahir les glandes salivaires, et seuls 19 % d'entre eux en seront capables. Les autres mourront et seront dégradés. Ainsi le nombre de sporozoïtes infectieux dans les glandes salivaires de l'anophèle est limité (HILLYER, BARREAU, ET VERNICK 2007). Ils y apparaissent dix à dix-huit jours après infection, et peuvent y survivre pendant un à deux mois. Lors du repas sanguin suivant, les sporozoïtes pourront être injectés à l'Homme et débiter un nouveau cycle asexué chez l'hôte vertébré (TUTEJA 2007).

## 6) Symptômes et risques

Les symptômes du paludisme apparaissent cycliquement puisque cette période correspond au cycle intra-érythrocytaire du parasite. Ces symptômes sont variables selon l'espèce de *Plasmodium* infectante, la quantité de parasites dans le sang du patient, la qualité du système immunitaire et la santé de l'hôte. Cependant, les adultes vivant dans les zones endémiques sont susceptibles de développer une immunité face au paludisme suite à une infection répétée par le parasite. Par contre, il est à noter que pour les voyageurs et expatriés adultes, les signes cliniques sont sept fois plus importants que pour les enfants les accompagnant (BAIRD 1998), et que l'infection des jeunes enfants par le parasite est souvent mortelle.

### a) Accès palustre simple

Les symptômes habituellement observés dans les cas de paludisme simple sont une alternance de trois phases. La première se caractérise par des frissons puissants, puis elle se poursuit par une fièvre intense pouvant monter jusqu'à 41 °C, et elle se termine par une transpiration abondante et une sensation de grande fatigue (OMS, 2016). Cet accès palustre s'étale sur une période de quatre à six heures et peut revenir deux ou trois jours plus tard selon l'espèce de *Plasmodium* infectante. Pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* il s'agira d'une « fièvre tierce », c'est-à-dire qu'elle revient tous les deux jours, tandis que pour *P. malariae* ce sera une « fièvre quarte » qui fait son apparition tous les trois jours. Ces différences sont dues à la durée du cycle de développement du parasite qui varie selon l'espèce de *Plasmodium*.

A cet accès palustre peuvent s'ajouter d'autres symptômes tels que : de la toux, une détresse respiratoire, des douleurs articulaires, des maux de tête, des diarrhées, des vomissements et des convulsions. Ces symptômes sont susceptibles d'apparaître huit à trente jours après l'infection. Cependant, *P. vivax* et *P. ovale* étant capables d'entrer en phase de dormance au niveau du foie, celle-ci peut durer de quelques semaines à plusieurs années (MILLER ET AL. 2002).



### b) Accès palustre grave

L'accès palustre simple peut dégénérer dans certains cas et donner lieu à un accès palustre grave. Le plus souvent, il s'agit d'une infection causée par *P. falciparum* et dans une moindre mesure, par *P. vivax*. D'ailleurs, 95 % des décès causés par le paludisme sont imputés à *P. falciparum*. Les personnes ayant un système immunitaire moins performant, notamment les personnes porteuses du VIH ou encore les enfants, ont plus de risque de développer cette forme de paludisme.

Les symptômes observés lors du paludisme sévère peuvent être : une jaunisse, un défaut de fonctionnement des reins, une anémie grave, une hypoglycémie, une altération de la conscience ou encore une acidose lactique. Et dans la grande majorité des cas, ils entraîneront la mort du malade. La malaria sévère qui touche principalement les enfants est identifiable notamment par l'acidose métabolique, qui se trouve être dans la plupart des cas une acidose lactique. Celle-ci est le symptôme le plus important et surtout déterminant à la survie du patient. Elle est en lien avec l'apparition d'une détresse respiratoire. Cela peut être dû à une production d'acide lactique par le parasite lui-même ou par l'effet combiné de facteurs sévères qui réduisent l'apport en oxygène aux tissus. Il a également été observé que dans les cas de malaria sévère, les érythrocytes non-infectés présentent un défaut de déformabilité. Ce symptôme associé à une acidose lactique, serait à l'origine de la diminution du flux sanguin dans les tissus. Et, lorsque ce défaut de déformabilité des globules rouges est couplé à une anémie sévère, l'apport en oxygène est fortement compromis (MILLER ET AL. 2002).

### c) Neuropaludisme ou accès pernicieux

Le neuropaludisme fait également partie des accès palustres graves, mais diffère quelque peu au niveau des symptômes.

Il s'agit d'une forme de complication qui fait suite à l'obstruction de petits vaisseaux sanguins du cerveau par des érythrocytes infectés. Dans ce cas, des convulsions importantes, des pertes de connaissance d'une durée minimale de trente minutes entraînant parfois un coma, sont observées. Le plus souvent, les patients atteints de neuropaludisme présentent de la fièvre, des vomissements, des maux de tête (MISHRA ET AL. 2007). A ces symptômes peuvent s'ajouter une jaunisse, un défaut de fonctionnement rénal, une détresse respiratoire, de l'anémie ou encore de l'hypotension (JAIN ET AL. 2008).

Cette complication est surtout observée chez de jeunes enfants, mais les symptômes évoluent selon l'âge. C'est l'une des causes principales de décès des enfants atteints du paludisme, puisqu'ils sont 19 % à y succomber. Parmi les enfants de moins de 5 ans atteints de malaria cérébrale, il n'y a que 2 % qui y survivront et qui présenteront des handicaps transitoires ou permanents extrêmement lourds (MURPHY ET BREMAN 2001). Malgré cela, l'anémie reste la cause majeure de décès chez les enfants atteints du paludisme (approximativement 50 % des décès) (HALDAR ET AL. 2007; MURPHY ET BREMAN 2001).

#### d) Paludisme de la femme enceinte

La femme enceinte, et de surcroît primipare, présente un risque élevé de paludisme sévère. Cela est en partie dû au fait que l'immunité acquise diminue pendant cette période. Le risque décroît avec le nombre de grossesses grâce à l'acquisition d'anticorps dirigés contre les variants d'antigènes de surface qui sont exprimés à la surface des érythrocytes infectant le placenta.

L'infection par *P. falciparum* entraîne des dommages pour la mère et l'enfant qui sont dus à la séquestration des parasites dans le placenta. Celle-ci a lieu grâce à la modification des hématies infectées en surface qui leur permet d'adhérer au placenta. Le mécanisme d'adhésion serait très similaire à celui de l'adhérence des leucocytes, c'est-à-dire que l'érythrocyte infecté s'attache puis roule sur la paroi du placenta avant de s'arrêter définitivement grâce à la liaison de l'hématie à des récepteurs hôtes (HO ET WHITE 1999).

Les dommages observés concernent aussi bien la mère que l'enfant à naître. Une interruption de l'échange nutritionnel entre le fœtus et la mère peut entraîner le décès de l'un ou l'autre, un retard de croissance pour le fœtus, une naissance prématurée, ou encore un faible poids de naissance. La mère peut également être anémiée et court le risque de développer une malaria sévère (ROGERSON ET AL. 2007; DESAI ET AL. 2007).

Au fur et à mesure des infections, l'hôte humain acquiert la capacité de développer une immunité face au parasite. Ainsi il sera en mesure de lutter contre l'infection et présentera des symptômes du paludisme moins importants.

#### 7) Immunité acquise

L'Homme est capable de développer une immunité protectrice contre le paludisme, qu'il acquiert tout au long de sa vie, mais qui reste tout de même incomplète. La prémunition est un équilibre hôte-parasite qui apparaît après 5 à 10 ans d'exposition et de nombreux accès palustres et ne se conserve que si l'exposition à l'infection par le parasite est continue. Comme elle n'est pas totale, elle ne permet pas d'éviter l'infection, mais elle est capable de réduire les symptômes de la maladie.

L'efficacité de l'immunité acquise varie selon l'âge. Les nourrissons et jeunes enfants sont les plus touchés par le paludisme grave, et qui entraîne le plus souvent leur décès. Cependant, les nourrissons jusqu'à 6 mois présentent tout de même une immunité qui leur serait conférée par des anticorps maternels transmis lors du troisième trimestre de grossesse. Une autre théorie existe sur la transmission de l'immunité de la mère à son bébé. Il se pourrait que le lait maternel contienne des inhibiteurs de la croissance du parasite tels que la lactoferrine ou les IgA (Immunoglobuline A) (KASSIM ET AL. 2000). Ensuite cette immunité diminue, laissant l'enfant démuni face aux infections par *Plasmodium* (DOBBS ET DENT 2016), augmentant le risque de fièvres souvent fatales pour les enfants de moins de 6 mois. Entre l'âge de 2 et 5 ans, l'immunité acquise commence à se mettre en place, ce qui augmente les chances de survie face au paludisme. Grâce à cette immunité, les enfants soumis à une



exposition forte et à une parasitémie élevée ne développent que rarement les symptômes du paludisme. Cependant, c'est aussi la période où les enfants sont les plus sujets au paludisme cérébral.

A partir de l'adolescence, le risque de développer un paludisme grave est quasi nul. A l'âge adulte, les malades présentant une parasitémie élevée sont rares, mais ceux-ci auront des symptômes graves. Dans les cas où la parasitémie est faible, il est courant que la personne infectée présente des symptômes bénins.

L'immunité acquise se trouve totalement bousculée chez les femmes enceintes, notamment chez les femmes primipares, même si cela n'est que temporaire. Ainsi leur susceptibilité d'être contaminées par *Plasmodium* est due à une détérioration des cellules immunitaires dans le placenta (diminution de la production de certaines cytokines), et à une immunosuppression due à un taux élevé d'hormones durant la grossesse, notamment les corticostéroïdes (ROGERSON ET AL. 2007).

Il est également à noter que pour une personne présentant une immunité acquise dans une région endémique et souhaitant se rendre dans une autre région endémique, l'immunité ne fonctionnera pas. En effet, les populations de parasites étant différentes d'une zone à l'autre, les antigènes présentés ne seront pas les mêmes, et par conséquent les anticorps produits par le système immunitaire seront dans l'incapacité de reconnaître ces nouveaux antigènes (BARRY ET HANSEN 2016).

Ainsi l'immunité acquise permet une protection partielle contre le parasite. Le fait que l'immunité acquise soit incomplète s'explique par le fait que *Plasmodium* a mis en place des stratégies pour échapper au système immunitaire (PIERROT, DIVE, ET KHALIFE 2008).

## 8) Contournement du système immunitaire

La première stratégie mise en place par le parasite pour échapper au système immunitaire de l'hôte consiste à se dissimuler le plus longtemps possible, et le fait que ce soit un parasite intracellulaire obligatoire y contribue pour beaucoup. Pendant la phase de développement intra-érythrocytaire, il est protégé de la reconnaissance par le système immunitaire via les anticorps car les hématies sont incapables de présenter des antigènes à leur surface. Au cours de ce cycle, *Plasmodium* contourne cette incapacité, ce qui peut conduire à son élimination par la rate. Or, certains antigènes exprimés par le parasite à la surface de l'érythrocyte, notamment PfEMP-1 (Erythrocyte Membrane Protein-1), sont impliqués dans l'adhésion des globules rouges infectés aux cellules endothéliales de l'hôte (SHERMAN, EDA, ET WINOGRAD 2003). Et pour compléter leur camouflage, ces cellules parasitées peuvent également se lier à plusieurs hématies saines, ce qui facilitera aussi la réinvasion.

La seconde parade mise en place par *Plasmodium* se situe au niveau des molécules interchangeables et se fait sur trois niveaux. Le premier niveau se base sur le fait que le parasite aurait plusieurs processus d'invasion impliquant des protéines qui ont des activités

similaires mais qui sont tout à fait différentes. Le second se situe au niveau génétique. En effet, un seul gène posséderait plusieurs allèles qui sont par ailleurs différents d'une population de parasites à une autre. Parmi les protéines présentant différents allèles, se trouve la protéine MSP-1 (Merozoite Surface Protein-1) qui est impliquée dans l'attachement des protéines (QARI ET AL. 1998). Même si les variations entre les allèles sont minimes, les anticorps et les lymphocytes T de l'hôte, qui ne peuvent reconnaître que des épitopes précis, ne sont pas en mesure de tous les identifier. Le dernier niveau correspond à la variation antigénique. Les antigènes, principales cibles du système immunitaire (MARSH ET HOWARD 1986), sont codés par différentes familles de gènes dont les familles *var*, *rif* et *stevor*. Les gènes *var*, environ une soixantaine, codent pour plusieurs variants d'antigènes PfEMP-1, ainsi le système immunitaire n'est pas en mesure de reconnaître tous les antigènes d'une seule et même famille (FLICK ET CHEN 2004).

La dernière stratégie consiste à leurrer et influencer la réponse immunitaire. Les antigènes de *Plasmodium* présentent des répétitions en tandem induisant une forte réponse immunitaire, le détournant de sa cible principale. Le parasite peut également jouer un rôle dans la réponse du système immunitaire notamment lors de son cycle érythrocytaire. En effet, les hématies infectées sont capables de s'attacher aux cellules dendritiques, ce qui provoque une inhibition de leur maturation, ainsi qu'une diminution de la stimulation des lymphocytes T (URBAN ET AL. 1999). Et pour contrecarrer le système immunitaire, *Plasmodium* est capable d'induire la production de cytokines suppressives telles que l'Interleukine 10 (IL-10) ou le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) par les lymphocytes T CD4+. Ces cytokines interviennent dans l'inhibition des lymphocytes T classiques (PIERROT, DIVE, ET KHALIFE 2008).

## 9) Diagnostic

Le diagnostic du paludisme est une combinaison entre les observations cliniques et des tests qui permettent de confirmer celles-ci.

Les observations cliniques effectuées chez le patient sont le plus souvent l'intermittence entre les frissons, les fièvres et les sueurs. A cela s'ajoute l'historique du patient qu'il est important de prendre en compte, par exemple un voyage dans un pays endémique.

Ensuite il faut confirmer ce diagnostic, et pour cela il y a différentes techniques plus ou moins coûteuses et sensibles.

La technique la plus sensible et la plus utilisée est celle de la goutte épaisse. Pour cela, environ 200  $\mu$ l de sang vont subir une hémolyse avant d'être colorés au Giemsa. La réalisation est un peu délicate, et la lecture requiert de la pratique. De plus, elle ne permet pas de déterminer l'espèce infectante.

La seconde technique qui est aussi très utilisée est le frottis sanguin. Celui-ci est simple à réaliser et permet de déterminer l'espèce de *Plasmodium* infectante par microscopie avec

un peu de pratique. Cependant, sa sensibilité est vingt à trente fois plus faible que pour le test de la goutte épaisse.

De nouveaux tests ont été développés, notamment le test par immunochromatographie sur bandelette qui permet de détecter des antigènes spécifiques de *Plasmodium*, et d'identifier l'espèce infectante. Ce type de test est rapide et très simple d'utilisation. Il est le plus souvent utilisé pour confirmer le diagnostic. Les inconvénients majoritaires sont : qu'il ne permet pas de calculer la parasitémie, son coût qui est très élevé et il détecte encore les antigènes quelques jours après la fin de l'infection.

Il y a également le QBC Malaria® (Quantitative Buffy Coat) qui permet la recherche d'antigènes circulants. Après centrifugation, les parasites sont marqués non-spécifiquement par un fluorochrome : l'acridine orange. C'est une technique qui est assez facile à utiliser, et qui a une très bonne sensibilité. Cependant, elle ne permet pas de déterminer l'espèce de *Plasmodium* responsable de la pathologie. Et son coût très élevé fait qu'elle est très peu utilisée, par conséquent la firme qui la commercialise a annoncé son retrait du marché.

Parmi les moyens de diagnostic se trouve la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui est très sensible. De plus, en utilisant des amorces spécifiques de chaque espèce, il est possible de déterminer le type de *Plasmodium* infectant (JOHNSTON ET AL. 2006). Mais cette technique est coûteuse, prend du temps et est difficile à mettre en œuvre dans les zones d'endémie.

Récemment, une équipe a montré que la technique de la photoacoustique par cytométrie en flux (PAFC) pouvait permettre de détecter le parasite *in vivo*. Pour cela, des répétitions d'impulsions sont utilisés et la détection de l'hémozoïne produite par le parasite se fait grâce à des lasers de longueurs d'onde différentes (532, 671 et 820 nm). Cette technique est extrêmement sensible, bien plus que le test de la goutte épaisse. Il existe un dispositif portatif de PAFC qui permettrait de l'utiliser facilement chez l'Homme et de détecter plus précocement l'infection (CAI ET AL. 2016). Pourtant, elle n'est pas en mesure d'identifier la forme de *Plasmodium* responsable de la pathologie.

L'identification de l'espèce de parasite qui provoque l'infection est importante puisque selon le type de *Plasmodium*, les conséquences sont plus ou moins graves. Par exemple, *P. knowlesi* et *P. malariae* présentent des morphologies très proches, ce qui rend le diagnostic difficile. Or *P. malariae* déclenche des accès palustres bénins, au contraire de *P. knowlesi*, ce qui rend les erreurs diagnostic mortelles (AHMED ET COX-SINGH 2015).

### C. La lutte contre le paludisme

Le moyen le plus efficace pour lutter contre l'infection est d'éviter celle-ci. Ainsi, il est recommandé d'éviter les piqûres de moustiques, ou encore d'utiliser des traitements préventifs qui s'appliquent surtout aux voyageurs.

## 1) Eviter la transmission à l'Homme

### a) Au niveau du moustique

#### o Eviter les piqûres

Le premier échelon de protection des individus vis-à-vis du paludisme reste la protection contre les piqûres de moustiques. Il est possible d'empêcher les moustiques de pénétrer dans les logements. Dans ce but, des insecticides, préférentiellement des insecticides à effet persistant, peuvent être pulvérisés à l'intérieur. Un obstacle peut également être dressé comme des moustiquaires placées sur les portes et fenêtres ou encore autour des couchages.

Bien évidemment il faut également protéger l'individu lui-même. Dans ce but, divers répulsifs sont utilisés, qu'ils soient naturels (extraits d'eucalyptus...), ou de synthèse (diéthyltoluamide, perméthrine...), d'applications cutanée ou vestimentaire ou encore en aérosol ou en lotion. Il est également recommandé de porter des vêtements longs imprégnés d'insecticides/répulsifs et cela surtout en fin de journée et durant la nuit puisque ce sont les périodes d'activité du moustique. Et durant la nuit, l'OMS conseille de dormir sous une moustiquaire imprégnée d'insecticide. Cette solution est privilégiée en Afrique, puisqu'en 2000 seulement 2 % de la population utilisaient cette protection alors qu'en 2015 ils étaient 55 %. On estime que cette même année, 67 % de la population africaine avaient accès à ce type de moustiquaire. Il est à noter que même si les moustiques développent des résistances aux insecticides, les moustiquaires qui en sont imprégnées restent un moyen de protection efficace (OMS, 2015).

Le niveau de lutte supérieur contre l'infection par le parasite réside dans la destruction du vecteur du parasite.

#### o Destruction des lieux de reproduction du moustique

Sachant que le moustique du genre *Anophèles*, vecteur de la transmission du paludisme, pond ses œufs dans des endroits humides tels que les points d'eau stagnante, les marais etc..., il était évident que l'assèchement de ces zones permettrait de diminuer, voire d'éradiquer, le moustique vecteur. C'est d'ailleurs ce qui s'est produit en Europe, dans les années 1930, et en Amérique du Nord en 1951. Cependant, dans les régions tropicales et subtropicales, les saisons des pluies associées à la végétation luxuriante rendent cette tâche très ardue. Ainsi les pays endémiques étant les régions tropicales et subtropicales, il fallait trouver un autre moyen de lutter contre le vecteur du parasite.

#### o Les insecticides

Au lieu de s'attaquer uniquement aux œufs de moustique, la lutte pouvait être dirigée contre la larve ainsi que le moustique lui-même. Pour cela, les premiers insecticides ont été créés au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Il en existe deux types aujourd'hui : des insecticides chimiques ou biologiques.

Familles	Nom des insecticides
Organochlorés	DDT, dieldrine
Organophosphorés	malathion, fénitrothion, pirimiphosméthyl
Carbamates	Bendiocarbe, propoxure
Pyréthriinoïdes	Deltaméthrine, lambda-cyhalothrine, perméthrine, cyfluthrine, cyperméthrine

Tableau 1: Familles et nom des différents insecticides utilisés pour éradiquer le vecteur du paludisme.

Il existe un troisième moyen d'éviter la transmission du parasite à l'Homme, la modification génétique du vecteur.

- Moustiques génétiquement modifiés

Dans les années 1930-1940, une nouvelle idée a germé : pourquoi ne pourrait-on pas modifier génétiquement les moustiques afin de les éradiquer ou bien de les rendre résistants au parasite ?

La tâche est ardue puisqu'il faut créer un moustique qui possède une résistance à *Plasmodium* ou qui entraîne l'extinction des moustiques vecteurs. De plus, il faut que ce gène ciblé et modifié soit stable et se transmette à la descendance du moustique sur le terrain.

Ces dernières années, de nombreuses avancées ont été faites sur ce sujet (**CHRISTOPHIDES 2005**). En 2015, la technique permettant la réalisation de ces modifications a vu le jour. Il s'agit du CRISPR-Cas9. Le principe consiste à introduire dans le génome une cassette contenant un ARN guide qui reconnaît la portion d'ADN à couper, une endonucléase : Cas-9 qui sert de ciseaux, et pour finir un gène synthétique exprimant le caractère désiré. La cassette permettra de modifier le chromosome homologue et pourra se transmettre de génération en génération. Ainsi le caractère modifié se répandra beaucoup plus vite.

Ainsi, deux équipes ont publié simultanément des articles présentant des modifications génétiques sur le moustique par CRISPR-Cas9, mais avec des finalités différentes.

La première a choisi d'insérer un gène de résistance à *P. falciparum* (kynurenine hydroxylase) chez *A. stephensi*, de manière à ce que le moustique ne soit plus en mesure de transmettre le parasite (**GANTZ ET AL. 2015**). La seconde, a inséré un gène de stérilité récessif chez *A. gambiae*. Le fait que le gène soit récessif permet au moustique de transmettre ce gène à sa descendance et ainsi de toucher la plus grande proportion possible de moustiques (**HAMMOND ET AL. 2016**).

Cependant ces deux stratégies ont des inconvénients. Le fait de rendre le moustique résistant au parasite pourrait vite ne plus être efficace. On peut supposer que le moustique et le parasite trouveront une parade tout comme ils l'ont fait en développant des résistances aux insecticides pour l'un ou aux traitements médicamenteux pour l'autre. Tandis que l'extermination des moustiques vecteurs a pour conséquence de laisser une niche écologique vide. Dans ce cas, il est envisageable que le parasite puisse trouver un nouveau vecteur de transmission à l'Homme.

La technique du CRISPR-Cas9 est tout de même à utiliser avec précaution. Il est tout à fait possible que la cassette s'insère ailleurs dans le génome et qu'un effet indésirable soit observé. Et, même si cela est peu probable, ce système puissant pourrait être capable de traverser la barrière des espèces et ainsi contaminer les prédateurs de l'Anophèle.

L'utilisation de ces moustiques génétiquement modifiés doit être bien réfléchi. En effet, il faut évaluer les conséquences environnementales, l'effet de la disparition de l'insecte sur la chaîne alimentaire, etc...

### b) Traitements préventifs pour les voyageurs

En plus des mesures citées précédemment, l'OMS recommande aux voyageurs souhaitant se rendre dans une zone endémique de prendre un traitement préventif. Cette précaution est encore plus indispensable pour les femmes enceintes et les enfants (le voyage leur est d'ailleurs déconseillé), qui présentent des risques plus élevés de paludisme grave. La prophylaxie n'étant pas efficace à 100 %, il est nécessaire de veiller à éviter les piqûres de moustiques. La chimioprophylaxie vise essentiellement à éviter la multiplication chez son hôte vertébré de *P. falciparum*, qui est à l'origine de la plupart des cas mortels.

Ce traitement doit être prescrit par un médecin, et doit prendre plusieurs critères en compte :

- la destination du voyage afin de l'adapter en fonction des risques et des résistances du parasite à certains médicaments, la saison, etc...
- la personne : son âge, son poids, ses antécédents pathologiques, ses intolérances aux antipaludiques, etc...

Une fois en possession de ces informations, le médecin est capable de choisir quelle molécule prescrire au voyageur ([Tableau 2](#)).

Molécule	Nom du médicament	Posologie	Prescription enfants et femmes enceintes	Début du traitement	Fin du traitement
Chloroquine	Nivaquine®	1 comprimé par jour	OK	Jour de l'arrivée	4 semaines après le retour
Association chloroquine et proguanil	(Nivaquine® + Paludrine®) ou Savarine® ou Nopalu®	1 comprimé par jour	Prescrit séparément chez les enfants, OK femmes enceintes	Jour de l'arrivée	4 semaines après le retour
Association atovaquone et proguanil	Malarone®	1 comprimé par jour	Ok pour les enfants et femmes enceintes mais peu de recul sur les risques encourus par le fœtus	Jour de l'arrivée	1 semaine après le retour
Méfloquine	Lariam®	1 comprimé par semaine	OK	10 jours avant l'arrivée pour détecter effets secondaires (troubles neuro-psychiques)	3 semaines après le retour
Doxycycline	Doxypalu® ou Granudoxy® Gé Ou Doxy® Gé	1 comprimé par jour	Déconseillé avant 8 ans et pendant le premier trimestre de grossesse. Contre-indiqué à partir du second trimestre de grossesse	Jour de l'arrivée	4 semaines après

Tableau 2: Chimio prophylaxies disponibles pour les voyageurs.

## 2) Traitements curatifs

Le paludisme est une maladie qui se soigne, mais seulement si le patient est traité rapidement et avec le traitement adapté à l'espèce de *Plasmodium* infectante et en adéquation avec les résistances connues du parasite dans la zone d'infection.

Le premier médicament connu est arrivé au XVIIème siècle en Europe : la quinine. Il a été ramené par des missionnaires jésuites suite à leur voyage au Pérou. Ce remède contre les

fièvres palustres est extrait de l'écorce du quinquina, un arbre originaire de la Cordillère des Andes.

Familles d'antipaludique	Familles chimiques	Nom du médicament	Stade parasitaire ciblé	Résistance
Dérivés de la Quinoléine	4-aminoquinoléines	Chloroquine (Nivaquine®)	Formes intra-érythrocytaires	Oui
		Amodiaquine		Oui
	Aminoalcools	Quinine (Quinoforme®, Dichlorhydrate de quinine®, etc...)	Formes intra-érythrocytaires	Oui
		Méfloquine (Lariam®)		Oui
		Halofantrine		Oui
		Luméfantrine		Oui
	8-aminoquinoléines	Primaquine	Formes hépatocytaires, gamétocytes, sporozoïtes	Oui
Naphtoliquinone	Atovaquone		Oui	
Dérivés anti-folates	Sulfamides	Sulfadoxine (Fansidar®), Sulfène		Oui
	Pyriméthamine, Proguanil	Pyriméthamine, Proguanil	Formes intra-érythrocytaires et sporozoïtes	Oui
Dérivés de l'Arthémisinine	Endoperoxides	Artésunate	Formes intra-érythrocytaires et gamétocytes	Oui
		Artémisinine,		Oui
		Artéméthér (Paluther®)		Oui
Antibiotiques		Tétracycline, Doxycycline		Non
		Clindamycine		Non

Tableau 3: Les différentes classes d'antipaludiques (adapté de (ANTONY ET PARIJA 2016)).

Cependant, son utilisation massive a entraîné l'apparition de parasites résistants. Ainsi, des dérivés de la quinine ont été créés afin de contourner cette résistance. Parmi ceux-ci nous pouvons citer la chloroquine qui a été découverte dans les années 1940, ou encore la Primaquine dans les années 1950.

A ce jour, il existe différentes familles de traitements qui ne ciblent pas tous les mêmes stades du parasite (Tableau 3). Néanmoins, pour une grande partie d'entre eux, le parasite a été en mesure de développer des résistances, et ce de plus en plus rapidement. Ces résistances ont été observées chez trois espèces de *Plasmodium* : *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae* (ANTONY ET PARIJA 2016), et pourraient apparaître suite à la prise d'un



traitement, lorsque l'élimination des parasites est tardive ou incomplète. Et il n'est pas rare d'observer que l'apparition d'une résistance à l'un des médicaments entraîne une résistance aux autres molécules de la même famille.

Bien évidemment, les premières résistances apparues sont celles dirigées contre les antipaludiques les plus utilisés et les moins coûteux, c'est-à-dire le Fansidar® (Sulfadoxine) et la Chloroquine.

L'OMS recommande, depuis 2001, l'utilisation de Combinaisons Thérapeutiques à base d'Arthémisinine (CTA) dans les zones de résistance multi-drogues afin de traiter les patients infectés par *P. falciparum* mais ne présentant pas de complication. Dans la majorité des cas, l'Arthémisinine ou l'un de ses dérivés est utilisé en association avec la Sulfadoxine ou la Mefloquine (TUTEJA 2007).

Dans les zones endémiques, les femmes étant dans leur deuxième ou troisième trimestre de grossesse ont la possibilité de prendre un traitement antipaludique en prévention. Si elles sont infectées, l'OMS conseille l'utilisation de combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine, mais il semblerait que l'effet soit limité (TARNING 2016). Dans la plupart des cas, la CTA est à base de Sulfadoxine-Pyriméthamine ou bien d'Hydroartémisinine-Pipéraquline.

De plus, il est tout à fait possible d'adapter la CTA en fonction des résistances observées sur le terrain. Et à ce traitement, l'OMS conseille d'ajouter une dose unique de Primaquine qui permet de cibler aussi les gamétocytes. Le fait de réaliser des combinaisons a pour but d'éviter les échecs des traitements contenant une seule molécule et par conséquent l'apparition de nouvelles résistances. La CTA fonctionne plutôt bien, sauf dans les zones de multi-résistances (ROGERS ET AL. 2009). Et depuis quelques années, des résistances aux différentes combinaisons de CTA sont observées (WITKOWSKI ET AL. 2016; LEANG ET AL. 2013).

Le parasite est donc capable de trouver une parade aux antipaludiques, et cela de plus en plus rapidement. Par conséquent, il est urgent de mettre au point de nouveaux traitements. L'idéal serait le développement d'un vaccin efficace.

### 3) Les candidats vaccins

La découverte d'un vaccin contre le paludisme serait un avantage, puisqu'il permettrait de prévenir l'infection, de réduire la transmission du parasite de son hôte vertébré à son hôte invertébré jusqu'à potentiellement éradiquer la maladie. Même si l'idée d'un vaccin contre le paludisme est dans les esprits depuis longtemps, et les pistes nombreuses, la complexité du parasite ainsi que la grande variabilité de ses antigènes rendent la tâche ardue.

Ces dernières années, plusieurs candidats vaccins étaient à l'étude (pour revue HOFFMAN ET AL. 2015). L'élaboration des vaccins se base soit sur le blocage de l'entrée et du développement des sporozoïtes dans les hépatocytes, soit sur l'inhibition de l'entrée et du

développement des mérozoïtes dans les hématies ou encore sur la transmission du parasite à l'Homme en induisant la production d'anticorps dirigés contre les stades sexués du parasite chez le moustique.

Le point commun à ces stratégies réside sur le fait qu'elles reposent les plus souvent sur les antigènes de surface exprimés par le parasite. Il a d'ailleurs été montré que les antigènes des mérozoïtes pouvaient être de bons candidats vaccins puisqu'ils ont mis en évidence une efficacité partielle lors d'essais cliniques (BEESON ET AL. 2016).

A ce jour, trois candidats sont envisagés en tant que vaccins, mais les études concernant leur efficacité sont plus ou moins avancées.

#### a) Le candidat SPZ

Le candidat SPZ, contrairement aux autres candidats vaccins, ne ciblent pas les antigènes directement. Ce vaccin consiste à injecter des sporozoïtes atténués par irradiation, et ainsi induire la réponse du système immunitaire humain. Les premières études préliminaires ont démontré que 83 % des patients étaient protégés de *P. falciparum* pendant au moins dix mois. Mais son efficacité diminue puisque vingt-huit mois après la dernière injection, l'efficacité du vaccin n'est plus que de 75 %, ce qui reste une valeur relativement élevée (ROESTENBERG ET AL. 2011).

En 2013, la firme Sanaria a développé un vaccin utilisant des sporozoïtes atténués, aseptisés, purifiés et cryoconservés. Lors d'un essai clinique de phase I, il a été montré que l'injection par voie intraveineuse du vaccin en cinq doses permettait une efficacité complète du vaccin, alors qu'avec quatre doses l'efficacité diminue à 77 %. De plus, il semblerait qu'il y ait un seuil immunologique dose-dépendant pour permettre une protection totale (SEDER ET AL. 2013).

Malgré ces résultats encourageants, il est peu probable que ce vaccin soit utilisé à grande échelle. En effet, la production des parasites atténués nécessite de vérifier que les parasites soient bien affaiblis. Et à cela s'ajoute la nécessité de ne pas rompre la chaîne du froid puisque les parasites sont cryoconservés. Cependant, il pourrait tout de même être utilisé en prévention pour les nourrissons, ainsi que pour les voyageurs (HOFFMAN ET AL. 2015).

#### b) Le candidat RTS,S

Le candidat RTS,S, développé par GlaxoSmithKline (GSK), était l'un des plus prometteurs. Il cible la protéine Circumsporozoïte de *P. falciparum* qui se situe à la surface des sporozoïtes au stade précoce du cycle hépatocytaire, avant d'être exporté dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cette protéine, grâce à ses deux états conformationnels, joue un rôle dans l'attachement du parasite aux hépatocytes, dans la motilité ou bien la migration du sporozoïte au travers des cellules hépatiques. Lors de la modification d'un motif particulier de cette protéine, cette dernière n'est plus capable de jouer ces rôles clés pour le parasite (COPPI ET AL. 2011).

RTS, S est la dernière version du vaccin dirigé contre la *Circumsporozoïte*. Il a pour but de détruire les parasites avant leur entrée dans le stade érythrocytaire. Il est constitué de la région centrale composée de répétitions (R) de la protéine, combinée à des épitopes de cellules T (T) et à l'antigène de surface de l'hépatite B : HBsAG (S). Cette protéine chimère est associée à des copies libres de HBsAG. Les protéines obtenues sont rassemblées dans des particules ressemblant à des virus. Ces dernières sont associées à un adjuvant afin d'augmenter l'efficacité du vaccin. Deux d'entre eux sont entrés en phase d'essais : RTS,S/AS02 et RTS,S/AS01 (AGNANDJI ET AL. 2015).

RTS,S/AS02 est entré en essais cliniques de phase II en 1998 notamment en Gambie, puis il a été testé dans d'autres pays africains tels que le Kenya, le Ghana etc... La première étude a permis de démontrer que ce vaccin était sain, toléré et immunogénique. Cependant la protection chez l'adulte n'est que de 34 % malgré l'administration de trois doses. Cette efficacité est légèrement augmentée grâce à une quatrième injection dans l'année qui suit (BOJANG ET AL. 2001). Ces mêmes adultes présentent tout de même encore des anticorps cinq ans plus tard. Ainsi les anticorps persistent malgré la forte diminution de leur concentration (BOJANG ET AL. 2009). Ce vaccin a également été testé chez les enfants et les nourrissons en Afrique. Il serait en mesure de leur conférer une protection, surtout vis-à-vis des formes de paludisme grave, mais celle-ci diminue avec le temps (ALONSO ET AL. 2004; ALONSO ET AL. 2005; SACARLAL ET AL. 2009).

En parallèle de l'étude de l'effet de RTS,S/AS02, des essais cliniques ont également été menés avec le candidat vaccin RTS,S/AS01. Ce dernier semble posséder une plus grande efficacité et immunogénicité que RTS,S/AS02 (KESTER ET AL. 2009). Ainsi, l'entrée en phase III des essais cliniques a été privilégiée pour le candidat RTS,S/AS01, dans plusieurs pays africains. Les résultats ont démontré que ce vaccin est capable d'empêcher un grand nombre de cas de paludisme pendant une période de 3-4 ans chez les nourrissons et les enfants, et cela même s'ils n'ont pas eu de dose de rappel. En effet, l'efficacité est évaluée à 28 % chez les enfants et à 18 % pour les nourrissons. Cependant, les doses de rappel permettent d'augmenter l'efficacité du vaccin jusqu'à 36 % ainsi que sa période d'action. L'efficacité du vaccin RTS,S/AS01 n'est pas très élevée, mais il est à noter qu'une diminution importante de cas de paludisme clinique et grave est observée, mais uniquement en cas d'administration de dose de rappel. Il a également été observé que le vaccin est moins efficace lorsque la première dose a été administrée très tôt (nourrissons entre six et douze semaines) (RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP 2015; AGNANDJI ET AL. 2011).

Ce vaccin est toutefois à utiliser avec précaution, puisque son administration peut réduire l'acquisition de l'immunité innée qui se fait grâce à des infections répétées par le parasite. Donc lorsque l'effet du vaccin diminue, les enfants présentent un risque plus élevé de développer le paludisme. Cela, associé au fait que l'efficacité n'est pas très élevée, implique que l'utilisation de moyens de prévention contre les piqûres de moustiques doit se poursuivre. Il est également à noter que certains enfants vaccinés développent des méningites. Même si rien ne relie ces cas au vaccin, le fait que seuls les enfants vaccinés présentent cette pathologie est troublant (RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP 2015).

L'OMS émet un avis favorable pour la poursuite de ce projet, mais certaines incertitudes doivent être levées avant de mettre ce vaccin sur le marché, notamment l'utilité d'une quatrième dose de vaccin à administrer. Au vu des résultats peu probants sur l'efficacité du vaccin chez les nourrissons, l'OMS ne recommande pas son utilisation chez les très jeunes enfants. Il reste également à déterminer l'effet de RTS,S/AS01 sur la mortalité ainsi que l'éventuel lien entre l'administration du vaccin et les apparitions de cas de méningite (OMS, 2016).

### c) Le candidat TBV

Le dernier candidat vaccin à l'étude, cible préférentiellement la transmission du parasite de l'Homme au moustique. Il est nommé TBV pour Transmission Blocking Vaccines. Il cible les antigènes du stade érythrocytaire sexué et du stade précoce du moustique. A ce jour, différents antigènes sont à l'étude. Parmi les candidats en cours d'évaluation chez l'Homme, peuvent être cités Pfs25 et son orthologue chez *P. vivax* Pvs25.

Dans le vaccin dédié à la lutte contre *P. falciparum*, appelé NYVAC Pf7, Pfs25 est associé à sept autres antigènes dans un vecteur viral atténué. Il a été testé en phase I et IIa, et les résultats ont montré que le vaccin était bien toléré, mais il semble que l'immunogénicité soit variable d'un individu à l'autre et que la quantité d'anticorps produits soit assez faible. Par conséquent, le vaccin ne possède pas une grande efficacité dans la protection contre le paludisme (OCKENHOUSE ET AL. 1998) et il semble en être de même pour le vaccin permettant de lutter contre *P. vivax* (MALKIN ET AL. 2005). Le but actuel est donc d'augmenter la réponse en anticorps notamment en modifiant directement le composé actif du vaccin (WU ET AL. 2006; QIAN ET AL. 2007).

Les développements des moyens de lutte contre le paludisme sont une priorité mondiale, qu'il s'agisse de méthodes de prévention, du développement de nouveaux médicaments ou encore de la découverte d'un vaccin efficace.

## D. Actions mondiales contre le paludisme.

Malgré le nombre élevé de cas palustres, qui s'élevait à 214 millions en 2015, ce chiffre a fortement diminué depuis 2000 où 290 millions de cas étaient recensés. De plus, pendant cette période une diminution de 30 % a été observée sur l'incidence du paludisme, et une baisse de 47 % des cas mortels. Ces résultats font suite à de nombreuses actions mondiales menées notamment par l'Organisation Mondiale de la Santé (l'OMS) et la Fondation Bill et Melinda Gates. Ainsi, de nombreux programmes ont vu le jour comme le WHO's Roll Back Malaria (RBM) program, le Multilateral Initiative in Malaria ou encore le Malaria Vaccine Initiative.

L'OMS en partenariat avec le RBM a annoncé ses objectifs mondiaux pour la période de 2016 à 2030. Ils consistent, à terme, à réduire le taux de mortalité lié au paludisme d'au moins 90 %, à réduire l'incidence des cas de paludisme au niveau mondial également d'au moins 90 %. L'OMS souhaite également éliminer le paludisme dans au moins trente-cinq pays

où la transmission du parasite existe encore aujourd'hui, et pour finir, empêcher la réapparition de la parasitose dans les pays où le paludisme a disparu. Ce projet, appelé AIM pour Action and Investment in Malaria, permet la mobilisation des ressources et indique les lignes directrices à suivre pour les gouvernements et les collaborations internationales. Il insiste sur le fait que l'éradication du paludisme nécessite de développer de nouveaux produits et de nouvelles techniques (OMS, 2015).

L'OMS et le RBM ne sont pas les seuls à s'impliquer dans l'éradication du paludisme. Cet objectif fait aussi partie des principales priorités de la fondation Bill et Melinda Gates. Ils ont nommé ce projet Accelerate to Zero. Pour permettre l'éradication du parasite, il faut empêcher toute transmission. Pour cela, la fondation souhaite développer de nouveaux médicaments unidoses efficaces, réussir à cibler les patients asymptomatiques afin de les traiter et pour finir, mettre au point de nouveaux outils qui permettront de contourner la résistance des moustiques et des parasites respectivement aux insecticides et aux traitements. A cela s'ajoute le développement de vaccins contre le paludisme qui puissent prévenir l'infection et/ou bloquer la transmission. La fondation Bill et Melinda Gates a par ailleurs annoncé en janvier dernier que 168.7 millions de dollars allaient être investis dans le développement de ces vaccins.

En plus des plans mondiaux assez généralistes, des initiatives un peu plus ciblées ont vu le jour. C'est le cas du GPARC (Global Plan for Artemisinin Resistance Containment), publié en 2011 par l'OMS, qui vise à maîtriser la résistance à l'Artémisinine qui apparaît peu à peu. Les objectifs sont les suivants :

- arrêter la propagation des parasites résistants,
- intensifier le suivi et la surveillance pour évaluer la menace de la résistance à l'Artémisinine
- améliorer l'accès aux diagnostics et au traitement rationnel avec les CTA
- investir dans la recherche sur la résistance à l'Artémisinine.

Malgré tous ces investissements et découvertes qui en découlent, il reste fort à faire pour protéger/soigner les millions de personnes vivant ou voyageant dans les zones à risques. Afin de pouvoir développer de nouveaux médicaments ou vaccins, il est nécessaire d'étudier en détail le fonctionnement complexe du parasite, notamment la façon dont est régulé son cycle de développement.

## II. La régulation post-traductionnelle chez *Plasmodium*

Le cycle très complexe du parasite met en œuvre différents acteurs qui peuvent être régulés à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel ou encore post-traductionnel. Ce dernier mécanisme permet au parasite de répondre aux stimuli qu'il reçoit tout au long de son cycle de développement.

### A. Différents mécanismes de régulation post-traductionnelle

Les modifications post-traductionnelles (MPTs) correspondent à l'ajout ou au retrait d'un groupement chimique sur un résidu spécifique. Chaque type de groupement implique des enzymes qui lui sont propres, que ce soit pour créer sa liaison covalente ou pour la rompre. Les MPTs ont un rôle sur : le repliement conformationnel des protéines qu'elles affectent, leur localisation, leur interactome, leur activité enzymatique ou encore leur stabilité. A plus grande échelle, ces modifications ont une implication dans l'expression des gènes, la localisation subcellulaire des protéines ou encore la signalisation cellulaire.

Même si l'étude des MPTs en est encore à ses prémices chez *Plasmodium*, quelques-unes d'entre elles ont été caractérisées (pour revue (DOERIG ET AL. 2015)).

#### 1) N- et O-glycosylation

Parmi les MPTs présentes chez le parasite, se trouve la N- et O-glycosylation. Peu de recherches ont été réalisées sur le sujet, et selon la méthode utilisée, les résultats sont très différents (pour revue (MACEDO ET AL. 2010)).

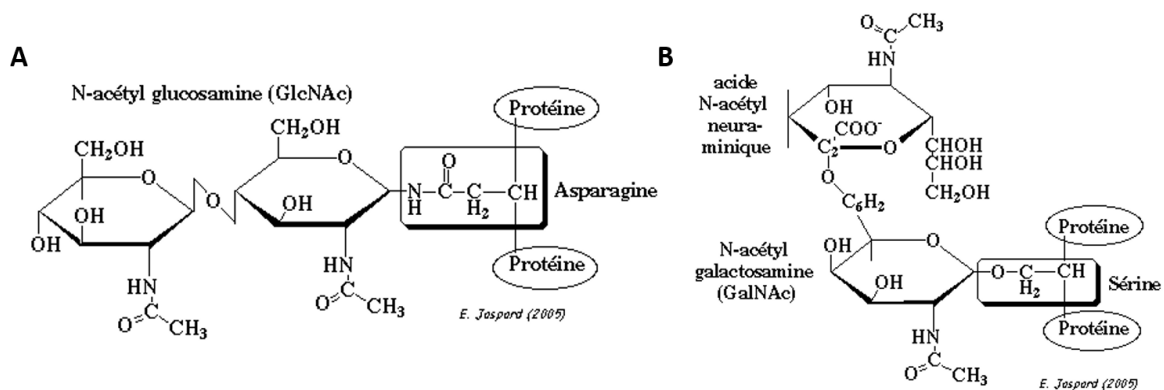


Figure 6 : Schématisation de la glycosylation. A) N-glycosylation. B) O-glycosylation (JASPARD, 2005).

#### a) N-glycosylation

C'est une MPT qui est à l'origine de nombreux débats sur son existence chez *Plasmodium*, puisqu'elle semble être présente pour certains (KIMURA ET AL. 1996; GOWDA, GUPTA, ET DAVIDSON 1997), ou en très faible quantité, voire même totalement absente pour d'autres (DIECKMANN-SCHUPPERT ET AL. 1992; DIECKMANN-SCHUPPERT, BAUSE, ET SCHWARZ 1994).

Cette modification consiste à ajouter des glucides, qui débutent généralement par une N-acétylglucosamine provenant de sucres donneurs, sur des résidus d'asparagine d'une protéine grâce à des glycosyltransférases (**Figure 6. A**). Elle jouerait notamment un rôle dans le ciblage des protéines, mais cette hypothèse est encore à confirmer. L'identification de protéines N-glycosylées chez *Plasmodium*, qui n'a pas encore été réalisée, serait une première étape.

La N-glycosylation aurait un rôle important chez le parasite pour certaines équipes de recherche, puisque l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de enzymes permettant cette MPT, tels que la tunicamycine ou le 2-déoxyglucose, stoppent la croissance du parasite et entraîne sa mort au stade érythrocytaire (**UDEINYA ET VAN DYKE 1981A; UDEINYA ET VAN DYKE 1981B; KIMURA ET AL. 1996**). Il a également été démontré que la quantité de protéines N-glycosylées varie pendant le cycle de développement asexué du parasite par SDS-PAGE sur des parasites traités et non traités à la tunicamycine à chaque stade, et marqué au D-[U-<sup>14</sup>C]glucose. En effet, il semblerait qu'elle soit plus importante pendant les stades anneau et trophozoïte précoce (**KIMURA ET AL. 1996**).

### b) O-glycosylation

Il s'agit, de la même façon que précédemment, d'un ajout de sucre sur une protéine, mais préférentiellement sur des résidus sérine ou thréonine (**Figure 6. B**). Cette réaction est aussi catalysée par des glycosyl-transférases présentes chez le parasite (**DIECKMANN-SCHUPPERT, BAUSE, ET SCHWARZ 1993**), et débute dans la plupart des cas par l'ajout d'une N-galactosamine. La réaction inverse, quant à elle, est catalysée par des glycosylases.

Selon l'équipe de Dieckmann-Schuppert qui a démontré la présence de protéines O-glycosylées, cette MPT est la principale forme de glycosylation des protéines au stade érythrocytaire (**DIECKMANN-SCHUPPERT ET AL. 1992; DIECKMANN-SCHUPPERT, BAUSE, ET SCHWARZ 1993; DIECKMANN-SCHUPPERT, BAUSE, ET SCHWARZ 1994**). Tout comme pour la N-glycosylation, la présence de protéines O-glycosylées est mise en doute puisque l'équipe de Gowda présente des résultats indiquant que la O-glycosylation est soit présente en très petite quantité, soit totalement absente (**GOWDA, GUPTA, ET DAVIDSON 1997**). Une étude plus récente chez un autre apicomplexe : *T. gondii*, a rapporté la présence d'O-N-acétylglucosamine et suggère fortement la présence de ces protéines chez *P. falciparum* (**PEREZ-CERVERA ET AL. 2011**).

## 2) Sumoylation

La sumoylation, elle aussi très peu étudiée, correspond à l'ajout d'une petite molécule ressemblant à l'ubiquitine (SUMO pour Small Ubiquitin-like MODifier), grâce à une liaison entre la partie C terminale (Ct) d'une glycine de la SUMO et une lysine spécifique de la protéine cible (**Figure 7**). Cette modification post-traductionnelle est catalysée par l'enzyme SUMO dont la localisation varie en fonction de l'avancement du cycle de développement de



*Plasmodium* (ISSAR ET AL. 2008). En effet, on la retrouve dans le noyau et le cytoplasme du parasite, ainsi que dans le cytoplasme de la cellule hôte.

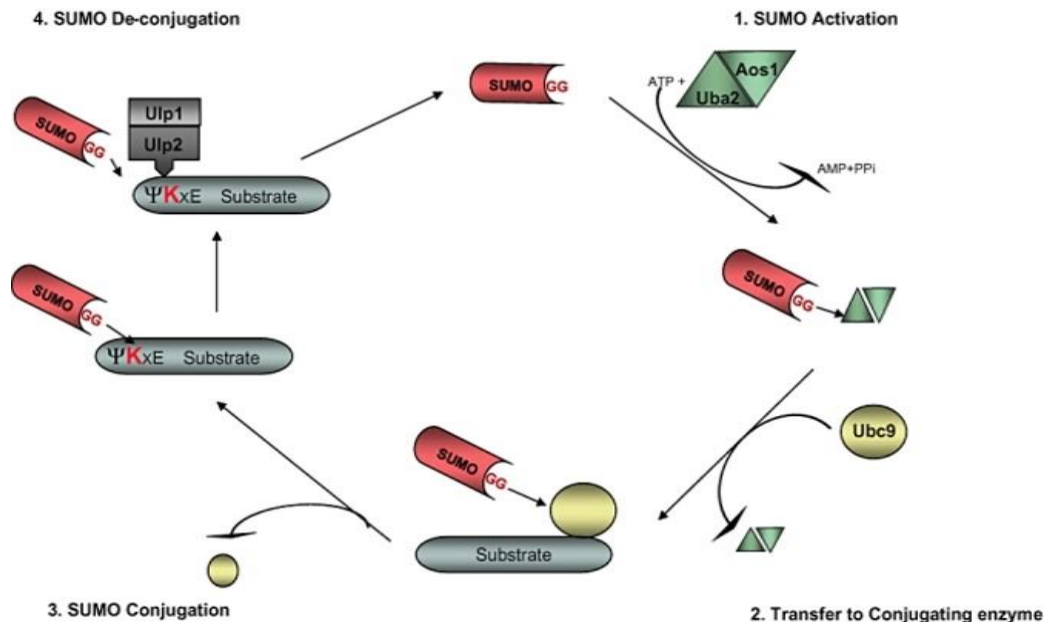


Figure 7 : Schématisation de la sumoylation (ISSAR ET AL. 2008).

Parmi les cibles connues de la sumoylation se trouve PfSir2, une sirtuine impliquée dans la régulation de l'expression des gènes *var*. La sumoylation permet, en modifiant l'interaction de la protéine sumoylée avec ses partenaires, de réguler la transcription, la localisation, la transduction du signal (ISSAR ET AL. 2008) ou encore de répondre au stress oxydatif lors du stade érythrocytaire (REITER ET AL. 2016). L'enzyme SUMO possède un antagoniste : l'anti-SUMO qui rend la sumoylation réversible (ISSAR ET AL. 2008).

### 3) Ubiquitylation

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle qui se caractérise par la liaison d'une ou plusieurs Ubiquitine(s) via le motif diglycine en Ct, sur des résidus lysine d'une protéine cible (Figure 8). Plusieurs types d'enzymes sont impliquées : tout d'abord l'enzyme qui active l'Ubiquitine E1, huit E1 putatives ont d'ailleurs été identifiées chez *P. falciparum*. Ensuite il y a une enzyme de conjugaison E2 qui charge l'Ubiquitine sur un groupement sulfure situé à sa surface. Le parasite possède quatorze représentants putatifs de cette enzyme. Et pour finir, la troisième enzyme à intervenir est la E3 qui permet de lier l'ubiquitine sur la protéine cible. Elles sont au nombre de cinquante-quatre E3 putatives chez *Plasmodium* (PONTS ET AL. 2008). Cette réaction est réversible grâce aux désubiquitylases qui seraient une vingtaine chez *P. falciparum*.



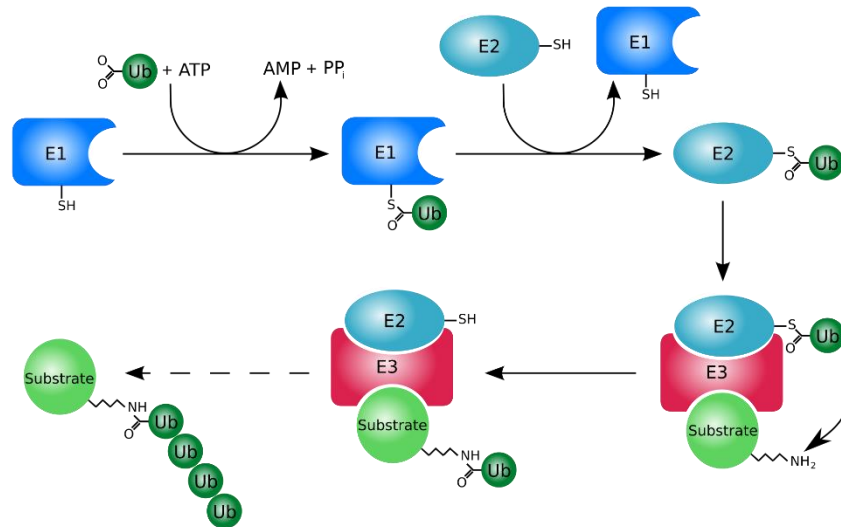


Figure 8: Schématisation d'ubiquitylation (source: Wikipédia).

Ce type de modification post-traductionnelle est sûrement l'un des plus représentés. Il a d'ailleurs été observé que plus de la moitié du protéome du parasite peut être ubiquitylé, et il s'avère qu'une grande partie de ces protéines sont spécifiques aux stades trophozoïte et schizonte. Cependant, l'on retrouve des protéines ubiquitylées à tous les stades du cycle intra-érythrocytaire du parasite (PONTS ET AL. 2011). Actuellement, peu de protéines ubiquitylées sont connues, mais on peut tout de même citer l'actine (FIELD ET AL. 1993), ou encore l'histone H2B (TRELLE ET AL. 2009). Ainsi l'ubiquitylation aurait un rôle dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes. Il est aussi à noter que la polyubiquitylation des protéines correspond à une étiquette de dégradation.

#### 4) Nitrosation

Cette MPT, qui se caractérise par l'ajout d'un groupe nitroso (-NO) sur les cystéines des protéines cibles, fait suite à un stress nitrosant. Les études sur la nitrosation chez *Plasmodium* sont quasiment inexistantes. La seule qui en fait état provient de l'équipe de Wang (WANG ET AL. 2014), et traite des protéines S-nitrosylées (SNO). Chez *P. falciparum*, il y aurait environ trois-cent-vingt protéines cibles potentielles de la nitrosation réparties dans différentes voies cellulaires, et notamment dans la glycolyse. Ainsi l'on peut imaginer que la nitrosation a un rôle important dans les processus cellulaires puisqu'elle permet de réguler la fonction des protéines. La nitrosation est une modification réversible des protéines, cependant les dénitrrosylases n'ont pas encore été identifiées chez *P. falciparum* (WANG ET AL. 2014).

#### 5) Glutathionylation

La glutathionylation, comme les MPTs précédentes, est très peu étudiée chez *Plasmodium*. Cette modification correspond à l'ajout de glutathion sur les groupements thiols des cystéines, et est réversible (Figure 9). L'équipe de Becker a démontré, en 2011 (KEHR ET AL. 2011), l'existence de protéines S-glutathionylées chez le parasite *P. falciparum*. Elle a

également été en mesure de déterminer les cibles de la S-glutathionylation qui sont au nombre de quatre-cent-quatre-vingt-treize. Parmi celles-ci se trouvent des protéines impliquées notamment dans les voies métaboliques des protéines et de l'azote, ainsi que dans les voies d'assimilation du glucose (KEHR ET AL. 2011).

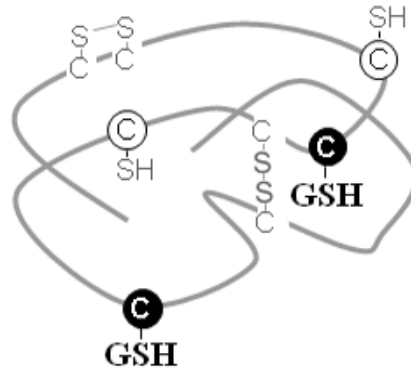


Figure 9: Schématisation de la S-glutathionylation (source dbGSH).

## 6) Acétylation

L'acétylation est un mécanisme qui permet d'introduire un groupement acétyle sur une lysine grâce à des enzymes de type lysine AcétylTransférase (KAT), qui seraient au nombre de quatre chez *P. falciparum*. La réaction contraire est, quant à elle catalysée par les cinq lysine-désacétylases présentes chez le parasite. Cette MPT permet de modifier la stabilité de la protéine ciblée, ses propriétés de fixation à l'ADN, ou encore sa capacité à interagir avec une autre protéine (MIAO ET AL. 2013). L'étude de l'acétylome des stades du développement érythrocytaire du parasite a mis en évidence quatre-cent-vingt-et-un sites d'acétylation répartis sur deux-cent-trente protéines qui se situent aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, les mitochondries ou l'apicoplaste (MIAO ET AL. 2013).

L'acétylation la plus étudiée est celle des histones. Le niveau d'acétylation des histones a un rôle sur l'état de condensation de la chromatine, ce qui permet de réguler l'expression des gènes. Les histones sont acétylées via des Histone AcétylTransférases (HAT) sur une ou plusieurs lysines. Parmi les huit HATs putatives présentes chez *P. falciparum* (BISCHOFF ET VAQUERO 2010), nous pouvons citer PfGCN5 qui acétyle préférentiellement les histones H3 sur les lysines K9 et K14. Son importance pour la survie du parasite a été prouvée, puisque son inhibition par le Curcumin entraîne l'arrêt de son développement (CUI, MIAO, ET CUI 2007).

PfMYST, est une autre HAT qui acétyle les lysines K5, K8, K12 et K16 des histones H4. Elle a par conséquent un rôle dans l'activation des gènes, et notamment l'activation des gènes *var* codants pour les antigènes de surface (Figure 10), ou encore dans la croissance du parasite (MIAO ET AL. 2010). L'acétylation des histones permet la décondensation de la chromatine, qui sera alors sous forme d'euchromatine, et donc la transcription des gènes.

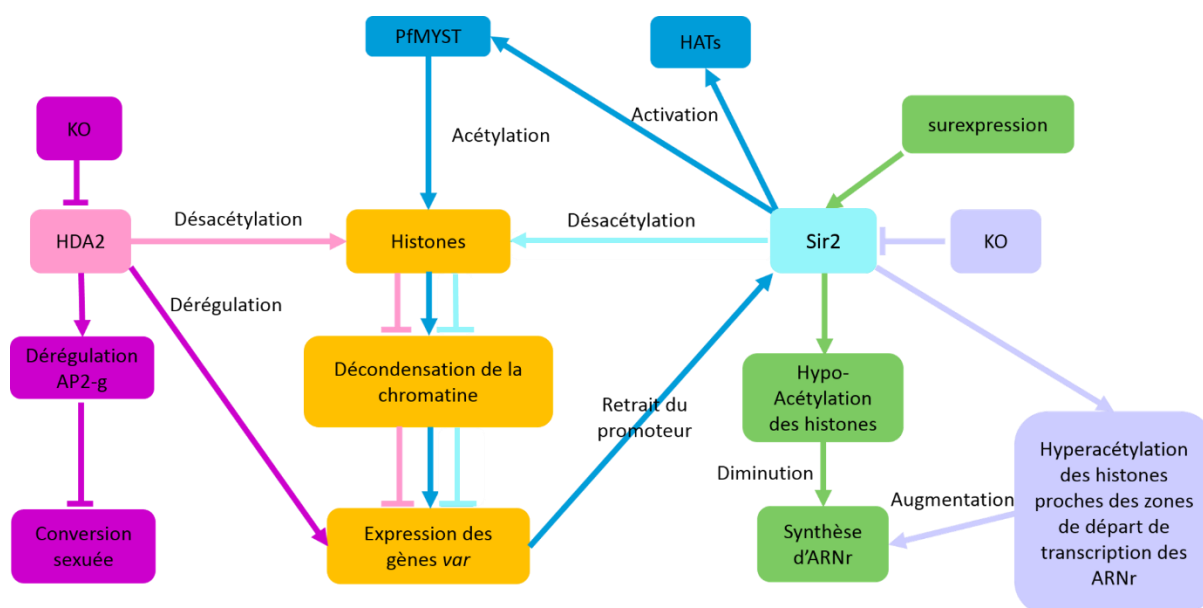


Figure 10 : Schématisation du rôle des HAT et HDAC connues chez *P. falciparum*.

Cependant cette modification post-traductionnelle est réversible grâce aux Histone DésAcétylases (HDAC). La plus connue d'entre elles est la Sirtuine 2 qui est  $\text{NAD}^+$  dépendante. Du fait de sa fonction, cette enzyme est souvent retrouvée en association avec l'hétérochromatine, forme condensée de la chromatine qui ne permet pas la transcription des gènes. Elle désacétyle préférentiellement les histones H3 diacétylées sur les lysines K9 et K14, et les histones H4 triacétylées sur la lysine K16 (FRENCH, CEN, ET SAUVE 2008). Il existe en fait deux Sirtuines 2 différentes : PfSir2A et PfSir2B. Le Knock-Out (KO) de Sir2A entraîne une hyper-acétylation des histones se situant à proximité des zones de départ de transcription des ARN ribosomiaux (ARNr) (Figure 10). Tandis que sa surexpression conduit à une hypo-acétylation des histones et par conséquent à la diminution de la synthèse des ARNr (Figure 10) (MANCIO-SILVA ET AL. 2013). De plus, la désacétylation des histones par Sir2 entraîne une inhibition de l'expression des gènes *var* se situant sur les télomères. Et l'absence de l'une de ces deux formes provoque un dysfonctionnement au niveau de l'expression mutuellement exclusive des gènes *var* (TONKIN ET AL. 2009). En cas d'activation des gènes *var*, Sir2 sera retirée de leur promoteur, ce qui permettra aux HAT d'acétyler les histones et donc de décondenser la chromatine pour que la transcription des gènes puisse s'effectuer (FREITAS-JUNIOR ET AL. 2005).

La seconde HDAC de *Plasmodium* connue est PfHDA2. Tout comme Sir2, elle a un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes *var*, puisque son KO dérègle leur expression (Figure 10). Le KO de PfHDA2 entraîne également un dérèglement du fonctionnement de AP2-g, un facteur de transcription contrôlant la conversion sexuée, ce qui indique que PfHDA2 a aussi un rôle dans le contrôle de la commutation du cycle asexué au cycle sexué (COLEMAN ET AL. 2014).

## 7) Méthylation

Les histones sont aussi la cible d'une autre forme de MPT qui influe également sur la condensation de la chromatine et par conséquent sur la transcription des gènes, il s'agit de la méthylation. Cette modification est visible sur les histones, mais aussi sur d'autres protéines qui sont notamment impliquées dans le métabolisme de l'ARN. Pour cela, un groupement méthyle est lié à des arginines de la protéine cible grâce à des méthyltransférases. Il existe trois PRMTs (Protein Arginine N-MethylTransferase) conservées chez *P. falciparum* dont PfPRMT1 qui mono- ou di-méthyle les histones H4 et H2 ou bien des protéines comme la fibrillarine et la protéine ribosomale S2, qui sont impliquées dans le métabolisme de l'ARN. La méthylation de l'arginine R3 de l'histone H4 permet d'activer la transcription des gènes (FAN ET AL. 2009). L'importance de PfPRMT1 a été démontrée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique qui conduit à un arrêt de la croissance du parasite.

A ces PRMTs s'ajoutent les dix Histone Lysine MéthylTransférases ou HKMT qui possèdent un domaine SET caractéristique des HKMTs et qui méthylent spécifiquement les lysines des histones H3 en position 4, 9 et 36 et des histones H4 en position 20 (CUI ET AL. 2008). Il a été montré que la méthylation des lysines 4 et 9 des histones H3 et 20 des histones H4, a lieu principalement dans les régions 5' des gènes *var* et *rif* et *stevor* (LOPEZ-RUBIO ET AL. 2007; LOPEZ-RUBIO, MANCIO-SILVA, ET SCHERF 2009). Ces modifications épigénétiques sont à l'origine de la régulation de l'expression de ces familles de gènes codant pour des antigènes de surface. Cependant, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 n'est possible que lorsque cette lysine est désacétylée par la Sirtuine 2 (J.-J. Lopez-Rubio, Mancio-Silva, et Scherf 2009). L'équipe de Cowman a étudié PfSET10 qui méthyle la lysine 4 des histones H3. Elle joue un rôle dans la variation antigénique de *P. falciparum* en maintenant les gènes *var* actifs pendant la division du parasite, ainsi que dans la transmission héréditaire des informations épigénétiques aux parasites filles (VOLZ ET AL. 2012). Une seconde HKMT a fait l'objet d'une étude, il s'agit de PfSET2. Elle contrôle la triméthylation de la lysine 36 des histones H3 au niveau des gènes *var*. Le KO de cette enzyme entraîne l'activation de tous les gènes *var* en même temps, ainsi que leur expression à la surface des érythrocytes. Par conséquent, PfSET2 a un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes *var* (JIANG ET AL. 2013).

Les enzymes antagonistes aux histones méthyltransférases, et présentes chez *P. falciparum*, sont les Histones DÉMéthylases (HDMs) qui se caractérisent par la présence d'un domaine Jumonji C. Chaque HDM est spécifique d'un substrat et d'un niveau de méthylation (mono-, di- ou tri- méthylation) (LIWANG CUI ET AL. 2008). Mais aucune étude ne décrit leur mécanisme d'action.

## 8) Lipidation

Cette catégorie de MPT a pour fonction principale de réguler l'association de protéines avec les membranes cellulaires. Elle consiste à ajouter un groupe lipophile sur une protéine cible. Ce groupe peut être de cinq types différents : un acide gras, un isoprénoïde, un stérol,

un phospholipide ou encore une ancre GPI (GlycosylPhosphatidyInositol). Ainsi, il existe 4 sortes de lipidation chez *P. falciparum* : la N-myristoylation, la palmitoylation, la prénylation et l'ancrage GPI. Il est tout à fait possible qu'une seule protéine soit la cible de deux catégories de lipidation (DOERIG ET AL. 2015).

#### a) N-myristoylation

La N-myristoylation peut s'effectuer de manière co-traductionnelle ou post-traductionnelle. Dans le premier cas, un acide gras de quatorze carbones appelé myristate est lié à une glycine se situant à l'extrémité N-terminale (Nt) d'une protéine cible débutant par le motif Met-Gly. Dans le second cas, le myristate est fixé sur une glycine se situant à l'intérieur de la protéine (DOERIG ET AL. 2015). Cette réaction irréversible s'effectue sur une trentaine de protéines cibles chez *P. falciparum*, et elle est catalysée par une N-MyristoylTransférase (NMT). Lorsque cette enzyme est défaillante, un défaut dans l'assemblage du complexe de la membrane interne est observé, or cet organite est essentiel à la survie du parasite (WRIGHT ET AL. 2014).

Le but principal de la N-myristoylation est de cibler les protéines à la membrane, mais cela n'est pas son seul objectif (RESH 2013). Parmi les protéines de *P. falciparum* myristoylées se trouve la protéine ARO (Armadillo Repeat Only) qui illustre le ciblage des protéines myristoylées à la membrane (CABRERA ET AL. 2012). En effet, elle est localisée sur la face cytosolique de la membrane des rhoptries. Cependant elle nécessite, en plus de sa N-myristoylation, d'être également palmitoylée. Ces deux réactions s'effectuent dans les vingt premiers acides aminés de la région Nt. Ce n'est pas la seule protéine présentant cette double lipidation, puisque dix-sept autres protéines palmitoylées et myristoylées également dans les vingt premiers acides aminés de la région Nt, ont été identifiées chez *P. falciparum* (CABRERA ET AL. 2012).

#### b) Palmitoylation

La palmitoylation consiste à ajouter un acide palmitique (seize carbones) sur un ou plusieurs résidus cystéine, via une liaison thioester. Cette réaction est catalysée par les douze PALmitoylTransférases (PATs) de *P. falciparum*, et elle est réversible grâce à l'action des Protéines Palmytoil-Thioesterases (PPTs) (JONES, TAY, ET RAYNER 2012). Ainsi, la palmitoylation peut être stable dans le temps ou bien être dynamique par l'utilisation alternée de ces deux enzymes (JONES ET AL. 2012). Il est à noter que certaines PATs sont régulées en fonction du stade de développement du parasite, alors que d'autres sont exprimées constitutivement (JONES, TAY, ET RAYNER 2012). Il a été démontré qu'au stade érythrocytaire du parasite, il y aurait plus de quatre-cents protéines palmitoylées impliquées dans des mécanismes importants tels que la cyto-adhérence, la signalisation cellulaire ou bien la résistance aux traitements médicamenteux (JONES ET AL. 2012).

L'ajout de l'acide palmitique sur une protéine a pour rôle de réguler l'interaction de cette dernière avec la membrane cellulaire, sa stabilité, sa localisation par ciblage à une

membrane spécifique, ou bien même de contrôler l'interaction protéine/protéine (JONES, TAY, ET RAYNER 2012). De plus, l'utilisation du 2-bromopalmitate, un inhibiteur de la palmitoylation, sur différents stades parasitaires, confirme le rôle essentiel de la palmitoylation pour le développement du parasite au stade intra-érythrocytaire ainsi que dans l'invasion des hématies (JONES ET AL. 2012).

### c) Prénylation

La troisième lipidation connue chez *P. falciparum* correspond à la prénylation. Pour cela un groupement isoprényl est relié à une cystéine à proximité de la région Ct de la protéine par une liaison thioéther (RESH 2013). Il existe deux types de prénylation qui se distinguent par l'acide gras ajouté. Le groupement peut être un farnésyl (quinze carbones), dans ce cas la réaction est catalysée par une farnésyltransférase. Ou bien il peut s'agir d'un groupement géranylgeranyl qui sera lié à la cystéine par une géranylgeranyltransférase (CHAKRABARTI ET AL. 2002). Contrairement à la myristoylation et à la palmitoylation, la prénylation n'est pas une réaction réversible.

Son rôle n'en est pas moins important, puisque l'inhibition des prényltransférases bloque la différenciation des parasites (CHAKRABARTI ET AL. 2002). Parmi les protéines prénylées, se trouvent les petites GTPases comme la famille Rab. Howe et collaborateurs ont démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de prényltransférase a pour conséquence une localisation inadéquate de Rab5, qui est une protéine impliqué dans le trafic vésiculaire. Ce défaut de localisation engendre des imperfections dans la morphologie et l'intégrité de la vacuole alimentaire imparfaites (HOWE ET AL. 2013). Ainsi la prénylation a un rôle dans la localisation des protéines ainsi que dans le trafic membranaire, mais il se pourrait qu'elle régule également les interactions protéine/protéine (RESH 2013).

### d) Ancre GPI

Pour finir, la modification lipidique la plus représentée au stade érythrocytaire de *P. falciparum* est l'ancrage GlycosylPhosphatidylinositol (GPI). Cet ancrage est constitué de plusieurs glucides qui sont ajoutés par une série d'enzymes glycolytiques (DOERIG ET AL. 2015). Deux structures d'ancrage GPI sont fréquemment retrouvées chez le parasite : l'éthanolamine phosphate-6(Man $\alpha$ 1-2)Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man $\alpha$ 1-4GlcN-PI et l'éthanolamine phosphate-6Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man- $\alpha$ 1-4-GlcN-PI (DEBIERRE-GROCKIEGO ET SCHWARZ 2010).

Au stade intra-érythrocytaire, il y a onze protéines identifiées comme possédant une ancre GPI. Parmi celles-ci on peut citer les antigènes membranaires associés aux rhoptries, et les protéines de surface des mérozoïtes (MSP). Les protéines PfMSP-1 et PfMSP-2 représentent 2/3 des protéines de surface associées à la membrane du parasite, et jouent un rôle dans l'invasion des érythrocytes (GILSON ET AL. 2006; COWMAN, BERRY, ET BAUM 2012). A ces onze protéines, s'ajoutent dix-neuf autres protéines prédites comme possédant une ancre GPI (GILSON ET AL. 2006).

Ainsi les ancres GPI ont, entre autres, un rôle dans la liaison des protéines de surface des formes extracellulaires du parasite à la membrane plasmique, et par conséquent dans l'invasion des globules rouges (GILSON ET AL. 2006; COWMAN, BERRY, ET BAUM 2012). Ces implications la rendent indispensable à la survie du parasite.

### 9) Phosphorylation

La phosphorylation est le phénomène de modification post-traductionnelle le plus étudié chez *Plasmodium*, et sera décrite en détails par la suite. Cette MPT correspond au transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP sur un acide aminé par estérification, via une protéine kinase (PK) (Figure 11). Dans la plupart des cas, l'acide aminé modifié est une sérine ou une thréonine, mais il peut également s'agir d'une tyrosine. Cependant, chez *Plasmodium*, moins de 1 % des phosphorylations concerne une tyrosine (SOLYAKOV ET AL. 2011).

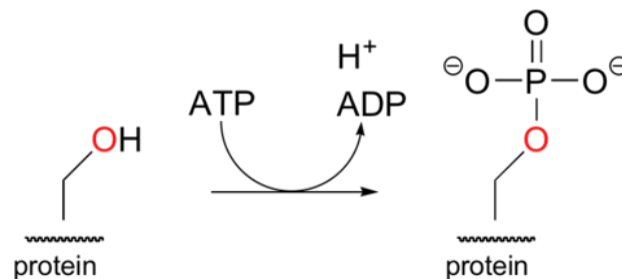


Figure 11 : Schématisation de la phosphorylation (source: UC Davis Chemwiki).

Le phosphoprotéome de *P. falciparum* a été étudié, mais le nombre de sites de phosphorylation déterminés varie en fonction de la méthode utilisée. Ainsi pour l'équipe de Doerig, il y aurait 1 177 sites de phosphorylation (SOLYAKOV ET AL. 2011), alors que pour celle de Alano il y en aurait 2 541 (LASONDER, GREEN, ET AL. 2012) ou encore plus de 5 000 pour Treeck et collaborateurs (TREECK ET AL. 2011).

Cette MPT a pour but de changer l'activité de la protéine cible, sa stabilité, ses interactions avec ses partenaires ou encore sa localisation (LIM ET AL. 2012). Or, la phosphorylation des protéines est réversible grâce à l'action de phosphatases. Ainsi cette modification est dynamique et peut évoluer en fonction de la progression du cycle de développement du parasite. L'importance de ce mécanisme de modification des protéines a été démontrée par l'utilisation d'inhibiteurs de kinases (KNOCKAERT ET AL. 2000; DORIN ET AL. 2001; McROBERT ET AL. 2008), puisque leur utilisation a un impact sur la croissance de *Plasmodium*. Cela peut s'expliquer par le fait que les protéines phosphorylées sont impliquées dans différents mécanismes cellulaires comme la réplication de l'ADN, la différenciation, la migration, le métabolisme, la cyto-adhérence ou encore l'invasion des érythrocytes (SOLYAKOV ET AL. 2011; TREECK ET AL. 2011; LASONDER, GREEN, ET AL. 2012; DOERIG ET AL. 2015).

Les kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines chez *P. falciparum* ont été listées et semblent être nombreuses par rapport au nombre de phosphatases codées par son génome. Certaines de ces kinases ont d'ailleurs été caractérisées.



## B. Les kinases

Chez *P. falciparum*, il y aurait entre quatre-vingt-six et quatre-vingt-dix-neuf protéines ressemblant aux PKs (WARD ET AL. 2004; ANAMIKA, SRINIVASAN, ET KRUPA 2005; TEWARI ET AL. 2010; TALEVICH ET AL. 2012), mais il n'y en a que quelques-unes dont la fonction a été identifiée. Différentes classes de kinases sont présentes : les kinases ressemblant à celles existant chez les eucaryotes (ePKs), celles ressemblant aux kinases des archées et plantes (aPKs), et les kinases spécifiques aux apicomplexes (Tableau 4). Le classement des enzymes ci-dessous correspond à celui qui a été réalisé par Talevich et al (TALEVICH ET AL. 2012).

### 1) Les ePKs

Quasiment toutes les familles de kinases des eucaryotes sont présentes chez *Plasmodium*. Il s'agit des CK1, des AGCs, des CamK, des CMGCs, des Tyrosine-Kinases Like, des PEKs et des NEKs (WARD ET AL. 2004; TEWARI ET AL. 2010; TALEVICH ET AL. 2012) (Tableau 4). Les deux groupes dont l'existence chez le parasite est discutée, sont les tyrosine-kinases et les MAPKKs encore appelées STE (STERility), ce dernier nom correspond au phénotype observé lorsque ces kinases sont mutées chez les eucaryotes.

#### a) Les Tyrosine-Kinases

L'existence des tyrosine-kinases (Tyr K) n'est toujours pas claire chez le parasite. Ce type d'enzyme ne semble pas être présent chez le parasite (WARD ET AL. 2004; TEWARI ET AL. 2010; SOLYAKOV ET AL. 2011; TREECK ET AL. 2011; TALEVICH ET AL. 2012). Malgré cela, la présence de phosphorylation sur des tyrosines, même si elle est faible, est observée (SOLYAKOV ET AL. 2011; TREECK ET AL. 2011). Ce type de phosphorylation est donc soit réalisé par un sous-ensemble de sérine/thréonine-kinases, soit par des kinases à double spécificité. Cette deuxième possibilité correspond à l'autophosphorylation d'une sérine/thréonine-kinase sur une tyrosine afin d'être activée (DOERIG ET AL. 2015).

#### b) Les MAPKKs ou STEs

Selon les recherches, cette catégorie de kinases est soit totalement absente, soit présente mais en petit nombre : un ou deux membres (WARD ET AL. 2004; TEWARI ET AL. 2010). L'équipe de Doerig a identifié une kinase STE : PfPK8 (TALEVICH ET AL. 2012). Habituellement, les MAPKKs sont impliquées dans la cascade de signalisation MAPK chez les eucaryotes. Or la présence de cette catégorie de kinases chez *P. falciparum* est encore discutée. Si ces enzymes sont absentes chez le parasite, l'hypothèse selon laquelle la cascade de signalisation MAPK du parasite serait différente, peut être émise.

#### c) Le groupe CK1

Contrairement aux deux familles précédentes, la famille des Caséine Kinases (CK) est bien présente même si elle est incarnée par un unique membre. Il s'agit de la caséine kinase 1



(CK1) (WARD ET AL. 2004). Cette kinase utilise préférentiellement les groupements phosphate provenant d'ATP. Elle est exprimée à tous les stades de développement du parasite, mais son activité est plus élevée au stade trophozoïte (BARIK, TAYLOR, ET CHAKRABARTI 1997). Sa localisation est dynamique puisqu'elle est retrouvée dans la membrane de la cellule hôte aux stades précoces, ainsi qu'à l'extérieur de l'érythrocyte. Aux stades trophozoïte et schizonte elle est plutôt intracellulaire, avant de s'associer aux micronèmes dans les mérozoïtes (DORIN-SEMBLAT ET AL. 2015).

L'inhibition de CK1 provoque un arrêt de la prolifération du parasite. Ainsi cette kinase possède un rôle important dans le développement de *P. falciparum* (KNOCKAERT ET AL. 2000). Cela s'est confirmé lors de l'identification des substrats de PfCK1 qui se sont avérés être impliqués dans l'épissage des ARNm, le trafic des protéines et l'invasion de la cellule hôte notamment (DORIN-SEMBLAT ET AL. 2015).

#### d) Groupe AGC

Les kinases du groupe AGC sont des sérine/thréonine-kinases dépendantes du calcium, des phospholipides et des nucléotides cycliques comme l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate) et le GMPc (Guanosine MonoPhosphate). Le nom AGC provient du fait que ce groupe contient notamment les kinases PKA, PKG et PKC chez les eucaryotes, alors que chez *Plasmodium* il est constitué de trois membres : PKA, PKG et PKB (TALEVICH ET AL. 2012).

##### o PKA :

La PKA, codée par un gène unique (SYIN ET AL. 2001), est une kinase dépendante de l'AMPc. Il a été montré que son expression varie en fonction du stade de développement du parasite, ainsi son niveau est plus élevé lors des stades asexués. Ceci est en corrélation avec la détection de l'activité de PfPKA au stade schizonte (SYIN ET AL. 2001). Dans le but d'être fonctionnellement active, cette kinase nécessite d'être phosphorylée dans sa boucle d'activation, tout comme vingt-deux autres kinases (SOLYAKOV ET AL. 2011). Cette phosphorylation, qui sera réalisée par une kinase, a pour but de réguler l'activité de la PKA.

Pour déterminer le rôle de PfPKA chez le parasite, un inhibiteur a été utilisé (SYIN ET AL. 2001). Il a été observé que la croissance du parasite est arrêtée, ainsi la PKA aurait un rôle essentiel dans la multiplication du parasite. Des expériences de surexpression de PKA ont également été réalisées, et l'altération de la croissance du parasite est à nouveau observée (BERALDO ET AL. 2005; MERCKX ET AL. 2008). Cependant, il suffit d'augmenter l'AMPc intracellulaire pour revenir à une croissance normale de *P. falciparum* (MERCKX ET AL. 2008).

Par conséquent, PfPKA a un rôle dans la croissance du parasite grâce aux substrats qu'elle phosphoryle. Il s'agit plus précisément de la concentration en calcium cytosolique (BERALDO ET AL. 2005), de la régulation des canaux anioniques des érythrocytes infectés (MERCKX ET AL. 2008; LASONDER, TREECK, ET AL. 2012), et de l'invasion de la cellule hôte (LEYKAUF ET AL. 2010; LASONDER, GREEN, ET AL. 2012; LASONDER, TREECK, ET AL. 2012).

○ PKG :

PfPKG est une kinase dépendante de GMPc qui diffère quelque peu des PKG de mammifère notamment au niveau de sa structure (DENG ET BAKER 2002). Cependant, elles ont un point commun qui est la phosphorylation de leur boucle d'activation pour les rendre fonctionnelles (SOLYAKOV ET AL. 2011). Cette enzyme est exprimée en majorité aux stades intra-érythrocytaires même si elle possède aussi un rôle dans la gamétogénèse.

PfPKG joue un rôle dans la progression du cycle asexué. En effet, son inhibition empêche les schizontes de poursuivre leur cycle puisqu'ils sont dimorphiques et dans l'incapacité de se rompre et de libérer les mérozoïtes infectieux (TAYLOR ET AL. 2010; COLLINS, HACKETT, ET AL. 2013; BROCHET ET AL. 2014). Par ailleurs, la sortie des formes infectieuses de leur cellule hôte implique la signalisation par le calcium qui est également liée à la PKG (BROCHET ET AL. 2014). Il se pourrait, même si cela n'est pas encore clairement démontré, que PfPKG ait un impact dans le glissement de l'oocinète, lors de la transmission du parasite au moustique (MOON ET AL. 2009). Et pour terminer, il s'avère que la PKG est essentielle à la gamétogénèse induite par l'acide xanthurénique produite par l'hôte invertébré (MCROBERT ET AL. 2008).

○ PKB :

Le dernier membre de la famille des AGC est PfPKB. Cependant, PfPKB diffère des autres membres de cette famille de par sa structure, puisqu'elle ne possède pas de domaine Pleckstrine et son domaine Nt est inhabituel comparé aux kinases de mammifères appartenant aux AGCs (KUMAR, VAID, ET AL. 2004). Cette dernière lui permet de se lier, en plus du calcium, à la calmoduline. Ces deux partenaires permettront de réguler son activité (VAID ET SHARMA 2006). Tout comme les autres membres de sa famille, PfPKB doit être phosphorylée sur une sérine dans sa boucle d'activation. Il semblerait qu'il s'agisse d'une autophosphorylation (KUMAR, VAID, ET AL. 2004).

Le principal rôle de PfPKB réside dans l'invasion des hématies, puisque son inhibition directe ou bien l'inhibition de ses activateurs en amont (la calmoduline et la phospholipase C) réduisent la capacité des mérozoïtes à infecter les globules rouges sains (KUMAR, VAID, ET AL. 2004; VAID, THOMAS, ET SHARMA 2008). Pour confirmer ce résultat, il s'avère que PKB est associé à PfGAP45 qui fait partie du moteur du glidéosome (VAID, THOMAS, ET SHARMA 2008).

e) Groupe CamK

Cette famille est composée de sérine/thréonine-kinases dépendantes de la calmoduline. L'activité de ces kinases dans le développement du parasite a été démontrée par Silva-Neto et collaborateurs (SILVA-NETO, ATELLA, ET SHAHABUDDIN 2002). Le développement des stades zygote à oocinète du parasite implique une maturation biochimique qui repose sur l'activité des kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline. Ainsi, les CamK ont un rôle dans le développement du parasite chez son hôte invertébré (SILVA-NETO, ATELLA, ET SHAHABUDDIN 2002).

La famille des CamK est composée de dix-sept membres et comprend des CDPKs, des PKs, PfKIN, et d'autres membres qui ne sont pas encore clairement identifiés en tant que kinase.

- CDPK1 à 7

Ce groupe d'enzymes présente une structure similaire aux Calcium-Dependent Protéines Kinases des plantes et protistes (CDPKs) d'où leur nom (WARD ET AL. 2004; LIM ET AL. 2012). Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine catalytique d'activation situé au même niveau que le domaine de liaison au calcium, ce dernier étant un domaine EF-hand (qui est en général présent en quatre exemplaires). La calmoduline étant capable de se lier aux ions calcium, le domaine de liaison au calcium permet donc de rapprocher la calmoduline de l'enzyme, et ainsi de l'activer. A ces domaines s'ajoute également un domaine de jonction qui permet la liaison à la membrane.

Certaines CDPKs de *P. falciparum* ont été bien décrites, alors que d'autres ne font l'objet que d'études préliminaires.

PfCDPK1 est une enzyme qui est exprimée principalement au stade intra-érythrocytaire (KATO, SAKATA, ET AL. 2008; GREEN ET AL. 2008; AZEVEDO ET AL. 2013), mais elle est également exprimée durant le cycle sexué chez le moustique (AZEVEDO ET AL. 2013). Cette protéine possède trois motifs qui sont : un motif consensus de myristoylation, un motif putatif de palmitoylation et enfin un domaine de jonction à la membrane (MÖSKES ET AL. 2004). Ce dernier motif explique la localisation membranaire de cette protéine, tandis que les autres motifs influent sur sa localisation dans les différents compartiments, puisqu'ils permettent d'exporter la protéine via une voie atypique (MÖSKES ET AL. 2004). PfCDPK1 a été localisée dans la vacuole parasitophore, dans le système vésiculaire du parasite, à la périphérie des mérozoïtes au niveau de la membrane interne (GREEN ET AL. 2008), ainsi qu'à la membrane plasmique du parasite durant les étapes de réplication et d'invasion, et chez les formes précoces du stade érythrocytaire (AZEVEDO ET AL. 2013).

PfCDPK1 est capable de phosphoryler deux de ses partenaires qui sont des composants du moteur du glidéosome (GREEN ET AL. 2008). Ainsi, une inhibition de cette enzyme entraîne une incapacité du parasite à envahir la cellule hôte (GREEN ET AL. 2008; KATO ET AL. 2008). Des interruptions du gène ont également été réalisées, et ont démontré que cette kinase est essentielle au parasite (KATO ET AL. 2008; AZEVEDO ET AL. 2013).

PfCDPK2 a, quant à elle, été caractérisée par l'équipe de Kappes (FÄRBER ET AL. 1997). Elle est constituée d'un domaine catalytique serine/thréonine kinase, d'une région de liaison à la membrane en Nt, de quatre domaines EF-hand putatifs, ainsi que d'un motif de myristoylation. Cette kinase est exprimée à tous les stades de développement intra-érythrocytaire du parasite, sauf à l'étape de segmentation. Afin d'être active, PfCDPK2 s'autophosphoryle mais uniquement en présence de calcium (FÄRBER ET AL. 1997). Le seul substrat identifié à ce jour, est la myéline basique, et tout comme pour son autophosphorylation, PfCDPK2 a besoin de calcium pour phosphoryler ce substrat.

La troisième kinase de la famille des CDPKs est composée également des quatre domaines caractérisant ces kinases. Elle semble être exprimée préférentiellement au stade érythrocytaire sexué, ainsi elle aurait un rôle dans la gamétogénèse (LI, BAKER, ET COX 2000).

PfCDPK4 présente également les quatre domaines habituels, cependant le domaine de jonction est un peu différent, ce qui ne l'empêche pas de réguler l'enzyme (RANJAN ET AL. 2009). Cette kinase est exprimée aux stades sexués. Chez *P. berghei*, CDPK4 possède un rôle dans la régulation du cycle sexué du parasite ainsi que dans sa transmission (BILLKER ET AL. 2004). Ce résultat est également valable chez *P. falciparum* (WARD ET AL. 2004).

La cinquième CDPKs de *P. falciparum* est exprimée dans les mérozoïtes infectieux (DVORIN ET AL. 2010). Les parasites KO pour cette enzyme présentent un arrêt de la croissance au stade schizonte. Ces derniers sont dans l'incapacité de se rompre et de libérer les formes infectieuses. Ce résultat suggère que PfCDPK5 a un rôle essentiel dans la libération des mérozoïtes (DVORIN ET AL. 2010).

En ce qui concerne CDPK6, aucune étude n'a été réalisée à son sujet.

La dernière CDPK identifiée est la CDPK7. Sa structure diffère des autres CDPK, puisqu'elle ne présente que deux domaines EF-hand se liant au calcium en Nt, mais elle possède un domaine pleckstrine situé à proximité du domaine catalytique (KUMAR ET AL. 2014). Le Knock-Out de cette kinase provoque une diminution de la croissance des parasites au stade intra-érythrocytaire, ce qui indique qu'elle a un rôle important dans le cycle asexué de *P. falciparum* (TEWARI ET AL. 2010; KUMAR ET AL. 2014).

Parmi les CamKs, se trouvent d'autres kinases qui n'appartiennent pas à la famille des CDPKs, et ne possèdent pas de domaine EF-hand (WARD ET AL. 2004). Il s'agit notamment des protéines kinases (PK) 2 et 9, dont seule PfPK2 a été étudiée.

- PfPK2

PfPK2 est une sérine/thréonine-kinase dépendante de la calmoduline, qui se situe principalement dans la membrane parasitaire des mérozoïtes (ZHAO ET AL. 1992; KATO, SUDO, ET AL. 2008). C'est une enzyme qui est phosphorylée en présence de calmoduline. L'utilisation d'un inhibiteur de cette dernière lors de la phase d'invasion, entraîne une impossibilité de phosphorylation de PfPK2, et donc une diminution de parasitémie des formes anneaux. Ainsi PfPK2 est un acteur du processus d'invasion (KATO, SUDO, ET AL. 2008).

La dernière enzyme caractérisée et faisant partie des CamKs est PfKIN.

- PfKIN

PfKIN est une sérine/thréonine kinase qui possède un domaine de liaison à l'ATP, un domaine de reconnaissance du substrat et un domaine de catalyse comme les autres kinases. Cependant, elle se démarque avec sa région Nt qui ne ressemble à aucune autre kinase. Cette enzyme est exprimée uniquement au stade gamétocyte, ce qui permet de supposer qu'elle fait partie du processus de transmission du parasite au moustique (BRACCHI ET AL. 1996).

Les protéines suivantes sont classées parmi les CamKs du fait de leur proximité phylogénétique (TALEVICH ET AL. 2012), mais elles ne sont pas encore caractérisées.

- o CamKs non caractérisées

Il s'agit de PF3D7\_1423600, de PF3D7\_1450000, de PF3D7\_0715300, de PF3D7\_0311400, de PF3D7\_0214600, de PF3D7\_0704500, et de PF3D7\_1104900.

Le groupe suivant présentant des similitudes avec les kinases eucaryotes est celui des CMGC.

- f) Groupe CMGC

Il est constitué de dix-huit membres (TALEVICH ET AL. 2012) qui sont des kinases dépendantes des cyclines (CDK), des MAPKs (Mitogen-Activated-Protein Kinases), des GSK (Glycogen-Synthase) ou encore des Kinases CDK-like.

- o CDK

Ce sont des kinases dépendantes de la liaison aux cyclines, connues pour être nécessaires à la régulation du cycle de développement du parasite. D'ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur de CDK empêche la croissance du parasite au stade trophozoïte/schizonte (IWANAGA ET AL. 2013). Elles sont au nombre de neuf, mais seules six d'entre-elles ont été caractérisées.

Tout d'abord, il y a PfCRK-1 et PfCRK-3. Ces deux enzymes nécessitent, pour être actives, d'être phosphorylées sur une tyrosine dans leur boucle d'activation. Cette phosphorylation dynamique réalisée par PfMRK est une réaction dépendante des cyclines (DOERIG ET AL. 1995; CHEN ET AL. 2006; SOLYAKOV ET AL. 2011). Mais pour ce faire, il faut que PfMRK s'autophosphoryle. Et contrairement à la phosphorylation de ses substrats, l'autophosphorylation est indépendante des cyclines (CHEN ET AL. 2006).

Le rôle de PfCRK-1 n'a pas été exploré, mais son expression est régulée au cours du développement, et une accumulation de son ARNm est observée au stade gamétocyte. Cela suggère un rôle de cette enzyme durant le cycle sexué du parasite chez le moustique (DOERIG ET AL. 1995). Il est tout de même à noter que cette enzyme, malgré sa ressemblance avec les CDK, ne possède pas une activité dépendante des cyclines (IWANAGA ET AL. 2013).

PfCRK-3, quant à elle, présente une activité CDK puisqu'elle est capable de phosphoryler l'histone H1 de mammifère, ainsi qu'un rôle crucial dans le développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum* (HALBERT ET AL. 2010). Par conséquent, cette importance pourrait être liée à une possible régulation de la condensation de la chromatine par modifications post-traductionnelles et donc de l'expression des gènes.

Parmi les CDK, se trouvent également les Pfpk5 et 6. Afin d'être en conformation active, ces enzymes doivent être phosphorylées (BRACCHI-RICARD ET AL. 2000; LE ROCH ET AL. 2000). Pfpk5 est cycline dépendante et est impliquée dans la régulation de la phase S du

parasite (GRAESER ET AL. 1996; MERCKX ET AL. 2003). PFK6, quant à elle, est exprimée essentiellement lors de la transition anneau/trophozoïte. Sa localisation nucléaire et cytoplasmique lui permet entre autre de phosphoryler des histones. Il se pourrait donc que celle-ci ait un rôle dans la réplication de l'ADN tout comme PFK5 (BRACCHI-RICARD ET AL. 2000).

La dernière CDK caractérisée est PfCK2 qui est en réalité une holoenzyme. L'activité kinase serait portée par la sous-unité PfCK2 $\alpha$ . Cette enzyme aurait un rôle essentiel pour les formes asexuées du stade érythrocytaire (HOLLAND ET AL. 2009).

Le sous-ensemble suivant appartenant au groupe des CMGCs est constitué de deux kinases ressemblant aux MAPKs.

- Map-1 et 2

Les homologues PfMAP-1 et -2 ressemblent aux MAPKs mais ne sont pas pour autant des orthologues clairs de la famille des MAPKs.

Le rôle de ces kinases a été démontré par la réalisation de Knock-Out (KO) chez les formes asexuées du parasite. Le KO de PfMAP-1 entraîne une augmentation de la production de PfMAP-2, cependant les parasites sont tout de même viables. Cela suggère un rôle important de PfMAP-1, mais qui peut être compensé par PfMAP-2 (DORIN-SEMBLAT ET AL. 2007), tandis que le KO de PfMAP-2 empêche l'exflagellation des gamétocytes mâles et donc la formation des oocinètes (RANGARAJAN ET AL. 2005; TEWARI ET AL. 2010). Cela est en adéquation avec l'expression gamétocyte-spécifique de PfMAP-2 (DORIN ET AL. 1999).

Parmi les kinases CMGCs se trouvent aussi les kinases qui s'apparentent à la kinase glycogène synthase (GSK).

- GSKs

Cette sous-famille est constituée de trois membres : PF3D7\_1316000 qui n'a pas été caractérisée, PFK1 et PFGSK3.

PFK1 est une enzyme exprimée et localisée de façon stade-spécifique (KAPPES ET AL. 1995). De plus, elle présente une implication lors de l'infection de la cellule hôte (CHAN, TAN, ET SIM 2007). Tandis que PFGSK3 est une kinase qui s'autophosphoryle de façon constitutive sur une tyrosine de sa boucle d'activation (SOLYAKOV ET AL. 2011; DOERIG ET AL. 2015) et dont l'ARNm est retrouvé en quantité égale durant le cycle érythrocytaire (DROUCHEAU ET AL. 2004). Cependant, la traduction de ces ARNm a lieu principalement lors du stade trophozoïte précoce. Une fois synthétisée, PFGSK3 est rapidement transportée vers le cytoplasme érythrocytaire où elle est associée à des structures vésiculaires (DROUCHEAU ET AL. 2004).

Les quatre dernières kinases du groupe CMGC sont des homologues aux CDKs et sont nommées des CDK-Like Kinases (CLK).

o CLKs

Les CLKs sont : PfCLK1 encore appelée PflAMMER, PfCLK2 ou PfsRPK2, PfCLK3 et PfCLK4 ou PfsRPK1. Très peu d'informations sont disponibles sur ces kinases, cependant il est connu que ces enzymes sont en fait toutes des SRPKs et phosphorylent des sérines et des arginines qui se situent dans des domaines RS (domaine riche en arginine et sérine) du côté Nt.

PfCLK1 possède en plus de ce domaine kinase atypique, un domaine LAMMER, d'où son nom (LI, TARGETT, ET BAKER 2001). Elle est exprimée spécifiquement au stade sexué, et pourrait être impliquée dans la régulation des processus de différenciation sexuelle de *P. falciparum* (LI, TARGETT, ET BAKER 2001). Quoi qu'il en soit, son action est nécessaire à la survie de celui-ci puisque le KO n'a pas permis d'obtenir de parasite viable (TEWARI ET AL. 2010).

En ce qui concerne PfCLK3, il semblerait qu'elle soit capable de s'autophosphoryler sur une tyrosine de sa boucle d'activation afin de prendre une conformation active. Bien que ce soit une sérine/thréonine-kinase, elle transfère un groupement phosphate de manière constitutive sur une tyrosine pendant sa traduction (SOLYAKOV ET AL. 2011).

g) Groupe TKL

Ce groupe est constitué de cinq membres : PF3D7\_1106800, PftKL1, PftKL2, PftKL3 et PftKL4 dont peu ou pas d'informations sont connues (TALEVICH ET AL. 2012). Seules PftKL2 et PftKL3 ont été caractérisées (ABDI ET AL. 2010; ABDI ET AL. 2013). PftKL2 et PftKL3 sont exprimées à tous les stades du cycle asexué du parasite ainsi qu'au stade gamétocyte. Cependant, leur rôle diffère. En effet, PftKL2 est exportée dans le cytoplasme de la cellule hôte, et aurait un rôle au niveau de la protection du parasite vis-à-vis du système immunitaire (ABDI ET AL. 2013). PftKL3, quant à elle, serait essentielle à la prolifération asexuée de *P. falciparum* (ABDI ET AL. 2010).

h) Groupe PEK

Le nom de ce groupe provient du fait que ces kinases phosphorylent la Pancreatic Eukaryotic initiation factor-2alpha Kinase (PEK). Elles sont au nombre de trois chez *P. falciparum* (TALEVICH ET AL. 2012) : PfeIK1, PfeIK2 et PfeIK4.

De façon surprenante, il s'avère que PfeIK1 n'est pas essentielle au développement du parasite, il est fort possible que d'autres enzymes prennent le relais (FENNELL ET AL. 2009). Par contre PfeIK2 et PfeIK4 sont des kinases nécessaires au parasite. La première contrôle la latence des sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique en phosphorylant PfeIF2 $\alpha$ , ce qui inhibe la traduction des ARNm et stoppe le cycle de développement du parasite (ZHANG ET AL. 2010), tandis que PfeIK4 est essentielle à l'achèvement du cycle érythrocytaire du parasite (ZHANG ET AL. 2012). En effet, celle-ci arrête la synthèse des protéines au stade schizonte ainsi que dans les gamétocytes prêts à infecter un Anophèle.



### i) Groupe NEK

Les quatre enzymes PfNEK-1, PfNEK-2, PfNEK-3 et PfNEK-4 sont des kinases liées à la famille des NIMA (Never In Mitosis gene A) présente chez les eucaryotes (TALEVICH ET AL. 2012). PfNEK-1 est exprimée uniquement aux stades asexués de *P. falciparum* (DORIN-SEMBLAT ET AL. 2011), alors que les trois autres membres de la famille NEK sont exprimés principalement dans les gamétocytes (REININGER ET AL. 2009; DORIN-SEMBLAT ET AL. 2011). Ainsi, leurs rôles sont différents. PfNEK-1 est nécessaire à l'achèvement du cycle asexué (DORIN-SEMBLAT ET AL. 2011), serait impliquée dans la régulation de la voie MAPK, même si l'existence de cette voie est discutée, et engagerait la phosphorylation de la kinase PfMAP-2 (DORIN ET AL. 2001). PfNEK-3 est également capable de phosphoryler cette kinase (LOW, CHUA, ET SIM 2009), tandis que PfNEK-2 est nécessaire à la transmission du parasite au moustique (REININGER ET AL. 2009), et PfNEK-4 est essentielle à la complétion du cycle sexué de *P. falciparum* (REININGER ET AL. 2005).

### j) Les kinases orphelines

Les vingt dernières kinases, ressemblant à des kinases eucaryotes mais de façon très éloignée, sont dites orphelines (TALEVICH ET AL. 2012). Parmi ces kinases ont été identifiées des Aurora (PfARK1, PfARK2 et PfARK3), ou bien encore PfPK7 qui a été caractérisée.

PfPK7 est une enzyme composite puisqu'elle présente des similarités avec plusieurs classes de kinases (DORIN ET AL. 2005). Elle est impliquée dans la schizogonie et par conséquent dans la prolifération du parasite (DORIN-SEMBLAT ET AL. 2008).

Mis à part les ePKs, *P. falciparum* présente également des kinases atypiques (aPKs), qui ne possèdent aucune homologie avec les ePKs.



Familles de kinases	Nom du groupe	Nombre de kinases	Nom ou numéro d'accèsion des kinases	Rôle
ePKs	STE	1	PfPK8	
	CK1	1	PfCK1*	
	AGC	3	PfPKA*, PfPKB*, PfPKG*	
	CamK	17	<u>7 CDPK</u> : PfCDPK1*, PfCDPK2*, PfCDPK3*, PfCDPK4*, PfCDPK5*, PfCDPK6*, PfCDPK7*	Voies de signalisation impliquant le calcium
			<b>PfPK2*</b> , PfPK9*	
			PfKIN*	
			Pf3D7_1423600*, Pf3D7_1450000*, Pf3D7_0715300, Pf3D7_0311400, Pf3D7_0214600*, Pf3D7_0704500*, Pf3D7_1104900*	
	CMGC	18	<u>9 CDK</u> : <b>PfCRK-1*</b> , <b>PfCRK-3*</b> , PfCRK-4*, PfCRK-5*, <b>PfMRK*</b> , <b>PfCK2*</b> , <b>PfPK5*</b> , <b>PfPK6*</b> , Pf3D7_1338900*	Régulation du cycle cellulaire
			<u>2 MAPK</u> : PfMAP-1*, PfMAP-2*	Transduction des signaux cellulaires
			<u>3GSK</u> : <b>PfGSK3*</b> , <b>PfPK1*</b> , Pf3D7_1316000*	Régulation de la prolifération cellulaire
			<u>2CLK</u> : PfCLK1* et PfCLK3* <u>2 SRPK</u> : PfSRPK1* et PfSRPK2*	Epissage des ARNm
	TKL	5	PfTKL1*, <b>PfTKL2*</b> , <b>PfTKL3*</b> , PfTKL4*, Pf3D7_1106800	
PEK	3	PfelK1*, PfelK2*, PfelK4*		
NEK		PfNEK-1*, PfNEK-2*, PfNEK-3*, PfNEK-4*	Régulation du cycle cellulaire	
orphelines	20	<u>3 ARK</u> : PfARK1*, PfARK2*, PfARK3*		
		<b>PfPK7*</b> , Pf3D7_1441300*, Pf3D7_1148000*, Pf3D7_1145200*, Pf3D7_0926000, Pf3D7_0321400, Pf3D7_0503500, Pf3D7_0926100*, Pf3D7_0926300, Pf3D7_0823000, Pf3D7_1331000, Pf3D7_1428500, Pf3D7_1247500*, Pf3D7_0928800, Pf3D7_1433900, Pf3D7_1121900*, Pf3D7_1474700		
aPKs	RIO	2	PfRIO1 et <b>PfRIO2</b>	
	ABC1	2	PfABCK1 et PfABCK2	
Kinases spécifiques des apicomplexes	FIKK	19	PfFIKK1, PfFIKK3, <b>PfFIKK4.1</b> , PfFIKK4.2, PfFIKK5, <b>PfFIKK7.1</b> , PfFIKK8, PfFIKK9.1, <b>PfFIKK9.2</b> , <b>PfFIKK9.3</b> , PfFIKK9.4, PfFIKK9.5, <b>PfFIKK9.6</b> , PfFIKK9.7, PfFIKK10.1, PfFIKK10.2, PfFIKK11, <b>PfFIKK12</b> et Pf3D7_1371700	

Tableau 4: Les protéines kinases putatives de *P. falciparum*. Ce tableau est réalisé à partir de l'arbre phylogénétique du kinome de *P. falciparum* (TALEVICH ET AL. 2012). Les protéines en gras ont été caractérisées. Les \* symbolisent les kinases essentielles tandis que les \* représentent les kinases qui ne sont pas indispensables à la survie du parasite (SOLYAKOV ET AL. 2011).

## 2) Les aPKs

Les aPKs sont divisées en deux familles : les RIO et les ABC1 constituées chacune de deux membres (**Tableau 4**). La sous-classe RIO est composée de PfRIOK1-like et PfRIOK2-like, et celle des ABC1 est formée par PfABCK1 et PfABCK2 (**WARD ET AL. 2004**). Cependant, ces kinases atypiques ne sont pas décrites.

Les apicomplexes se démarquent des autres eucaryotes notamment par la présence de kinases qui leur sont spécifiques : les FIKKs.

## 3) Les kinases spécifiques des apicomplexes

Ce groupe englobe des kinases atypiques possédant un motif Phe-Ile-Lys-Lys (FIKK) sans le sub-domaine II. Dix-neuf FIKKs sont répertoriées, et il y aurait un ou deux pseudogènes qui leur seraient associés (**WARD ET AL. 2004; TEWARI ET AL. 2010; TALEVICH ET AL. 2012**) (**Tableau 4**). Ainsi *P. falciparum* est l'apicomplexe possédant le plus grand nombre de FIKK (**WARD ET AL. 2004; ANAMIKA, SRINIVASAN, ET KRUPA 2005; TEWARI ET AL. 2010; TALEVICH ET AL. 2012**). Certaines de ces kinases ont un motif PEXEL qui leur permet d'être ciblées à différents compartiments subcellulaires (**NUNES ET AL. 2007; TALEVICH ET AL. 2012**). La plupart des FIKKs se situent dans le cytoplasme érythrocytaire (**SCHNEIDER ET MERCEREAU-PUJALON 2005**) et pourraient jouer un rôle dans le remodelage de la surface des hématies (**NUNES ET AL. 2007; NUNES ET AL. 2010**).

Les études réalisées à propos des différentes kinases de *P. falciparum* indiquent que ces enzymes sont impliquées dans des mécanismes cellulaires variés. Et il a été montré que certaines d'entre elles sont indispensables au développement du parasite. Ainsi les phénomènes de phosphorylation semblent être nécessaires à la croissance du parasite. Cependant, cette modification post-traductionnelle est réversible grâce à l'action de phosphatases.

## C. Les phosphatases

Plusieurs études du phosphatome de *P. falciparum* ont été réalisées et ont déterminé entre vingt-sept et soixante-sept phosphatases chez le parasite (**Tableau 5**) (**WILKES ET DOERIG 2008; PANDEY ET AL. 2014; GUTTERY ET AL. 2014**). Cette petite quantité de phosphatases désigne *Plasmodium* comme étant l'organisme eucaryote présentant le plus petit phosphatome (**WILKES ET DOERIG 2008**). Ainsi, il est tout à fait logique de supposer que ces phosphatases ne possèdent pas de substrat très spécifique. Il s'avère en fait que les phosphatases sont des holoenzymes constituées d'une sous-unité catalytique constante et d'un ensemble de sous-unités régulatrices variables (**VIRESHUP ET SHENOLIKAR 2009**). Ces dernières vont déterminer sa localisation, sa spécificité et réguler son activité.

La plupart des phosphatases de *P. falciparum* possèdent des résidus de liaison aux résidus phosphates ainsi que des résidus de liaison aux ions métalliques comme le fer, le calcium, le manganèse, le zinc par exemple. Elles sont capables de retirer les groupements

phosphates se situant sur des résidus tyrosines, sérines et thréonines essentiellement, et beaucoup plus rarement sur des résidus histidines (**WILKES ET DOERIG 2008**).

Les phosphatases identifiées appartiennent à différentes classes majeures : les métallophosphatases (MPP), les phosphatases ressemblant aux haloacides déshalogénases (HAD-like ou NIF), les tyrosine-phosphatases (PTPs), les phosphatases endo- et exonucléases (EPPs), les histidine-phosphatases (HPs), les phosphatases ressemblant aux tyrosine-phosphatases (PTP-like). A ces différentes enzymes, s'ajoutent des phosphatases « orphelines » (**Tableau 5**).

### 1) Les métallophosphatases

Le groupe des métallophosphatases est divisé en deux sous-familles : les PPPs (PhosphoProteins Phosphatase) et les PP2Cs.

#### a) Les phosphoprotéines phosphatases

Les PfPPPs (PhosphoProtéines Phosphatases) sont au nombre de dix-huit, il s'agit de PfPPP1, PfPPP2A, PfPPP5, PfPPP7, PfPPP2B, PfPPPKL, PfSHLP1, PfSHLP2, PfDDB1, PfGAP50, PfPPPβ, PfPPP4, PfPPP8, PfCPPED1, PfVsp29, PfMRE11, Pf3D7\_1464600, Pf3D7\_0312400 (**Tableau 5**) (**GUTTERY ET AL. 2014**). Ce groupe contient la plupart des phosphatases caractérisées chez *P. falciparum*. Par ailleurs, la majorité d'entre elles sont des sérine/thréonine-phosphatases (**PANDEY ET AL. 2014**).

Toutes les phosphatases caractérisées sont décrites ci-dessous, à l'exception de PfPPP1 qui, faisant l'objet de ce travail de thèse, fera l'objet d'un chapitre à part.

#### o PfPPP2A

PfPPP2A, est l'une des sérine/thréonine-phosphatases les plus abondantes (**DOBSON ET AL. 1999**; **VIRSHUP ET SHENOLIKAR 2009**) qui est impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Son activité combinée à celle de PfPPP1 représente 90 % de l'activité sérine/thréonine-phosphatase du parasite. D'ailleurs ces deux enzymes présentent une ressemblance au niveau de leur domaine catalytique, et sont toutes deux inhibées par l'acide okadaïque (**MACKINTOSH ET AL. 1990**). PfPPP2A possède également un motif conservé dans sa queue Ct qui joue un rôle dans la régulation de l'enzyme. Ce motif est également retrouvé chez les phosphatases PP2A-like : PfPPP4 et PfPPP6. PfPPP2A ainsi que PfPPP4 et PfPPP6, nécessitent de former un trimère afin d'être catalytiquement actives (**PANDEY ET AL. 2014**).

Cette phosphatase possède une localisation variable au cours du cycle de vie du parasite (**GUTTERY ET AL. 2014**), ce qui implique qu'elle est régulée par des partenaires. Parmi ces derniers se trouvent PfPTPA qui est un activateur de la phosphatase (**VANDOMME ET AL. 2014**), ou bien PfARP qui est un inhibiteur spécifique de l'enzyme (**DOBSON ET AL. 2003**).

- PfPP2B

Tout comme PfPP2A, PfPP2B forme un hétérotrimère dans le but d'être catalytiquement active. Ces deux enzymes possèdent d'ailleurs des zones de similarité, notamment au niveau de la zone catalytique, et sont souvent classées dans la même sous-famille de PPP. Cette sérine/thréonine-phosphatase (DOBSON ET AL. 1999), encore appelé calcineurine, possède différents domaines de régulation, tels qu'une région auto-inhibitrice et des sites de liaison au calcium et à la calmoduline en Ct (BAJSA, DUKE, ET TEKWANI 2008; PANDEY ET AL. 2014). Elle pourrait également être régulée par phosphorylation puisque des sites de phosphorylations putatifs ont été identifiés dans la région Nt de la protéine (BAJSA, DUKE, ET TEKWANI 2008).

Par ailleurs, l'inhibition de la calcineurine est possible par la cyclosporine A mais seulement en présence de cyclophiline (DOBSON ET AL. 1999). L'inhibition de PfPP2B entraîne une limitation de la croissance de *P. falciparum* (SINGH, MORE, ET CHITNIS 2014).

- PfPPβ

PfPPβ est une sérine/thréonine-phosphatase putative constituée d'un domaine catalytique proche des phosphatases de type PP2A dans sa région Ct, et en Nt des sites de phosphorylation (LI ET BAKER 1997). Elle nécessite la liaison d'un ion magnésium pour être catalytiquement active. Comme les enzymes appartenant au groupe des PP2A, PfPPβ est inhibée par l'acide okadaïque (WILKES ET DOERIG 2008). Cette phosphatase est exprimée spécifiquement au stade gamétocyte et pourrait par conséquent être impliquée dans le développement sexué du parasite (LI ET BAKER 1997).

- PfPP5

PfPP5 présente son site catalytique dans sa région Ct, une séquence de ciblage nucléaire à son extrémité Nt hypothétique. Cependant, celle-ci est localisée aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme durant le cycle érythrocytaire et chez les gamétocytes mâles, mais tout de même en plus grande quantité dans le noyau (LINDENTHAL ET KLINKERT 2002; GUTTERY ET AL. 2014). Elle possède également quatre motifs TPR (Tetratricopeptide Repeat) qui ont un rôle dans l'auto-inhibition de la phosphatase (DOBSON, KAR, ET AL. 2001). Toutefois, cette auto-inhibition, plutôt faible, est levée en présence d'acide arachidonique et d'acide oléique (LINDENTHAL ET KLINKERT 2002). Elle peut être inhibée par une autre molécule comme par exemple l'acide okadaïque (LINDENTHAL ET KLINKERT 2002). Cette protéine est connue pour interagir avec PfHsp90 via le domaine TPR (DOBSON, KAR, ET AL. 2001).

- PfPP7

Cette phosphatase a été identifiée en tant que PfPPJ avant de devenir PfPP7 (DOBSON, BRACCHI, ET AL. 2001). Celle-ci est une sérine/thréonine-phosphatase dépendante du calcium qui se fixe au niveau des deux domaines EF-hands en Nt pour être active (KUMAR, MUSIYENKO, OLDENBURG, ET AL. 2004), ainsi que du manganèse pour effectuer la réaction (BAJSA, DUKE, ET TEKWANI 2008; PANDEY ET AL. 2014). Cette phosphatase est résistante aux inhibiteurs classiques de PfPP1 et PfPP2A, ce qui peut s'expliquer par la séquence atypique de la région

Ct (DOBSON, BRACCHI, ET AL. 2001). Son expression est localisée dans le noyau durant le cycle intra-érythrocytaire (GUTTERY ET AL. 2014) et est majoritaire au stade schizonte (DOBSON, BRACCHI, ET AL. 2001).

- PfPPKL

Identifiée à l'origine en tant que PfPP $\alpha$  (LI ET BAKER 1998), PfPPKL tient son nom de la présence de domaines Kelch-like en tandem dans sa région Nt (BAJSA, DUKE, ET TEKWANI 2008; WILKES ET DOERIG 2008). A ces domaines s'ajoute une région Ct ressemblant à celle de PfPP1 (BAJSA, DUKE, ET TEKWANI 2008). Cette enzyme est exprimée uniquement au stade sexué et préférentiellement dans les gamétocytes femelles et dans les ookinètes au niveau du pôle apical (BAJSA, DUKE, ET TEKWANI 2008; GUTTERY ET AL. 2012; PHILIP ET AL. 2012). Cette expression stade spécifique explique pourquoi la délétion de PPKL de *P. berghei* provoque une différenciation anormale des ookinètes, ainsi que des parasites incapables de se mouvoir, ce qui empêche le parasite de rejoindre l'épithélium intestinal du moustique (GUTTERY ET AL. 2012). Fait intéressant, il n'existe pas de PPKL chez les opisthocontes, ce qui pourrait en faire une bonne cible thérapeutique (WILKES ET DOERIG 2008).

- PfSHLP1 et 2

Ces deux phosphatases sont proches des phosphatases bactériennes : les Shewanella-like ou Shelps (WILKES ET DOERIG 2008), et sont retrouvées également chez les plantes, les champignons et d'autres protozoaires. PfSHLP1 et 2 ont un rôle dans l'invasion de la cellule hôte (KUTUZOV ET ANDREEVA 2012). Cependant, elles sont exprimées à des stades de vie du parasite très différents. En effet, PfSHLP1 est exprimée durant le cycle de vie complet du parasite, mais elle est plus abondante lors du cycle intra-érythrocytaire (PATZEWITZ ET AL. 2013), tandis que PfSHLP2 est exprimée durant les phases schizonte et mérozoïte extracellulaire (FERNANDEZ-POL ET AL. 2013). Leur différence d'expression en fonction du stade de développement du parasite est en lien avec leur rôle, puisque PfSHLP1 intervient dans la transmission du parasite (PATZEWITZ ET AL. 2013) et PfSHLP2 est sécrétée dans l'érythrocyte hôte où elle déphosphoryle la protéine membranaire Band 3 et celle-ci possède un rôle dans l'adhésion et l'invasion de la cellule hôte (FERNANDEZ-POL ET AL. 2013).

- PfGAP50

La phosphatase PfGAP50 est une protéine associée au glidéosome qui permet la motilité du parasite. Elle est également appelée ACP5 pour ACide Phosphatase 5. Cette enzyme montre une préférence pour les substrats di- et triphosphorylés (MÜLLER ET AL. 2010). Elle est composée d'un signal d'ancrage dans la partie Nt et d'un domaine transmembranaire dans la région Ct. Ce dernier lui permet d'ailleurs de se localiser au niveau du complexe de la membrane interne (BOSCH ET AL. 2012). Et, de façon surprenante, elle possède des sites de liaison pour des ions Cobalt plutôt que pour des ions retrouvés plus couramment (BOSCH ET AL. 2012). Cette protéine, exprimée à tous les stades de développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum* (MÜLLER ET AL. 2010), possède une localisation qui évolue en fonction de ce cycle. En effet, elle est retrouvée dans le réticulum endoplasmique lors du stade précoce, avant d'être exportée au pôle apical lors de la formation des mérozoïtes filles, avant d'arriver

dans la vacuole parasitophore (YEOMAN ET AL. 2011). PfGAP50 aurait un rôle dans l'acquisition des nutriments provenant de l'hôte.

La deuxième sous-famille de PPP est celle des PP2Cs (**Tableau 5**).

### b) Les PP2C

Elle est constituée de onze membres : PfPPM1, PfPPM2, PfPPM3, PfPPM4, PfPPM5, PfPPM6, PfPPM7, PfPPM8, PfPPM9, PF3D7\_1009600 et PF3D7\_1208900, dont huit ne présentent pas d'orthologue humain (PANDEY ET AL. 2014). Ces enzymes, pour la majorité des sérine/thréonine-phosphatases dépendantes du magnésium ou du manganèse, ne sont pas caractérisées, à l'exception de PfPPM2.

PfPPM2, plus couramment appelée PfPP2C, est une sérine/thréonine-phosphatase dépendante du magnésium exprimée tout au long du cycle de vie de *P. falciparum*. Elle semble posséder deux domaines catalytiques, mais pour optimiser son activité, elle est capable de se dimériser, ce qui élève à quatre le nombre de sites actifs (MAMOUN ET AL. 1998). Elle présente également une boucle atypique qui pourrait être impliquée dans l'interaction avec ses substrats. A ces domaines s'ajouteraient des sites de myristoylation ainsi que des sites de phosphorylation qui pourraient réguler son activité (TREECK ET AL. 2011; WRIGHT ET AL. 2014). Elle présente de nombreux substrats parmi lesquels se trouvent des composants de la machinerie de traduction et de transcription (MAMOUN ET GOLDBERG 2001). Cela semble suggérer que cette phosphatase joue un rôle important dans la croissance du parasite. Et c'est le cas, puisque la mutation de PfPP2C démontre son implication dans la différenciation des oocinètes (GUTTERY ET AL. 2014). De plus, les tentatives de Knock-Out ont été un échec, ce qui confirme son essentialité à la survie du parasite (MAMOUN ET GOLDBERG 2001). Elle posséderait aussi un rôle dans l'allocation du sexe des gamètes.

Les autres membres de la sous-famille des PP2Cs sont exprimés en des lieux et périodes différents (GUTTERY ET AL. 2014). Cela explique la variété de phénotypes observés pour les mutants de certaines de ces phosphatases, notamment le mutant PfPPM1 qui est incapable de produire des ookinètes, et le mutant PfPPM5 qui présente des difficultés à produire des oocystes bien formés. Cependant, certaines phosphatases sont supposées posséder des activités redondantes puisque les parasites KO pour les phosphatases PfPPM3, PfPPM4, PfPPM7 et PfPPM8 ne présentent pas de phénotype particulier. Et en ce qui concerne PfPPM9, elle semble posséder une activité essentielle puisque des modifications génétiques de sa séquence sont impossibles (GUTTERY ET AL. 2014).

### 2) Les HaloAcide Déhalogénase-like

La seconde famille de phosphatases identifiée chez *P. falciparum* est celle des HAD-like (Haloacide Déhalogénase-like) (**Tableau 5**) qui comporte notamment des phosphatases ressemblant aux NIFs (NLI Interacting Factor-like PP) (WILKES ET DOERIG 2008). Elle est composée de dix membres : PfNIF2, PfNIF3, PfNIF4, PfTIM50, PfHAD3, PfPNKP, PfPNPase (4-nitrophenylphosphatase), PF3D7\_0817400, PF3D7\_1118400, PF3D7\_0303200. Parmi ces

enzymes, cinq d'entre elles ne présentent pas d'orthologue chez l'Homme (PANDEY ET AL. 2014).

La seule de ces enzymes qui soit caractérisée est PfPNKP (SIRIBAL ET AL. 2011). Elle est d'ailleurs atypique puisqu'elle est bifonctionnelle. Elle possède une activité kinase et phosphatase, d'où son nom : PolyNucleotid Kinase/Phosphatase (PNKP). Ainsi elle pourrait, comme son homologue humain, phosphoryler les extrémités 5'-OH de l'ADN et déphosphoryler les extrémités 3' phosphate de l'ADN. Elle serait impliquée dans la réparation des cassures de l'ADN simple brin (SIRIBAL ET AL. 2011).

### 3) Les protéines tyrosine-phosphatases

Le troisième groupe de phosphatases constitué de quatre membres : PfYVH1, PfPRL, PF3D7\_1127000 et PfPTP1, correspond aux protéines tyrosine-phosphatases (PTP). Elles peuvent être classées en trois familles (Tableau 5) : les phosphatases spécifiques des tyrosines, à double spécificité (DSPs) et les phosphatases à faible poids moléculaire (PANDEY ET AL. 2014).

#### ○ PfYVH1

PfYVH1 est une PTP qui est exprimée tout au long du cycle de vie du parasite (KUMAR, MUSIYENKO, CIOFFI, ET AL. 2004). Son site catalytique à double spécificité, qui permet de cibler des phosphosérines et des phosphotyrosines, se situe dans la région Nt alors que son domaine de liaison aux ions zinc se situe dans la partie Ct. Elle est localisée aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, selon le stade de développement du parasite (KUMAR, MUSIYENKO, CIOFFI, ET AL. 2004). Par son interaction avec PfPE (Pescadillo, une protéine régulatrice du cycle cellulaire), il semblerait que PfYVH1 joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire (KUMAR, MUSIYENKO, OLDENBURG, ET AL. 2004; GUTTERY ET AL. 2014), ainsi que dans le processus de traduction (PANDEY ET AL. 2014).

#### ○ PfPRL

Cette phosphatase ressemble à une protéine humaine de régénération du foie (PRL), d'où son nom. Elle est exprimée au cours du cycle intra-érythrocytaire du parasite, ainsi que dans les gamètes femelles et les zygotes (PENDYALA ET AL. 2008; GUTTERY ET AL. 2014). Elle serait une PTP à double spécificité, mais, seule son activité phosphatase a été démontrée (PENDYALA ET AL. 2008; PANDEY ET AL. 2014). Elle présente un motif de farnésylation en Ct qui permettrait à la PfPRL de s'associer à la membrane. Cette localisation au niveau de la membrane est confirmée puisqu'elle se situe au même endroit que la protéine membranaire PfAMA-1 (PENDYALA ET AL. 2008). Cette dernière est une protéine localisée dans la membrane apicale des mérozoïtes, et impliquée dans l'invasion des hématies. Ainsi, il se pourrait que PfPRL ait également un rôle à jouer dans l'invasion des érythrocytes (PANDEY ET AL. 2014).

#### ○ PfPTP1 et PF3D7\_1127000

PfPTP1 et PF3D7\_1127000 ne sont pas caractérisées. Cependant, la mutation de PfPTP1 ne provoque pas de phénotype chez le parasite. Ainsi, elle n'est pas essentielle et



possède une activité redondante avec une autre phosphatase (GUTTERY ET AL. 2014). Sa localisation au pôle apical des oocinètes matures suggère un rôle de PfPTP1 dans la polarité apicale.

En ce qui concerne PF3D7\_1127000, elle présente un motif PTP incomplet qui laisse planer un doute sur l'activité possible de cette phosphatase (PANDEY ET AL. 2014).

#### 4) Les Phosphatases Exonucléase-Endonucléases

La famille des Phosphatases Exonucléase-Endonucléases (EEP) est constituée de huit protéines putatives non caractérisées qui présentent toutes un domaine EEP conservé (PANDEY ET AL. 2014). Il s'agit de PF3D7\_0319200, PF3D7\_0705500, PF3D7\_1111600, PF3D7\_0107200, PF3D7\_0305600, PF3D7\_1238600, PF3D7\_1363500 et PF3D7\_1430600 (Tableau 5). Il est à noter que six d'entre-elles ne présentent pas d'orthologue humain.

PF3D7\_0705500 et PF3D7\_1111600 possèdent des domaines supplémentaires qui leur confèrent la capacité d'hydrolyser les inositol 5-phosphate. PF3D7\_0319200, quant à elle, présente une séquence similaire à une 2'5-phosphodiesterase. Et PF3D7\_1238600 ressemble à une sphingomyéline phosphodiesterase qui pourrait jouer un rôle important dans le développement et la croissance du parasite (PANDEY ET AL. 2014).

#### 5) Les histidines-phosphatases

La cinquième famille de phosphatases de *P. falciparum* est celle des histidines-phosphatases (HP) et compte cinq membres dont PfPGM1 et PfPGM2 (Tableau 5). Celles-ci sont des phosphoglycérate mutases putatives (PGMases) qui impliquent des résidus histidine dans leur mécanisme d'action (HILLS ET AL. 2011). Un premier résidu est phosphorylé pendant la réaction, en même temps que deux arginines clés, tandis qu'un second résidu se lie à un groupement phosphate avant, pendant et après le transfert (PANDEY ET AL. 2014). PfPGM2 pourrait soit être impliquée dans le métabolisme du phosphate du parasite, soit être un régulateur du cycle de vie. Quoi qu'il en soit, cette phosphatase est essentielle au développement du parasite (HILLS ET AL. 2011).

#### 6) Les protéines tyrosine-phosphatases-like

La dernière famille identifiée de phosphatases de *P. falciparum* est celle des protéines ressemblant aux tyrosine-phosphatases (PTP-like). Cette famille est divisée en trois sous-classes : PTPLA, RHOD et les phosphatases CYTH-like (Tableau 5).

##### a) PTPLA

Il n'existe qu'un membre de cette sous-famille : PfPTPLA. Elle présente une modification du site catalytique qui se caractérise par la substitution d'une proline par une arginine. Cela pourrait la rendre catalytiquement inactive (WILKES ET DOERIG 2008). Elle possède également un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique en Ct (PANDEY ET



AL. 2014). Elle posséderait un rôle important dans la transmission de l'infection à l'Homme (GUTTERY ET AL. 2014).

### b) RHOD

Ce groupe comprend deux phosphatases putatives : PfMKP1 et PF3D7\_1206400 comportant un ou deux domaines homologues à la rhodanèse (RHOD) (PANDEY ET AL. 2014). C'est d'ailleurs dans le domaine RHOD que se situerait dans le site catalytique de ces enzymes.

### c) CYTH-like phosphatase

Le dernier sous-groupe est celui des triphosphate tunnel métaloenzyme phosphatases (CYTH-like phosphatases). Il ne comprend qu'un seul membre : PfPRT1 (PANDEY ET AL. 2014). Celui-ci serait une triphosphatase de l'ARN et aurait un rôle à jouer dans la réalisation de la coiffe de l'ARN (AURRECOECHEA ET AL. 2009).

A ces différentes familles de phosphatases de *P. falciparum*, s'ajoute des enzymes orphelines qui ne ressemblent pas aux phosphatases des autres eucaryotes.

## 7) Les phosphatases orphelines

Il existe différentes classes de phosphatases orphelines : les PAP2-like, les Syja-N, les PTH2 et les nucléoside-phosphatases (Tableau 5).

Les PAP2-like, ou phosphatases acide 2-phosphatidique, sont au nombre de trois, dont deux sont le produit d'un seul gène mais de deux épissages différents de l'ARNm. Il s'agit de PfPAP, qui possède deux isoformes, et de PF3D7\_0805600 (PANDEY ET AL. 2014).

La classe des Syja-N (SacLhomology domain), est composée, quant à elle, de trois membres : PfIP5P, PF3D7\_0705500 et PF3D7\_0802500 (PANDEY ET AL. 2014). Leur nom provient de leur motif commun situé en Nt, qui est également présent sur la protéine inositol-5-phosphatase synaptojanine.

La troisième sous-classe des phosphatases orphelines, représentée par un membre unique : PF3D7\_0610500, est celle des peptidyl-tRNA hydrolase type 2 (PTH2) (PANDEY ET AL. 2014). Elle aurait un double rôle puisqu'elle serait capable de phosphoryler et de déphosphoryler des résidus tyrosine (AURRECOECHEA ET AL. 2009).

Les nucléosides phosphatases sont représentées par deux membres putatifs chez le parasite : PF3D7\_1431800 (apyrase putative) et PF3D7\_1322000 (adénosine diphosphate putative) (PANDEY ET AL. 2014).

Famille	Sous-famille	Nombre de phosphatases	Nom ou numéro d'accèsion des phosphatases
<b>MPPs</b>	PPPs	18	<b>PfPPP1, PfPPP2A, PfPPP2B, PfPPPβ, PfPPP5, PfPPP7, PfPPKL, PfSHLP1, PfSHLP2, PfGAP50, PfDBR1, PfPPP4, PfPPP8, PfCPPED1, PfVsp29, PfMre11, PF3D7_1464600, PF3D7_0912400</b>
	PP2C	11	PfPPM1, <b>PfPPM2</b> , PfPPM3, PfPPM4, PfPPM5, PfPPM6, PfPPM7, PfPPM8, PfPPM9, Pf3D7_1009600, Pf3D7_1208900
<b>HAD-like</b>		10	PfNIF2, PfNIF3, PfNIF4, PfTIM50, PfHAD3, <b>PfPNKP</b> , PfPNPase, PF3D7_0817400, PF3D7_1118400, PF3D7_0303200
<b>PTPs</b>		4	<b>PfYVH1, PfPRL</b> , PF3D7_1127000, PfPTP1
<b>EEPs</b>		8	PF3D7_0319200, PF3D7_0705500, PF3D7_1111600, PF3D7_0107200, PF3D7_0305600, PF3D7_1238600, PF3D7_1363500, PF3D7_1430600
<b>HPs</b>		5	<b>PfPGM1, PfPGM2</b> , PF3D7_1430300, PF3D7_0208400, PF3D7_0310300
<b>PTP-like</b>	PTPLA	1	PfPTPLA
	RHOD	2	PfMKP1, PF3D7_1206400
	CYTH-like phosphatase	1	PfPRT1
<b>Orphelines</b>	PAP2-like	3	PfPAP.1, PfPAP.2, PF3D7_0805600
	Syja-N	3	PfIP5P, PF3D7_0705500, PF3D7_0802500
	PTH2	1	PF3D7_0610500
	Nucléoside phosphatases	2	PF3D7_1431800, PF3D7_1322000

Tableau 5: Les différentes phosphatases de *P. falciparum*. En gras sont représentées les phosphatases caractérisées (GUTTERY ET AL. 2014).

Parmi les protéines phosphatases citées précédemment, la protéine phosphatase de type 1 est la plus étudiée. Quelques-uns de ses partenaires/régulateurs ont d'ailleurs été identifiés et caractérisés.

### III. PfPP1 et ses partenaires/régulateurs

#### A. PfPP1

PfPP1, ou la Protéine Phosphatase de type 1 de *P. falciparum*, est responsable de la majorité de l'activité phosphatase du parasite (YOKOYAMA ET AL. 1998; BHATTACHARYYA ET AL. 2002). Elle est codée par un gène unique qui se situe sur le chromosome 14 du génome de *P. falciparum* (BHATTACHARYYA ET AL. 2002; KUMAR ET AL. 2002). Le gène codant pour la protéine PfPP1 (PF3D7\_1414400 sur PlasmoDB) est composé de quatre introns et de cinq exons. Ce gène code pour une protéine de 304 acides aminés, soit 34.9 kDa, qui est exprimée à tous les stades érythrocytaires, ainsi que dans les gamètes (BHATTACHARYYA ET AL. 2002). Durant ce cycle, elle est aussi bien retrouvée dans le noyau que dans le cytoplasme (DAHER ET AL. 2006). Elle présente environ 80 % d'homologie avec la PP1c humaine, bien que plus courte. Elle est d'ailleurs la plus petite PP1 connue (KUMAR ET AL. 2002). Malgré cela, PfPP1 possède les mêmes caractéristiques que ses homologues, notamment le site catalytique qui se situe dans la région Nt et qui est quasiment parfaitement conservé, les domaines de liaison aux inhibiteurs, et la séquence signature des sérine/thréonine-phosphatases (LRGNHE). A ceux-là s'ajoutent des sites de liaison pour les ions métalliques ainsi qu'un domaine d'interaction avec le groupement phosphate et un autre pour l'interaction avec le substrat, ou encore deux sites putatifs de liaison à des protéines kinases C et cinq sites putatifs de phosphorylation par la caséine kinase (BHATTACHARYYA ET AL. 2002; KUMAR ET AL. 2002).

La PfPP1 recombinante a montré une activité phosphatase vis-à-vis du substrat pNPP (para-NitroPhénylPhosphate), d'histones phosphorylées sur une sérine ou encore d'un peptide synthétique phosphorylé sur une tyrosine *in vitro* (KUMAR ET AL. 2002). Ces résultats suggèrent que cette phosphatase pourrait être à la fois une tyrosine-phosphatase et une sérine/thréonine-phosphatase, mais il semblerait que son activité majoritaire s'effectue principalement sur les résidus sérine et thréonine. L'acide aminé impliqué dans cette activité a d'ailleurs été identifié, il s'agit de l'asparagine 122. Sa mutation entraîne une abolition de l'activité de PfPP1 (KUMAR ET AL. 2002).

Afin de déterminer le rôle de PfPP1 chez le parasite, il est tout à fait possible d'utiliser des inhibiteurs de PfPP1 puisque, comme ses homologues, elle est sensible à l'acide okadaïque (YOKOYAMA ET AL. 1998; BHATTACHARYYA ET AL. 2002), à la calyculine A (YOKOYAMA ET AL. 1998; BHATTACHARYYA ET AL. 2002; BLISNICK ET AL. 2006), la tautomycine ou encore des partenaires inhibiteurs comme les inhibiteurs 1 et 2 (KUMAR ET AL. 2002). L'utilisation de ces inhibiteurs a permis de confirmer l'activité phosphatase de PfPP1 puisque qu'une hyperphosphorylation dose-dépendante des protéines est observée lorsque la phosphatase est inhibée (BHATTACHARYYA ET AL. 2002). Et elle a également pu montrer une diminution dose-dépendante de la réinvasion des mérozoïtes suite à l'absence de déphosphorylation de PfSBP1 (protéine transmembranaire de liaison au cytosquelette) par PfPP1 (BLISNICK ET AL. 2006). Pour déterminer les rôles de l'enzyme chez le parasite, d'autres approches ont été utilisées. La première est l'ARN interférence (RNAi) qui empêche la traduction de l'ARNm en protéine. Et il s'avère que le RNAi de PfPP1 à différents stades inhibe la croissance du parasite,

ce qui semble indiquer que l'enzyme est essentielle à la progression du cycle cellulaire (KUMAR ET AL. 2002). Mais l'utilisation du RNAi chez *P. falciparum* est controversée. Ainsi, une seconde approche a été utilisée : il s'agit d'expérimentations par génétique inverse. Les tentatives de Knock-Out de PP1 chez *P. falciparum* ont été un échec (KHALIFE, RESULTATS NON PUBLIES), et il en est de même pour la PP1 de *P. berghei* (Guttery et al. 2014a; M. Zhang et al. 2016). Ces résultats indiquent que PfPP1 est essentielle à la survie du parasite.

Le faible nombre de phosphatases chez le parasite semble indiquer qu'elles ne possèdent pas une grande spécificité de substrats. En réalité, ce sont les partenaires de ces enzymes qui vont leur apporter une spécificité de substrat, une activité et une localisation spécifique (VIRSHUP ET SHENOLIKAR 2009). Ainsi, au lieu de présenter une phosphatase PfPP1, le parasite présente une myriade de phosphatases constituées de la partie catalytique PfPP1 et d'un partenaire/régulateur. Chez l'Homme, environ deux-cents régulateurs de PP1 ont été décrits, mais chez *P. falciparum*, les régulateurs de PfPP1 sont peu étudiés.

## B. Les régulateurs de PfPP1

Différents partenaires de PfPP1 ont été déterminés par génomique comparative puisqu'ils sont connus pour être des régulateurs de PP1 chez d'autres organismes.

### 1) PflRR1

Le premier partenaire potentiel de PfPP1 identifié est PflRR1 (PF3D7\_1032800), un homologue de Sds22 chez *Schizosaccharomyces pombe* (DAHER ET AL. 2006). PflRR1 appartient à la famille de protéines LRR riches en leucine (DAHER, PIERCE, ET KHALIFE 2007), qui sont au nombre de quatorze chez *P. falciparum* (PflRR1 à PflRR14). Ces protéines sont caractérisées par la présence de quatre à dix motifs LRR dont la séquence consensus est LXXLXXNXL, où X peut être n'importe quel acide aminé. La réalisation de PCR quantitatives a démontré que ces protéines sont exprimées tout au long du cycle érythrocytaire du parasite avec une augmentation aux stades trophozoïte tardif et schizonte (DAHER, PIERCE, ET KHALIFE 2007).

PflRR1 est une protéine de 247 acides aminés et d'un poids moléculaire de 29.3 kDa (DAHER ET AL. 2006). Elle présente 42 % d'identité avec SpSds22 qui se concentre sur la région située entre les acides aminés 23 et 242. Tout comme les membres de la famille LRR, elle présente neuf répétitions LRR. Elle possède également un peptide signal en Nt, tandis qu'en Ct se trouvent dix-neuf acides aminés conservés qui constituent la coiffe LRR (DAHER ET AL. 2006).

La présence d'ARNm de PflRR1 a été démontrée durant le cycle intra-érythrocytaire, y compris dans les gamétocytes, avec un taux d'ARNm maximal au stade trophozoïte précoce. Cependant, la protéine est présente majoritairement au stade schizonte (DAHER ET AL. 2006). Durant ce cycle, PflRR1 est localisée aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, tout comme PfPP1. Cette colocalisation serait en accord avec une éventuelle interaction entre PfPP1 et PflRR1. Celle-ci a d'ailleurs été démontrée par GST pull-down ainsi que par une

expérience de co-immunoprécipitation sur un extrait de parasites. Le rôle de PflRR1 sur l'activité phosphatase de PfPP1 a également été exploré et démontre que PflRR1 inhibe l'enzyme jusqu'à 90 % que ce soit *in vitro* ou dans le modèle hétérologue en ovocyte de Xénope. Ainsi, PflRR1 est un régulateur de la phosphatase de type 1.

## 2) Pfl2

Le second partenaire de PfPP1 est l'inhibiteur 2 (Pfl2) dont le numéro d'accèsion sur PlasmoDB est PF3D7\_0320000 (FREVILLE ET AL. 2013). Il a été identifié par homologie avec l'inhibiteur 2 humain. Cette protéine de 144 acides aminés est la plus petite des inhibiteurs 2 connus. Sa séquence protéique comporte un signal de localisation nucléaire putatif, ainsi que deux motifs identifiés pour interagir avec PP1. Il s'agit du motif « RVxF » dont la forme dégénérée est : R/K(X<sub>1</sub>)<sub>0-1</sub>V/I(X<sub>2</sub>)F/W, où X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub> peuvent être n'importe quel acide aminé sauf la proline pour X<sub>2</sub>, et le motif KHYNE. Cependant, un troisième motif d'interaction avec PP1 existe chez l'I2 humain mais n'est pas présent chez Pfl2 : le motif KGILK. Depuis peu, un autre motif d'interaction avec PP1 a été identifié, il s'agit du motif FXXR/RXR/K qui est présent dans la région Ct de Pfl2.

La protéine Pfl2 est globalement non-structurée, mais certaines zones sont capables de former des hélices  $\alpha$ . L'utilisation de la spectrométrie par RMN a mis en évidence deux zones d'interaction (FREVILLE ET AL. 2014). La première est la région qui se situe entre les acides aminés 5 et 41, elle contient notamment le motif RVxF (<sup>12</sup>KTISW<sup>16</sup>) dans une région désordonnée. La seconde zone se situe entre les acides aminés 94 et 117. Celle-ci présente les motifs <sup>102</sup>HYNE<sup>105</sup>, qui se situe dans une hélice  $\alpha$ , et FXXR/RXR/K (<sup>95</sup>FKEKRK<sup>100</sup>).

La réalisation d'un Knock-In chez *P. falciparum* a démontré que le locus de Pfl2 est accessible (FREVILLE ET AL. 2013). Malgré cela, les tentatives de Knock-Out de Pfl2 ont été un échec, ce qui tend à prouver que ce gène est essentiel à la survie du parasite. La localisation de Pfl2 a été déterminée, par la fusion de la protéine à un tag GFP, dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme (FREVILLE ET AL. 2013), tout comme PfPP1, ce qui serait en accord avec l'hypothèse selon laquelle Pfl2 serait capable d'interagir avec PfPP1.

L'interaction de Pfl2 avec PfPP1 a été démontrée par test de type ELISA, ou encore par double hybride de levure et l'implication des trois motifs a été étudiée par la réalisation de mutants (FREVILLE ET AL. 2013; FREVILLE ET AL. 2014). Lorsque l'un des motifs est modifié, l'interaction avec PP1 persiste. Cependant, la mutation simultanée des motifs RVxF et FXXR/KXR/K abolit l'interaction avec PP1 (FREVILLE ET AL. 2014). Les différents résultats obtenus indiquent que le motif RVxF serait le motif principal d'interaction. La mutation des différents motifs de Pfl2 entraîne une modification du rôle de la protéine sur l'activité phosphatase de PfPP1. En effet, Pfl2WT présente une inhibition de PP1 allant jusqu'à 80 %. Mais la mutation de chacun des trois motifs d'interaction diminue ou abolit la fonction inhibitrice de Pfl2 (FREVILLE ET AL. 2013; FREVILLE ET AL. 2014). Donc ces trois motifs possèdent un rôle dans la régulation de la phosphatase.

Des peptides synthétiques dérivés des différents motifs d'interaction ont été synthétisés, et leur effet sur la croissance du parasite a été observé (FREVILLE ET AL. 2013; FREVILLE ET AL. 2014). Les peptides dérivés des motifs RVxF et FXXR/RXR/K provoquent une inhibition dose-dépendante de la croissance de *P. falciparum*, alors que le peptide dérivé du motif HYNE ne semble pas avoir d'effet sur la progression du cycle érythrocytaire du parasite. Tous ces résultats indiquent que le motif RVxF est la principale zone d'interaction avec PfPP1, et que ce motif ainsi que le motif FXXR/RXR/K ont un rôle dans la fonction régulatrice de Pf12 sur l'activité de la phosphatase.

### 3) Pf13

Pf13 (PF3D7\_1031700) a été identifié comme partenaire/régulateur de PfPP1 par homologie avec l'inhibiteur 3 humain (I3) (FREVILLE ET AL. 2012). Cette identité, de 31 %, se concentre essentiellement au centre de la séquence. C'est d'ailleurs dans cette zone que se situe le motif RVxF : <sup>41</sup>KVVRW<sup>45</sup>. Pf13 est une protéine de 116 AA, localisée majoritairement dans le noyau du parasite, dont la structure est désordonnée. Cependant, il existe des régions possédant des propensions à prendre une structure hélicoïdale.

L'interaction entre Pf13 et PfPP1 a été démontrée par spectroscopie à RMN. Cette technique met en avant différents domaines d'interaction, et parmi ces domaines se trouve le motif RVxF : <sup>41</sup>KVVRW<sup>45</sup> (FREVILLE ET AL. 2012). La mutation du tryptophane de ce motif entraîne une diminution importante de l'interaction entre Pf13 et la phosphatase par différentes approches. Ainsi le motif RVxF est impliqué de façon majoritaire dans l'interaction. Cependant, il est à noter que la spectroscopie par RMN indique un second domaine d'interaction mais présentant une affinité différente de celle du domaine contenant le motif RVxF.

Le rôle de ce partenaire de PfPP1 a été déterminé *in vitro*, où il semble augmenter l'activité de PfPP1 de 50 %, ce qui est assez surprenant puisque l'I3 humain est, comme son nom l'indique, un inhibiteur de la phosphatase (FREVILLE ET AL. 2012). De plus, le mutant du motif RVxF de Pf13 n'entraîne pas de modification de l'activité de PfPP1. Afin d'explorer le rôle de Pf13 chez le parasite, l'accessibilité du locus a été démontrée par la réalisation d'un Knock-In. Puis un Knock-Out a été réalisé, mais aucun parasite viable n'a été obtenu, ce qui suggère l'essentialité du gène.

### 4) PfcF2β

PfcF2β (PF3D7\_1010600) est le dernier régulateur de PfPP1 identifié (TELLIER ET AL. 2016). Cette protéine de 25.3 kDa est constituée de 222 acides aminés, soit moitié moins que son homologue humain. L'homologie entre ces deux protéines est de 47 % et se concentre principalement dans la région Ct. L'étude de sa séquence a mis en évidence notamment un domaine conservé qui est aussi présent chez PfcF5. Tout comme les régulateurs décrits ci-dessus, PfcF2β possède un motif de type RVxF : <sup>103</sup>KVAW<sup>106</sup>, ainsi qu'un motif FXXR/KXR/K : <sup>29</sup>FGEKKK<sup>34</sup>.

Cette protéine semble être impliquée dans la traduction des ARNm puisqu'elle interagit avec PefIF2 $\gamma$  et PefIF5 qui appartiennent à la machinerie de traduction (TELLIER ET AL. 2016). Mais l'interactome de PefIF2 $\beta$  ne se limite pas à ces deux protéines. En effet, elle interagit également avec PfPPP1 et semblerait être un inhibiteur de la phosphatase. La mutation de l'un ou l'autre des motifs potentiels d'interaction n'influe pas sur la liaison à PfPPP1. Par contre la mutation simultanée des motifs RVxF et FXXR/KXR/K abolit l'interaction, ce qui prouve qu'ils sont bien impliqués dans celle-ci (TELLIER ET AL. 2016).

Son rôle ainsi que sa localisation chez le parasite ont également été investigués. Malgré la preuve de l'accessibilité du locus de PefIF2 $\beta$ , les tentatives de Knock-Out n'ont pas permis d'obtenir de parasites viables (TELLIER ET AL. 2016). Cela semble indiquer que PefIF2 $\beta$  est essentielle à la survie du parasite. Cette protéine a été localisée par immunofluorescence et par western-blot sur les différentes fractions du parasite. Et, fait surprenant, elle se situe aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, ce qui signifie qu'elle n'aurait pas uniquement un rôle dans la traduction des protéines dans le cytoplasme. De plus, elle est co-localisée avec PfPPP1, ce qui suggère qu'elle puisse réguler la phosphatase dans le noyau et le cytoplasme.

Ainsi, la régulation des modifications post-traductionnelles, et notamment de la phosphorylation, est primordiale pour le bon déroulement de la croissance du parasite. Le rôle majeur des acteurs impliqués dans la régulation de ces MPT en font des cibles thérapeutiques privilégiées.







# Cadre et objectifs



## Cadre et Objectifs

L'existence de modifications post-traductionnelles chez *Plasmodium* a été démontrée, et la plus étudiée d'entre elles est le phénomène de phosphorylation/déphosphorylation. L'importance des kinases et des phosphatases catalysant ces réactions a été observée chez le parasite par l'utilisation d'inhibiteurs ou par l'interruption des gènes codant ces enzymes. Il est également connu que ces enzymes ont un rôle à jouer dans différents mécanismes tels que la régulation du cycle cellulaire, la réinvasion et la virulence. Ainsi la régulation de ces enzymes est un processus nécessaire et complexe.

La protéine phosphatase de type 1 (PP1) est la phosphatase majoritaire de *Plasmodium falciparum*, représentant à elle seule 90 % de l'activité phosphatase du parasite. Son rôle est d'ailleurs essentiel pour le parasite. En effet, les tentatives de réalisation de Knock-Out se sont soldées par des échecs, suggérant qu'aucune autre phosphatase n'est en mesure de remplacer l'activité de PfPP1. De manière générale, PP1 est une holoenzyme, toujours associée à une sous-unité régulatrice. Cette dernière a pour rôle de réguler son activité, sa localisation ainsi que sa spécificité d'action. A ce jour, environ cent-quatre-vingt régulateurs ont été décrits dans différentes espèces, y compris l'Homme et la levure. Cependant, chez *P. falciparum*, très peu de régulateurs de PfPP1 sont connus.

Au laboratoire, seuls quatre partenaires de PfPP1 ont été identifiés par génomique comparative : PflRR1 (Leucine Rich Repeat 1), Pfl3 (Inhibiteur 3), Pfl2 (Inhibiteur 2) et PflF2 $\beta$  (facteur d'initiation de la traduction eucaryote de type 2 sous-unité  $\beta$ ). Chacune de ces protéines a fait l'objet de recherches approfondies.

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la caractérisation moléculaire et fonctionnelle de PflF2 $\beta$ . Après vérification de l'expression de ces protéines chez le parasite, des études de l'interaction entre PfPP1 et ces partenaires ont été réalisées. Le but était d'identifier les motifs impliqués dans la liaison à la phosphatase. Pour cela, différentes approches ont été employées, telles que la production de mutants utilisés en tests de type ELISA et GST pull-down par exemple, ou encore le recours à la résonance magnétique nucléaire. Le premier motif identifié est le motif RVxF retrouvé dans les séquences protéiques de Pfl2, Pfl3 et PflF2 $\beta$ . Ce motif est crucial à l'interaction entre PfPP1 et ses partenaires Pfl3 et PflF2 $\beta$ , et est impliqué dans la fonction inhibitrice de Pfl2. A ce motif principal s'ajoutent deux autres motifs : le motif HYNE indispensable à l'inhibition de PfPP1 par Pfl2 et le motif FxxR/KxR/K retrouvé chez Pfl2 et PflF2 $\beta$ . Ce dernier motif est nécessaire à l'interaction entre la phosphatase et ses partenaires Pfl2 et PflF2 $\beta$ . De plus, ces différents partenaires de PfPP1 démontrent un rôle sur l'activité de la phosphatase. PflRR1, Pfl2 et PflF2 $\beta$  auraient un rôle d'inhibiteur puisqu'ils provoquent une diminution de l'activité de PfPP1 *in vitro*, tandis que Pfl3, malgré son nom et le rôle de son homologue humain dans l'inhibition de PP1, serait un activateur de la phosphatase du parasite. Il a également été démontré que les partenaires Pfl2, Pfl3 et PflF2 $\beta$  sont essentiels pour le parasite.

L'ensemble des études ci-dessus a mis en évidence plusieurs différences entre ces régulateurs de PfPP1 et leurs homologues chez l'Homme. Cependant, au vu du cycle de développement atypique du parasite et du rôle connu de PP1 dans la régulation du cycle cellulaire chez les eucaryotes, il est vraisemblable que *Plasmodium* possède des

## Cadre et Objectifs

partenaires/régulateurs de PfPP1 qui lui soient spécifiques. Dans le but de les identifier, une approche plus globale a été entreprise au laboratoire, et a consisté en un criblage en double hybride de levure d'une banque d'ADN complémentaire de *P. falciparum* en utilisant la PfPP1 comme appât.

Ainsi l'objectif de ma thèse est divisé en deux parties.

Le premier est d'étudier les clones obtenus lors du criblage en double hybride de levure, et d'initier des recherches sur quelques-uns d'entre eux. La confirmation des interactions avec PfPP1 en double hybride de levure, a permis d'isoler deux partenaires potentiels intéressants. Il s'agit de PF3D7\_0919900 (RCC-PIP) et PF3D7\_1202600 (CLP) qui ont été retrouvés huit et dix fois respectivement lors du criblage sur un milieu de forte stringence. Nous avons par ailleurs débuté la caractérisation de CLP en :

- analysant la séquence entière de CLP ;
- confirmant l'interaction du clone de CLP avec PfPP1 par différentes approches ;
- déterminant la fonction de CLP sur l'activité phosphatase de PfPP1.

Le second objectif, qui est le sujet principal de cette thèse, concerne la caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la protéine RCC-PIP. Cette étude visait à déterminer les régions/motifs de ce potentiel régulateur qui pourraient intervenir au niveau de la relation structure/fonction du complexe qu'il forme avec PfPP1. Ce travail s'est articulé autour de plusieurs points :

- L'analyse bio-informatique de la séquence de cette protéine afin de déterminer d'éventuels motifs d'interaction avec PfPP1, ainsi que des domaines connus ;
- L'étude de l'interaction de RCC-PIP avec PfPP1 par différentes approches ;
- La caractérisation *in vitro* de la fonction de RCC-PIP sur l'activité phosphatase de PfPP1 ;
- L'identification du ou des motifs d'interaction entre cette protéine et PfPP1 par la réalisation de mutants.
- La détermination du rôle de ce partenaire de PfPP1 chez le parasite. Pour cela, nous réaliserons un Knock-In chez *P. falciparum* afin de déterminer l'accessibilité du locus. Puis nous effectuerons un Knock-Out de la protéine d'intérêt dans le but d'observer une éventuelle essentialité du gène pour le parasite. Nous réaliserons également un Knock-Out conditionnel chez *P. berghei* afin de déterminer le rôle de PF3D7\_0919900 à chaque étape de développement du parasite.
- L'observation de la localisation de PF3D7\_0919900 chez le parasite.

Cette étude a pour but de caractériser des régulateurs spécifiques de PfPP1 et d'améliorer la compréhension du cycle de développement atypique du parasite régulé par cette enzyme. Ces deux partenaires de PfPP1 pourront également faire l'objet d'études complémentaires et éventuellement être utilisées en tant que cibles thérapeutiques.





# Résultats





## I. Identification des partenaires de PfPP1 et caractérisation de CLP

### A. Identification de l'interactome de PfPP1 par criblage en double hybride de levure

#### 1) Analyse globale de l'interactome de PfPP1

Afin de déterminer l'interactome de PfPP1, le criblage d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) de *P. falciparum* en double hybride de levure a été réalisé, en utilisant la phosphatase en tant qu'appât. Le but était d'identifier de nouveaux partenaires/régulateurs de la protéine phosphatase de type-1 qui soient spécifiques ou non au parasite.

Pour cela, quatre criblages successifs ont été effectués, ce qui a permis de cribler environ  $8.3 \times 10^6$  clones, et cela sur des milieux à forte stringence permettant de limiter les faux positifs. Lors du criblage, la présence des diploïdes est observée sur un milieu DDO (Double Drop Out medium : SD-LW), l'interaction entre PfPP1 et ses partenaires sur un milieu TDO (Triple Drop Out medium : SD-LWH) et si l'interaction est forte alors elle sera visible sur QDO (Quadruple Drop Out medium : SD-LWHA).

Cela nous a amenés à l'identification de soixante-deux clones, représentant trente-neuf protéines différentes, comme partenaires potentiels de PfPP1. Seulement vingt-cinq clones se trouvent être en cadre ouvert de lecture avec le domaine GAL4AD. Cependant, les trente-sept clones qui ne sont pas en cadre de lecture peuvent tout de même être considérés comme des clones positifs puisqu'il a été montré que la levure est capable de modifier le cadre de lecture afin de croître sur un milieu sélectif (CHIDLEY ET AL. 2011). Parmi les soixante-deux clones obtenus, il n'y en a que deux possédant la séquence complète du gène. Il s'agit de l'histone H2A (PF3D7\_0617800), et d'une protéine putative conservée de fonction inconnue (PF3D7\_0320000). Ces deux protéines ont une séquence assez courte augmentant ainsi la possibilité d'obtenir la protéine complète.

Il est aussi à noter que 37 % de ces clones présentent un motif RVxF ou sa séquence dégénérée [R/K]-X<sub>0-1</sub>-[V/I]-X<sub>0-1</sub>-[F/W] dans la portion de protéine obtenue lors du criblage en double hybride de levure. Ce motif étant connu pour interagir avec PP1, cela conforte le fait que ces protéines puissent être des partenaires de PfPP1. Les clones ne possédant pas de motif RVxF pourraient, quant à eux, présenter d'autres motifs d'interaction avec PP1 connus, comme le motif FxxR/KxR/K ou encore le motif HYNE. Il est également possible que ces clones nous permettent d'identifier de nouveaux motifs d'interaction avec PfPP1.

Les protéines obtenues lors du criblage de banque ont des rôles putatifs divers, elles sont potentiellement impliquées dans la dynamique de condensation/décondensation de la chromatine, dans la réparation de l'ADN, dans la synthèse des ARN messagers ou encore dans la liaison du GTP aux protéines nucléaires.

Pour compléter ces données, un cinquième criblage a été réalisé, et l'ensemble des résultats a été inclus dans un article ayant pour objet l'identification des partenaires de PfPP1 par différentes approches, qui sera détaillé dans la thèse de Thomas Hollin (HOLLIN ET AL. 2016) ([Annexe 1](#)).

Les différents clones ont été classés selon le nombre de clones obtenus pour chaque protéine, le milieu de stringence sur lequel est observée l'interaction avec PfPP1 en double hybride de levure, la présence d'un motif RVxF et selon le fait que les clones soient en cadre de lecture avec le domaine GAL4AD ou non. Nous avons choisi d'initier l'étude de trois protéines présentant un motif RVxF dans le fragment obtenu lors du criblage : PF3D7\_1202600, PF3D7\_0919900 et Ran (PF3D7\_1117700), et trois autres protéines dont la liaison semble être indépendante du motif RVxF : Rad54 (PF3D7\_0803400), PF3D7\_0418300 et H2A (PF3D7\_0617800) ([Tableau 6](#)).

No d'accension PlasmoDB	Fonction (PlasmoDB)	taille protéine (AA)	nb clones obtenus	Observation des clones selon la stringence du milieu		Fragment obtenu lors du criblage		
				TDO/X/A	QDO/X/A	position (AA)	taille (AA)	motifs
PF3D7_1202600	conserved protein, unknown function	2180	10	+	+	1462-1644	182	3 RVXF
				+	+	1468-1570	102	2 RVXF
				+	+	1395-1713	318	5 RVXF
				+	+	1483-1747	264	3 RVXF
				+	+	1483-1721	238	3 RVXF
				+	+	1630-1738	108	non
				+	+	1483-1712	229	3 RVXF
				+	+	1488-1715	227	3 RVXF
				+	+	15-290	275	non
				+	+	1437-1711	274	3 RVXF
PF3D7_0919900	regulator of chromosome condensation, putative	3381	8	+	+	863-1108	245	1 RVXF
				+	+	875-1086	211	1 RVXF
				+	+	836-965	129	non
				+	+	895-1099	204	1 RVXF
				+	+	836-1035	199	1 RVXF
				+	+	801-1038	237	1 RVXF
				+	+	801-971	170	non
				+	+	846-1034	188	1 RVXF
PF3D7_0617800	histone H2A	132	3	+	-	2-132	130	non
				+	+	2-132	130	non
				+	+	1-132	131	non
PF3D7_0803400	DNA repair protein rad54, putative	1239	1	+	+	859-1084	225	non
PF3D7_0418300	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	992	1	+	+	69-138	69	non
PF3D7_1117700	GTP-binding nuclear protein ran/tc4 (RAN)	214	1	+	+	2-214	212	1 RVXF

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des clones issus du criblage en double hybride de levure d'une banque d'ADNc en utilisant PfPP1 comme appât, et dont l'étude a été initiée.

## 2) Analyse des interactions RVxF dépendantes choisies

### a) PF3D7\_1202600

Cette protéine conservée de fonction inconnue est la protéine qui a été retrouvée le plus souvent lors du criblage, avec dix clones. Ces derniers sont tous en cadre ouvert de lecture avec le domaine GAL4AD, et représentent quasiment tous le même fragment de la protéine, à l'exception d'un clone se situant au début de la protéine et ne contenant pas de motif RVxF, alors que les neuf autres clones possèdent entre un et sept motifs RVxF. De plus, ces clones présentent une interaction forte avec PfPP1 puisque les diploïdes se développent sur un milieu de forte stringence (QDO). Pour la caractérisation, nous avons utilisé le plus grand fragment obtenu lors du criblage (AA 1395 à 1713 sur les 2 180 AA que compte la protéine).

### b) PF3D7\_0919900

Cette protéine a été retrouvée huit fois lors du criblage de la banque d'ADNc de *P. falciparum*. C'est une protéine putative potentiellement impliquée dans la régulation de la condensation des chromosomes d'après les informations disponibles sur la base de données PlasmoDB. Les huit clones, tous en cadre ouvert de lecture avec le domaine GAL4AD, représentent sensiblement le même fragment de la protéine qui contient un motif RVxF. De plus, ils interagissent fortement avec la phosphatase, puisque les diploïdes se développent sur un milieu QDO.

### c) Ran (PF3D7\_1117700)

La troisième protéine dont l'étude a été initiée est Ran. Elle est représentée par un unique clone dont le cadre de lecture n'est pas en phase avec le domaine GAL4AD, mais qui possède un motif RVxF. Ce clone, qui couvre la protéine complète de Ran, est capable d'interagir fortement avec PfPP1 (colonies visibles sur milieu QDO), ce qui en fait un bon candidat d'étude. Nous avons donc cloné cette protéine afin qu'elle soit en cadre ouvert de lecture (ORF pour Open Reading Frame) avec le domaine GAL4AD pour poursuivre son étude.

Dans le but de découvrir éventuellement de nouveaux motifs d'interaction avec PfPP1, nous nous sommes aussi attachés à étudier des clones ne présentant pas de motifs RVxF.

## 3) Analyse des interactions RVxF indépendantes choisies

### a) Rad54 (PF3D7\_0803400)

Un seul clone de cette protéine de 1 239 AA, en cadre ouvert de lecture avec le domaine GAL4AD, a été obtenu lors du criblage de la banque avec PfPP1. Ce fragment de protéine de 225 AA, bien que ne possédant pas de motif RVxF, est capable d'interagir avec la

phosphatase, y compris sur un milieu QDO. De plus, cette protéine serait impliquée dans la réparation de l'ADN, suggérant qu'elle aurait un rôle important chez le parasite.

#### b) PF3D7\_0418300

Comme la protéine précédente, PF3D7\_0418300 est représentée par un unique clone ne possédant pas de motif RVxF. Un petit fragment (69 AA sur 992 AA), en cadre de lecture avec le domaine GAL4AD, a été obtenu lors du criblage, et est capable d'interagir avec PfPP1 mais pas de manière aussi forte que les clones présentés ci-dessus (colonies se développant sur un milieu TDO).

#### c) H2A (PF3D7\_0617800)

La dernière protéine à laquelle nous allons nous intéresser, est l'histone H2A connue pour être phosphorylée, suggérant qu'elle aurait un rôle de substrat vis-à-vis de PfPP1. Lors du criblage, la protéine complète a été obtenue, mais elle n'est pas en cadre de lecture avec le domaine GAL4AD. H2A semble être capable d'interagir avec PfPP1 sur un milieu QDO. Le gène de H2A a été cloné afin d'être en cadre de lecture ouvert avec le domaine GAL4AD, et d'entamer l'étude de la protéine qu'il code.

### 4) Confirmation de l'interaction en double hybride de levure

Une première étape dans l'analyse des clones choisis a consisté à vérifier que les interactions de ces clones avec PfPP1 n'étaient pas des faux positifs. Pour cela, nous avons effectué à nouveau les croisements en double hybride de levure entre ces différents clones et les levures Y187 exprimant PfPP1. Ces clones ont aussi été croisés avec des levures transformées avec les plasmides pGBKT7 vide et pGBKT7 laminine afin d'obtenir des témoins négatifs. Dans le même sens, les levures exprimant PfPP1, ont été croisées avec des levures Y2HGold transformées avec le plasmide pGADT7 vide. Ces différents témoins permettent de montrer qu'il n'y a pas une auto-activation du promoteur GAL4, et que les diploïdes obtenus ne sont pas capables de se développer sur des milieux de sélection TDO (SD-LWH) et QDO (SD-LWHA).

	pGBKT7 vide	Laminine	PfPP1
pGADT7 vide	-	-	-
PF3D7_1202600	-	-	+++
PF3D7_0919900	-	-	+++
Ran ORF	-	-	-
Rad54	-	-	-
PF3D7_0418300	-	-	-
H2A ORF	-	-	-

Tableau 7: Confirmation des interactions observées lors du criblage de la banque d'ADNc de *P. falciparum* avec PfPP1 comme appât en double hybride de levure. Le signe « - » indique une absence d'interaction, tandis que « +++ » correspond à une interaction forte (croissance des diploïdes sur QDO).

Les résultats présentés dans le **Tableau 7** montrent que les seules colonies obtenues correspondent au croisement entre PfPP1 et PF3D7\_0919900 d'une part, et PfPP1 et PF3D7\_1202600 d'autre part. Ces colonies sont observées sur milieu QDO ce qui traduit une interaction forte (**Tableau 7**). Pour vérifier que les absences d'interaction ne sont pas dues à un défaut de production de protéine, nous avons extrait les protéines de levures et réalisé un western-blot. La révélation est effectuée par un anticorps anti-HA (**Figure 12. A**) d'une part pour les clones en pGADT7, et par un anticorps anti-myc d'autre part pour PfPP1 (**Figure 12. B**). Ces révélations montrent que toutes les protéines sont exprimées par les levures. De plus, les diploïdes sont en mesure de se développer sur le milieu DDO, confirmant que les diploïdes sont bien présents. Le défaut de croissance des diploïdes sur TDO serait donc dû à une absence d'interaction.

Ainsi, nous n'avons pas été en mesure de confirmer l'interaction de Ran, Rad54, PF3D7\_0418300 et H2A avec PfPP1.



*Figure 12 : Vérification de la production en levure des six partenaires potentiels de PfPP1 et de PfPP1 elle-même. (A) Révélation des clones issus du criblage de la banque en double hybride de levure par PfPP1 par un anticorps anti-HA, (B) et de la protéine PfPP1 par un anticorps anti-myc.*

Au vu de ces résultats, l'objet de cette thèse s'est porté sur la caractérisation moléculaire et fonctionnelle de PF3D7\_1202600 et PF3D7\_0919900, ainsi que l'étude de leur interaction avec PP1 et leur rôle chez le parasite. Les résultats obtenus quant à l'étude de PF3D7\_1202600 sont présentés ci-dessous, tandis que ceux concernant PF3D7\_0919900, dont l'étude a été plus poussée, feront l'objet d'une seconde partie de cette thèse.

## B. Initiation de la caractérisation de PF3D7\_1202600

### 1) Analyse de la séquence de PF3D7\_1202600

D'après les données de PlasmoDB, le gène de 7 241 bases, codant pour la protéine PF3D7\_1202600, est constitué de six exons et de cinq introns. Elle est exprimée tout au long du cycle érythrocytaire, et présente un pic d'expression au stade ookinète, mais elle est quasiment absente au stade gamétocyte. Cette protéine de 2 180 AA, soit environ 250 kDa, ne possède pas de fonction connue (**Annexe 2**). Cependant, elle interagirait avec un facteur putatif d'initiation de la traduction eucaryote, ainsi qu'avec une protéine putative associée aux chromosomes. Elle possède des homologues chez la souris, l'Homme ou encore la drosophile, il s'agit de NEMF (Nuclear export mediator factor), Sdccag1 et Caliban respectivement. Cette homologie se situe sur trois régions majeures : la partie N terminale

(Nt) (AA 3 à 156), entre les acides aminés 400 et 800 et la partie C terminale (Ct) (AA 1 964 à 2 145) ([Annexe 3](#)).

PF3D7\_1202600, du fait de son homologie avec la protéine Caliban chez la Drosophile, sera appelée par la suite Caliban-like protein (CLP). Sa séquence protéique présente dix-sept motifs RVXF dont sept dans la région isolée lors du criblage (AA 1 395 à 1 713) ([Figure 13](#)), contre deux pour Caliban, et un pour Sdccag1 humain et NEMF murin. Un deuxième fragment de protéine a été obtenu lors du criblage (AA 15 à 290). Cependant nous avons concentré notre étude sur le fragment couvrant les AA 1 395 à 1 713, cette portion de protéine étant obtenue dans neuf clones sur dix. Dans la suite de cette étude ce fragment sera nommé CLPf.



Figure 13 : Schéma de la protéine PF3D7\_1202600 ou CLP. En vert est représenté le fragment étudié lors de cette thèse, et en bleu clair la deuxième région de CLP obtenue lors du criblage de banque en double hybride de levure.

## 2) Etude de l'interaction de CLP avec PfPP1

L'interaction en double hybride de levure entre PfPP1 et CLPf ayant été confirmée, nous avons utilisé différentes approches afin de compléter cette étude : l'interaction en bactéries, le GST pull-down, l'immunoprécipitation et le test de type ELISA.

### a) L'interaction en bactérie

Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction en bactérie. Pour cela, nous avons utilisé le vecteur pETDuet-1 qui permet de co-exprimer les deux protéines en bactérie. Ce vecteur présente deux sites multiples de clonage (MCS) permettant l'expression des deux protéines avec des étiquettes différentes (tag -6His et tag -S).

Les lysats de bactéries exprimant les deux protéines sont placés en présence de billes de Nickel. Ainsi, la protéine PfPP1-6His se liera aux billes via son tag -6His, et les partenaires de PfPP1 resteront liés à la phosphatase. Les protéines fixées à ces billes sont révélées par un anticorps anti-Histidine pour PfPP1 et un anticorps anti-S pour CLPf. En témoin sont déposés les inputs de la production de PfPP1 seule ([Figure 14, piste 1](#)) et de la production de PfPP1 et de CLPf ([Figure 14, piste 2](#)) qui permettent de vérifier l'expression des protéines, et de confirmer qu'une éventuelle absence d'interaction n'est pas due à un défaut de production de CLPf.



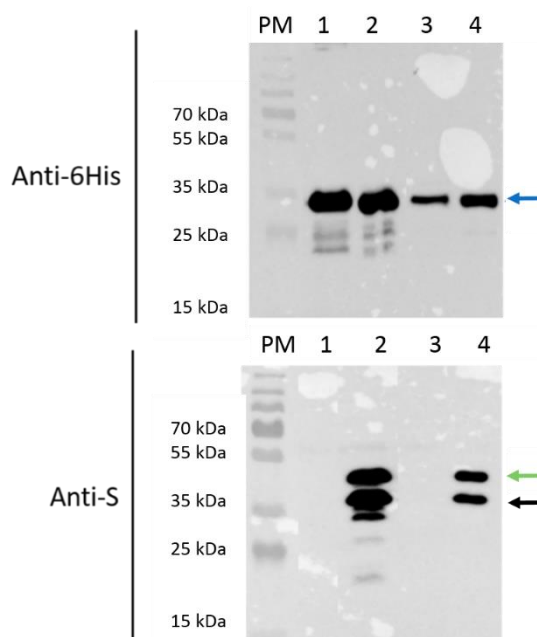


Figure 14 : Interaction entre CLPf et PfPPP1 par co-expression en bactérie. Piste 1 : input des bactéries induites exprimant PfPPP1 seule, piste 2 : input des bactéries co-exprimant PfPPP1 et CLPf, piste 3 : billes de nickel avec extrait des bactéries induites exprimant PfPPP1, piste 4 : billes de nickel avec extrait des bactéries co-exprimant PfPPP1 et CLPf. La révélation des protéines est réalisée par un anticorps anti-6His (en haut) et un anticorps anti-S (en bas). La flèche bleue indique la présence de PfPPP1, la flèche verte signale la protéine CLPf et la flèche noire la protéine CLPf dégradée.

La détection par un anticorps anti-6His permet d'observer l'expression de PfPPP1-6His à la taille attendue de 35 kDa (Figure 14, pistes 1 et 2) ainsi que sa fixation aux billes de Nickel (Figure 14, piste 3). La révélation par l'anticorps anti-S permet de démontrer la production de la protéine CLPf tagguée -S par la bactérie à une taille d'environ 40 kDa (Figure 14, piste 2). Cependant, nous remarquons que la protéine CLPf est produite sous deux formes. La taille attendue étant de 37 kDa, il semblerait que CLPf-S migre légèrement plus haut que la taille attendue. La bande inférieure peut être un produit de dégradation pouvant être révélée par l'anticorps anti-S. Finalement, la détection par l'anticorps anti-6His montre une bande à 35 kDa correspondant à PfPPP1 fixées aux billes de Nickel, tandis que l'anticorps anti-S révèle la protéine CLPf lorsque les protéines sont co-exprimées (Figure 14, piste 4). Par conséquent, CLPf interagit avec PfPPP1 par cette approche.

### b) GST pull-down

Une seconde approche a été utilisée afin de confirmer l'interaction entre CLPf et PfPPP1 : le GST pull-down.

Pour cela, dans un premier temps, CLPf, fusionnée à un tag -6His, a été produite de manière recombinante et son expression a été confirmée par coloration au Simply Blue® afin de vérifier la pureté de la protéine, ainsi que par un western-blot anti-6His. Une bande à la taille de 40 kDa est observée, ce qui est légèrement supérieur à la taille attendue de 37 kDa (Figure 15. A).

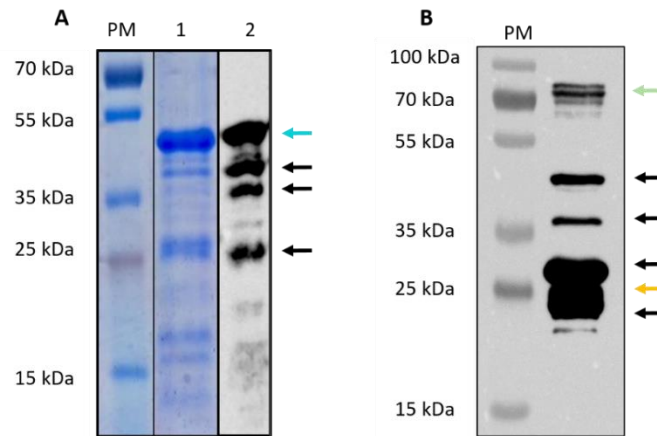


Figure 15 : Production de CLPf-6His et CLPf-GST. A) La pureté de la protéine CLPf-6His est vérifiée par coloration au Simply Blue® en piste 1, et la présence du tag -6His par un western-blot en utilisant un anticorps anti-6His en piste 2. B) La qualité des billes de Glutathion agarose liées à la protéine recombinante CLPf-GST est vérifiée par la révélation du western-blot avec un anticorps anti-GST. La flèche turquoise indique la protéine recombinante CLPf-6His, la flèche verte la protéine CLPf-GST, les flèches noires les protéines dégradées et la flèche orange la GST libre.

Cette protéine est ensuite placée en présence de billes de Glutathion agarose seules ou liées à la GST ou à la PfPP1-GST. Cependant, nous avons observé que CLPf-6His est capable d'interagir avec la GST seule (résultats non présentés), ce qui rend les résultats ininterprétables. Nous avons donc réalisé l'expérimentation en utilisant les protéines CLPf tagguée à la GST et PfPP1 tagguée -6His. La protéine CLPf-GST a été produite sous forme recombinante et sa qualité a été vérifiée par un western-blot révélé par un anticorps anti-GST (Figure 15. B). La protéine est observée à une taille d'environ 70 kDa ce qui est légèrement supérieur à la taille attendue de 61 kDa (Figure 15. B).

Afin de réaliser le GST pull-down, CLPf-GST est fixée à des billes de Glutathion agarose, puis la PfPP1-6His est incubée avec ces billes. Des billes de Glutathion agarose seules ou incubées avec la GST sont utilisées en témoins négatifs. L'absence de signal après révélation par un anticorps anti-6His nous permet de confirmer que PfPP1-6His n'est pas capable d'interagir avec ces billes (Figure 16, pistes 1 et 2).

L'interaction est analysée après révélation par un anticorps anti-GST afin de détecter CLPf-GST (Figure 16, western-blot supérieur) et par un anticorps anti-6His, permettant de détecter PfPP1 (Figure 16, western-blot inférieur).

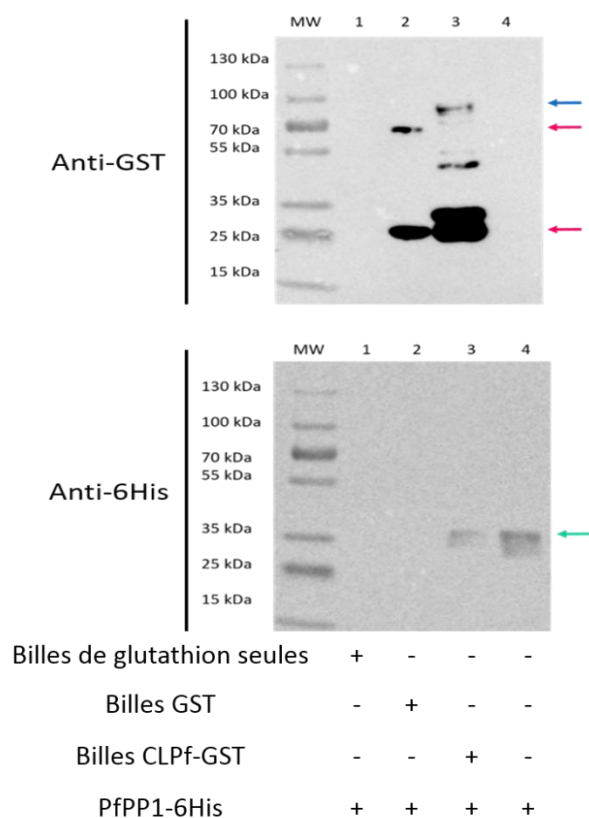


Figure 16: Interaction entre CLPf et PfPP1 par GST pull-down. La piste 1 correspond au témoin négatif réalisé avec des billes de Glutathion agarose seules en présence de PfPP1-6His, la piste 2 est également un témoin négatif effectué avec la GST seule et la phosphatase tagguée -6His, la piste 3 correspond au GST pull-down effectué avec CLPf-GST et PfPP1-6His, et la piste 4 à la protéine PfPP1-6His seule. La flèche bleue indique la protéine CLPf-GST, la rose la GST seule, et le dimère de GST et la verte PfPP1-6His. Le western-blot est réalisé avec un anticorps anti-GST (western-blot supérieur) et un anticorps anti-6His (Western-blot inférieur).

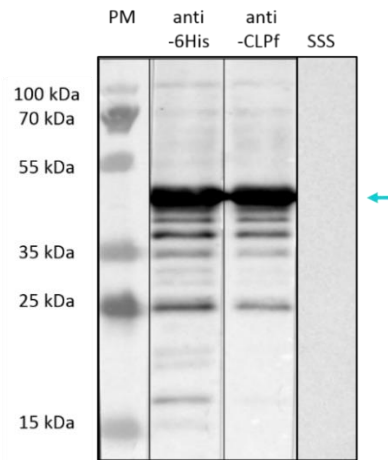
Après révélation avec l'anticorps anti-6His, nous observons une bande à 35 kDa dans la piste correspondant à la mise en contact de PfPP1 avec CLPf fixée aux billes (**Figure 16, western-blot inférieur, piste 3**). Cette taille correspondant à celle attendue pour PfPP1-6His, ainsi nous pouvons conclure que PfPP1-6His interagit avec CLPf. Nous observons également que l'anticorps anti-GST est capable de détecter une protéine correspondant à la GST seule. Cette observation est courante puisque ce tag a tendance à se cliver de la protéine à laquelle il est lié (**Figure 16, piste 3**).

Par la suite, nous avons choisi de confirmer ces interactions en utilisant une troisième approche : l'immunoprécipitation.

### c) Immunoprécipitation

Pour effectuer ce type d'expérimentation, nous avons produit un anticorps dirigé contre la protéine recombinante CLPf-6His. Il est ensuite testé sur la protéine recombinante pour vérifier sa capacité à la reconnaître (**Figure 17**). Une bande aux alentours de 37 kDa est détectée par le sérum anti-CLPf (**Figure 17, piste 2**), et par l'anticorps anti-histidine (**Figure 17, piste 1**). Cette bande correspond à la protéine CLPf, par conséquent le sérum anti-CLPs

est capable de reconnaître la protéine recombinante CLPf-6His, contrairement au sérum de souris pré-immune (**Figure 17, piste 3**).



*Figure 17: Vérification de la reconnaissance de la protéine recombinante CLPf par le sérum anti-CLPf. La piste 1 est révélée par un anticorps anti-6His, la piste 2 par le sérum anti-CLPf et la piste 3 par le sérum de souris saine (SSS). La flèche turquoise indique la protéine CLPf. Les bandes en dessous correspondent à des dégradations de CLPf.*

Les immunoprécipitations (IP) sont réalisées en incubant ce sérum avec des billes de protéine G-agarose et la protéine CLPf-6His. Puis la protéine recombinante PfPP1-GST est ajoutée. Un témoin négatif est réalisé en utilisant des billes de protéine G-agarose incubées avec le sérum de souris pré-immune. Finalement, l'analyse de l'interaction est réalisée par western-blot révélé par des anticorps anti-GST et anti-6His.

Nous observons que les billes avec le sérum anti-CLPf sont capables de fixer cette protéine ainsi que PfPP1-GST (**Figure 18, piste 2**), puisque leurs tailles respectives sont de 37 kDa et 60 kDa. Tandis que les billes avec le sérum de souris saine ne reconnaît ni CLPf-6His, ni PfPP1-GST (**Figure 18, piste 1**). Par conséquent, CLPf est capable d'interagir avec PfPP1.

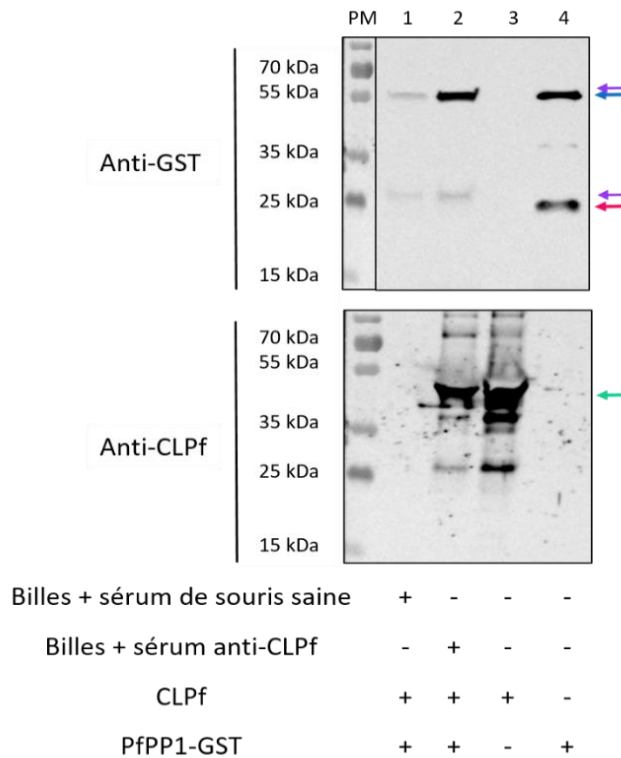


Figure 18 : Immunoprécipitation de CLPf et PfPP1. La piste 1 correspond au témoin négatif de l'IP réalisée avec le sérum de souris saine, la piste 2 à l'IP CLPf/PfPP1-GST, la piste 3 à l'input CLPf et la piste 4 à l'input de PfPP1-GST. Le western-blot du haut est révélé par un anticorps anti-GST, tandis que celui du bas est révélé par l'antisérum dirigé contre CLP. La flèche bleue indique PfPP1-GST, la flèche verte CLP et la flèche rose indique la GST libre. Les flèches violettes indiquent les IgG des antisérums.

L'interaction entre PfPP1 et son partenaire CLPf a donc été démontrée par différentes approches. L'interaction en bactérie ne permet pas de conclure quant à une interaction directe entre ces deux protéines, cependant les approches par GST pull-down et immunoprécipitation semblent l'indiquer. Dans le but de confirmer cette interaction directe, un test d'interaction de type ELISA a été réalisé.

#### d) Test de type ELISA *in vitro*

La protéine recombinante CLPf-6His est mise en présence de différentes concentrations de protéine recombinante PfPP1 marquée à la biotine (Figure 19). Un témoin négatif et également utilisé, il s'agit de la BSA (Bovin Serum Albumin).

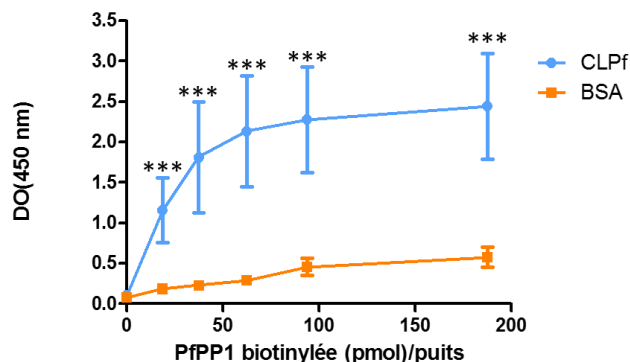


Figure 19: Tests d'interaction *in vitro* de type ELISA entre PfPP1 et la protéine CLPf. La protéine CLP est adsorbée sur une plaque ELISA à une concentration de 50 pmol/puits. Des doses croissantes de protéine PfPP1 biotinylée (0-200 pmol) sont ensuite ajoutées et l'interaction est lue par absorbance à 450 nm. Cette expérience a été réalisée trois fois en duplicate. Les résultats sont exprimés en densité optique DO à 450 nm (+/- SEM). La significativité à 1% de l'intensité de l'interaction, représentée par les étoiles, a été évaluée par le test de Mann & Whitney.

Nous observons une augmentation dose-dépendante de la densité optique, ce qui indique que CLPf est capable d'interagir de façon directe avec PfPP1 (Figure 19). De plus, il semblerait que cette interaction soit forte, puisque la courbe d'interaction atteint très rapidement un plateau.

### 3) Rôle de CLP sur l'activité phosphatase de PP1

Pour observer un éventuel rôle de CLP sur l'activité de PP1, deux approches ont été utilisées : un test *in vitro* utilisant le substrat pNPP et la PfPP1, puis nous avons exploité le modèle hétérologue d'ovocyte de Xénope.

#### a) Test pNPP

Dans un premier temps, nous avons réalisé un test *in vitro* utilisant le substrat pNPP (para-NitroPhénylPhosphate). Celui-ci, lorsqu'il est hydrolysé, libère un composé coloré : le nitro-4-phenol. Ainsi, l'activité phosphatase peut être mesurée par absorbance à 405 nm.

La protéine recombinante PfPP1 est pré-incubée en présence de différentes quantités de protéine CLPf, puis le substrat pNPP est ajouté. On observe que la présence de CLPf ne modifie pas de façon significative l'activité de la phosphatase par cette approche (Figure 20).

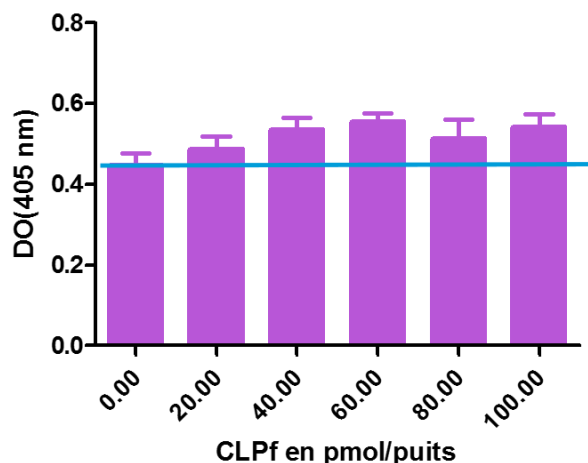


Figure 20 : Test d'activité de type pNPP in vitro. Rôle de CLPf sur l'activité phosphatase de PfPP1 en fonction de la quantité de protéine CLPf. Le trait bleu correspond à l'activité de base de PfPP1. Les résultats sont exprimés en densité optique (DO) à 405 nm (+/- SEM, n=3). La différence d'activité n'est pas significative (test de Mann & Whitney).

### b) Fonction de CLPf en ovocyte de Xénope

Dans ce système, les ovocytes de Xénope (*Xenopus laevis*) sont bloqués en prophase I, et ce blocage peut être levé par l'incubation des ovocytes dans un milieu contenant de la progestérone ou par l'injection d'inhibiteurs de phosphatases. L'ovocyte passe alors en métaphase II et ce phénomène est visible par l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal, ce qui est caractéristique de la GVBD (Germinal Vesicle BreakDown). La fonction de la protéine CLPf sur l'activité de PP1 peut être testée dans ce système puisque la PP1 de Xénope présente plus de 80 % d'homologie avec PfPP1. La stratégie utilisée est d'injecter l'ARNm de CLPf dans l'ovocyte de Xénope et d'observer l'induction de la GVBD. Si cette protéine est un inhibiteur de XePP1, alors la GVBD pourra être observée. Par contre, si CLPf est un activateur de la phosphatase, il faudra étudier l'effet de la protéine CLPf sur la GVBD induite par la progestérone. Ces expériences sont réalisées en collaboration avec le Professeur Bodart et le Docteur Cailliau (EA4479, Université Lille 1).

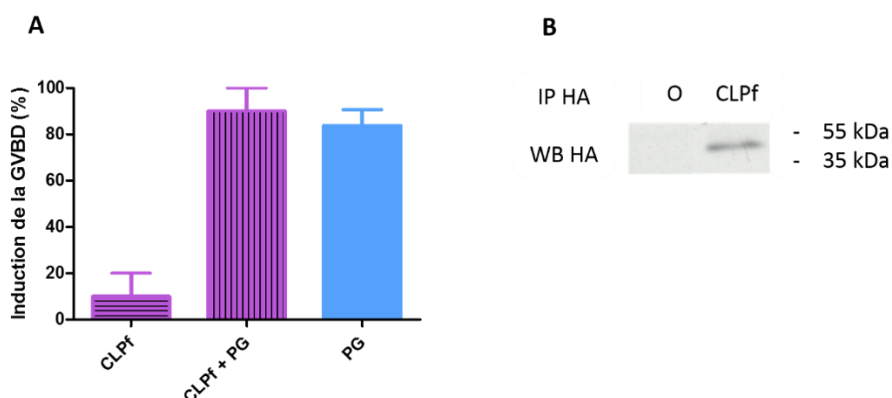


Figure 21: Effet de CLPf sur la GVBD des ovocytes de Xénope. (A) L'ARNm correspondant à cette protéine est micro-injecté à des ovocytes qui sont placés ou non en présence de progestérone (PG) et l'observation de la GVBD est faite 15 h après. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'induction de GVBD (+/- SEM, n=2). (B) La vérification de l'expression de la protéine CLPf 16 h après la micro-injection de 60 ng d'ARNm en ovocytes de Xénope, qui est effectuée par l'extraction des protéines et la réalisation d'un western-blot anti-HA. En témoin négatif est utilisé un lysat d'ovocytes natifs (O).

Nous nous sommes d'abord placés dans le cas où la protéine CLPf serait un inhibiteur de XePP1. Cette expérience a été réalisée deux fois et n'a pas permis d'observer la GVBD des ovocytes microinjectés avec l'ARNm de CLPf (10% d'induction de GVBD) (**Figure 21. A**). Ces résultats suggèrent que CLPf n'est pas un inhibiteur de XePP1. Nous nous sommes ensuite assurés de la production de la protéine CLPf à partir de l'ARNm micro-injectés (**Figure 21. B**). Il s'avère que la protéine est effectivement produite puisqu'une bande à la taille attendue de 37 kDa est observée. Par conséquent, l'absence d'effet de la micro-injection de l'ARNm de CLPf sur la GVBD des ovocytes est due au fait que cette dernière n'est pas un inhibiteur de PP1. Ce résultat confirme ce qui a été observé par test pNPP.

Ensuite nous avons testé l'effet de la protéine CLPf sur la GVBD lorsque celle-ci est induite par la progestérone (**Figure 21. A**). On observe en moyenne 90 % de GVBD suite à la micro-injection de l'ARNm de CLPf, contre environ 80 % de GVBD pour le témoin progestérone. Cela semble indiquer que la protéine CLPf ne serait pas non plus un activateur de XePP1.

Il est tout de même à noter que ces résultats sont à prendre avec précaution. En effet, il n'a pas été démontré que la protéine CLPf est capable d'interagir avec XePP1.



## II. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de PF3D7\_0919900, nouveau partenaire de PfPP1

### A. Analyse et confirmation de la séquence de PF3D7\_0919900

#### 1) Analyse de la séquence

PF3D7\_0919900 est une protéine de 3 381 AA (**Annexe 4**) spécifique de *Plasmodium*, codée par un gène de 10 146 pb sans intron. D'après les données disponibles dans PlasmoDB, cette protéine, d'environ 396 kDa, est exprimée majoritairement aux stades trophozoïte tardif et schizonte. Son interactome est disponible sur PlasmoDB, et indique qu'elle aurait un rôle dans la régulation de la condensation des chromosomes ainsi que dans l'import/export des protéines impliquant l'Exportine, entre le noyau et le cytoplasme.

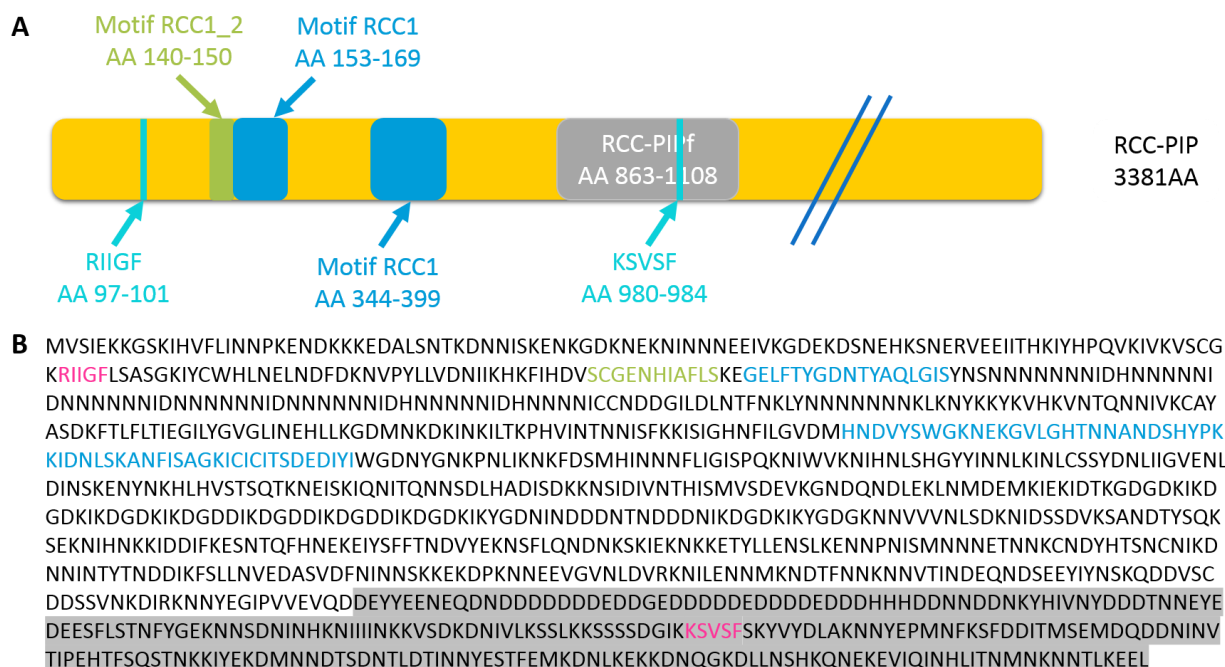


Figure 22: Analyse de la séquence protéique de PF3D7\_0919900. A) Schématisation des différents motifs de la protéine. B) Séquence protéique des AA 1 à 1108 de la protéine PF3D7\_0919900. En bleu sont représentés les motifs RCC1, en vert le motif RCC1\_2 et en rouge les motifs RVxF. La portion d'AA en gris correspond au fragment obtenu lors du criblage et qui fait l'objet de cette thèse.

L'analyse de la séquence protéique complète de PF3D7\_0919900 a mis en évidence la présence de deux motifs RVxF. Le premier, correspondant à RIIGF, se situe dans la partie Nt, tandis que le second motif RVxF, KSVSF, se situe dans la portion de gène qui a été obtenue lors du criblage de banque (AA 863 à 1 108) (**Figure 22. A, Annexe 4**). Ce dernier pourrait être impliqué dans l'interaction avec la protéine phosphatase de type 1 (PP1), puisque ce motif est connu pour être présent dans la séquence de 80% des régulateurs de la phosphatase.

**Regulator of chromosome condensation (RCC1) consensus (pfam00415) :**

RCC1 consensus 1 **DGRVYTWGRNEYGQLGL** 17  
 PF3D7\_0919900 153 **EGELFTYGDNTYAQLGI** 169

RCC1 consensus 1 **DGRVYTWGRNEYGQLGLG-DTEDVLPQIVEGLSGVRRVQV---ACGAS-HTVAL** 56  
 PF3D7\_0919900 344 **HNDVYSWGKNEKGVLGHTNNANDSHYPKKIDNLSKANFISAGKICICITSDEDIYI** 399

**Regulator of chromosome condensation (RCC1) signature 2 (Prosite PS00626) :**

Consensus pattern **[LVMFA]-[STAGC](2)-G-x-[TAV]-H-[STAGLI]-[LVMFA]-[K]-[LVM]**  
 PF3D7\_0919900 140 **VSCGENHIAFL** 150

Figure 23: Alignements des séquences consensus des motifs RCC1 et RCC1\_2 avec ceux de la protéine PF3D7\_0919900.

A ceux-ci s'ajoutent des motifs RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1) (Figure 22. A, Annexe 4). Il s'agit plus précisément de deux motifs RCC1 et un motif RCC1\_2 dont les alignements avec les séquences consensus sont représentés ci-dessus (Figure 23). Le premier domaine, comportant un motif RCC1 et un motif RCC1\_2 accolés, se situe entre les AA 140 et 169, tandis que le second motif RCC1 se situe entre les AA 344 et 399. Ils contiennent trois glycines conservées qui permettent le repliement entre les différents feuilletts, et des résidus hydrophobes qui stabilisent les feuilletts  $\beta$  anti-parallèles (HADJEBI ET AL. 2008). Les motifs RCC1 interagissent avec des protéines, tandis que les motifs RCC1\_2 sont plutôt connus pour interagir avec de l'ADN (HADJEBI ET AL. 2008).



Figure 24: Modélisation des motifs RCC1 et RCC1\_2 de PF3D7\_0919900 (AA 140 à 424), à partir de la structure des motifs RCC1 de la protéine RCC1 humaine (NC\_000001.11) (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi>). Les flèches représentent les feuilletts  $\beta$ , en bleu sont désignés les motifs RCC1 et en rouge le motif RCC1\_2. Le cercle rose indique la présence d'une poche qui pourrait permettre la liaison des motifs RCC1 et RCC1\_2 de PF3D7\_0919900 à des protéines ou de l'ADN.

Afin de réaliser une modélisation 3D de la protéine PF3D7\_0919900 nous avons utilisé le programme <https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi>. Mais pour cela, le programme se base sur le cristal d'une protéine connue. Il se trouve que les seuls domaines modélisés sont ceux contenant les motifs RCC1 et RCC1\_2. Ainsi la modélisation 3D s'applique uniquement à la région comprise entre les AA 140 et 424 (Figure 24). Cette région est donc

composée de quatorze feuillets  $\beta$  anti-parallèles organisés de telle sorte qu'ils laissent une poche qui pourrait permettre la liaison des protéines ou de l'ADN aux motifs RCC1.

Du fait de la potentielle interaction de PF3D7\_0919900 avec PfPP1 et de la présence de motifs RCC1 dans sa séquence, cette protéine a été nommée RCC-PIP pour Regulator of Chromosome Condensation-Phosphatase Interacting Protein.

Il est également à noter que la protéine RCC-PIP présente des stretches d'asparagines et d'acides aspartiques (**Figure 22. B**) qui peuvent être un obstacle à la production de protéines recombinantes. Dans la région Ct se trouvent aussi des répétitions du motif HDQHGK dont le rôle n'a pas été identifié.

Dans la suite de ce travail, la protéine désignée par RCC-PIPf correspond au fragment qui a été obtenu lors du criblage de la banque d'ADNc de *P. falciparum* (AA 863 à 1 108).

## 2) Confirmation de la séquence codante

D'après les données disponibles dans PlasmoDB, peu de peptides sont retrouvés par spectrométrie de masse MS/MS. De plus, la séquence de la protéine est assez inhabituelle du fait de la présence de stretches d'asparagines. Ainsi nous avons vérifié l'existence du transcrit par la réalisation de PCR sur l'ARN rétro-transcrit d'une culture asynchrone de *P. falciparum*. Nous avons d'abord tenté d'amplifier le gène complet mais ces essais se sont soldés par des échecs. Cela peut s'expliquer par la longueur du gène codant et par la grande quantité d'adénines et de thymidines dans le génome de *P. falciparum* pour lesquels la polymérase présente moins d'affinité. Nous avons ensuite réduit les essais à une portion de 5 kb, puis de 3 kb, taille à partir de laquelle nous avons été en mesure d'amplifier un fragment du gène. Afin de compléter cette identification, nous avons réalisé des PCR par chevauchement afin de couvrir la totalité du gène codant (**Figure 25. A**). Pour cela, dix couples d'amorces ont été utilisés (**Figure 25. B, Annexe 5**).

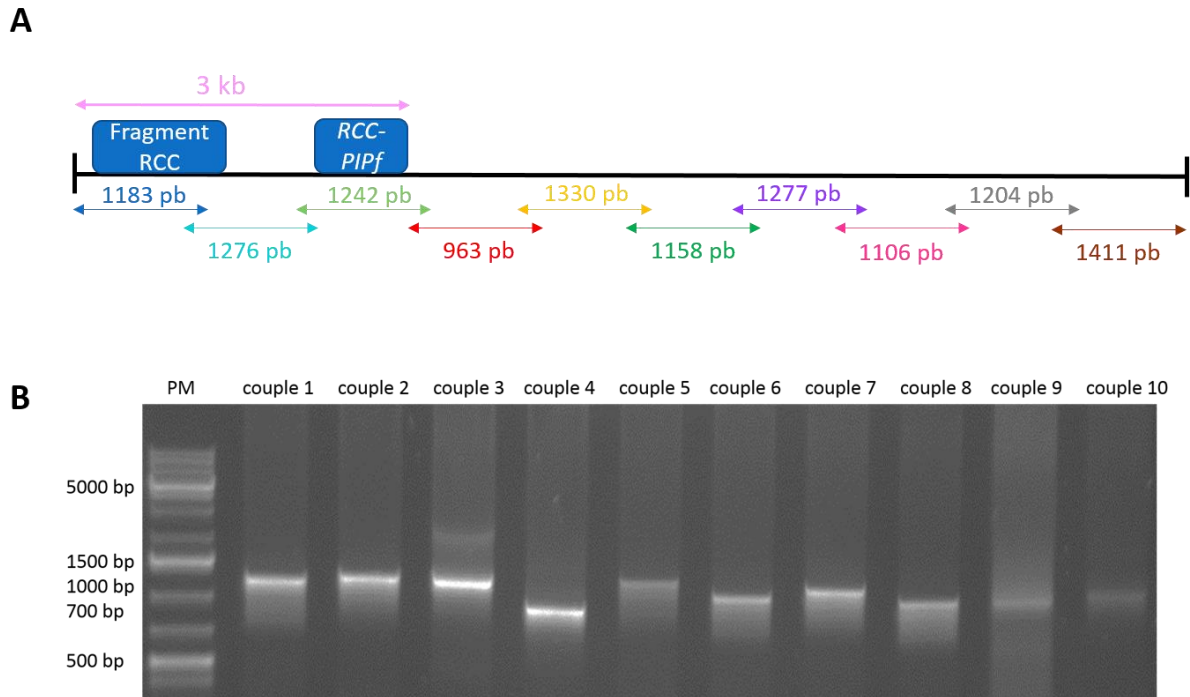


Figure 25: Vérification de la séquence codante du gène RCC-PIP par la réalisation de PCRs par chevauchement sur une RT de *P. falciparum*. A) Schématisation des couples d'amorces utilisés pour les PCR par chevauchement et positionnement des fragments protéiques étudiés. B) Observation après migration sur gel d'agarose, des fragments obtenus suite à la réalisation des PCR par chevauchement sur l'ARN rétro-transcrit de *P. falciparum*.

Le séquençage de l'ensemble des fragments obtenus par PCR (**Figure 25. B**) a permis de confirmer la séquence codante pour la protéine RCC-PIP, et qu'elle est correctement annotée à l'exception du nucléotide en position 467 qui n'est pas une thymidine mais une cytosine. Cependant cette différence n'entraîne pas de conséquence sur la séquence protéique.

## B. Interaction de RCC-PIPf avec PfPP1, et implication du motif RVxF

De la même façon que pour CLP, après avoir confirmé l'interaction en levure entre le clone de RCC-PIP et PfPP1, il était nécessaire de confirmer cette interaction par d'autres approches. Mais avant cela, nous avons examiné la capacité du fragment de 3 kb à interagir avec PfPP1 en double hybride de levure.

### 1) Etude de l'interaction en double hybride de levure

#### a) Interaction du fragment RCC-PIP-3 kb avec PfPP1

Ce fragment de 3 kb correspond aux AA 1 à 1 108 et comprend donc les motifs RCC1 et RCC1\_2 ainsi que les deux motifs RVxF et le fragment de protéine obtenu lors du criblage. Par conséquent, il serait logique que ce fragment de 3 kb soit en mesure d'interagir avec PfPP1. Mais malgré plusieurs tentatives, l'interaction en double hybride de levure n'a pas pu être observée.

Du fait de la grande quantité d'asparagines, il est possible que la levure ne soit pas en mesure de produire la protéine. En effet, nous avons tenté de vérifier la production de la protéine par différentes techniques d'extraction, mais sa présence n'a pas pu être démontrée. Cela suggère que l'absence d'interaction serait due à un défaut d'expression de RCC-PIP-3 kb.

#### b) Implication du motif RVxF dans l'interaction avec PfPP1 en double hybride de levure

Lors de l'analyse de la séquence protéique de RCC-PIP, nous avons observé la présence d'un motif RVxF dans le fragment de RCC-PIP obtenu suite au criblage de la banque. Les motifs RVxF étant connus pour être impliqués dans l'interaction avec PP1, nous avons souhaité étudier l'implication de ce motif dans l'interaction de RCC-PIPf avec PfPP1.

##### o Mutation du motif RVXF

Le motif RVxF étudié correspond aux acides aminés KSVSF qui se situent entre les positions 980 et 984. Par mutagenèse dirigée, nous avons remplacé la valine en position 982 et la phénylalanine en position 984 par des alanines. Ainsi, le motif <sup>980</sup>KSVSF<sup>984</sup> devient le motif <sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>. Ce mutant sera appelé par la suite RCC-PIPf-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>. Afin d'observer l'effet de ces mutations sur l'interaction de RCC-PIP avec PfPP1, les approches mises en œuvre précédemment, ont été utilisées.

##### o Conséquence de la mutation du motif RVxF de RCC-PIPf sur l'interaction en double hybride de levure

Nous avons tout d'abord testé l'interaction du mutant RCC-PIPf-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> avec PfPP1 en double hybride de levure. Pour cela, nous avons effectué le croisement des levures exprimant RCC-PIPf-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> avec celles exprimant PfPP1. En parallèle, en témoin positif, les levures exprimant RCC-PIPf WT sont également croisées avec celles exprimant PfPP1 (**Figure 26**). En guise de témoins négatifs, les levures transformées avec les différentes constructions en pGADT7 sont croisées avec celles transformées avec les vecteurs pGBKT7 vide et laminine, et les levures transformées avec les constructions en pGBKT7 sont croisées avec celles transformées avec le vecteur pGADT7 vide (**Figure 26**). Ces différents témoins permettent de vérifier l'absence d'auto-activation du système.

Les résultats montrent que les protéines RCC-PIPf-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> et PfPP1 n'interagissent pas puisqu'aucune colonie n'est observée sur les milieux TDO et QDO (**Figure 26**). Cela n'est pas dû à l'absence des diploïdes puisque des colonies sont observées sur milieu DDO. Par contre, RCC-PIPf WT interagit fortement avec PfPP1, comme nous l'avons démontré précédemment (**Figure 26**). Par conséquent, il semble que le motif RVxF soit nécessaire à l'interaction entre RCC-PIPf et PfPP1 en double hybride de levure.

	pGBKT7 vide	laminine	PfPP1WT	
pGAT7 vide				DDO
				TDO
				QDO
RCC-PIPf WT				DDO
				TDO
				QDO
RCC-PIPf <sup>980KSASA<sup>984</sup></sup>				DDO
				TDO
				QDO

Figure 26: Implication du motif RVxF dans l'interaction entre RCC-PIPf et PfPP1 en double hybride de levure. En témoins négatifs, sont croisés les levures contenant les constructions pGBKT7 vide et laminine avec les levures contenant les constructions pGADT7 vide, RCC-PIPf, et RCC-PIPf-<sup>980KSASA<sup>984</sup></sup>, ainsi que la levure contenant le vecteur pGADT7 vide avec les levures contenant les constructions pGBKT7 vide, laminine et PfPP1. Pour chaque croisement, la première ligne correspond à la présence des deux protéines (DDO), la seconde à la présence d'une interaction entre les deux protéines (TDO), et la 3<sup>ème</sup> à une interaction forte entre ces deux partenaires (QDO).

De plus, les extractions des protéines des différentes levures ayant servi aux croisements ont mis en évidence que PfPP1 (Figure 27. A), RCC-PIPf WT (Figure 27. B) ainsi que RCC-PIPf-<sup>980KSASA<sup>984</sup></sup> (Figure 27. C) sont bien exprimées. Donc l'absence d'interaction entre RCC-PIPf-<sup>980KSASA<sup>984</sup></sup> et PfPP1 n'est pas due à un défaut d'expression des protéines par les levures.

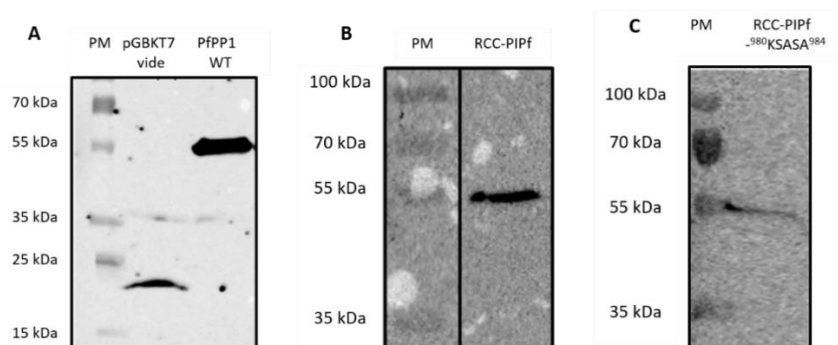


Figure 27: Vérification de l'expression des protéines PfPP1, RCC-PIPf WT et RCC-PIPf-<sup>980KSASA<sup>984</sup></sup> en levure. (A) La protéine PfPP1 est révélée par un anticorps anti-myc, tandis que les protéines RCC-PIPf WT (B) et mutée <sup>980KSASA<sup>984</sup></sup> (C) sont révélées par un anticorps anti-HA.

Nous avons donc montré, en utilisant le double hybride de levure, que RCC-PIPf interagit avec PP1, et que cette interaction est dépendante du motif RVxF. Afin de confirmer ces observations, nous avons utilisé d'autres approches. La première est la co-expression en bactérie, mais elle ne nous a pas permis d'obtenir de résultats exploitables. Nous avons donc utilisé le GST pull-down.



## 2) Etude de l'interaction avec PfPP1 par GST pull-down

L'étude de l'interaction de PfPP1 a été poursuivie avec le fragment obtenu lors du criblage, mais sous une forme plus courte (AA 920 à 1 108) qui ne contient pas de stretches d'acides aspartiques. Cela a permis de faciliter la production de la protéine recombinante par les bactéries. Ce fragment sera nommé RCC-PIPfc pour la protéine recombinante sauvage, et cette même protéine mutée dans son motif RVxF sera appelée RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>.

Nous avons produit la protéine RCC-PIPfc-6His de manière recombinante. La pureté de la protéine produite a été vérifiée par coloration au Simply Blue®, et la qualité par la réalisation d'un western-blot avec un anticorps dirigé contre le tag -6His de la protéine. La présence d'une bande à la taille attendue de 25 kDa démontre la production de la protéine RCC-PIPfc-6His (**Figure 28. A**).

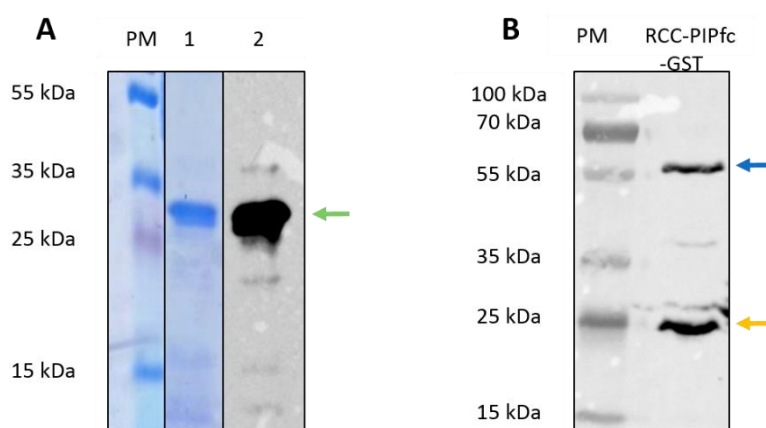


Figure 28: Production des protéines recombinantes RCC-PIPfc tagguées -6His ou -GST. A) Vérification de la pureté de la protéine RCC-PIPfc-6His par coloration au Simply Blue® (piste 1) et par western-blot avec un anticorps anti-Histidine (piste 2). B) Vérification de la production de la protéine recombinante RCC-PIPfc-GST par révélation avec un anticorps anti-GST. La flèche verte indique la protéine RCC-PIPfc-6His, la flèche bleue la protéine RCC-PIPfc-GST et la flèche orange la GST libre.

Par la suite, nous avons réalisé le GST pull-down en mettant la protéine recombinante RCC-PIPfc-6His en présence de billes de Glutathion agarose seules ou liées à la GST, qui serviront de témoins négatifs, ainsi qu'en présence de billes de Glutathion agarose liées à la PfPP1-GST. Lors des premiers essais, nous avons observé que RCC-PIPfc-6His était en mesure d'interagir avec les billes de Glutathion agarose seules. Par conséquent, les résultats obtenus n'étaient pas interprétables.

Nous avons donc choisi de réaliser le GST pull-down dans l'autre sens, c'est-à-dire en clonant RCC-PIPfc dans un vecteur permettant de produire une protéine recombinante fusionnée à la GST (50 kDa) (**Figure 28. B**). Cette protéine a été fixée à des billes de Glutathion agarose avant d'y ajouter la protéine recombinante PfPP1-6His (35 kDa) (**Figure 29, piste 3**). En témoins négatifs sont utilisées des billes de Glutathion agarose seules ou liées à la GST (**Figure 29, piste 1 et 2**).

Après séparation des protéines sur SDS-PAGE, un western-blot est effectué et révélé par un anticorps dirigé contre le tag -GST qui permettra d'observer la présence de la GST seule

et de la protéine RCC-PIPfc-GST (**Figure 29, western-blot supérieur**), et un par un anticorps anti-6His qui détectera la présence de PfPP1-6His (**Figure 29, western-blot inférieur**).

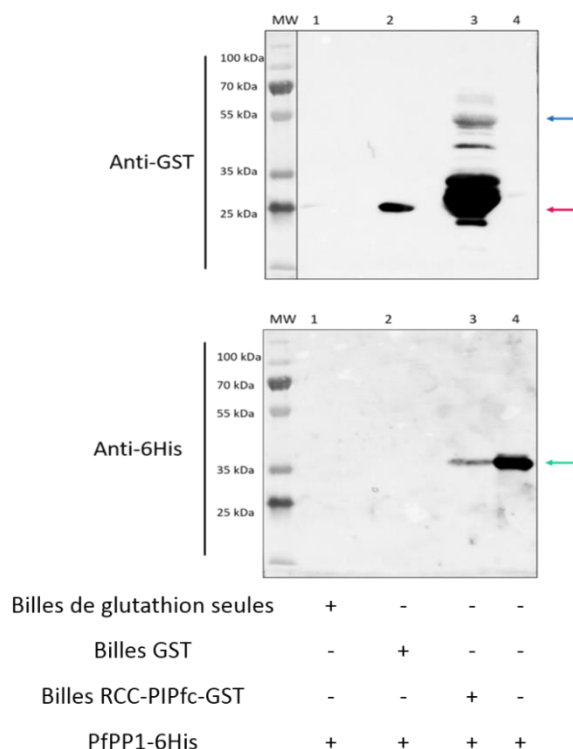


Figure 29: Interaction entre RCC-PIPfc et PfPP1 par GST pull-down. La piste 1 correspond au témoin négatif réalisé avec des billes de Glutathion agarose seules, la piste 2 est également un témoin négatif effectué avec la GST seule, la piste 3 correspond au GST pull-down entre RCC-PIPfc-GST et PfPP1-6His, et la piste 4 à la protéine PfPP1-6His seule. La flèche bleue indique la protéine RCC-PIPfc-GST, la rose la GST seule et la verte PfPP1. Les protéines sont révélées avec un anticorps anti-GST (en haut) et un anticorps anti-histidine (en bas).

Nous observons une bande de 35 kDa révélée par l'anticorps anti-6His, qui correspond à PfPP1 (**Figure 29, piste 3**). Par conséquent, PfPP1 semble interagir avec RCC-PIPfc-GST de façon spécifique (**Figure 29, piste 3**) puisque les témoins négatifs ne démontrent pas d'interaction entre PfPP1-6His et les billes de Glutathion agarose seules ou liées à la GST seule (**Figure 29 pistes 1 et 2**).

Nous observons également des dégradations de la protéine recombinante RCC-PIPfc-GST, avec une bande majoritaire à 25 kDa qui correspond à la GST libre (**Figure 29, piste 3**). Malheureusement, en modifiant le temps d'induction ou la concentration en sel des tampons, nous n'avons pas été en mesure d'améliorer la qualité de production de la protéine RCC-PIPfc-GST.

Nous avons donc utilisé une troisième approche afin de confirmer cette interaction.

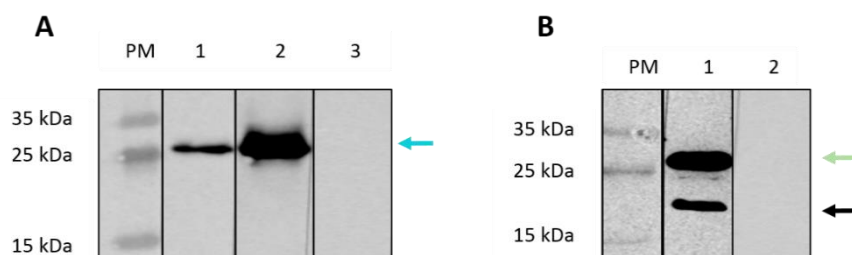
### 3) Immunoprécipitation

Afin de réaliser une immunoprécipitation, nous avons produit un sérum dirigé contre RCC-PIPfc-6His, et ce sérum est ensuite testé sur la protéine recombinante. Il s'avère qu'il est en mesure de reconnaître une protéine de 25 kDa, correspondant à RCC-PIPfc (**Figure 30. A,**



**piste 2**), tout comme l'anticorps anti-6His (**Figure 30. A, piste 1**). Aucune bande n'est observée avec le sérum de souris pré-immune (**Figure 30. A, piste 3**).

Dans le but de tester l'influence du motif RVxF dans l'interaction RCC-PIPfc/PfPP1, nous nous sommes assurés que le sérum anti-RCC-PIP est en mesure de reconnaître la protéine mutée dans son motif RVxF (**Figure 30. B, piste 1**). Une bande de 25 kDa est détectée, ce qui correspond à la taille attendue de la protéine recombinante RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>. De nouveau, aucune bande n'est observée avec le sérum de souris pré-immune (**Figure 30. B, piste 3**).



*Figure 30 : Reconnaissance des protéines recombinantes RCC-PIPfc WT et mutée par le sérum anti-RCC-PIPfc. A) La protéine RCC-PIPfc WT est révélée par un anticorps anti-Histidine (piste 1), par le sérum dirigé contre RCC-PIPfc (piste 2) et par le sérum de souris pré-immune (piste 3). B) La protéine RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> est détectée par le sérum dirigé contre RCC-PIPfc (piste 1) et par le sérum de souris pré-immune (piste 2). La flèche turquoise indique la présence de la protéine RCC-PIPfc WT, la flèche verte désigne la protéine RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> et la flèche noire la dégradation de la protéine RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>.*

Nous avons ensuite effectué les immunoprécipitations (IP) en incubant, sur la nuit, le sérum anti-RCC-PIPfc avec des billes de protéine G agarose et la protéine RCC-PIPfc-6His WT ou RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>. Puis la protéine recombinante PfPP1-GST est ajoutée. Ensuite, les protéines sont séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et un western-blot est réalisé. En témoin négatif sont utilisés des billes de protéine G agarose incubées avec le sérum de souris pré-immune.

L'analyse en western blot montre, après révélation avec le sérum de souris anti-RCC-PIPfc, que les billes incubées avec le sérum anti-RCC-PIP sont capables de fixer les protéines RCC-PIPfc WT et mutée dans son motif RVxF (**Figure 31, western-blot inférieur, pistes 2 et 4**). La révélation avec un anticorps anti-GST montre, quant à elle, que PfPP1-GST interagit avec RCC-PIPfc WT (**Figure 31, western-blot supérieur, piste 2**), mais pas avec la protéine mutée dans son motif RVxF (**Figure 31, western-blot supérieur, piste 4**). Comme attendu, le sérum de souris pré-immune, servant de témoin négatif, n'est pas en mesure de se lier aux protéines RCC-PIPfc WT ou <sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>.

Par conséquent, les résultats indiquent que RCC-PIPfc est capable d'interagir avec PfPP1, et que le motif RVxF est nécessaire à l'interaction entre PfPP1 et son partenaire par cette approche, tout comme par la technique du double hybride de levure.

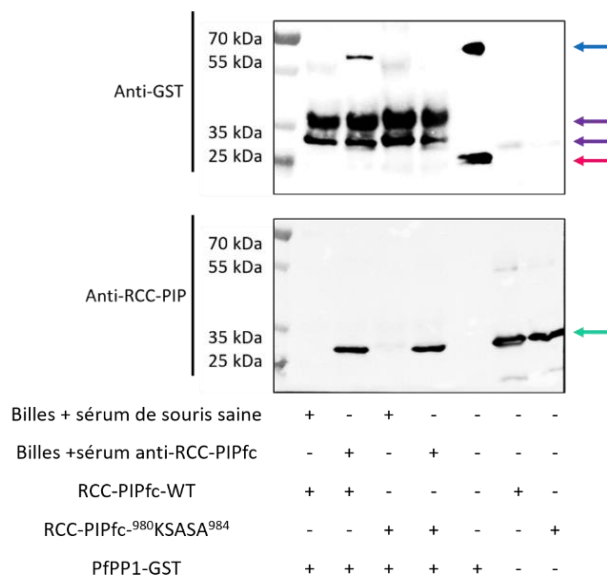


Figure 31: Interaction entre RCC-PIPfc et PfPP1, et implication du motif RVxF par immunoprécipitation. Des billes de protéine G agarose sont liées soit à un sérum de souris pré-immune, soit à un sérum dirigé contre RCC-PIPfc. Puis la protéine RCC-PIPfc WT ou <sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> est incubée en présence de ces billes. Ensuite la protéine PfPP1-GST est ajoutée pendant 2 h. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE puis un western-blot est réalisé. La membrane supérieure est révélée par un anticorps anti-GST, et celle inférieure par le sérum dirigé contre RCC-PIPfc. La flèche bleue indique la présence de PfPP1-GST, la rose la GST libre et la verte les protéines RCC-PIPfc WT et <sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>. Les flèches violettes, quant à elles, indiquent des bandes aspécifiques.

L'interaction entre PfPP1 et son partenaire RCC-PIPfc a donc été démontrée par différentes approches. Finalement nous avons utilisé le test de type ELISA afin de confirmer ces résultats par une troisième approche.

#### 4) Test de type ELISA *in vitro*

Dans une plaque ELISA, les protéines RCC-PIPfc WT et RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> ont été adsorbées à la concentration de 50 pmol/puits (Figure 32). Puis, différentes quantités de protéine PfPP1 marquée à la biotine ont été ajoutées.

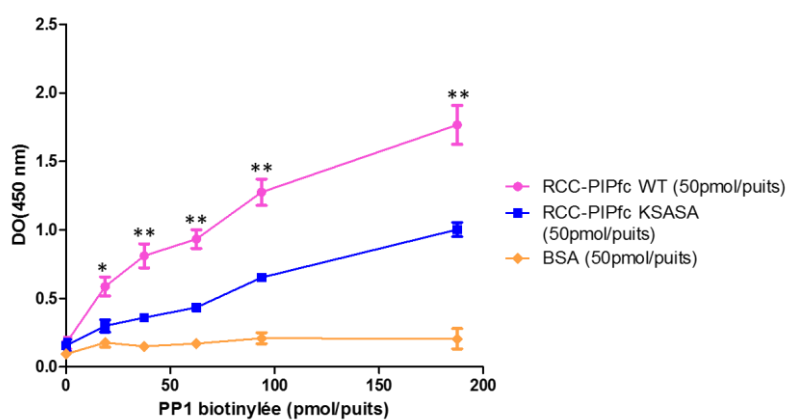


Figure 32 : Test d'interaction de type ELISA entre PfPP1 et RCC-PIPfc WT ou RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>. Les protéines RCC-PIPfc sauvage ou mutée sont adsorbées dans une plaque ELISA, puis différentes quantités de PfPP1 marquée à la biotine sont ajoutées. L'interaction est quantifiée par lecture de la DO à 450 nm (+/- SEM, n=3). Les statistiques sont réalisées par le test de Mann & Whitney, et démontre la différence significative entre l'interaction de RCC-PIPfc WT avec PfPP1 et celle entre RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> et PfPP1. \*\* indique une significativité à 0.1 % et \* une significativité à 2.5 %.

On observe que la protéine RCC-PIPfc sauvage interagit avec PfPP1 (**Figure 32**). Par contre, la protéine RCC-PIPfc mutée dans son motif RVxF présente une diminution d'environ 50 % de son interaction avec PfPP1 comparé à l'interaction entre RCC-PIP WTfc et PfPP1 (**Figure 32**).

Ce résultat suggère que l'interaction résiduelle soit due à un site d'interaction additionnel. Par conséquent, nous avons tronqué la protéine en ajoutant un codon stop par mutagenèse dirigée juste après le motif RVxF. Cette protéine, nommée RCC-PIPfc-stop, a été produite de façon recombinante et utilisée en test de type ELISA (**Figure 33**). Les résultats montrent que RCC-PIPfc-stop interagit avec PfPP1, mais dans une moindre mesure que la protéine RCC-PIPfc WT (diminution de l'interaction d'environ 60 %). Cette interaction résiduelle peut être due à la présence du motif RVxF, puisque nous avons montré précédemment son implication dans l'interaction entre RCC-PIPfc et PfPP1.

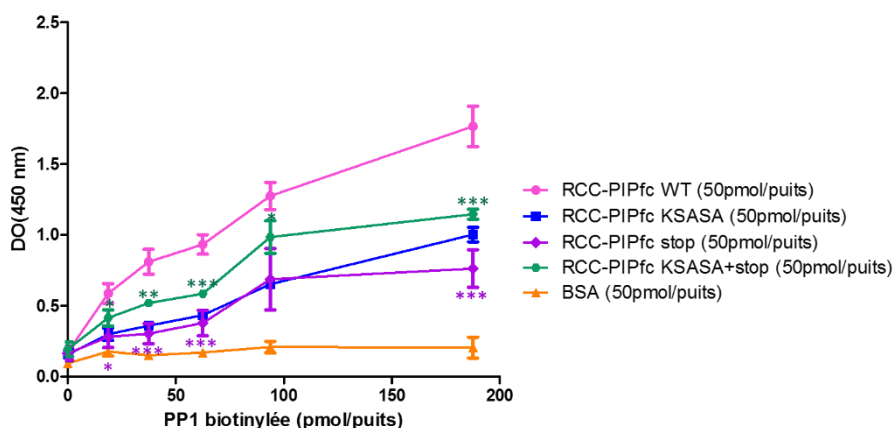


Figure 33: Test d'interaction de type ELISA entre PfPP1 et les différentes protéines de RCC-PIPfc. Les protéines RCC-PIP sauvage ou mutée sont adsorbées dans une plaque ELISA, puis différentes quantités de PfPP1 marquée à la biotine sont ajoutées. L'interaction est quantifiée par lecture de la DO à 450 nm (+/- SEM, n=3). Les statistiques sont réalisées par le test de Mann & Whitney, et démontre la différence significative entre l'interaction de RCC-PIPfc WT avec PfPP1 et celles entre les protéines RCC-PIPfc mutées avec PfPP1. \*\*\* indique une significativité à 1 %, \*\* une significativité à 2.5 % et \* une significativité à 5 %.

Par conséquent nous avons inséré un codon stop par mutagenèse dirigée en aval du motif RVxF préalablement muté, et cette protéine sera nommée RCC-PIPfc<sup>-980</sup>KSASA<sup>984</sup>+stop. Un test ELISA a été réalisé avec cette protéine, et montre que cette protéine interagit avec PfPP1 et, de façon surprenante, cette interaction est plus forte que celle observée entre RCC-PIP<sup>-980</sup>KSASA<sup>984</sup> et PfPP1 (**Figure 33**).

Ces résultats confirment donc que RCC-PIPfc interagit avec PfPP1 de manière directe. Mais l'observation d'une interaction résiduelle avec la protéine mutée dans son motif RVxF indique que, contrairement aux différentes approches utilisées, ce motif RVxf ne serait pas indispensable à l'interaction par test de type ELISA.

Cependant, au vu des résultats obtenus en double hybride de levure et immunoprécipitation, nous pouvons conclure que ce motif est impliqué dans l'interaction, voire essentiel à celle-ci.

Afin de caractériser la fonction de RCC-PIP, nous nous sommes ensuite attachés à l'étude du rôle de RCC-PIPfc sur l'activité de PP1.

### C. Fonction de RCC-PIPfc sur la phosphatase et implication du motif RVxF

Pour observer l'effet de ce partenaire sur PfPP1, deux approches sont utilisées.

#### 1) Test pNPP

La première approche est un test *in vitro* qui utilise le substrat pNPP.

PfPP1 a été mise en présence du substrat pNPP et de différentes quantités de protéines RCC-PIPfc sauvage ou <sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>. On observe que RCC-PIPfc WT est capable d'augmenter de façon dose dépendante l'activité de PfPP1, même si cette augmentation n'est pas très marquée (Figure 34). Cette augmentation n'est significative que lorsque RCC-PIPfc WT est ajoutée à la quantité de 150 pmol/puits. Cette expérience a été reproduite trois fois et les résultats obtenus sont similaires.

Lorsque le test est réalisé avec RCC-PIPfc mutée dans son motif RVxF, on observe une légère augmentation de l'activité phosphatase en présence de 150 pmol/puits de RCC-PIP-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> (Figure 34). Néanmoins, cette augmentation n'est pas significative. Ce résultat est en accord avec le fait que la mutation du motif RVxF de RCC-PIP entraîne une diminution, voir une abolition de l'interaction avec PfPP1.

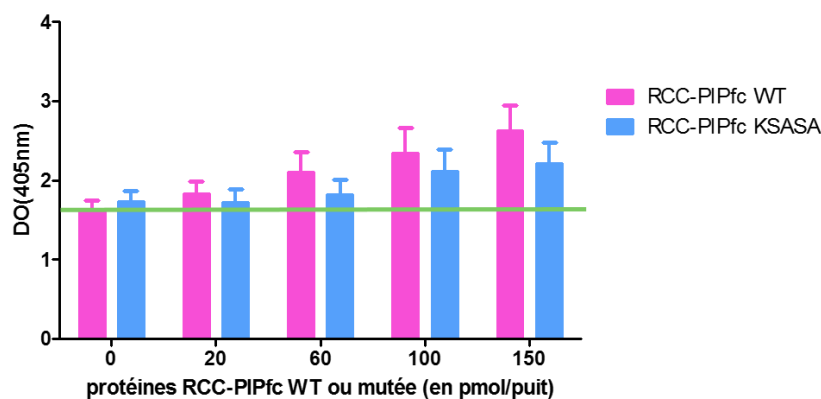


Figure 34 : Rôle de RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> sur l'activité phosphatase de PfPP1 par test pNPP. PfPP1 est pré-incubée avec différentes quantités de RCC-PIP sauvage et mutée pendant 30 min à 37 °C. Le substrat pNPP est ensuite ajouté et incubé 1 h à 37 °C. La DO est ensuite lue à 405 nm (SEM +/-, n=3). Le trait vert indique l'activité de base de PfPP1.

\* correspond à une significativité supérieure à 1 % par le test de Mann & Whitney.

Les résultats indiquent que RCC-PIPfc pourrait être un activateur de la phosphatase, mais il est nécessaire de le vérifier par une seconde approche.

#### 2) L'ovocyte de Xénope

La fonction de RCC-PIPfc peut également être testée dans le système hétérologue de l'ovocyte de Xénope puisque PfPP1 présente 80 à 85 % d'homologie avec la PP1 de Xénope.

Il est à noter que nous avons utilisé cette approche uniquement pour observer l'effet de RCC-PIPf WT. Le principe de cette approche ayant été détaillé plus haut, nous allons nous intéresser directement à l'effet de la micro-injection de l'ARNm de RCC-PIPf. Cet ARNm a été synthétisé à partir de la construction en pGADT7, ainsi l'ARNm obtenu code pour la protéine RCC-PIPf-HA.

Nous nous sommes d'abord assurés de la production des protéines par les ovocytes après micro-injection de l'ARNm de RCC-PIPf (**Figure 35. A**). Il s'avère que la protéine RCC-PIPf-HA est présente dans le lysat des ovocytes de Xénope qui ont été micro-injectés. Puis nous avons réalisé une première expérience en nous plaçant dans le cas où RCC-PIPf serait un inhibiteur de XePP1. Cette expérience a été réalisée trois fois et n'a pas permis d'observer l'induction de la GVBD des ovocytes après injection des ARNm (8.25 % d'induction de GVBD) (**Figure 35. B**). Ces résultats suggèrent que RCC-PIPf ne serait pas un inhibiteur de XePP1, ce qui est concordant avec ce qui a été observé par test pNPP.

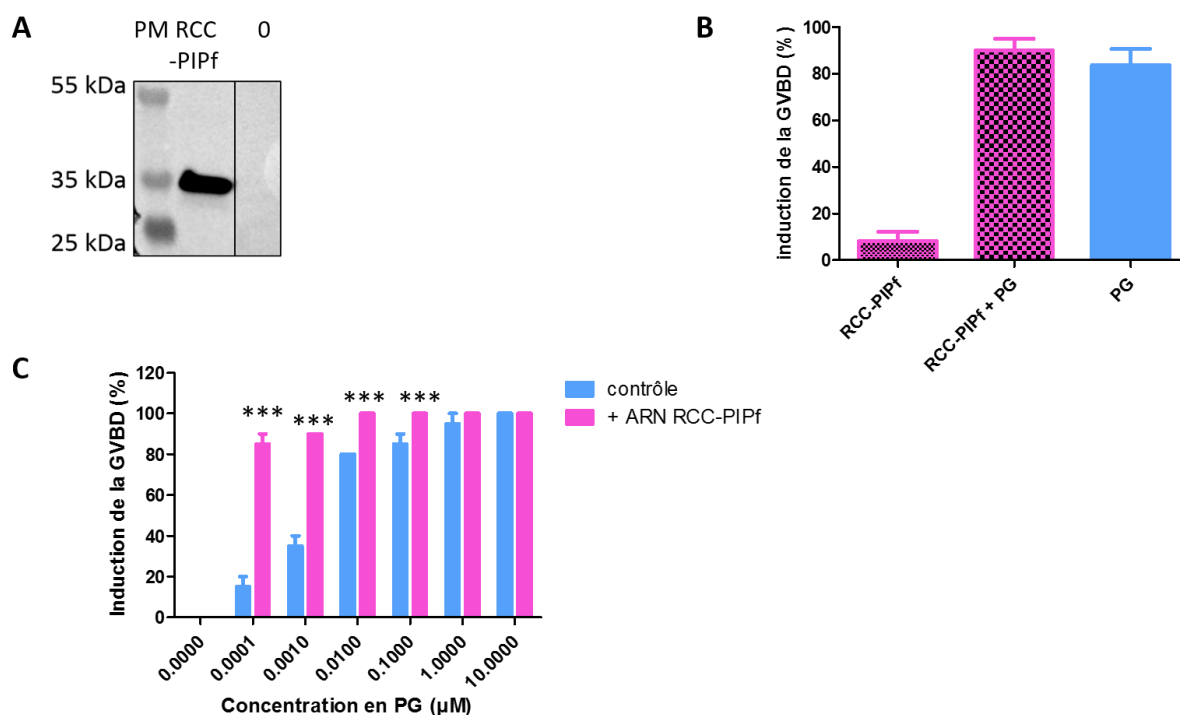


Figure 35: Effet de RCC-PIPf sur la GVBD des ovocytes de Xénope. A) Production de RCC-PIPf 16 h après la micro-injection de l'ARNm correspondant vérifiée par western-blot après révélation à l'aide d'un anticorps anti RCC-PIPf. Le « O » correspond au lysat d'ovocytes natifs. B, C) L'ARNm de RCC-PIPf est micro-injecté à des ovocytes qui sont placés ou non en présence de progestérone (PG) à concentration constante (B) ou variable (C) et l'observation de la GVBD est faite 16 h après. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'induction de GVBD (+/- SEM, n=3), et le test de Mann & Whitney est utilisé afin d'évaluer la significativité. Les étoiles représentent une significativité >5 %.

Ensuite nous avons testé l'effet de RCC-PIPf sur la GVBD lorsque celle-ci est induite par la progestérone. On observe en moyenne 90 % de GVBD contre environ 80 % de GVBD pour le témoin avec la progestérone (**Figure 35. B**). Cela semble indiquer que la protéine RCC-PIPf ne serait pas non plus un activateur de XePP1. Cependant, lors d'un test où les ovocytes incubés avec la progestérone n'ont présenté que 50 % de GVBD, nous avons observé que la micro-injection de l'ARNm de RCC-PIPf semblait augmenter ce pourcentage de GVBD pour

atteindre 100 %. Nous avons donc réalisé un test en utilisant différentes concentrations de progestérone (**Figure 35. C**). Seize heures après la micro-injection ou non de l'ARNm de RCC-PIPf, on observe une différence significative de l'induction de GVBD lorsque les ovocytes sont incubés en présence d'une concentration faible de progestérone. Ces résultats suggèrent que RCC-PIPf serait capable d'induire la GVBD lorsque celle-ci est préalablement amorcée par la progestérone. Afin de conforter ces résultats l'interaction entre RCC-PIPf et XePP1 reste à vérifier.

Nous avons donc démontré que le fragment RCC-PIPf est capable d'interagir avec PfPP1 via le motif RVxF qu'il contient, et que ce fragment protéique aurait un rôle sur la fonction de la phosphatase, même si cette observation reste à confirmer.

Afin de poursuivre la caractérisation fonctionnelle de RCC-PIP, nous nous sommes ensuite intéressés à une autre portion de la protéine. En effet, lors de l'analyse de la séquence protéique complète de RCC-PIP (**Annexe 4**), nous avons également mis en lumière des motifs RCC1, connus pour interagir notamment avec des protéines chez d'autres organismes. Dans le but de découvrir la fonction de RCC-PIP, nous nous sommes donc intéressés à l'interactome de ces motifs RCC1.

#### D. Identification de l'interactome des motifs RCC1

##### 1) Criblage de banque en double hybride de levure

Nous avons réalisé un criblage d'une banque d'ADNc de *P. falciparum* en double hybride de levure en utilisant les motifs RCC1 comme appât (AA 1 à 399, et correspond par la suite à la protéine RCC). Lors de ce criblage,  $1.05 \times 10^5$  clones ont été criblés et sept clones présentaient une interaction avec les motifs RCC1 de RCC-PIP sur milieu QDO. Parmi eux, il y avait deux clones en cadre ouvert de lecture : il s'agit de PfRhopH3 (PF3D7\_0905400) et de PfCDPK7 (PF3D7\_1123100).

Ces deux interactions ont été testées à nouveau en double hybride de levure, et il s'avère que seule PfCDPK7 est capable d'interagir avec PfPP1. Cette interaction ne semble pas très forte puisque les diploïdes sont capables de se développer sur un milieu TDO, mais pas sur un milieu QDO (**Figure 36. A**). Le fragment de PfCDPK7 obtenu lors de criblage correspond aux AA 994 à 1 291 sur une protéine qui compte 2 265 AA. La protéine correspondant à ce fragment sera nommée PfCDPK7f dans la suite de cette thèse.

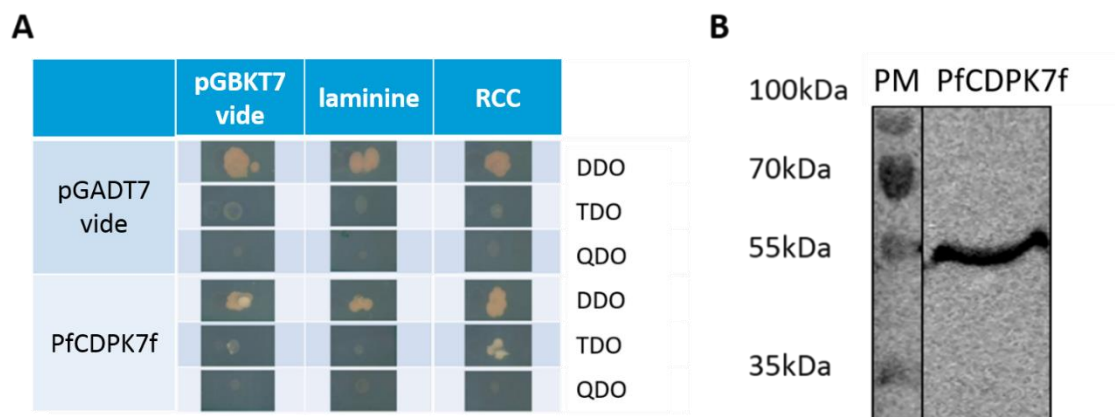


Figure 36: Interaction entre PfCDPK7 et les motifs RCC1 (RCC) de RCC-PIP. (A) Les croisements ont été réalisés en double hybride de levure sur différents milieux de stringence. (B) La protéine CDPK7f a été extraite de la levure et révélée par un anti-GAL4AD.

L'expression des protéines RCC et PfCDPK7f par les levures ont été vérifiées après extraction et western-blot, et ont été révélées respectivement par un anticorps anti-myc et un anticorps anti-GAL4AD (Figure 36. B). Une bande est observée à une taille de 55 kDa, correspondant à la taille attendue de la protéine PfCDPK7-GAL4AD. Malgré les nombreuses techniques d'extraction utilisées et tentatives pour démontrer l'expression chez la levure des motifs RCC1 de RCC-PIP, correspondant à la protéine RCC, aucune n'a abouti.

## 2) Analyse de la séquence protéique de CDPK7

La protéine CDPK7 est une kinase Calcium dépendante appartenant à la famille des CamK. Le gène de cette protéine se situe sur le chromosome 11 et comporte un intron. La séquence codante, quant à elle, est constituée de 6 798 pb et code pour une protéine de 2 265 AA dont le poids moléculaire est d'environ 265 kDa. Elle possède dans sa région Nt deux domaines EF-hand (AA 66 à 131) et dans sa région Ct un domaine pleckstrine (AA 1 714 à 1 815) et un domaine kinase (AA 1 821 à 2 077) (KUMAR ET AL. 2014). Selon les informations disponibles sur PlasmoDB, elle interagirait entre autre avec une protéine ubiquitine ligase E3 RNF5 putative (PF3D7\_0627300), une nucléoporine putative NUP100/NSP100 (PF3D7\_0905100) ou encore la sous-unité 4 du complexe de transcription NOT4 (PF3D7\_1235300).



Figure 37 : Schéma des différents domaines de PfCDPK7. En turquoise sont représentés les domaines EF-hand, en vert clair le domaine pleckstrine et en vert foncé le domaine kinase. En gris est représentée PfCDPK7f, qui est le fragment de PfCDPK7 retrouvé lors du criblage de la banque d'ADNc de P. falciparum avec les domaines RCC1 de RCC-PIP.

## 3) Confirmation de l'interaction entre les motifs RCC1 de RCC-PIP et PfCDPK7f par GST pull-down

Puisque l'interaction entre les motifs RCC1 de RCC-PIP (protéine appelée RCC par la suite) et PfCDPK7 est confirmée en double hybride de levure, il était nécessaire de la vérifier



par une autre approche. Pour cela nous avons choisi de réaliser un GST pull-down en utilisant les protéines recombinantes RCC-6His et PfCDPK7-GST. Ces protéines sont produites sous forme recombinante, et la qualité de leur production est vérifiée par un western-blot révélé par des anticorps anti-Histidine et anti-GST pour détecter RCC-6His et PfCDPK7f-GST respectivement (**Figure 38**). Ces deux protéines sont détectées à la taille attendue de 70 kDa.

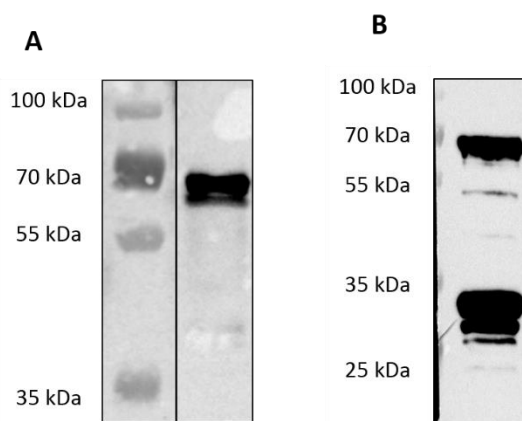


Figure 38: Expression des protéines RCC-6His et CDPK7f-GST. La protéine recombinante RCC-6His (A) est révélée par un anticorps anti-6His, tandis que la protéine PfCDPK7-GST fixée aux billes de Glutathion agarose (B) est révélée par un anticorps anti-GST.

La protéine CDPK7-GST est liée à des billes de Glutathion agarose, puis la protéine recombinante RCC-6His est incubée avec ces billes. Afin de vérifier que RCC-6His n'est pas capable d'interagir avec la GST seule ou les billes de Glutathion agarose seules, ces billes sont utilisées en témoin négatif. L'analyse de l'interaction est réalisée par western blot révélé par un anticorps anti-GST et un anticorps anti-6His (**Figure 39**).

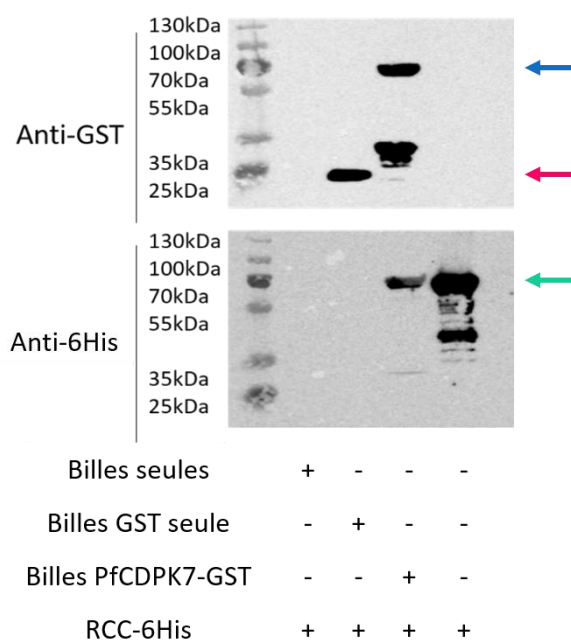


Figure 39 : Interaction entre RCC et PfCDPK7 par GST pull-down. La piste 1 confirme que RCC n'est pas capable de se lier aux billes de Glutathion agarose seules, la piste 2 montre que RCC ne se lie pas non plus à la GST seule. La piste 3 présente l'interaction entre RCC et CDPK7 et la piste 4 correspond à la protéine RCC-6His seule. La membrane du haut est révélée par



un anticorps anti-GST, alors que celle du bas est révélée par un anticorps anti-6Histidines. La flèche bleue désigne la protéine PfCDPK7-GST, la flèche rose la GST seule et la flèche verte la protéine RCC-6His.

L'observation d'une bande à la taille attendue de RCC-6His après incubation de cette protéine avec CDPK7f-GST montre que RCC est capable de se lier au fragment CDPK7f de la kinase CDPK7. Ce résultat confirme donc l'interaction qui avait été observée en double hybride de levure.

Ainsi RCC-PIP serait capable d'interagir d'un côté avec la kinase PfCDPK7 et de l'autre avec la phosphatase PfPPP1.

### E. Etude de RCC-PIP chez le parasite

Afin d'étudier le rôle de RCC-PIP chez *Plasmodium* nous avons réalisé plusieurs expériences de génétique inverse utilisant *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium berghei*, et étudié la localisation de la protéine chez ces deux espèces.

Tout d'abord, nous nous sommes attachés à vérifier l'accessibilité du locus de PfRCC-PIP en générant des parasites Knock-In (KI).

#### 1) Knock-In chez *P. falciparum*

Le principe du Knock-In (KI) consiste à insérer un tag, par recombinaison homologue, à l'extrémité de la protéine d'intérêt. Dans le cas présent il s'agit d'un tag HA qui est ajouté en 3' du gène *PfRCC-PIP* (**Figure 40. A**). Après transfection, les parasites sont maintenus sous pression de sélection, et des génotypes sont réalisés régulièrement dans le but de détecter une intégration de la construction dans le génome des parasites transfectés (**Figure 40. B**). Des PCRs permettant de détecter le gène endogène (p51-p52), le plasmide (p57-p58) et l'intégration (p60-p58) sont réalisées régulièrement sur l'ADN génomique de parasites sauvages et de parasites transfectés. L'intégration du plasmide a été observée par génotypage au bout de 51 semaines de culture sous pression de sélection (**Figure 40. B**).

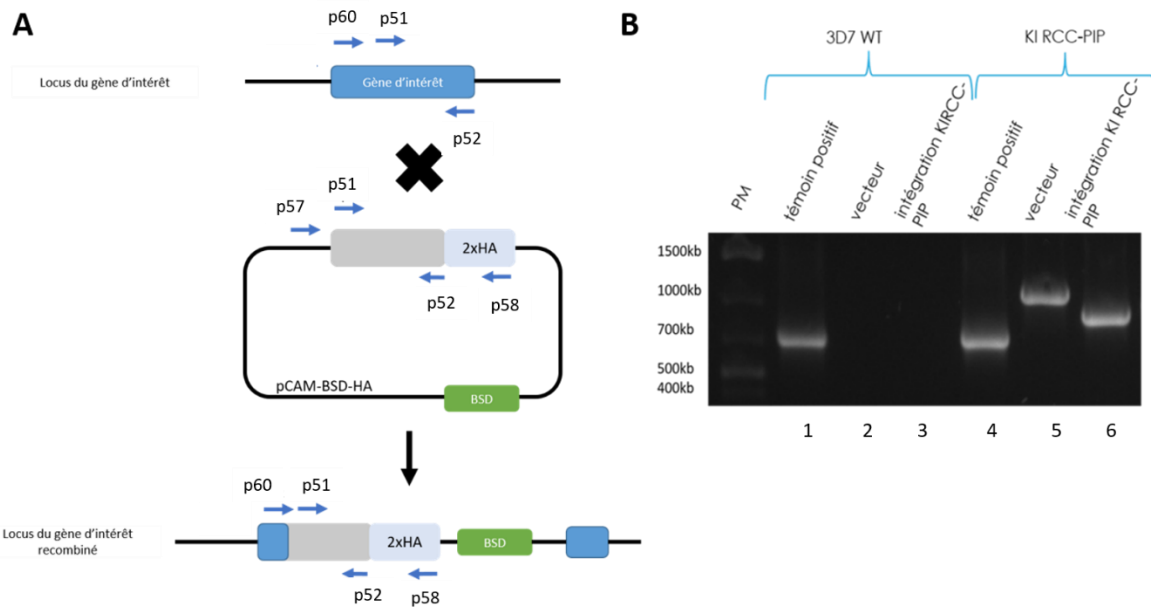


Figure 40 : Knock-In de RCC-PIP chez *P. falciparum*. A) Schématisation de la construction du KI RCC-PIP. B) Génotypes réalisées sur l'ADNg de parasites sauvages, qui sert de témoin, et de parasites transfectés avec la construction du Knock-In. Les pistes 1 et 4 sont les témoins positifs, les pistes 2 et 5 sont les PCR qui permettent de démontrer la présence du vecteur, et pour finir les pistes 3 et 6 démontre l'intégration du plasmide.

Afin de vérifier l'expression de la protéine RCC-PIP fusionnée au tag –HA, nous avons réalisé un western-blot avec des extraits protéiques préparés à partir des parasites Knock-In. Cependant, jusqu'à présent, les différentes tentatives se sont soldées par des échecs. Cela peut être dû au poids moléculaire très élevé de la protéine (396 kDa) qui pourrait être un frein au transfert de la protéine sur la membrane de nitrocellulose.

Puisque le locus de PfrCC-PIP semble accessible, un Knock-Out pour ce gène a été réalisé.

## 2) Knock-Out chez *P. falciparum*

Pour cela, un gène de résistance à un antibiotique, la blasticidine, est inséré au milieu du gène d'intérêt, ce qui empêche l'expression du gène et donc de la production de la protéine (Figure 41. A). Cette cassette de résistance permet également de sélectionner les parasites possédant le plasmide et/ou ayant intégré la construction. Tout comme pour le KI, des génotypes sont réalisés régulièrement par la réalisation de PCRs. Différents couples d'amorces sont utilisés afin de détecter le gène endogène (p53-p54), le vecteur recombinant utilisé lors de la transfection (p57-p59) et l'intégration du Knock-Out (KO) (p61-p59) (Figure 41. B). Au bout de 41 semaines de culture sous pression de sélection, les parasites transfectés ne présentent pas d'intégration de la construction malgré la présence du vecteur.

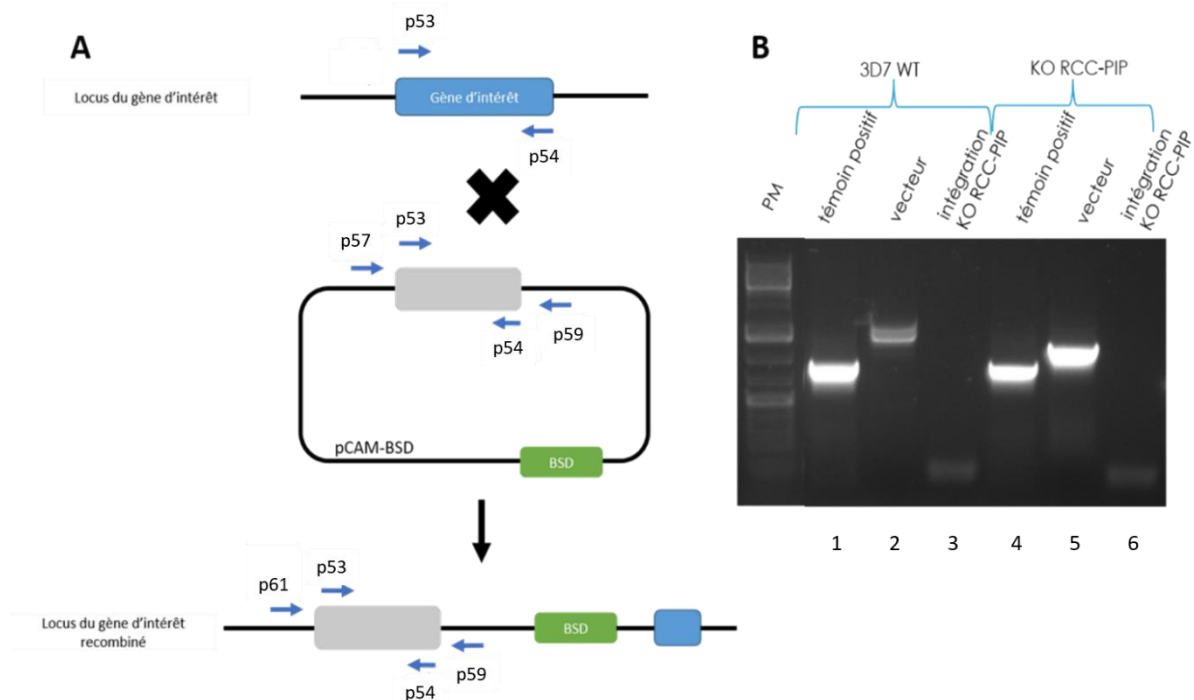


Figure 41 : Knock-Out de RCC-PIP chez *P. falciparum*. A) Schématisation de la construction du KO RCC-PIP. B) Génotypes réalisés par PCR sur l'ADNg de parasites sauvages, qui sert de témoin négatif, et de parasites transfectés avec la construction du knock-out. Les pistes 1 et 4 sont les témoins positifs, les pistes 2 et 5 sont les PCR qui permettent de démontrer la présence du vecteur, et pour finir les pistes 3 et 6 correspondent à l'intégration du plasmide du KO.

Il est nécessaire d'attendre encore 10 semaines de culture supplémentaires sous pression de sélection puisque l'intégration du KI a été observée au bout de 51 semaines. Nous pourrions conclure à une essentialité du gène uniquement si l'intégration du KO n'est pas observée au bout de ce laps de temps.

Pour compléter l'étude de l'importance de RCC-PIP chez *Plasmodium*, nous avons réalisé un Knock-Out conditionnel (KOc) chez *P. berghei*, espèce spécifique des rongeurs.

### 3) Knock-Out conditionnel chez *P. berghei*

L'utilisation du modèle *P. berghei* présente de nombreux avantages. Tout d'abord c'est un modèle dont le cycle est plus facile à maintenir car il se fait chez la souris ou le rat notamment. De plus, il existe des outils qui n'existent pas chez *P. falciparum* comme le KOc, et l'efficacité de transfection y est beaucoup plus élevée. Avant d'utiliser ce modèle, il était nécessaire de vérifier que la protéine RCC-PIP existe chez *P. berghei*.

#### a) Existence de RCC-PIP chez *P. berghei*

L'analyse du génome de *P. berghei* a révélé l'existence d'un homologue à PfRCC-PIP (PBANKA\_0820800). Cette homologie n'est pas très élevée puisqu'elle est de 36 % (Annexe 6). Cependant les motifs RCC1 ainsi que le motif RVxF qui est dans le fragment de protéine obtenu lors du criblage sont conservés chez *P. berghei*. Cela suggère que la protéine PbRCC-PIP pourrait interagir avec PfPPP1 via ce motif RVxF.

Nous avons vérifié cette hypothèse en clonant le fragment de *P. berghei*, homologue à celui obtenu lors du criblage de banque chez *P. falciparum* (PbRCC-PIPf), afin de réaliser des croisements avec PfPP1 en double hybride de levure. Nous avons pu ainsi démontrer que PbRCC-PIPf est capable d'interagir avec PfPP1 fortement, tout comme son homologue chez *P. falciparum* (résultat non présenté).

#### b) Knock-out conditionnel

Le principe du Knock-Out conditionnel repose sur un système « Tet on/Tet off », permettant la répression de l'expression d'un gène en présence de tétracycline. Afin de réaliser cette approche, nous avons utilisé un plasmide qui nous a été donné par le Dr Soldati (Université de Genève, Suisse). Ce plasmide pTnewPRFp-TRAD4Ty-TetO7-HAPRF-hDHFR contient un trans-activateur TRAD4, le gène hDHFR conférant la résistance à la pyriméthamine, deux épitopes du tag –HA, ainsi que le promoteur sensible à la tétracycline TetO7 (**Figure 42. A**) (PINO ET AL. 2012). Nous avons cloné dans ce vecteur le promoteur de RCC-PIP (1 063 pb en amont du codon start) suivi du trans-activateur TRAD4 et la région Nt du gène de *PbRCC-PIP* (808 pb après le codon start) en aval du promoteur TetO7 et des épitopes –HA. Cette construction est ensuite linéarisée et transfectée à des schizontes de *P. berghei* ANKA. Puis ces schizontes sont injectés par voie intraveineuse à des souris et les parasites transfectés sont sélectionnés par ajout de pyriméthamine dans l'eau de biberon des souris. La construction s'intègre dans le génome de *P. berghei* par une double recombinaison homologue (**Figure 42. A**). Dans le cas de RCC-PIP, nous avons obtenu des parasites résistants quatre jours après la transfection.

L'intégration a été vérifiée par la réalisation de génotypage sur l'ADNg des parasites transfectés et sauvages (témoin négatif) (**Figure 42. B**). En témoins positifs sont utilisés les amorces pour amplifier les fragments du gène de *RCC-PIP* (p62-p63) et du promoteur (p64-p65). Et l'intégration du gène et du promoteur est vérifiée par l'utilisation des amorces (p66-p67) et (p68-p69) respectivement. Ainsi nous avons observé que le promoteur ainsi que le gène de *RCC-PIP* se sont bien intégrés au locus génomique. Nous avons également montré par western-blot que la protéine RCC-PIP tagguée HA est effectivement produite à la taille attendue de 292 kDa (**Figure 42. C**).

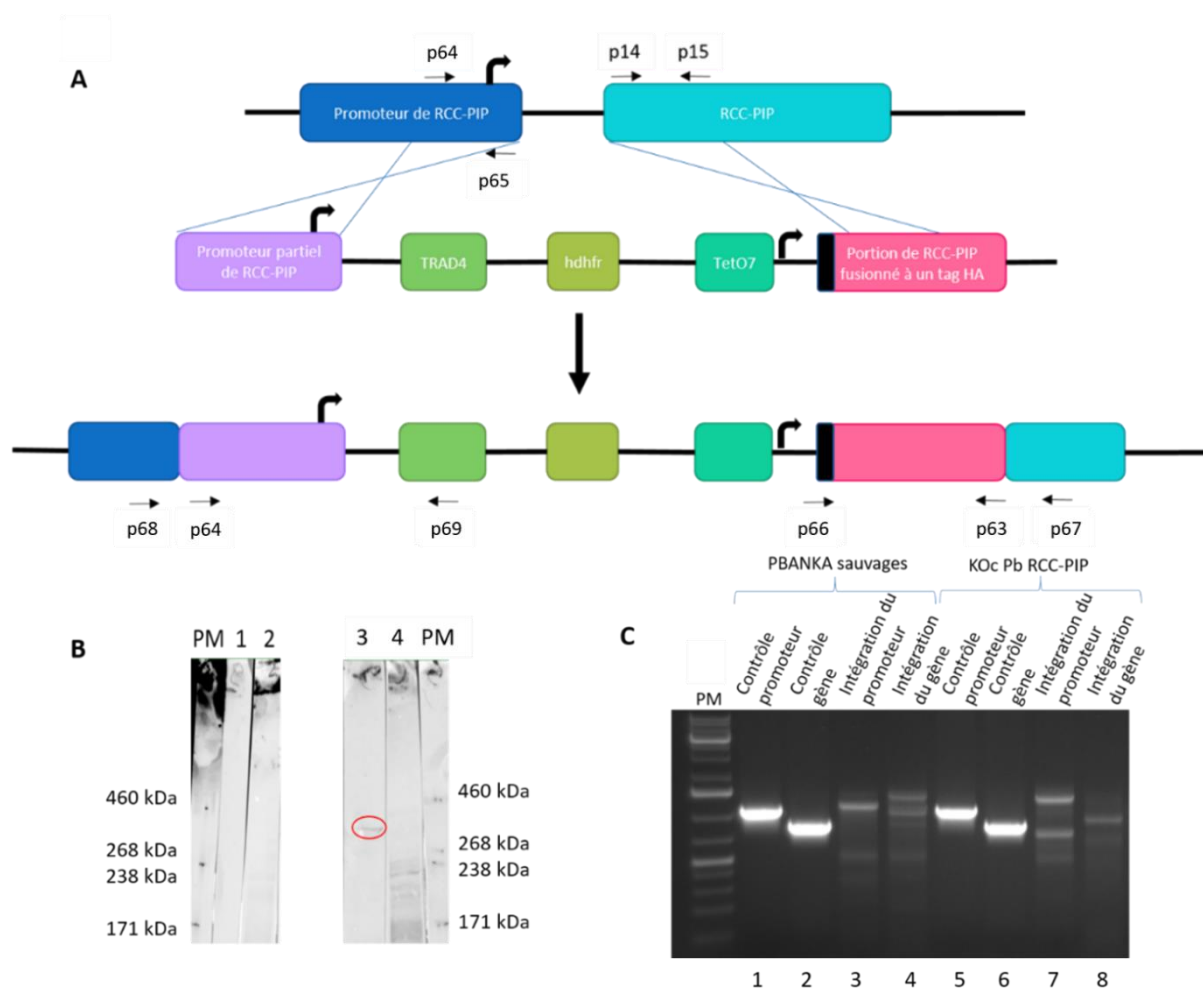


Figure 42 : Réalisation du Knock-Out conditionnel de RCC-PIP chez *P. berghei*. A) Schématisation de la construction, de son intégration dans le génome de *P. berghei*, ainsi que les amorces utilisées lors du génotypage. B) Vérification de la production de la protéine tagguée HA. Les pistes 1 et 2 correspondent aux protéines de parasites sauvages, tandis que les pistes 3 et 4 sont les protéines des parasites transfectés. Les pistes 1 et 3 sont révélées avec l'anticorps anti-HA biotinylé, tandis que les pistes 2 et 4 sont révélées avec l'anticorps secondaire uniquement (la streptavidine). C) Vérification de l'intégration de la construction par génotypage. Les PCR sont réalisées sur l'ADNg de parasites sauvages et transfectés. Les pistes 1 et 5 correspondent au contrôle positif du promoteur, les pistes 2 et 6 au contrôle positif du gène, les pistes 3 et 7 à l'intégration du promoteur et les pistes 4 et 8 à l'intégration du gène.

Les parasites ayant intégré la construction ont ensuite été clonés par dilution limite chez la souris. Trois clones ont été obtenus, amplifiés et vérifiés par génotypage. Nous avons ensuite réalisé deux types d'expériences visant à éteindre le gène d'intérêt. Dans une première, des souris infectées avec un des clones KOc-RCC-PIP ont été traitées par de l'ATc (AnhydroTétracycline diluée dans l'eau de biberon) pendant deux jours. En parallèle, un groupe de souris infectées par le même clone n'a pas reçu ce traitement. Les parasites obtenus ont été analysés par western blot afin de détecter une éventuelle diminution de l'expression de PbRCC-PIP-HA. Malheureusement nous n'avons pas été en mesure de détecter la protéine PbRCC-PIP-HA dans l'extrait protéique des parasites KOc-RCC-PIP non traité, ce qui ne nous a pas permis de conclure quant à l'extinction du gène par traitement à l'ATc.

Dans une seconde expérience, nous avons réalisé un suivi de la parasitémie chez des souris infectées par PbKOc-RCC-PIP et par *P. berghei* WT en parallèle. Dans chaque cas un

groupe de souris est traité deux jours avant l'infection et durant tout le suivi de l'expérience (10 jours) avec de l'ATc, et le groupe témoin n'est pas traité. Cependant, aucune différence de parasitémie n'a été observée entre les différents groupes (résultat non présenté).

## F. Etude de la localisation de RCC-PIP chez *Plasmodium*

Nos études génétiques chez le parasite ne nous ayant pas permis jusqu'à présent de conclure quant à l'essentialité ou au rôle de RCC-PIP, nous avons étudié sa localisation qui pourrait être indicateur de la fonction de cette protéine parasitaire.

### 1) Localisation de RCC-PIP chez *P. falciparum*

En première intention, nous avons utilisé le plasmide pARL-2 (Dr. Sanchez, Heidelberg, Allemagne) qui doit permettre l'expression épisomale de la protéine étudiée, fusionnée à la GFP. Cependant, du fait de la grande taille de la protéine, seulement le fragment 5' de 3 kb a pu être inséré (**Figure 25. A**). Des anneaux de *P. falciparum* ont été transfectés avec cette construction et ont été placés sous pression de sélection. Dans le cas présent, il s'agit de l'antibiotique WR99210 qui permet de sélectionner les parasites transfectés puisque la construction porte une résistance à cet antibiotique. Malgré quatre tentatives, aucune des transfections réalisées n'a permis d'obtenir des parasites viables et exprimant la protéine fusionnée à la GFP.

Par conséquent nous avons réalisé des tests en immunohistochimie sur les parasites sauvages et en immunofluorescence sur les parasites Knock-In.

#### a) Localisation de RCC-PIP par immunohistochimie

Une culture de parasites sauvages de *P. falciparum* est fixée en formol, puis elle est incluse dans un bloc de paraffine dans lequel seront réalisées des coupes fines. Un marquage est effectué avec l'anticorps polyclonal dirigé contre RCC-PIP<sub>fc</sub>, et un kit de détection à la phosphatase alcaline (**Figure 43**). Cette approche a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Gosset (Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l'Université Catholique de Lille).

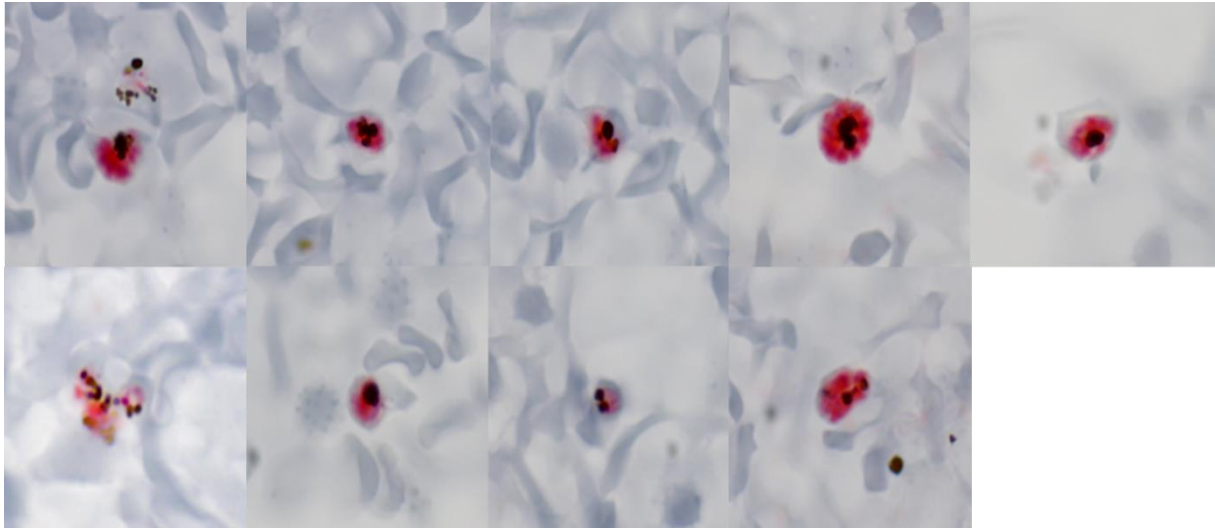


Figure 43: Localisation de RCC-PIP par immunohistochimie chez *P. falciparum*. La protéine RCC-PIP est détectée par l'antisérum dirigé contre la protéine recombinante RCC-PIPfc.

L'observation des marquages ainsi obtenus indique que la protéine RCC-PIP serait cytoplasmique. Cependant nous n'avons pas réussi à détecter la protéine par western-blot en utilisant l'antisérum RCC-PIPfc. Il est donc difficile d'affirmer que le marquage observé correspond à PfRCC-PIP.

Pour contourner ce souci, nous avons choisi de localiser la protéine par immunofluorescence grâce à la construction du Knock-In RCC-PIP-HA chez *P. falciparum*.

#### b) Localisation par immunofluorescence

La localisation a été étudiée chez des parasites *P. falciparum* KI-HA, par immunofluorescence grâce à un anticorps primaire anti-HA et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor 488 (fluorescence verte) (Figure 44).

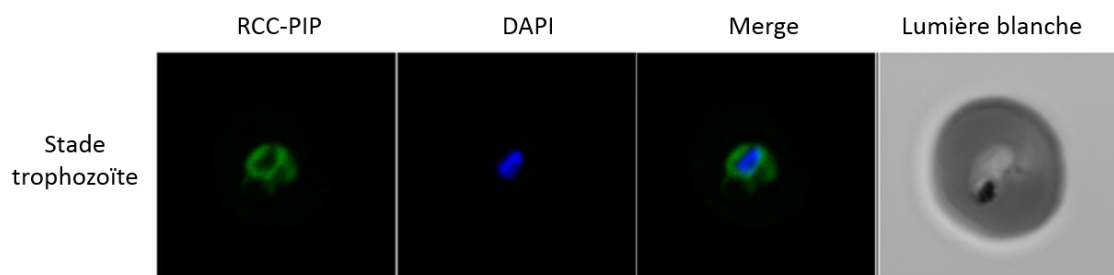


Figure 44: Localisation de RCC-PIP chez *P. falciparum*. La protéine RCC-PIP est représentée par le marquage vert, tandis que le noyau est coloré en bleu par le DAPI.

D'après les marquages, il semblerait que RCC-PIP soit péri-nucléaire au stade trophozoïte (Figure 44), ainsi qu'au stade schizonte (résultat non présenté).

Cependant, pour valider les résultats il faudrait vérifier que la protéine tagguée HA est bien produite. Pour cela, nous avons tenté de réaliser un western-blot mais du fait de la grande taille de la protéine, nous rencontrons des difficultés à observer sa présence dans les

extraits parasitaires. Malgré cela, la réalisation d'un génotypage a permis de démontrer l'intégration de la construction (**Figure 40**) ce qui indique que la protéine RCC-PIP tagguée - HA pourrait être produite par le parasite.

## 2) Localisation de RCC-PIP chez *P. berghei*

Afin de compléter l'étude de la localisation de RCC-PIP chez *Plasmodium*, nous avons utilisé les parasites *P. berghei* KOc de RCC-PIP chez, puisque la construction utilisée permet de fusionner un tag -HA en Nt de la protéine.

Dans ce cas de figure, la production de la protéine tagguée HA a été préalablement vérifiée par western blot (**Figure 42**). Après la réalisation du marquage par immunofluorescence, on observe que la localisation de PbRCC-PIP est cytoplasmique, tout comme celle de son homologue chez *P. falciparum* (**Figure 45**).

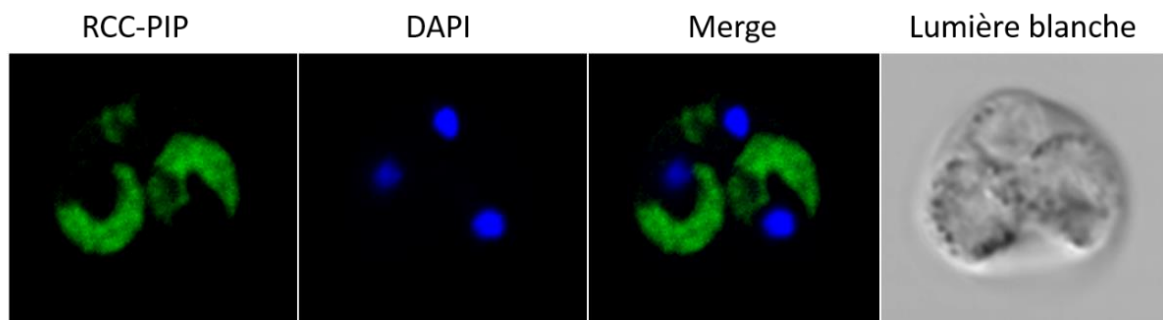


Figure 45: Localisation de RCC-PIP chez *P. berghei* par immunofluorescence. La protéine RCC-PIP est représentée par le marquage vert, tandis que le noyau est coloré par le DAPI.

Les études de localisation réalisées par immunohistochimie et immunofluorescence chez *P. falciparum* et par immunofluorescence chez *P. berghei*, donnent donc des résultats similaires. RCC-PIP serait donc absente du noyau chez *Plasmodium* et localisée dans le cytoplasme des parasites dans une zone péri-nucléaire.









# Matériel et Méthodes



## I. Matériel

### A. Plasmides

Lors de ce travail de thèse, différents plasmides ont été utilisés. Les vecteurs pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO®, pETDuet-1, pQE30, pGEX4T3, pGADT7 et pGBKT7 sont commercialisés respectivement par Invitrogen, Novagen, QIAGEN, Life Sciences et Clontech pour les deux derniers. Les plasmides utilisés pour les transfections chez *P. falciparum* : pCAM-BSD et pCAM-BSD-HA, nous ont été transmis par le Dr. C. Doerig (Université de Monash, Melbourne, Australie), tandis que le plasmide pARL nous a été transmis par le Dr. C. Sanchez (Heidelberg, Allemagne) et le plasmide pTnewPRFp-TRAD4Ty-TetO7-HAPRF-hDHFR nous a été fourni par le Dr. D. Soldati (Université de Genève, Suisse).

### B. Amorces et constructions

Dans le tableau suivant, sont indiquées les amorces utilisées pour les différentes constructions réalisées durant la thèse. Les amorces sont dessinées en fonction des données génomiques issues de PlasmoDB.

Les amorces employées pour les clonages par recombinaison homologue (F dans le **Tableau 8**), ont été dessinées en utilisant le site <http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcrPrimersInit.do>.

Au laboratoire, certaines constructions étaient déjà disponibles, c'est le cas de PfPP1-pGBKT7, PfPP1-pETDuet-1 et PfPP1-GST. La banque d'ADNc de *P. falciparum* clonée en pGADT7 utilisée pour réaliser le criblage en double hybride de levure provient de la société Dualsystems Biotech.

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées durant ces travaux. L : Ligation avec le kit TOPO® TA Cloning® (Invitrogen), M : PCR par mutagenèse dirigée (ISIS DNA polymerase (MP biomedical), F : Ligation par recombinaison homologue en utilisant le kit In-Fusion® HD Cloning (Clontech).

Clones obtenus suite au criblage, remis en cadre ouvert de lecture :

Construit	Nom	Séquence	Site de restriction	Nom de la protéine ou utilisation	Clonage	Sens
Ran-pGADT7	p1	GGATCCTGGATTCACAAGAATATATCC AC	BamHI	remise en cadre de lecture	F	F
	p2	CTCGAGTTAATTTCAATATCTTCTTCATC AATAGC	XhoI			R
H2A-pGADT7	p3	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGTCAGC AAAAGGAAAAACTGGTAG	EcoRI	remise en cadre de lecture	F	F
	p4	GATTCATCTGCAGCTCGAGTTAATAATCT TGATTGGCAGTACCAGC	XhoI			R

Constructions réalisées pour la caractérisation de CLP :

Construit	Nom	Séquence	Site de restriction	Nom de la protéine ou utilisation	Clonage	Sens
Interaction :						
PfPP1+ CLPf- pETDuet- 1	p5	GATATACATATGGCAGATCTAGATGATG AAAAGAAGAAACAGGTAAC	BglII	Interaction en bactérie, clonage 2ème MCS PfPP1-pETDuet-1	F	F
	p6	GTTTCTTTACCAGACTCGAGTTCTTGCTC AACCTCCTTAATAATTTAC	XhoI			R
CLPf- pGEX4T3	p7	GGTCCGCGTGGATCCGATGATGAAAA GAAGAAACAGGTAA	BamHI	CLPf-GST	F	F
	p8	GGCCGCTCGAGTCGACTTCCCTCCACA GCATCATC	Sall			R
CLPf- pETDuet- 1 (1er MCS)	p9	CATCACCACAGCCAGGATCCAGATCTAG ATGATGAAAAGAAGAAACAGG	BamHI	CLPf-6His	F	F
	p10	CATTATGCGGCCGCAAGCTTCTCGAGTT CTTGCTCAACCTCCTTAATAA	HindIII			R

Construit	Nom	Séquence	Site de restriction	Nom de la protéine ou utilisation	Clonage	Sens
-----------	-----	----------	---------------------	-----------------------------------	---------	------

Confirmation de la séquence codante de RCC-PIP :						
Couple 1- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p11	ATGGTATCTATAGAAAAGAAAGG		PCR par chevauche ment sur RT-PCR effectuée à partie d'ARN d'une culture asynchron e de parasite 3D7	L	F
	p12	CGTCTGATGTTATACATATGC				R
Couple 2- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p13	GATGTATATTCTGGGGG			L	F
	p14	CTACAGATGCATCTTCAACA				R
Couple 3- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p15	GTAATGATTACCATACATC			L	F
	p16	CCAAACTGGGTGTTACACC				R
Couple 4- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p17	GATACTAGTGATAACACTTTAG			L	F
	p18	CAAACCCAATTCGTCCATGTGC				R
Couple 5- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p19	CTTCGTAATTATCGTACAAATG			L	F
	p20	CCAAGTCTAACGGTTTAC				R
Couple 6- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p21	GTAATATGTTGAAGAAAG			L	F
	p22	CTACATAATGTGCAGGTG				R
Couple 7- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p23	GAGAAACGCATCAGCAAC			L	F
	p24	GGTAGGATTCTTCATCTAATTC				R
Couple 8- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p25	GTAAATGATGATAGTAGTAG			L	F
	p26	CGTTCATCTTTATATCTTAATTGG				R
Couple 9- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p27	CCTAATGAATCGGATACGG			L	F
	p28	CATGTTTACCATGTTGATCATG				R
Couple 10- pCR <sup>TM</sup> 2.1 -TOPO <sup>®</sup>	p29	CGTGAGGATCAACATGGTAAAC			L	F
	p30	CATAATAATCTTCTGTACC				R
RCC-PIP- 3 kb- pGADT7	p31	GGAGGCCAGTGAATTCATGGTATCTATA GAAAAGAAAGGAAGC	EcoRI	RCC-PIP- 3kb-HA	F	F
	p32	TCATCTGCAGCTCGAGAGTTCTTCTTTA GAGTGTTATTTTTATTC	XhoI			R

Protéines recombinantes RCC-PIP utilisées en test d'interaction :						
Mutation RVxF	p33	GTATAAAAAAAGTGC <u>CGTCCG</u> CTTTTAA G		RCC-PIPf- 980KSASA <sup>984</sup>	M	F



	p34	CTTAAAA <u>G</u> CGGAC <u>G</u> CACTTTTTTTTATAC		et RCC-PIPfc- <sup>980</sup> KSASA <sup>984</sup>		R
Insertion Stop	p35	CTATGTCCGAAATG <u>T</u> AGCAAGACG		RCC-PIPfc-stop et RCC-PIPfc- <sup>980</sup> KSASA <sup>984</sup> + stop	M	F
	p36	CGTCTTG <u>C</u> TACATTTTCGGACATAG				R
PfPP1+RCC-PIPfc-pETDuet-1	p37	GATATACATATGGCAGATCTAGATGAAT ATTATGAGGAAAACGAACAAG	BglII	Interaction en bactérie, clonage 2ème MCS PfPP1-pETDuet-1	F	F
	p38	GTTTCTTTACCAGACTCGAGAGTTCTTCC TTTAAAGTGTATTTTTATTTC	XhoI			R
RCC-PIPfc-pQE30	p39	ACCATCACCATCACGGATCCACAAATAA CGAATATGAAGATGAAGAAAAG	BamHI	RCC-PIPfc-6His	F	F
	p40	AAGCTCAGCTAATTAAGCTTAGTTCTTCC TTTAAAGTGTATTTTTATTTC	HindIII			R
RCC-PIPfc-pGEX4T3	p41	GGTTCCGCGTGGATCCCAATAACGAAT ATGAAGATGAAGAAAAG	BamHI	RCC-PIPfc-GST	F	F
	p42	GGCCGCTCGAGTCGACAGTTCTTCCTTA AAGTGTTATTTTTATTTC	Sall			R

## Confirmation de l'interaction entre RCC et PfCDPK7f

Construit	Nom	Séquence	Site de restriction	Nom de la protéine ou utilisation	Clonage	Sens
RCC :						
RCC-pGBKT7	p43	CATGGAGGCCGAATTCATGGTATCTATA GAAAAGAAAGGAAGC	EcoRI	criblage en double hybride, RCC-myc	F	F
	p44	GCCGCTGCAGGTCGACGGTTTATTCCCA TAATTATCACCCC	Sall			R
RCC-pQE30	p45	ACCATCACCATCACGGATCCATGGTATCT ATAGAAAAGAAAGGAAGC	BamHI	RCC-6His	F	F
	p46	AAGCTTGGCTGCAGGTCGACCCCTTTAC CTCATCAGACACC	Sall			R

CDPK7f :						
CDPK7f-pQE30	p47	ACCATCACCATCACGGATCCGGGAACCA AAATGAAAACC	BamHI	CDPK7f-6His	F	F
	p48	AAGCTCAGCTAATTAAGCTTCCAATTCTT CCAAGG	HindIII			R
CDPK7f-pGEX4T3	p49	GGTTCCGCGTGGATCCGGGAACCAAAAT GAAAACC	BamHI	CDPK7f-GST	F	F
	p50	GGCCGCTCGAGTCGACCCAATTCTTCCA AGG	Sall			R

Etude chez *Plasmodium*

Construit	Nom	Séquence	Site de restriction	Nom de la protéine ou utilisation	Clonage	Sens
<b><i>P. falciparum</i> :</b>						
RCC-PIP-pCAM-BSD-HA	p51	CATATTTATTAAGTGCAGGATGATATCTGCCTAAGTGATCATATAG	PstI	KI-RCC-PIP	F	F
	p52	CATCATATGGATAGGATCCCATTAATAATCTTCTGTACCATAAATATTTTTATATT	BamHI			R
RCC-PIP-pCAM-BSD	p53	CATATTTATTAAGTGCAGATGGTATCTATAGAAAAGAAAGGAAGC	PstI	KO-RCC-PIP	F	F
	p54	GCTCTAGAAGTGGATCCGTGTAAATTTGTCTGAAGCATATGCAC	BamHI			R
RCC-PIP-3k-pARL	P55	TTACATATAACTCGAGATGGTATCTATAGAAAAGAAAGGAAGC	XhoI	RCC-PIP-3kb-GFP	F	F
	P56	TCTCCTTACTCATGGTACCAGTTCTTCTTTAGAGTGTTATTTTTATTC	KpnI			R
<b>Génotypage <i>P. falciparum</i>:</b>						
	p57	GTAATTTATGGGATAGCGATTTTTTTTAC TGTCTG		Détection de l'épisome		F
	p58	CCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAG				R
	p59	GCCATATCCAAGCTTTTAAGCATAATCTGG				R
	P60	GGACCCTTACCAAACCAATGAGCAG		Intégration du KI RCC-PIP		F
	P61	GATGTTTGTACCCATAATATATATATTTCCCTTTTGTGG		Intégration du KO RCC-PIP		F

<b><i>P. berghei</i> :</b>						
gène-RCC-PIP-pTnewPR Fp-TRAD4Ty-TetO7-HAPRF-hDHFR	p62	CGTGCCCGATTATGCCGGCATGTCTATTGATATTCGAGGTAG	NaeI	KOc de PbRCC-PIP	F	F
	p63	CAAAATTTTAACGCTAGCGTCTCTAAAGAACCATTAATATTATTTCCCC	NheI			R
promoteur-RCC-PIP-pTnewPR Fp-TRAD4Ty-TetO7-HAPRF-hDHFR	p64	CAAAAAAAGCGCAGATCTGCTTCCCAGTAACTTATCTATTTCC	BglII	KOc de PbRCC-PIP	F	F
	p65	CATTTTAAGCTTCCGCGGGACATTTTATTATTATTATGTCAC	SacII			R

Génotypage *P. berghei* :

	p66	CTGCAGCAAAATGTCAGGTTACCCCTATGAC GTGC		Intégrati on du gène de PbRCC- PIP		F
	p67	GGTTTATTTCCATATGTACCACCCC				R
	p68	GTTTGTATTCCAAGTCATACG		Intégrati on du Promote ur de PbRCC- PIP		F
	p69	GGCCATCACAAATATGAAACAG				R

### C. Anticorps

Les anticorps anti-HA et anti-myc, provenant des sociétés Roche et Sigma respectivement, sont utilisés pour détecter l'expression des protéines en levure. Les anticorps anti-6His, anti-GST, anti-S, anti-GFP et anti-HA couplé à la biotine sont commercialisés par Roche, Qiagen, Life technologies, Novagen, Roche et Abcam respectivement. La streptavidine couplée à la peroxydase est commercialisée par Invitrogen. L'anticorps anti-souris couplé à la peroxydase réalisé au laboratoire est disponible à l'utilisation.

## II. Méthodes

### A. Réalisation des constructions

#### 1) Les sources d'ADN

##### a) ADN génomique

L'ADN génomique (ADNg) est obtenu à partir de schizontes purifiés lysés dans un tampon contenant 50 mM Tris pH 7.5, 150 µg/ml protéinase K et 2 % SDS, durant 2 h à 55 °C, suivi de deux étapes d'extraction avec du phénol-chloroforme (ajout d'un volume). L'ADN génomique est ensuite précipité avec l'acétate de sodium (0.1 volume) et de l'éthanol 100 % (2 volumes). Après deux lavages, l'ADN génomique est repris dans de l'eau puis dosé au Nanovue. L'ADNg sera utilisé comme matrice pour obtenir les séquences codantes des protéines ne possédant pas d'intron.

##### b) ADN codant

Il est obtenu par la réalisation d'une rétro-transcription sur l'ARNm extrait d'une culture asynchrone de *P. falciparum* de la souche 3D7. L'ARNm est isolé par ajout de trizol Reagent® (Invitrogen) sur le culot de parasites.

L'ARN est d'abord traité à la DNase I, à raison de 1 µl pour 1 µg d'ARN, pendant 14 min à 25 °C. Ensuite, 1 µl d'EDTA à 25 mM est ajouté, et le mélange est incubé 10 min à 65 °C avant d'être placé sur glace. Puis, la rétro-transcription est réalisée grâce au kit Superscript® III First Strand Synthesis Mix (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur avec un mélange d'amorces d'oligoDT et d'héxamères. Puis la pureté de la RT-PCR est vérifiée par PCR sur un gène contenant un ou plusieurs introns.

## 2) Réalisation des constructions par recombinaison homologue

Les amorces utilisées pour amplifier les fragments à cloner par recombinaison homologue comportent 15 pb supplémentaires qui sont complémentaires aux vecteurs. Le fragment d'ADN d'intérêt est amplifié en utilisant le kit Taq polymérase Advantage® 2 (Clontech). Puis le clonage est effectué grâce au kit In-Fusion® HD Cloning (Clontech), selon les recommandations du fournisseur. Ce kit permet une recombinaison homologue entre les 15 pb complémentaires des extrémités de l'ADN amplifié et les extrémités du vecteur linéarisé. Ensuite, des bactéries compétentes Stellar® (Clontech) sont transformées avec le plasmide contenant le promoteur. Par séquençage, l'exactitude de la séquence a été vérifiée.

## 3) Clonage en kit TOPO TA-cloning

Ce type de clonage ne concerne que les fragments d'ADN obtenus lors des PCR par chevauchement. Pour cela, les PCR sont effectuées avec le kit Taq polymérase Advantage® 2, à l'aide des amorces p11 à p30. Puis les fragments d'ADN obtenus sont insérés dans le vecteur PCR™2.1-TOPO® en utilisant le kit TOPO® TA Cloning® selon le protocole recommandé (Invitrogen). Les bactéries compétentes *E. coli* TOP10 (Invitrogen) sont transformées avec le produit de ligation. Après amplification en bactéries, l'ADN plasmidique obtenu est vérifié par séquençage.

## 4) Mutagenèse dirigée par PCR

La mutation du motif RVxF de RCC-PIP a été réalisée par mutagenèse dirigée en utilisant le couple d'amorce p33-p34. Tandis que la délétion de RCC-PIPfc par l'insertion d'un codon stop en aval du motif RVxF est effectuée grâce aux amorces p35 et p36. Le clone de RCC-PIPfc contenant le codon stop prématuré et la mutation du motif RVxF est, quant à lui, réalisé en utilisant la construction RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KASA<sup>984</sup> en pQE30 comme matrice et les amorces p35-p36.

La mutagenèse dirigée par PCR est effectuée sur une matrice à l'aide d'amorces comportant les mutations souhaitées. Dans le cas présent, la matrice correspond à RCC-PIPf ou RCC-PIPfc dans le vecteur voulu (pQE30, pGADT7), et du. La mutagenèse dirigée est réalisée à l'aide du kit ISIS DNA polymerase (MP biomedical) selon le protocole du fournisseur. Pour finir, la matrice de départ, méthylée par la bactérie, est dégradée par 1 µl de DpnI (NEB) 1 h à 37 °C et l'échantillon est transformé en bactéries DH5α. Après vérification de la séquence, les constructions en pGADT7 sont transformées en levures Y2Hgold, tandis que les

constructions en pQE30 sont transformées en bactéries BL21 afin de produire les protéines recombinantes correspondantes.

## B. Double hybride de levure

### 1) Souches de levures, constructions et transformation

La banque d'ADNc de *P. falciparum* est disponible dans le vecteur pGADT7-HA (Dualsystems Biotech.) et est transformée dans la souche de levure Y2HGold (Clontech) selon les recommandations du fournisseur. Les colonies contenant la banque se développent sur des milieux déficients en leucine (SD-L) à 30 °C pendant trois à quatre jours. Les levures Y2HGold contiennent quatre gènes rapporteurs intégrés : AUR1-C, HIS3, ADE2 et MEL1 dont l'expression est sous le contrôle de trois promoteurs GAL4. Ces gènes sont utilisés pour détecter l'interaction en double hybride de levure, et pour réduire le taux de faux positifs.

L'appât, PfPP1 ou PfRCC (amplification de l'insert par le couple d'amorce p43-p44), est cloné dans le vecteur pGBKT7 (Clontech), permettant de fusionner la protéine à un tag GAL4DBD (DNA Binding Domain) qui un domaine de liaison à l'ADN. Ces vecteurs, PfPP1-pGBKT7 et PfRCC-pGBKT7, sont transformés dans la souche Y187 de levure (Clontech) selon les instructions du fournisseur, et les levures sont étalées sur un milieu déficient en tryptophane (SD-W).

Dans cette étude, la souche Y2HGold (mat a) est transformée avec des constructions effectuées en pGADT7-HA (RCC-PIPf, RCC-PIPf-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>, CLPf, PfCDPK7f), et les colonies se développent sur un milieu SD-L. Tandis que la souche Y187 (mat  $\alpha$ ) est transformée avec les constructions réalisées en pGBKT7 (PfPP1 et RCC) et les colonies se développent sur milieu SD-W.

### 2) Criblage de la banque d'ADNc de *P. falciparum*, et séquençage des clones obtenus

Pour réaliser un criblage de la banque d'ADNc de *P. falciparum*, les levures contenant l'appât (ici il s'agit de PfPP1 ou RCC) sont croisées avec 1 ml de la banque selon le protocole fourni par Clontech. Les diploïdes obtenus, se développant sur les milieux TDO (SD-LWH) et QDO (SD-LWHA), pourront ensuite être repiqués dans 5 ml de milieu SD-L liquide.

L'ADN des clones positifs est ensuite obtenu grâce au kit de purification d'ADN plasmidique (Macherey-Nagel) et à l'ajout de 100  $\mu$ l de billes de verre (Sigma) dans le tampon de lyse. Le plasmide est ensuite transformé en bactéries compétentes (*E. coli* DH5 $\alpha$  de Life Technologies) afin d'amplifier le vecteur. Les bactéries sont étalées sur milieu LBA (Luria Broth Ampiciline), puis elles sont mises en culture en milieu liquide avant d'extraire l'ADN plasmidique qui sera finalement séquencé et analysé grâce à la base de données PlasmoDB.

L'interaction observée lors du criblage de banque peut être confirmée en recroisant l'appât et sa cible en double hybride de levure.

### 3) Interaction en double hybride de levure

Pour cela, des souches de levure de polarités sexuelles différentes sont croisées. L'utilisation des différents vecteurs permettra de mettre en évidence l'interaction entre les deux protéines contenues dans ces vecteurs. Le vecteur pGADT7 permet la production d'une protéine fusionnée au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4-AD, et le vecteur pGBKT7, une protéine fusionnée au domaine de fixation de l'ADN de GAL4 (DNA-BD) (Figure 46). Si ces domaines AD et BD sont suffisamment proches, le gène rapporteur de l'histidine est exprimé, ainsi l'interaction est observable sur un milieu déplété en histidine. En cas d'interaction plus forte, le gène situé en aval de l'histidine, l'adénine, est également exprimé. Cette interaction forte est observable sur un milieu déplété en histidine et en adénine.

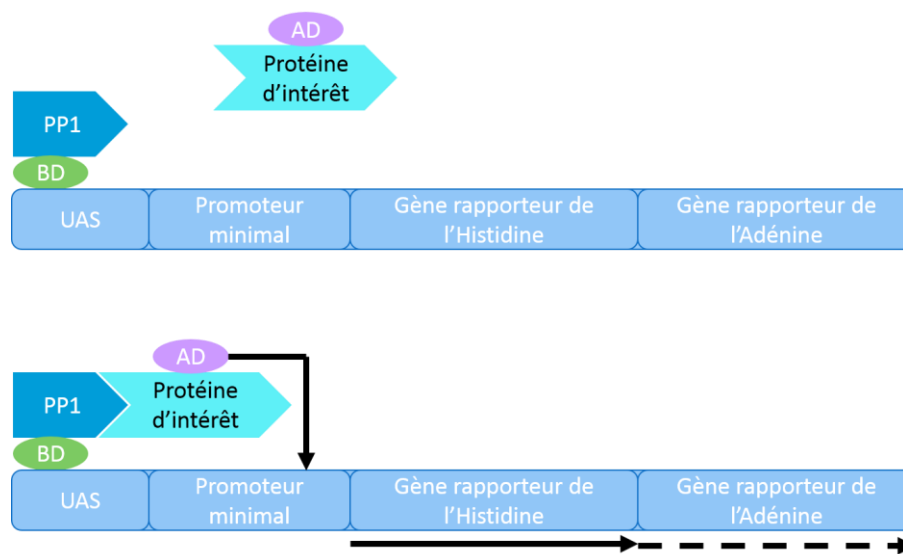


Figure 46 : Schéma de fonctionnement de l'interaction en double hybride de levure.

Pour réaliser les croisements, deux grosses colonies, une de chaque polarité sexuelle, sont mélangées dans 1 ml d'YPD, puis incubées à 37 °C, 200 rpm une nuit. Le mélange est ensuite étalé sur trois milieux différents :

- SD sans leucine ni tryptophane (SD-LW, Clontech) pour vérifier la présence des diploïdes ;
- SD sans leucine, tryptophane et histidine (SD-LWH, Clontech) pour détecter une interaction ;
- SD sans leucine, tryptophane, histidine et adénine (SD-LWHA, Clontech) qui permet d'observer une interaction plus forte.

### 4) Vérification de la production des protéines

Afin d'extraire les protéines de levures, deux techniques sont employées : la première est réalisée grâce au kit Yeast Protein Extraction Buffer tandis que la seconde utilise l'extraction à la soude.

#### a) Kit Yeast Protein Extraction Buffer (GE Healthcare)

L'extraction des protéines de levure par le kit de GE Healthcare est réalisée selon le protocole fourni, en utilisant le tampon d'extraction complété avec une pastille d'antiprotéases (Roche) et du DTT à une concentration de 5 mM. Les protéines sont ensuite déposées sur gel d'acrylamide 12 % afin de les séparer par SDS-PAGE. Puis elles sont transférées sur membrane de nitrocellulose qui sera incubée en présence d'un anticorps anti-HA (1/2 500) pour les constructions en pGADT7 et un anticorps anti-myc (1/1 000) pour celles en pGBKT7. Un anticorps anti-souris (1/50 000) est utilisé en anticorps secondaire. Puis la membrane est révélée au Dura (Thermo scientific), et les protéines sont détectées par chimioluminescence grâce au LAS4000 (GE HealthCare).

La seconde technique utilisée pour l'extraction de protéines de levures est l'extraction à la soude.

#### b) Extraction au NaOH

Une culture liquide de 5 ml de levures est centrifugée 5 min à 1 000 g, le culot est resuspendu dans 100 µl d'eau. Ensuite, 100 µl de soude 0,2 M y sont ajoutés et le mélange est incubé 5 min à température ambiante afin de lyser les levures. Le lysat est centrifugé 5 min à 1000 g, puis le culot est repris dans 100 µl de tampon de charge 1X (Tampon 3X : Tris-HCl 150 mM pH 6.5, SDS 7.5 %, β-mercaptoéthanol 15 %, glycérol 30 % et bleu de bromophénol 0.25 %). L'échantillon est chauffé 3 min à 100 °C, centrifugé 5 min à 1000 g, puis il est déposé sur gel d'acrylamide. Un western-blot est réalisé comme décrit ci-dessus.

### C. Expression des protéines recombinantes

#### 1) Protéines tagguées 6His

##### a) Les protéines RCC-PIPfc et CLPf-6His

Les constructions RCC-PIPfc-pQE30 et CLPf-pETDuet-1, réalisées respectivement avec les couples d'amorce p39-p40 et p9-p10, ont été utilisées.

Des bactéries compétentes *E. coli* BL21 contenant les différentes constructions de RCC-PIPfc ou de CLPf sont mises en culture dans 50 ml de milieu LBA sur la nuit sous agitation à 37 °C. Le lendemain, elle est diluée dans 1 L de LBA toujours sous agitation à 37 °C jusqu'à obtenir une DO à 600 nm entre 0.6 et 0.8. 1 ml de culture est gardé afin de servir de témoin non induit. La culture est ensuite induite par 0.5 mM d'IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Euromedex) final sur la nuit à 16 °C pour RCC-PIPfc, et 3 h à 37 °C pour CLPf. Là encore, 1 ml de culture est gardé en tant que témoin d'induction. Par la suite, la culture est centrifugée 30 min à 4 °C à 4 500 tours.

Le culot obtenu est ensuite lysé par ajout de 5 ml de tampon de lyse par gramme de cellules (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Imidazole 20 mM, Guanidine 6 M, 1 pastille

d'antiprotéase, pH 7.5), et cela sur roue pendant 1 h à 4 °C. Le lysat est ensuite soniqué (Branson Digital Sonifier) par vingt cycles de 15 s et ultra-centrifugé à 10 000 tours 30 min à 4 °C. Pendant ce temps, les billes de Nickel (Macherey-Nagel) sont équilibrées par trois lavages de 3 ml avec le tampon de lavage (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, imidazole 20 mM, Guanidine 6 M, pH 7.5) et centrifugation de 3 min à 4 500 rpm à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines est ensuite placé en présence des billes de Nickel sur la nuit à 4 °C. Ensuite, les billes sont centrifugées 15 min à 4 °C 4 500 rpm et lavées dix fois par ajout de 5 ml de tampon de lavage. Au dernier lavage, les billes sont reprises dans 1.5 ml de tampon de lavage, et un échantillon de 30 µl qui permet de vérifier la fixation de la protéine aux billes. Les protéines sont ensuite éluées dans 4 ml de tampon d'éluion (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Imidazole 600 mM, pH 7.5), durant 1 h sur roue à 4 °C. Les billes sont centrifugées à 4 300 rpm pendant 15 min à 4 °C, puis le surnageant est récupéré et 30 µl sont préservés pour la vérification de la qualité de la protéine avant d'effectuer une dialyse (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) sur la nuit sous agitation douce à 4 °C. Le lendemain, la protéine est récupérée et centrifugée 20 min à 4 °C, 14 000 rpm. La pureté de la protéine est finalement vérifiée par SDS-PAGE 12 % coloré au SimplyBlue™ Safe Staining (Invitrogen), ainsi que par western-blot anti-6His en utilisant le kit de détection Dura et la lecture se fait grâce à l'ImageQuantLAS4000. La protéine est finalement dosée en utilisant le kit BCA assay (Pierce) et/ou le nanovue (GE Healthcare).

Ce protocole est valable pour les différentes constructions de RCC-PIPfc et CLPf. Cependant, les tampons de production de la protéine recombinante CLPf-6His contiennent 500 mM de NaCl.

#### b) RCC-6His

Le principe de production est le même que celui de la protéine CLP-6His, mais le surnageant des bactéries lysées est filtré et déposé sur la colonne de Nickel (Protino® Ni-NTA Columns 1ml, Macherey-Nagel) de la chromatographie (Biologic LP de Biorad). La protéine est ensuite éluée par le tampon d'éluion cité ci-dessus, avec 500 mM de NaCl, et dialysée une nuit à 4 °C contre le tampon de dialyse à 500 mM de NaCl. La vérification de la pureté de la protéine et le dosage sont réalisés de la même façon que pour les protéines CLPf-6His et RCC-PIPfc-6His.

#### 2) Protéines tagguées GST

Le protocole suivant est valable pour la production des protéines : GST, PfPP1-GST, CLPf-GST et RCC-PIPfc-GST. Les constructions sont réalisées dans le vecteur pGEX4T3, permettant d'obtenir des protéines fusionnées à la GST. Elles sont ensuite transformées en bactéries *E. coli* de type JM109 et mises en culture dans un milieu LBA.

L'expression des différentes protéines est induite par 0.5 mM d'IPTG lorsque la culture de bactéries présente une DO à 600 nm entre 0.6 et 0.8. L'induction est réalisée pendant 3 h à 37 °C sous agitation, sauf pour la GST seule dont l'induction ne dure que 30 min. La culture



est ensuite centrifugée à 4 500 rpm pendant 30 min, et le culot est repris dans 25 ml de tampon de lyse (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 %, lysozyme 1 mg/ml, et une pastille d'anti-protéase (Roche), pH 7.5) pendant 1 h sur roue à 4 °C, puis le lysat est soniqué durant vingt cycles de 15 s. Ensuite, il est ultra-centrifugé 30 min à 4 °C à 10 000 rpm. Le surnageant est filtré et placé au contact de billes de Glutathion-sepharose (Sigma) préalablement réhydratées 1 h dans un tampon de préparation (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Triton-X100 1 % et une pastille d'anti-protéase, pH 7.5), lavées cinq fois dans un tampon de lavage (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Triton-X100 0.1 %, pH 7.5) et centrifugées 5 min à 2 600 rpm à 4 °C. Les billes sont incubées une nuit à 4 °C sur roue en présence du lysat. Le lendemain elles sont lavées cinq fois dans le tampon de lavage et centrifugées 5 min à 2 600 rpm à 4 °C. Le dernier lavage est réalisé en Tris 20 mM/NaCl 150 mM. La qualité de fixation des protéines aux billes de glutathion est vérifiée par la réalisation d'un western-blot anti-GST. Pour la protéine PfPP1-GST, du MnCl<sub>2</sub> 1 mM est ajouté dans chaque tampon.

L'élution de PfPP1-GST est réalisée par l'ajout de 5 ml de tampon d'élution (Tris 50 mM, glutathion 5 mM et MnCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.5) pendant 1 h sur roue à 4 °C. Ensuite, les billes sont centrifugées à 2 500 rpm pendant 3 min à 4 °C. Le surnageant est filtré et dialysé contre un tampon de dialyse (Tris 20 mM, NaCl 150 mM et MnCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.5). Finalement, la pureté de la protéine est vérifiée par migration de la protéine sur gel d'acrylamide et coloration au Simply Blue®, et la protéine est dosée au nanovue.

### 3) Production sérums dirigés contre RCC-PIP et CLP

#### a) Immunisation

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

Les protéines recombinantes RCC-PIP<sub>fc</sub> et CLP<sub>f</sub>, préalablement purifiées par électroélution sont utilisées pour immuniser des souris CD1. Approximativement 50 µg de protéines diluées dans l'hydroxyde d'alun (Alu-gel-S, Serva) (1 volume/1 volume) sont injectés par voie intra-péritonéale. Deux boosts sont effectués à J21 et J35 dans les mêmes conditions. Une pré-saignée est effectuée le jour de la première injection, qui servira de contrôle négatif (appelé sérum de souris pré-immune). A J49, un prélèvement sanguin au niveau du sinus rétro-orbital est réalisé, le sérum est titré par Western-blot. Si le titre est correct, des prélèvements sanguins sont réalisés à intervalle régulier de deux semaines, jusqu'à diminution de l'efficacité du sérum observée par western-blot.

#### b) Test en western-blot

La protéine recombinante RCC-PIP<sub>fc</sub> ou CLP<sub>f</sub>, selon le sérum à tester, est déposée sur gel d'acrylamide 12 % puis transférée sur membrane de nitrocellulose. Après saturation des membranes avec du PBS lait 5 %, les membranes sont incubées avec les sérums d'immunisation et de souris saine à différentes dilutions (1/50 à 1/2 000) sur la nuit à 4 °C.

Après plusieurs lavages au PBS Tween 0,4%, les membranes sont incubées avec un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (1/50 000 dans PBS lait 5 %) pendant 1 h. Après un nouveau cycle de lavages, les protéines sont révélées en utilisant un kit de détection par chimioluminescence (Dura) et la lecture se fait grâce à l'ImageQuantLAS4000.

## D. Tests d'interactions

### 1) En bactérie

Pour cela, le vecteur pETDuet-1 est utilisé puisqu'il possède deux sites multiples de clonage (MCS) qui permettent de produire deux protéines : l'une fusionnée au tag -6His et l'autre à un tag -S. Ici la protéine PfPP1 est tagguée -6His tandis que CLPf ou RCC-PIPfc sont fusionnées au tag -S.

L'expression des protéines et la lyse des bactéries sont réalisées de la même façon que pour la production des protéines tagguées histidines. Du fait de la présence de PfPP1-6His, du  $MnCl_2$  1 mM est ajouté dans chaque tampon. Une fois les protéines fixées aux billes de Nickel, ces dernières sont lavées dix fois et sont finalement reprise dans 50  $\mu$ l de tampon de charges. Les protéines sont séparées par migration sur gel d'acrylamide 12 %, et transférées sur membrane de nitrocellulose en double exemplaire. En effet, la première membrane est révélée par un anticorps anti-6His (1/2 000<sup>ème</sup>) afin de déterminer la présence de PfPP1-6His et la seconde membrane par un anticorps anti-S (1/2 000<sup>ème</sup>) La révélation est effectuée grâce au kit Dura et la détection de la chimioluminescence par l'ImageQuant LAS4000.

### 2) GST pull-down

2  $\mu$ g de protéine recombinante PfPP1-6His sont incubés avec la protéine CLPf-GST, RCC-PIPfc-GST ou la GST seule fixée aux billes de Glutathion agarose et 25  $\mu$ g de BSA dans un tampon de « binding » (Tris 20 mM, NaCl 500 mM,  $MnCl_2$  1 mM, Hepes 20 mM, EDTA 0.2 mM, Triton-X100 0.1 %, 1 mM DTT et un cocktail d'inhibiteur de protéase, pH 7.5) pendant 2 h à 4 °C sur roue. Après cinq lavages avec le tampon de « binding », les protéines sont éluées dans du tampon de charge 1X, déposées sur gel d'acrylamide puis transférées sur membranes de nitrocellulose. Les membranes sont révélées avec un anticorps anti-6His (1/2 000<sup>ème</sup>) ou un anticorps anti-GST (1/2 000<sup>ème</sup>). Un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase est utilisé comme anticorps secondaire (1/50 000<sup>ème</sup>) et la révélation se fait grâce au kit de détection Dura et l'utilisation de l'ImageQuant LAS4000.

### 3) Immunoprécipitation

La première étape consiste à réhydrater les billes d'agaroses protéines G (Sigma), à raison de 1.25 ml d'eau PPI pour 50 mg, pendant 30 min sur roue à 4 °C. Elles sont ensuite centrifugées 3 min à 3 000rpm à 4 °C, puis elles sont reprises dans du tampon Tris 20 mM et NaCl 150 mM (1 volume/1 volume). Puis 20  $\mu$ g de la protéine recombinante d'intérêt (ici il

s'agit de RCC-PIPfc, RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>, ou CLPf) sont pré-épuisés dans 500 µl de tampon de lavage (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Triton-X100 0.1 % et une pastille d'antiprotéases, pH 7.5) sur 40 µl de billes d'agarose G pendant 2 h sur roue à 4 °C. Le surnageant est récupéré et séparé en deux. La moitié est mise en présence de 40 µl de billes sèches, de 10 µl de sérum dirigé contre la protéine d'intérêt, de 2 µg de peptide 6His et de 50 µg/ml de BSA, et le volume est complété à 500 µl de tampon de lavage. L'autre moitié est mise en présence du même mélange, mais le sérum est remplacé par du sérum de souris pré-immune, ce qui servira de témoin négatif. Ces différentes billes sont incubées une nuit sur roue à 4 °C. Le lendemain, elles sont lavées cinq fois avec du tampon de lavage. Ensuite, 5 µg de protéines recombinantes PfPP1-GST, ainsi que du MnCl<sub>2</sub> 1 mM sont ajoutés dans un volume final de 500 µl de tapon de lavage. Les échantillons sont incubés 2 h sur roue à 4 °C. Finalement, elles sont rincées cinq fois en tampon de lavage avant d'être reprises dans 50 µl de tampon de charge.

Les échantillons sont chauffés 3 min à 100 °C, centrifugés 2 min à 15 000 rpm, et déposés sur gel d'acrylamide en duplicat, et transférées sur membrane de nitrocellulose. La protéine PfPP1-GST est révélée par un anticorps anti-GST, tandis que les protéines RCC-PIPfc et RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> sont révélées par le sérum dirigé contre RCC-PIPfc et CLPf par le sérum dirigé contre CLPf.

#### 4) Test de type ELISA

##### a) Biotinylation de PfPP1

La protéine, à une concentration de 0,75 mg/ml, est préalablement dialysée une nuit contre un tampon NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (Merck) à pH 8,5 ; elle est mise en contact avec 200 µl de biotine (Calbiochem) à 1 mg/ml dans du DMSO 2h à température ambiante à l'abri de la lumière. Une dialyse (PBS) d'une nuit à 4°C permet d'éliminer la biotine libre. La qualité du marquage à la biotine est vérifiée en incubant différentes dilutions de la protéine avec le substrat TMB (révélation, confère ci-dessous).

##### b) Test ELISA

Cette technique permet de détecter une interaction *in vitro* et de la quantifier (FIGURE 46). Pour cela, la protéine à tester et l'Albumine Bovine Sérique (BSA) servant de témoin négatif, sont diluées dans du PBS avant d'être adsorbées à 1 µg/puits, dans une plaque 96 puits Nunc (ThermoScientific), une nuit à 4 °C. Le lendemain, cinq lavages au PBS Tween 0,1 % sont effectués (laveur de plaques, Dynex Magellan Biosciences). Puis la plaque est saturée avec 250 µl de PBS gélatine 0,5 % (Sigma) pendant 1 h à température ambiante. De nouveau, cinq lavages sont effectués, puis la protéine biotinylée est déposée à différentes concentrations (dilution dans du PBS Tween 0,1 %). La plaque est alors incubée 2 h à 37 °C. Cinq lavages au PBS Tween 0,1 % sont effectués, et 100 µl de streptavidine-HRP (diluée au 1/20 000<sup>ème</sup> dans du PBS Tween 0,1 %, BIOSPA) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée à 37 °C pendant 30 min et subit un nouveau cycle de lavages. Ensuite, elle est révélée

par ajout de 100  $\mu$ l de substrat TMB (Tétraméthylbenzidine, Uptima) et incubée 5 min à l'obscurité. La réaction est finalement stoppée par 100  $\mu$ l de HCl 2 N (Merck), avant que la plaque soit lue par spectrophotométrie à 450 nm (Multiscan FC, ThermoScientific) (**Figure 47**).

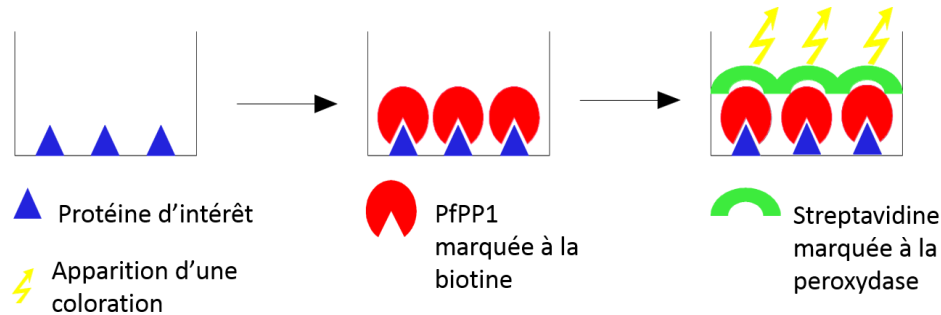


Figure 47 : Principe du test de type ELISA.

## E. Activité sur la phosphatase

### 1) Test pNPP

Le test para-NitroPhénylPhosphate (pNPP) (Sigma) est utilisé dans le but de définir l'activité de PfPP1 vis-à-vis du substrat (**BARIK 1993; DAHER ET AL. 2006**), le pNPP. Une gamme de dilution a été réalisée afin de définir la concentration de PfPP1 nécessaire pour obtenir une DO d'au moins 0.5. Différentes concentrations des protéines recombinantes CLPf, RCC-PIPfc WT ou RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>, diluées dans le tampon Tris 10 mM, sont incubées avec PfPP1, pendant 30 min à 37 °C. Le substrat pNPP est ajouté pendant 1 h à 37 °C. La libération du para-NitroPhénol, composé coloré, traduit l'action de la phosphatase ce qui peut être mesuré par lecture de la densité optique à 405 nm.

### 2) En ovocytes de Xénope

#### a) Préparation de l'ARNm

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

## b) Induction de la GVBD

La préparation des ovocytes de Xénope et les expériences de micro-injection ont été effectuées comme décrit précédemment (en collaboration avec l'équipe du Pr. Bodart, Université Lille 1) (VICOONE ET AL. 2004). Chaque expérience est réalisée sur vingt ovocytes de Xénope provenant de deux ou trois animaux différents. L'ARNm de RCC-PIPf ou CLPf est micro-injecté. La progestérone est utilisée comme témoin positif dans ces expériences. La GVBD (Germinal Vesicle BreakDown) est détectée par l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal après 15 h à 18 h environ.

L'expression des protéines à partir de l'ARNm est vérifiée 15 h après la micro-injection. Les ovocytes sont lysés dans un tampon (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 500 mM, SDS 0.05 %, Triton-X100 0.5 %, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 1 mg/ml, leupeptine 10 µg/ml, aprotinine 10 µg/ml, soybean trypsin inhibitor 10 µg/ml, benzamidine 10 µg/ml, PMSF 1 mM et sodium vanadate 1 mM) et centrifugés 15 min à 10 000 g à 4 °C. Une électrophorèse suivie d'un western-blot sont réalisés sur ces extraits, puis la membrane est révélée avec un anticorps dirigé contre RCC-PIPfc.

## F. Génétique inverse

### 1) *P. falciparum*

#### a) Préparation des plasmides

Pour obtenir les séquences qui serviront pour le Knock-In (KI) et le Knock-Out (KO) de RCC-PIP chez *P. falciparum*, des PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique de *P. falciparum*, avec les couples d'amorces p51-p52 et p53-p54 respectivement (Tableau 6). Les produits de PCR sont insérés au niveau des sites de restriction PstI et BamHI, respectivement dans le vecteur pCAM-BSD-Hémagglutinine (HA) pour la construction tagguée en 3' (afin de vérifier l'accessibilité au locus), et dans le vecteur pCAM-BSD pour la construction du côté 5' (afin de déterminer son essentialité) de PfRCC-PIP. Les deux vecteurs possèdent une cassette BSD conférant une résistance à la blasticidine (BSD). Les constructions sont ensuite vérifiées par séquençage.

#### b) Culture de la souche 3D7 de *P. falciparum*

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

### c) Préparation des anneaux et transfection

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

Pour cela, une préparation est réalisée en mélangeant 100 µg d'ADN plasmidique, 210 µL de cytomix 1X (KCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.15 mM, EGTA 2 mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, HEPES 25 mM et le pH est ajusté à 7.6 avec du KOH et compléter à 100 ml avec de l'eau) et de l'eau pour avoir un volume final de 300 µl. Cette préparation est ensuite placée dans une cuve d'électroporation en présence de 75 µl d'un culot de cultures (ce qui correspond à environ 100 millions de parasites), et de 25 µl de cytomix 1,43X. L'électroporation est réalisée en utilisant l'appareil à électroporation BIORAD (Gene pulser Xcell) avec les paramètres suivants : 300 V, 950 µF, ∞ Ω, 2 mm (SIDHU, VALDERRAMOS, ET FIDOCK 2005). Les parasites sont ensuite mis en culture dans un flacon de 25 cm<sup>2</sup> avec du milieu RPMI AGH gazé au trigaz (5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % N<sub>2</sub>). 4 h après la transfection, le milieu est changé et la culture à nouveau gazée.

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

### d) Génotypages

L'ADN total est extrait à partir d'un culot de parasites au stade schizonte, en utilisant le kit KAPA Express Extract (KAPABioSystem) selon les recommandations du fournisseur.

Les génotypages sont réalisés en parallèle sur l'ADN total de parasites sauvages et de parasites transfectés. Les PCR pour le génotypage des parasites KI-RCC-PIP sont effectuées à l'aide des couples d'amorce p51-p52, p57-p58 et p60-p58 afin de vérifier respectivement la présence du gène *RCC-PIP* (témoin positif), du plasmide, et de l'intégration de la construction du KI. Dans le cas du KO-RCC-PIP, le couple d'amorces p53-p54 est utilisé en guise de contrôle positif du gène endogène. Tandis que le couple p57-p59 a pour but de vérifier la présence de la construction et le couple p61-p59 pour déterminer une éventuelle intégration de la construction du KO de RCC-PIP.

## 2) *P. berghei*

### a) Préparation des plasmides

Le promoteur de PbRCC-PIP est amplifié par PCR sur l'ADN génomique de *P. berghei* en utilisant le kit Taq polymérase Advantage<sup>®</sup> 2 avec le couple d'amorces p64-p65. Le produit

de PCR est ligué au plasmide pPRFp-TRAD4Ty-TetO7-HAPRF-hDHFR-1 (fourni par le Dr. Pino de l'université de Genève, Suisse) (PINO ET AL. 2012), au niveau des sites de restriction BglII/SacII, grâce au kit In-Fusion® HD Cloning (Clontech). Les bactéries compétentes Stellar sont transformées avec le plasmide contenant le promoteur. Par séquençage, l'exactitude de la séquence a été vérifiée. Puis une PCR est réalisée sur l'ADN génomique de *P. berghei* en utilisant le couple d'amorces p62-p63, afin d'amplifier une partie du gène de PbRCC-PIP. Le produit de PCR est alors inséré dans le vecteur pPRFp-TRAD4Ty-TetO7-HAPRF-hDHFR-1 contenant le promoteur, au niveau des sites de restriction NaeI/NheI. L'exactitude des séquences est vérifiée par séquençage.

Pour faciliter la double recombinaison homologue, le plasmide contenant le gène et le promoteur de PbRCC-PIP est linéarisé par l'enzyme NheI. Après purification sur gel, le plasmide linéarisé est précipité à l'acétate de sodium et repris dans 20 µl d'eau.

### b) Préparation des schizontes et transfection

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

Une partie des schizontes purifiés, 20 µl d'ADN plasmidique linéarisé (soit environ 30 µg d'ADN, pour une injection de 10 µg par souris) et 100 µl de tampon Nucleofector human T cell complet (Lonza) sont placés dans une cuve d'électroporation. La transfection est réalisée avec un appareil de type Amaxa® Nucleofector® avec le programme U33. Les parasites électroporés sont repris dans du PBS. 100 µl de la préparation par souris mâles CD1 de six semaines (Charles River) leurs sont alors injectés par voie intraveineuse. 30 h après l'injection, la pyriméthamine (70 mg repris dans 10 ml de DMSO puis complété à 1 L d'eau à un pH compris entre 3.5 et 5) est ajoutée à l'eau de boisson afin de sélectionner les parasites transfectés/recombinants. Cette résistance est apportée par la présence d'une cassette contenant la résistance à cet antibiotique qui est insérée dans le génome. Grâce à des frottis sanguin effectués deux fois par semaine, la parasitémie peut être suivie.



### c) Génotypage

L'ADN total de *P. berghei* est extrait de la même façon que l'ADN total de *P. falciparum* par l'utilisation du kit KAPA Express Extract (KAPABioSystem) sur un culot de schizontes obtenus à partir de parasites se développant chez des souris sous pyriméthamine. Le génotypage est réalisé en parallèle sur l'ADN total de parasites sauvages et transfectés avec la construction du Knock-Out conditionnel de PbRCC-PIP (KOc-PbRCC-PIP). Différents couples d'amorces sont utilisés : le couple p64-p65 et p62-p63 sont utilisés en guise de témoins positifs de la présence du promoteur et du gène respectivement. Le couple p68-p69 a, quant à lui, pour but de vérifier l'intégration du promoteur, et le couple p66-p67, de vérifier l'intégration du gène.

Un western-blot est également effectué afin de vérifier l'expression de la protéine PbRCC-PIP fusionnée au tag HA. Un culot de schizontes maturés (1 ml de sang parasité de souris est mûri une nuit dans du milieu RPMI, à une agitation de 54 tr/min à 37 °C) sont repris dans du tampon de charge 1X et les protéines sont séparées par migration sur un gel NuPAGE® Novex® 3-8 % en Tris Acetate (ThermoFisher) puis transférées sur membrane de nitrocellulose dans un tampon de transfert contenant du méthanol. Ce type de gel et de tampon de transfert est utilisé du fait du poids moléculaire très élevé de la protéine PbRCC-PIP. Les membranes sont ensuite révélées avec un anticorps anti-HA couplé à la biotine (1/2 500<sup>ème</sup> dilué dans du PBS BSA 5 %) et la streptavidine HRP (1/150 000<sup>ème</sup> diluée en PBS BSA 5 %).

## G. Localisation chez le parasite

### 1) Par l'utilisation d'un vecteur épisomal

Pour déterminer la localisation de RCC-PIP, le vecteur pARL est utilisé puisqu'il permet de fusionner la protéine d'intérêt à un tag GFP en 3'. La construction RCC-PIP-3kb-pARL a été réalisée en amplifiant ce fragment avec les amorces p55-p56 et en utilisant le kit In-Fusion® HD (Clontech).

La transfection chez *P. falciparum* est réalisée de la même façon que celles des KI et KO, mais la pression de sélection n'est pas la même puisque le vecteur pARL possède la résistance à l'antibiotique WR99210 (Sigma). La croissance des parasites est observée quatre à six semaines après l'électroporation. La vérification de la production de la protéine tagguée à la GFP est effectuée par lyse d'un culot de parasites RCC-PIP-3kb-GFP et séparation des protéines par SDS-PAGE. Elles sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose, et la membrane est révélée par un anticorps anti-GFP (1/2 000<sup>ème</sup>)

### 2) Par immunohistochimie

Cette approche pour déterminer la localisation de RCC-PIP chez *P. falciparum* a été réalisée en collaboration avec le Dr Gosset (Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l'Université Catholique de Lille).



Pour cela, 5 ml de culture asynchrone de parasite sauvage de la souche 3D7 de *P. falciparum*, d'environ 5 % de parasitémie, sont centrifugés à 2 500 g pendant 5 min et le culot est fixé durant 24 h dans 10 % de formaline neutre et inclus dans de la paraffine. L'évaluation morphologique est effectuée en examinant des sections (4 µm) colorées à l'hématoxyline-éosine-safran.

Pour l'immunohistochimie permettant la détection de RCC-PIP, les lames ont été colorées en présence d'un anticorps anti-RCC-PIP polyclonal (dilution 1/100<sup>ème</sup>), pendant 1 h à 37 °C en utilisant le kit de détection Ventana Ultraview rouge dephosphatase alcaline universelle dans un processeur Ventana BenchMark XT (Ventana). L'antigène est récupéré dans un tampon citrate pH 6, par un processus automatisé standard sur le BenchMark XT Ventana à 37 °C pendant 1 h.

### 3) Par immunofluorescence

Chez *P. falciparum*, une culture d'environ 5 % de parasitémie est centrifugée à 2 500 rpm pendant 5 min sans frein. Puis le culot est repris dans 1 ml de tampon de fixation (4 % de paraformaldéhyde, 0.075 % de glutaraldéhyde). Tandis que pour *P. berghei*, une saignée à l'œil est effectuée afin de récupérer quelques gouttes de sang dans de l'héparine pour éviter la coagulation. Le sang sera également repris dans 1 ml de tampon de fixation.

Puis, l'échantillon est placé 10 min dans la glace avant d'être centrifugé 2 min à 2 000 rpm à température ambiante, et le culot est repris dans 1 ml de PBS. Le sang est déposé sur des lamelles coatée à la poly-L-lysine dans une plaque 24 puits. Ces lamelles sont préparées en déposant de la poly-L-lysine à 0.1 mg/ml à leur surface, puis elles sont incubées 2 h à température ambiante et rincées au PBS. L'échantillon de sang est laissé sédimenté pendant 30 min minimum à température ambiante. Puis les lamelles sont rincées au PBS délicatement. Les globules rouges fixés à la lamelle sont perméabilisés et saturé par 500 µl d'un tampon contenant du PBS BSA 1 % et 0.5 % de triton-X100. Les lamelles sont à nouveau rincées au PBS, avant d'être mises en contact avec l'anticorps primaire : un anticorps anti-HA biotinylé dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du PBS BSA 1 % pendant 1 h à 37 °C en chambre humide. Afin d'avoir un témoin du bruit de fond, une lamelle est incubée uniquement en présence de l'anticorps secondaire. De nouveaux lavages sont réalisés, puis les lamelles sont mises en contact avec l'anticorps secondaire, un anti-streptavidine Alexa fluor 488 (Molecular Probes) dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans du PBS BSA 1 % ainsi que de 1 µg/ml de DAPI (Sigma), et cela pendant 1 h à 37 °C dans une chambre humide et à l'obscurité. Les lamelles sont lavées en PBS une dernière fois avant de réaliser le montage de la lamelle sur la lame en Mowiol 4-88 (Sigma).

Les lames sont ensuite regardées en microscopie confocale par le microscope LSM880 (Zeiss).





# Discussion et Perspectives



*Plasmodium falciparum*, parasite responsable du paludisme, possède un cycle complexe à deux hôtes : l'Anophèle et l'Homme. Dans ce dernier se déroule notamment le cycle intra-érythrocytaire qui permet aux parasites de se multiplier rapidement. Cette croissance implique des mécanismes de régulation très finement orchestrés. Parmi eux nous pouvons citer les modifications post-traductionnelles et notamment les phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation mettant en jeu des kinases et des phosphatases. L'importance de certaines de ces enzymes chez le parasite a été démontrée dans des études récentes, par la réalisation de Knock-Out (TEWARI ET AL. 2010; GUTTERY ET AL. 2014).

La majorité de l'activité phosphatase du parasite est due à la protéine phosphatase de type 1 ou PfPP1. Au laboratoire, nous concentrons nos recherches sur cette enzyme, ainsi que ses régulateurs. En effet, PP1 possède un rôle majeur dans le développement de *Plasmodium*, car la réalisation de Knock-Out chez *P. berghei* a été un échec (GUTTERY ET AL. 2014). De plus, cette phosphatase est une holoenzyme constituée d'une sous-unité catalytique constante et d'un ensemble de sous-unités régulatrices variables qui permettent à la phosphatase d'agir sur des substrats divers et variés. Ainsi, les partenaires de PfPP1 ont un rôle tout aussi important que la phosphatase elle-même, et ont pour but de réguler son activité, sa localisation ainsi que sa spécificité.

Une première approche par génomique comparative a été utilisée et a permis l'étude de quatre régulateurs de PfPP1 : PflRR1 (Pf Leucine Rich Repeat1, (DAHER ET AL, 2006)), Pfl3 (Pf Inhibiteur 3, (FREVILLE ET AL, 2012)), Pfl2 (Pf Inhibiteur 2, (FREVILLE ET AL, 2013)), ou encore PflF2 $\beta$  (Facteur d'initiation de la traduction eucaryote de type 2, sous-unité  $\beta$ , (TELLIER ET AL. 2016)). Nous avons démontré que ces protéines sont essentielles à la survie du parasite par des expériences de génétique inverse et qu'elles sont impliquées dans la régulation de la phosphatase puisque PflRR1, Pfl2 et PflF2 $\beta$  sont capables de diminuer l'activité de PfPP1, alors que Pfl3 a tendance à l'augmenter. Les motifs nécessaires à l'interaction entre ces régulateurs et la phosphatase ont également été identifiés, grâce à la réalisation de mutants. Il a été observé que le motif RVxF est impliqué dans l'interaction entre PfPP1 et Pfl2, Pfl3 et PflF2 $\beta$ , ainsi que dans la fonction inhibitrice de Pfl2. Et il a été également démontré que le motif FxxR/KxR/K joue un rôle dans la liaison entre PfPP1 et ses partenaires Pfl2 et PflF2 $\beta$ , ainsi que dans la fonction inhibitrice de Pfl2.

Cependant, dans un souci de compréhension du cycle de développement atypique du parasite, il est nécessaire de découvrir des partenaires de PfPP1 qui soient spécifiques de la phosphatase. Ainsi, au cours de ces travaux, nous avons initié l'étude de l'interactome de PfPP1 par une approche plus globale en double hybride de levure. Puis nous avons étudié au niveau moléculaire et fonctionnel, deux nouveaux partenaires potentiels de la PfPP1.



## I. Identification des partenaires de PfPP1

Les différents criblages de banque d'ADNc de *P. falciparum* avec PfPP1 en double hybride de levure, présentés dans la partie résultats, ont été inclus dans un article regroupant l'interactome de PfPP1 identifié par différentes techniques, et dans lequel je suis en co-premier auteur (**Annexe 1**) (HOLLIN ET AL. 2016). Cependant, pour compléter cette étude, un cinquième criblage de banque a été réalisé.

La réalisation du cinquième criblage a permis pour certaines protéines, de les retrouver à nouveau, et pour d'autres d'observer pour la première fois leur interaction avec PfPP1. De plus, des informations supplémentaires sur chaque clone ont été ajoutées. Nous avons notamment précisé la présence ou non, d'autres motifs potentiels d'interaction avec PfPP1 situé dans le fragment issu du criblage ou dans la séquence complète des protéines. En effet, d'autres motifs que le motif RVxF ont été décrits comme interagissant avec PfPP1, nous pouvons citer les motifs FxxR/KxR/K (ou FKK), HYNE, SILK, etc...

Suite aux premiers criblages, nous avons choisi de nous intéresser à six clones possédant un motif RVxF ou non : PF3D7\_0418300, Rad54, H2A, Ran, PF3D7\_1202600 et PF3D7\_0919900. Les éléments complémentaires issus du cinquième criblage concernant ces six candidats sont présentés et discutés ci-dessous.

### A. Analyse des interactions RVXF indépendantes

Lors des premiers criblages, la séquence codante de PF3D7\_0418300 avait été obtenue une fois en cadre ouvert de lecture avec le domaine GAL4AD, et l'interaction était détectable sur un milieu de forte stringence (QDO). De façon intéressante, cette protéine a été retrouvée dans deux clones lors du dernier criblage mais uniquement en cadre non ouvert de lecture, et les interactions avec PfPP1 n'ont été observées que sur TDO (milieu de faible stringence). L'interaction en double hybride de levure entre PfPP1 et ce partenaire semble donc varier.

La protéine Rad54, quant à elle, n'a pas été représentée par de nouveau clone lors du dernier criblage en double hybride de levure. Il est à noter que cette protéine qui ne contient pas de motif RVxF présente un motif FKK qui se situe en dehors du fragment de protéine obtenu lors du criblage. Les motifs FKK étant connus pour interagir avec PP1, cette observation est un argument en faveur du fait que Rad54 pourrait être un partenaire de PfPP1. Il est donc surprenant que nous n'ayons pas pu confirmer l'interaction entre PfPP1 et le clone Rad54.

Le dernier clone étudié ne possédant pas de motif RVxF est l'histone H2A. Cette protéine a été obtenue dans trois clones lors des premiers criblages et dans cinq clones lors du dernier criblage. Cependant, pour ces cinq clones, l'interaction avec PfPP1 n'a été observée que sur TDO. Et, fait intéressant, sur ces huit clones, six contenaient la séquence de H2A décalée par rapport au cadre de lecture du domaine GAL4AD. Nous avons choisi le clone



présentant la copie complète de H2A que nous avons re-cloné en cadre de lecture avec le domaine GAL4AD. Cependant ce clone en ORF n'a pas présenté d'interaction avec PfPP1 lors du test de confirmation. Ce résultat est surprenant puisque l'histone H2A humaine, qui présente une identité de 67 % avec PfH2A, est capable d'interagir avec PfPP1 par test de type ELISA (HOLLIN ET AL. 2016). Néanmoins, l'interaction entre PfPP1 et PfH2A n'a pas été étudiée, par conséquent il est possible que ces protéines ne soient pas des partenaires. Mais, cela est peu probable puisque l'identité entre les histones H2A humaine et de *P. falciparum* est élevée, et que l'interaction entre PP1 et H2A a été démontrée chez d'autres organismes. En effet, l'histone H2A de *Saccharomyces cerevisiae* est capable d'interagir avec Glc7, l'homologue de PfPP1 chez la levure, afin que la phosphatase puisse la déphosphoryler (BAZZI ET AL. 2010; COSTANZO ET AL. 2010). Cependant, il est possible que, du fait de la forte conservation de l'histone H2A à travers les espèces, l'expression combinée de ScH2A et PfH2A, qui présentent une identité de 68%, soit toxique pour la levure et que par conséquent elle ne produise qu'en faible quantité la protéine PfH2A. Cette expression, même si elle n'est pas très élevée lui permettrait juste de pouvoir survivre sur le milieu de sélection. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'expression observée par western-blot est très faible. Cela pourrait également expliquer pourquoi nous avons obtenu majoritairement des clones qui ne sont pas en cadre de lecture avec le domaine GAL4AD.

En résumé, bien que différents éléments soient en faveur d'une interaction de ces trois candidats avec PfPP1, nous n'avons pas été en mesure de confirmer ces interactions en double hybride de levure. D'autres approches, telles que le test de type ELISA utilisé pour H2A, ou encore le GST pull-down, auraient été nécessaires afin de compléter cette étude.

## B. Analyse des interactions RVXF dépendantes

En parallèle, nous avons aussi choisi d'initier l'étude de Ran, du fait de la présence d'un motif RVxF. Lors du cinquième criblage, aucun autre clone correspondant à cette protéine n'a été retrouvé. Ainsi cette protéine n'est représentée par un seul clone qui n'est pas en cadre de lecture avec le domaine GAL4AD. Nous avons testé à nouveau l'interaction entre PfPP1 et Ran, re-cloné en cadre de lecture, par la technique du double hybride de levure, mais aucune interaction n'a pu être observée. Ce résultat, combiné au fait qu'il n'y ait qu'un seul clone obtenu lors du criblage, suggère que cette interaction est un faux positif. Cela peut s'expliquer par le fait que le motif RVxF n'est peut-être pas un motif valide d'interaction avec PfPP1. En effet, sa séquence n'est pas celle d'un motif long, il n'a d'ailleurs pas été retrouvé lors de l'analyse *in silico* de l'interactome de PfPP1 avec le motif RVxF étendu (HOLLIN ET AL. 2016).

La protéine Caliban Like Protein (CLP) est représentée par dix clones lors des premiers criblages. De façon intéressante, des motifs autres que le motif RVxF, ont été identifiés dans la séquence de CLP. Il s'agit de trois motifs FKK et d'un motif SILK. Il est à noter qu'un clone, parmi les dix obtenus, se situe dans une région différente des neuf autres et ne possède pas de motif RVxF, mais présente un motif FKK. Il serait intéressant de confirmer que ce clone interagit effectivement avec PfPP1 et, le cas échéant, d'observer l'effet de la mutation du motif FKK dans cette interaction. Le fragment correspondant aux AA 1 395 à 1 713 (noté CLPf)

obtenu dans les neuf autres clones, a fait l'objet d'études complémentaires (voir ci-après) qui ont permis de confirmer son interaction avec PfPPP1.

Finalement, RCC-PIP est l'une des protéines qui a été retrouvée le plus souvent lors des cinq criblages réalisés. Le dernier criblage a permis d'obtenir un clone supplémentaire qui n'est pas en cadre de lecture avec le domaine GAL4AD, contrairement aux clones obtenus précédemment. Ce fragment (AA 1 549-1 733) de protéine ne se situe pas dans la même région que les autres clones (AA 850 à 1 100), et ne possède pas de motif RVxF. Tout comme pour CLP, il serait intéressant d'étudier l'interaction de ce fragment avec PfPPP1. En effet, ce clone pourrait présenter un nouveau motif de liaison à PfPPP1. Le clone choisi pour poursuivre l'étude de RCC-PIP (RCC-PIPf AA 863 à 1 108) a, quant à lui, confirmé sa capacité à interagir avec PfPPP1 (cf Discussion, partie II).

Les clones choisis, trois avec un motif RVxF et trois sans motif RVxF, ont été recroisés avec PfPPP1 en double hybride de levure. Nous avons écarté de notre étude quatre d'entre eux puisque nous n'avons pas confirmé leur interaction après les avoir recroisés avec PfPPP1. Au vu de nos résultats n'ayant mis en évidence que deux partenaires de PfPPP1, il nous a semblé nécessaire d'étudier l'interactome de PfPPP1 par d'autres approches. Dans ce but, Hollin et al ont réalisé une analyse *in silico* du génome de *P. falciparum* en utilisant comme filtre un motif RVxF étendu dont le consensus est : [K<sub>52</sub>R<sub>13</sub>][K<sub>55</sub>R<sub>10</sub>][K<sub>19</sub>N<sub>15</sub>S<sub>13</sub>T<sub>5</sub>]V[S<sub>22</sub>H<sub>11</sub>T<sub>9</sub>R<sub>6</sub>Q<sub>6</sub>N<sub>6</sub>][F<sub>60</sub>W<sub>5</sub>] (HOLLIN ET AL. 2016). Une approche par chromatographie de co-affinité a complété cette étude. Certains des partenaires identifiés par l'une de ces méthodes ont été testés en ELISA afin de confirmer leur interaction avec PfPPP1 (seize protéines sur dix-sept ont confirmé leur interaction avec PfPPP1). La démarche de confirmation des résultats obtenus en double hybride de levure a été employée par d'autres équipes comme celle du Dr Gupta qui a été en mesure de confirmer sept interactions sur huit observées en double hybride de levure, par ELISA et GST pull-down (DUDHA ET AL. 2015). Ainsi, la présence de faux positifs, lors d'un criblage en double hybride de levure, est tout fait possible.

Il est également important de noter que les protéines RCC-PIP et CLP, qui font l'objet de cette thèse, sont apparus dans l'étude de l'interactome de PfPPP1 *in silico*. Le fait que ces protéines aient été démontrées comme faisant partie de l'interactome de PfPPP1 par deux approches différentes conforte l'idée qu'elles sont des partenaires de la phosphatase, et par conséquent le choix de les étudier.

## C. Etude de Caliban-Like Protein

### 1) Analyse de la séquence et potentiel rôle de CLP sur PfPPP1

Caliban Like Protein (CLP) est un homologue de Sdccag1 chez l'Homme et de Caliban chez la Drosophile. Cette homologie est basée sur trois régions : la région Nt, entre les AA 400 et 800 et la région Ct. Il est important de noter que la protéine Caliban de *Drosophila melanogaster* est beaucoup plus courte (992 AA) que CLP (2 180 AA). Ainsi CLP présente des insertions entre les régions conservées qui pourraient permettre d'apporter des fonctions

supplémentaires à cette protéine. Ces fonctions pourraient être spécifiques à *Plasmodium*, puisque ces régions ne présentent aucune homologie avec des protéines d'autres organismes.

Caliban est l'homologue de CLP le plus étudié. Des expériences d'ARN interférence de Caliban et de l'Exportine chez *D. melanogaster* ont permis de démontrer que Caliban joue un rôle dans la régulation du transport nucléaire impliquant l'Exportine (BI ET AL. 2005). En effet, l'Exportine est impliquée dans le transport des protéines de plus de 40 kDa du noyau vers le cytoplasme. Pour cela, elle se fixe à une protéine G, ce qui va lui permettre de changer de conformation afin d'interagir avec la protéine à exporter et de sortir du noyau via les pores nucléaires (MAHIPAL ET MALAFA 2016). Ces protéines G, ou petites GTPases, ont rôle dans la transduction des signaux cellulaires notamment grâce à l'échange du GDP en GTP. De façon intéressante, l'un des membres de la famille des GTPases est présent dans l'interactome de PfPP1 : Ran. Malgré le fait que l'interaction entre PfPP1 et Ran n'est pas été confirmée, il se pourrait qu'elle soit pourtant bien réelle. Ainsi, lorsque Ran reçoit les signaux cellulaires, pourrait interagir avec PP1 et ainsi permettre l'export de PP1 par CLP.

La région Nt de Caliban est connue pour posséder un domaine de la liaison à la machinerie de l'export nucléaire (BI ET AL. 2005). Du fait de l'identité (37 %) entre les régions Nt de Caliban et de CLP, il est possible d'imaginer que ce domaine est également présent chez CLP. Malheureusement, il n'est pas clairement identifié chez Caliban puisque son existence a été démontrée en fusionnant des fragments de la protéine à la GFP et en observant la localisation de la protéine par immunofluorescence. Néanmoins, l'identité entre Caliban et CLP n'est pas suffisamment élevée pour nous permettre d'affirmer sa présence chez *P. falciparum*. De plus, cet export nucléaire implique l'Exportine chez *D. melanogaster*. Il est à noter qu'une protéine homologue à l'Exportine existe dans le génome de *P. falciparum*, mais aucune étude n'a démontré son rôle dans l'export des protéines. Ainsi, CLP pourrait être en mesure d'effectuer l'export nucléaire de protéines via l'Exportine. Actuellement, peu de choses sont connues concernant l'export des protéines chez *Plasmodium*. Cependant, il existe des protéines portant un motif PEXEL (*Plasmodium* EXported ELEMENT) qui leur permet d'être exportées dans la membrane de la vacuole parasitophore, tandis que d'autres ne présentent pas ce motif mais sont tout de même transportées à la membrane de cette vacuole (SPIELMANN ET GILBERGER 2010).

La région Ct de Caliban chez *D. melanogaster* se lie, quant à elle, au peptide signal d'export nucléaire (NES) de la protéine Prospéro, et permet son transport au cytoplasme (BI ET AL. 2005). Cette région ne concerne que les deux cents derniers acides aminés de la protéine. Cette zone étant conservée avec celle de PfCLP (identité de 35 %), il est possible que la région Ct soit en mesure de se fixer au NES de certaines protéines parasitaires. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer l'interactome des deux cents derniers acides aminés de CLP en réalisant par exemple un criblage de banque d'ADNc de *P. falciparum* avec ce fragment comme appât. De plus, les NES, motif riche en acides aminés hydrophobes, sont présents chez *Plasmodium*, notamment dans la région Ct de PfARO (Armadillo Repeats Only) (MITRA ET AL. 2016). Néanmoins, il n'a pas été démontré directement que cette région de PfARO fonctionne comme un signal d'export nucléaire, mais il semblerait qu'un inhibiteur

d'Exportines modifie sa localisation habituellement nucléo-cytoplasmique. Cela suggère que PfARO est exportée via la liaison de l'Exportine au niveau de son NES.

La protéine Caliban de *D. melanogaster*, est également associée à l'apoptose, puisqu'elle est exprimée de façon p53 dépendante (WANG ET AL. 2013). La protéine p53 est impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN ainsi que dans l'induction de l'apoptose. Il a été démontré que Caliban facilite l'apoptose dépendante ou non de p53 via l'expression de la Caspase-3. Cependant, p53 et la Caspase-3 ne semblent pas exister pas chez *P. falciparum*. Par conséquent, il est peu probable que CLP soit en mesure d'induire l'apoptose chez le parasite par cette voie.

En résumé, l'analyse de la séquence de CLP et de ses homologues avec Caliban suggère que cette protéine pourrait avoir un rôle de protéine cargo qui permettrait le trafic des protéines du noyau vers le cytoplasme, en impliquant l'Exportine.

En parallèle nous avons montré par différentes approches que le fragment de CLP, situé entre les AA 1 395 et 1 713 interagit avec PfPP1. D'après l'analyse de la séquence de CLP, le rôle qui pourrait lui être attribué, et les données concernant la localisation nucléocytoplasmique de PfPP1, il est possible que CLP soit en mesure de transporter PfPP1 du noyau vers le cytoplasme via l'Exportine. Et par conséquent, CLP pourrait réguler l'activité de la phosphatase en modifiant sa localisation. Chez *D. melanogaster*, ce sont les deux cents derniers AA de Caliban qui se lient au NES des protéines à transporter (BI ET AL. 2005). Mais CLP interagit avec PfPP1 via une région différente, et combiné au fait que PfPP1 ne semble pas présenter de motif d'export nucléaire, PfPP1 pourrait être exportée dans le cytoplasme par CLP mais différemment de l'export de Prospéro via Caliban chez *D. melanogaster* (BI ET AL. 2005).

## 2) Fonction de CLPf sur l'activité de la phosphatase

Dans le but d'observer le rôle de CLPf sur l'activité phosphatase de PfPP1, nous avons ensuite réalisé un test de type pNPP. Il s'avère que PfPP1, en présence de CLPf, ne montre pas de variation de son activité. Ainsi, il semblerait que CLPf ne soit ni un inhibiteur, ni un activateur de la phosphatase. Bien que ces résultats doivent être pris avec précaution du fait que le substrat pNPP ne soit ni physiologique ni spécifique de PfPP1, l'utilisation du modèle hétérologue de l'ovocyte de Xénope semble confirmer l'absence d'effet de CLP sur PP1. En effet, CLPf est dans l'incapacité d'inhiber XePP1 (pas d'activation de la maturation des ovocytes), ni de l'activer (pas d'inhibition de la maturation des ovocytes en présence de progestérone). Néanmoins, la vérification de l'expression de CLPf indique qu'elle est produite mais en faible quantité après la micro-injection en ovocyte de Xénope, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet observé. Ainsi nous pourrions augmenter la concentration d'ARNm de CLPf injectée. De plus, malgré la forte homologie entre les protéines phosphatases de type 1 de *P. falciparum* et de Xénope, il aurait été intéressant de vérifier l'interaction entre CLPf et XePP1 en réalisant une co-immunoprécipitation.

Ainsi, le fragment de CLPf obtenu suite au criblage ne présente pas de fonction sur la phosphatase. Cependant, la protéine étudiée ne correspondant qu'à une portion de CLP, il est possible que cette dernière possède tout de même une fonction sur PfPP1 mais que la région qui porte cette fonction ne soit pas présente dans le fragment RCC-PIPf.

Néanmoins, l'absence de fonction sur la phosphatase est en accord avec son rôle supposé de protéine cargo. Pour confirmer ce rôle, il serait intéressant d'étudier la localisation de CLP au cours du cycle de *Plasmodium*. Si CLP est impliquée dans le transport des protéines parasites, nous pouvons nous attendre à observer une localisation nucléocytoplasmique. Il est également possible de déterminer l'importance de CLP à la survie du parasite par la réalisation d'un Knock-Out (KO), après s'être assuré de l'accessibilité du locus de CLP par l'obtention d'un Knock-In. PfPP1, étant elle-même essentielle au parasite, nécessite d'être finement régulée. Par conséquent, le KO de CLP pourrait empêcher sa régulation par modification de sa localisation, ce qui pourrait avoir un effet délétère pour le parasite. Nous pourrions également réaliser un Knock-Out conditionnel (KOc) chez *P. berghei* puisque PfCLP et PbCLP présentent 44 % d'identité, et les zones conservées entre Caliban et PfCLP le sont aussi chez PbCLP. Il est tout de même à noter que PbCLP (1 738 AA) est un peu plus courte que PfCLP (2 180 AA). La réalisation d'un KOc pourrait nous donner une indication quant à l'importance de CLP à chaque stade de développement du parasite, que ce soit lors du cycle intra-érythrocytaire ou lors du cycle sexué chez le moustique.

## II. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de RCC-PIP

Dans cette partie, nous avons étudié une seconde protéine : RCC-PIP au niveau de son interaction avec PfPP1, du motif impliqué dans cette liaison, de sa fonction sur la phosphatase, de son rôle dans la survie de *Plasmodium* et de sa localisation au cours du cycle érythrocytaire du parasite.

### A. Caractérisation moléculaire de RCC-PIP

#### 1) Analyse *In silico*

RCC-PIP est une protéine spécifique de *Plasmodium* et ne possède pas d'homologie hormis au niveau des motifs RCC1. Il est connu, chez d'autres organismes, que ces motifs RCC1 sont capables d'interagir avec des protéines et de l'ADN (HADJEBI ET AL. 2008). Ces motifs sont présents, le plus souvent au nombre de sept, chez la protéine du même nom. La protéine RCC1 humaine a été cristallisée et a servi à la modélisation des motifs RCC1 de RCC-PIP. Il semble que la structure soit relativement similaire à celle de la protéine RCC1 humaine (Figure 48) (RENAULT ET AL. 1998).

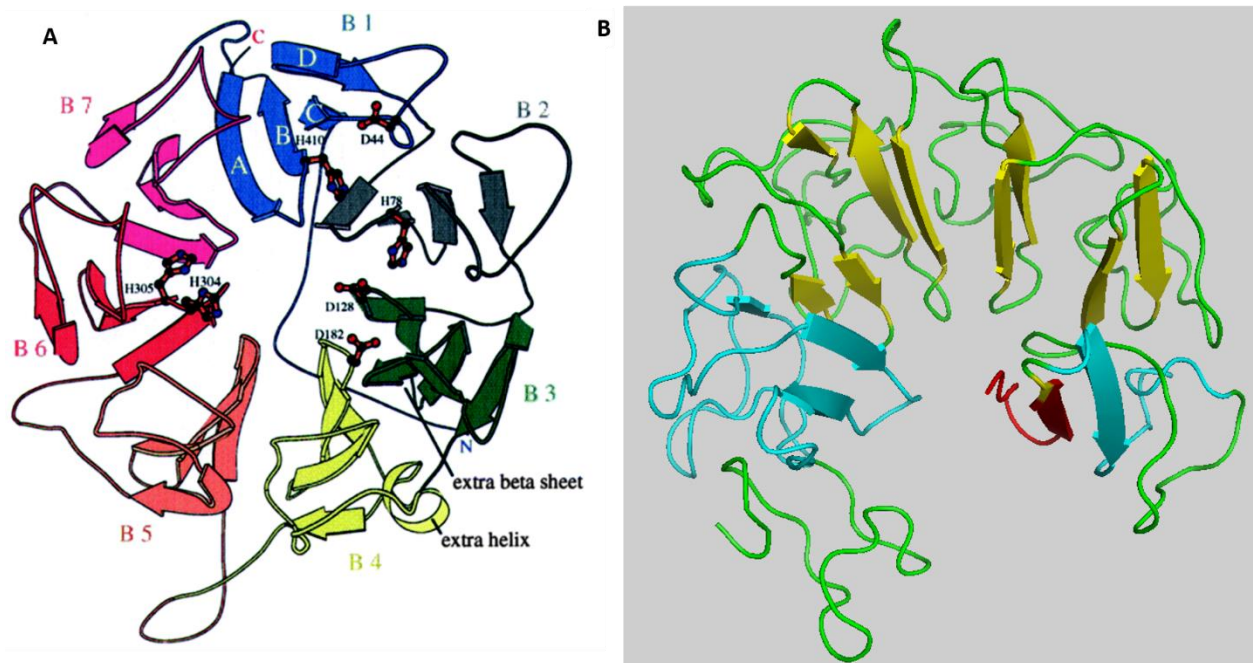


Figure 48: Modélisation 3D des motifs RCC1. A) Modélisation de la protéine RCC1 humaine (RENAULT ET AL. 1998). B) Modélisation des motifs RCC1 de RCC-PIP à partir des motifs RCC1 de la protéine humaine du même nom (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi>).

Or, la protéine RCC1 humaine est capable d'interagir d'un côté avec la protéine Ran-GTP pour effectuer son rôle de facteur d'échange nucléotidique de guanidine, et de l'autre avec de l'ADN. Cette liaison à l'ADN est facilitée par la liaison de RCC1 aux histones H2A et H2B chez l'homme et la levure (SEKI, HAYASHI, ET NISHIMOTO 1996; NEMERGUT ET AL. 2001). Cette liaison aux histones est à l'origine du nom RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1) puisque ces interactions permettent de réguler la condensation des chromosomes. D'ailleurs XerCC1, en s'associant à la chromatine et à la protéine RanGTP, contrôle le transport nucléocytoplasmique, la formation des fuseaux mitotiques et l'assemblage de l'enveloppe nucléaire (NEMERGUT ET AL. 2001). Néanmoins, il n'a pas été montré que les protéines contenant des motifs RCC1 soient en mesure d'interagir avec l'histone H2A. Cependant, la protéine humaine HERC2 est en mesure d'interagir avec l'histone H2A déubiquitineuse USP16, notamment via son domaine RLD (RCC1-Like Domain) (ZHANG, YANG, ET WANG 2014). Et, comme son nom l'indique, USP16 déubiquitine l'histone H2A en réponse aux dommages de l'ADN. Par conséquent HERC2 ne présente pas d'interaction directe avec l'histone H2A.

En amont des motifs RCC1, se situe un motif RVxF, or, celui-ci n'est pas conservé chez *Plasmodium berghei*. De plus, ce motif RVxF (RIIGF) ne correspond pas à un motif long et est atypique. Ces observations, associées au fait qu'aucun fragment de RCC-PIP obtenu lors du criblage de banque ne le contienne, laisse penser que ce motif ne serait pas un site de liaison à PfPP1.

Par contre, la partie Ct de la protéine ne présente aucune homologie avec d'autres protéines, ce qui suggère qu'elle ait un rôle spécifique à *Plasmodium*. On peut remarquer l'existence de douze répétitions GKHDQH successives dont le rôle nous est inconnu. Ces



motifs, inexistant chez *P. berghei*, pourraient avoir un rôle spécifique à *P. falciparum*. Il aurait pu être intéressant de réaliser un criblage de la banque d'ADNc de *P. falciparum* avec la partie Ct de RCC-PIP afin de déterminer son interactome, et nous permettre d'élaborer une hypothèse sur le rôle de cette protéine chez le parasite. Il est également à noter que la répétition de ce motif est observée chez d'autres protéines de *P. falciparum* comme une protéine de liaison à l'ARN putative (PF3D7\_1139100), une petite ribonucléoprotéine nucléaire U1 (PF3D7\_1367100) ou encore l'ADN polymérase I (PF3D7\_0625300).

La protéine complète renferme un grand nombre d'acides aminés de type asparagine et acide aspartique, et peu de peptide de cette protéine ont été détectés par spectrométrie de masse, ce qui laissait planer un doute quant à l'existence de cette protéine telle qu'elle est annotée dans PlasmoDB.

## 2) Vérification de l'existence du transcrite de RCC-PIP chez *Plasmodium*

Ainsi nous avons souhaité tout d'abord vérifier l'existence du transcrite de RCC-PIP chez le parasite. Du fait de sa taille, nous n'avons pas réussi à amplifier la séquence codante entière sur une RT-PCR réalisée à partir d'ARNm d'une culture asynchrone de *P. falciparum*. Par conséquent, nous avons amplifié la séquence codante par PCR chevauchantes, puis nous avons séquencé les fragments obtenus. Ainsi la protéine RCC-PIP existe telle qu'elle est annotée sur PlasmoDB, à la différence d'une base mais qui ne modifie pas la séquence protéique.

Lors de ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à l'étude de fragments de la protéine de RCC-PIP. En effet, la taille de la protéine étant très importante et n'ayant pas obtenu la séquence codante complète du gène *RCC-PIP*, nous étions dans l'incapacité de produire la protéine recombinante entière. Pour contourner cela, nous aurions pu utiliser un gène synthétique, mais il aurait fallu utiliser des systèmes spécifiques pour produire cette protéine de 396 kDa. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer la levure *Pichia pastoris*, ou bien des cellules d'insectes. Cependant, la détection de la protéine recombinante par western-blot, surtout en levure, reste compliquée du fait du poids moléculaire de la protéine.

Ainsi nous avons utilisé le fragment obtenu lors du criblage (AA 863 à 1 108) pour étudier son interaction avec PfPP1.

## B. Etude de l'interaction RCC-PIP/PfPP1 et implication du motif RVxF

Nous avons employé différentes approches, telles que le GST pull-down, l'immunoprécipitation ou encore le test de type ELISA, qui nous ont permis de confirmer l'interaction entre RCC-PIP<sub>fc</sub> et PfPP1.

Lors de l'analyse de la séquence, nous avons identifié un motif RVxF correspondant à la séquence <sup>980</sup>KSVSF<sup>984</sup>, qui pourrait être impliqué dans cette interaction. Par conséquent nous avons réalisé une mutagenèse dirigée pour modifier ce motif en <sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>, l'acide aminé alanine (A) étant plus neutre que la Valine (V) et la phénylalanine (F). Ces mutations entraînent une diminution de l'interaction d'environ 50 % en test de type ELISA. L'interaction

résiduelle du mutant RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> avec PfPP1 en ELISA suggère un éventuel second motif d'interaction. Ainsi nous avons inséré un stop prématuré par mutagénèse dirigée juste en aval du motif RVxF afin de déterminer sa position. La protéine tronquée démontre une interaction plus faible avec PfPP1 comparée à la protéine sauvage. Nous pouvons supposer que l'interaction résiduelle est due à la présence du motif RVxF. Par la suite une protéine RCC-PIPfc mutée dans le motif RVxF et tronquée, a été produite. Cependant celle-ci présente une interaction avec PfPP1, et cette interaction semble plus forte que celle observée avec le mutant RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup>. L'incohérence des résultats obtenus peut être liée à l'utilisation du test d'interaction de type ELISA. En effet, ce type d'expérimentation implique l'immobilisation sur un support de la protéine RCC-PIP, mutée ou non, ce qui peut entraîner une détection, même faible, de l'interaction entre PfPP1 et la protéine immobilisée.

Afin de clarifier le rôle de RVxF dans l'interaction et l'existence d'autres domaines de liaison, nous avons testé l'interaction du mutant RCC-PIPfc-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> avec PfPP1 en double hybride de levure et en immunoprécipitation. Les résultats obtenus par ces deux approches démontrent une abolition de l'interaction entre PfPP1 et RCC-PIPf ou RCC-PIPfc lorsque le motif RVxF est muté. Ces résultats indiquent que le motif RVxF de RCC-PIP est non seulement impliqué dans la liaison de cette protéine à PfPP1, mais il semble en être le contributeur majeur. Il est à noter que l'importance du motif RVxF de partenaires régulateurs de PfPP1 a été observée par le passé, notamment pour l'inhibiteur 3 (PfI3) et le facteur d'initiation de la traduction eucaryote de type 2 sous-unité  $\beta$  (PfeIF2 $\beta$ ) (FREVILLE ET AL. 2012; TELLIER ET AL. 2016).

Il pourrait être intéressant de vérifier que la protéine complète RCC-PIP est capable d'interagir avec PP1 chez le parasite par la réalisation d'une immunoprécipitation de RCC-PIP avec le sérum dirigé contre RCC-PIPfc, et analyser son interactome en spectrométrie de masse. Mais avant cela, il faudrait s'assurer que le sérum dirigé contre le fragment de RCC-PIP est en mesure de reconnaître la protéine native. Un premier test a été réalisé, mais la protéine n'a pas pu être détectée dans des extraits parasitaires préparés à partir d'une culture mixte de *P. falciparum*. Nous supposons que cela peut être dû à la taille de la protéine, qui rend le transfert difficile, ou bien que la protéine est présente mais en trop faible quantité pour être observée par western-blot. Pour faciliter la détection, nous souhaitons réaliser une immunoprécipitation de la protéine RCC-PIP tagguée -HA à partir des parasites KI avec un anticorps dirigé contre ce tag fixé à des billes de protéine G agarose. Cette approche nous permettrait de concentrer la protéine et éventuellement de révéler la protéine avec un anticorps anti-RCC-PIPfc.

Nous avons ensuite analysé le rôle de RCC-PIP sur l'activité de la phosphatase et l'implication du motif RVxF dans celle-ci.



### C. Fonction de RCC-PIP sur l'activité de PfPP1, et implication du motif RVxF

Nous avons démontré par la réalisation d'un test pNPP que RCC-PIP est capable d'activer la phosphatase. Cependant, cette augmentation d'activité n'est significative qu'à une concentration élevée de RCC-PIP. Par contre, à cette même concentration la protéine RCC-PIP-<sup>980</sup>KSASA<sup>984</sup> ne présente pas d'effet significatif sur l'activité phosphatase. Cette observation semble logique puisque cette protéine interagit peu en ELISA, voire pas du tout en IP ou en double hybride de levure, avec PfPP1.

L'effet de RCC-PIP sur l'activité de PfPP1, observé dans le test pNPP, étant assez faible, nous avons utilisé le modèle hétérologue de l'ovocyte de Xénope. L'ovocyte de Xénope est une cellule polarisée bloquée en prophase I de méiose (phase G2) sous l'action d'un certain nombre de molécules dont PP1. Nous avons analysé l'effet de la micro-injection de l'ARNm de RCC-PIPf en ovocyte de Xénope. Dans un premier temps, nous avons pu observer que l'injection de RCC-PIPf ne déclenche pas la maturation des ovocytes, mesurable par l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal (GVBD). Ceci pourrait indiquer que RCC-PIP n'est pas un inhibiteur de la PP1 de Xénope. Dans ce modèle, il a été montré que la micro-injection de sous-unités activatrices de PP2A, phosphatase également impliquée dans le blocage des ovocytes en phase G2, prévient la GVBD induite par la progestérone (**VANDOMME ET AL. 2014**). Aussi, nous avons testé si RCC-PIP pourrait avoir le même effet sur PP1. Cependant, lorsque la maturation des ovocytes est induite par ajout de progestérone dans le milieu, nous n'observons pas d'effet suite à la micro-injection de l'ARNm de RCC-PIPf. Néanmoins, de façon intéressante, nous avons observé qu'en présence d'une faible quantité de progestérone, habituellement incapable d'induire la GVBD, la micro-injection de l'ARNm de RCC-PIPf déclenche la maturation des ovocytes. La faible quantité de progestérone serait donc capable d'initier la GVBD sans pouvoir pour autant permettre son enclenchement et RCC-PIPf aurait besoin de cette faible quantité de progestérone pour entraîner la GVBD. Nous pouvons supposer que les voies d'activation déclenchées par la progestérone et par RCC-PIP sont différentes. En effet, RCC-PIPf pourrait, en agissant sur la phosphatase, permettre la dissociation du complexe cdc25/14-3-3 phosphorylé. Ainsi cdc25 pourra être phosphorylée et induire la GVBD (**SCHMITT ET NEBREDÁ 2002**). Afin de confirmer que RCC-PIP intervient via XePP1, il faudrait vérifier par immunoprécipitation que ces deux protéines interagissent. Si c'est le cas, il serait possible que l'inhibition de XePP1 par RCC-PIP contribue au déclenchement de la GVBD. Cependant cette inhibition ne serait pas assez forte pour que cette voie soit activée en l'absence de progestérone puisque nous n'observons pas de maturation en présence de RCC-PIPf seule.

Ainsi, nous avons observé que RCC-PIP régulerait différemment l'activité de PP1 selon l'approche utilisée. Le test pNPP serait en faveur d'un rôle activateur. Cependant le substrat pNPP n'est pas spécifique de PfPP1, et il se pourrait que le complexe RCC-PIP/PfPP1 présente des difficultés pour le déphosphoryler. En ce qui concerne les tests d'activité en ovocytes de Xénope, l'effet de RCC-PIPf dépendant de la progestérone sur la GVBD est différent de ce qui est observé habituellement dans le cas d'un activateur ou d'un inhibiteur de PfPP1 (**FREVILLE ET AL. 2012; FREVILLE ET AL. 2013; FREVILLE ET AL. 2014; VANDOMME ET AL. 2014; TELLIER ET AL.**

2016). Nous avons démontré la production de la protéine RCC-PIPf suite à l'injection de l'ARNm. Cependant il faudrait s'assurer que RCC-PIPf interagit avec la PP1 endogène. Dans ce cas l'implication du motif RVxF dans la fonction régulatrice de la phosphatase pourrait être également étudiée.

Enfin, pour rappel, l'ARNm et la protéine recombinante de RCC-PIPf et RCC-PIPfc respectivement, ne sont que des fragments de la protéine entière. Il se pourrait qu'il existe d'autres domaines participant à la fonction de RCC-PIP sur l'activité phosphatase de PfPPP1 se situant en dehors de ce fragment, et qui permettraient d'amplifier son rôle.

#### D. Interactome des motifs RCC1

Par la suite nous nous sommes attachés à étudier les motifs RCC1 présents en Nt de RCC-PIP. Il est connu que ces motifs RCC1 sont capables d'interagir avec des protéines (HADJEBI ET AL. 2008). Ainsi nous avons réalisé un mini-criblage d'une banque d'ADNc de *P. falciparum* en utilisant ces motifs comme appât. Cela nous a permis d'identifier PfCDPK7 comme protéine interagissant avec les motifs RCC1 de RCC-PIP. Lors du criblage, nous n'avons obtenu qu'un fragment de PfCDPK7 qui correspond aux AA 994 à 1 291 sur les 2 265 AA que compte la protéine, et que nous avons nommé PfCDPK7f. PfCDPK7 possède un rôle majeur dans le développement du parasite au stade asexué, puisque la réalisation d'un Knock-Out de cette kinase entraîne un défaut de développement des parasites au stade anneau et un faible nombre de mérozoïtes filles (KUMAR ET AL. 2014). Cependant elle n'est pas indispensable puisque le parasite survit à l'interruption du gène *PfCDPK7*. Par contre, les tentatives de Knock-Out chez *P. berghei* n'ont pas abouti, ce qui tend à démontrer que PbCDPK7 est essentielle au parasite (TEWARI ET AL. 2010). Un homologue de PfCDPK7 existe chez *Toxoplasma gondii*, et est essentielle à la survie du parasite car il possède un rôle majeur dans la réplication (MORLON-GUYOT ET AL. 2014).

L'approche du double hybride de levure avec les motifs RCC1 ne nous permet pas d'identifier le motif avec lequel interagit PfCDPK7f. Pour le déterminer, nous pourrions insérer un stop prématuré juste après le motif RCC1\_2, ou le premier motif RCC1 par mutagenèse dirigée. L'observation des interactions suite au croisement en levure de ces mutants avec PfCDPK7f permettrait de définir plus précisément les régions impliquées.

Les motifs RCC1, étant conservés dans différentes protéines, il est possible que l'interaction entre RCC et CDPK7f soit non spécifique. En effet, la protéine native peut présenter un repliement conformationnel permettant la fixation de certaines protéines aux motifs RCC1. Mais l'utilisation de ces seuls motifs pour tester l'interaction pourrait modifier cette conformation et faciliter des interactions qui normalement ne devraient pas avoir lieu. Pour compléter cette étude, il serait intéressant de vérifier l'existence du complexe RCC-PIP-CDPK7 chez le parasite. Pour cela, nous pourrions réaliser une immunoprécipitation chez le parasite, en utilisant soit le sérum dirigé contre RCC-PIPfc (à condition qu'il soit en mesure de reconnaître la protéine native), soit la souche de parasite KI-RCC-PIP qui permet d'avoir une protéine tagguée -HA. L'interaction entre RCCPIP et PfCDPK7 pourrait être révélée par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre PfCDPK7f. S'il n'est pas possible de générer cet

anticorps chez la souris, l'interactome de RCC-PIP serait analysé par spectrométrie de masse. Actuellement, deux interactomes sont disponibles : l'un réel sur plasmDB obtenus par double hybride de levure avec RCC-PIP comme appât, et l'autre hypothétique sur String-DB par co-expression. Dans aucune de ces études PfCDPK7 n'apparaît comme potentiel partenaire de RCC-PIP. L'analyse de ces données montre qu'il n'y a qu'une seule protéine commune. Il s'agit d'une protéine conservée dont la fonction n'est pas connue (PF3D7\_1025900). Par ailleurs, la majorité des protéines interagissant avec RCC-PIP en double hybride sont des protéines conservées de fonction inconnue (56 %). Les autres sont notamment :

- un antigène : Tryptophan/Threonine-rich antigen (TryThrA, PF3D7\_0830500),
- une protéine se liant aux antigènes : Erythrocyte Binding antigen-181 (EBA181, PF3D7\_0102500),
- des protéines exportées : Exported protein 2 (Exp2, PF3D7\_1471100) ou *Plasmodium* exported protein de fonction inconnue (PF3D7\_0113200),
- un facteur d'activation protéique : neutral sphingomyelinase activation factor protein putative (PF3D7\_1124100),
- une alanyl aminopeptidase de la famille M1 (PF3D7\_1311800),
- ou encore un facteur de transcription : transcription factor with AP2 domain (AP2-L, PF3D7\_0730300).

Parmi ces protéines, il n'y en a que trois qui interagiraient avec RCC-PIP, il s'agit d'une protéine de fonction inconnue (PF3D7\_1248700), de l'alanyl aminopeptidase de la famille M1, et du facteur de transcription avec un domaine AP2 (AP2-L).

L'interactome virutel de RCC-PIP disponible sur String-DB, quant à lui, présente des protéines de rhoptries : les RhOptry Neck protein 3 et 4 (RON3 : PF3D7\_1252100 et RON4 : PF3D7\_1116000) et RhopH2 (High molecular weight rhoptry 2, PF3D7\_0929400). Fait intéressant, la protéine RhopH3 a été retrouvée lors du criblage en double hybride de levure avec les motifs RCC1 de RCC-PIP. Après avoir re-croisé les levures exprimant ces deux protéines, nous avons conclu que l'interaction RhopH3/RCC1 était un faux positif. Mais il se peut que l'interaction soit observable par d'autres approches comme le GST pull-down ou l'immunoprécipitation. Les autres protéines interagissant avec RCC-PIP sont des enzymes telles que la guanylylcyclase (PF3D7\_1138400), la rhomboid protease ROM4 (PF3D7\_0506900), et la sphingomyeline phosphodiesterase (PF3D7\_1238600).

La réalisation de l'interactome de l'intégralité de la protéine d'intérêt pourrait nous confirmer l'interaction de RCC-PIP non seulement avec PfCDPK7 mais également avec PfPPP1. Cependant, cette approche ne nous permettrait pas de vérifier si la kinase et la phosphatase sont capables de se fixer en même temps à RCC-PIP, ou si une compétition existe entre ces deux enzymes. La présence du triplexe pourrait être démontrée par l'utilisation du triple hybride de levure. Nous avons déjà été en mesure de cloner le fragment de RCC-PIP contenant les motifs RCC1 et RVxF, mais la production de la protéine n'avait pas pu être démontrée. Il n'est pas rare de rencontrer des difficultés pour démontrer l'expression des protéines en levure alors qu'elles sont pourtant bien exprimées. Par conséquent, il est

possible que la protéine contenant les motifs RCC-PIP et RVxF soit exprimée par la levure, mais que nous n'ayons pas réussi à la détecter. Le triple hybride de levure nous permettrait d'observer la formation d'un triplex, ou bien une compétition entre CDPK7 et PP1 pour se fixer à RCC-PIP.

Suite aux résultats obtenus, il semblerait que RCC-PIP soit capable d'interagir d'un côté via son motif RVxF avec une phosphatase : PfPP1, et de l'autre avec une kinase CDPK7 grâce à ses motifs RCC1 (**Figure 49**). De façon surprenante, RCC-PIP serait donc capable d'interagir avec des enzymes possédant des activités antagonistes.

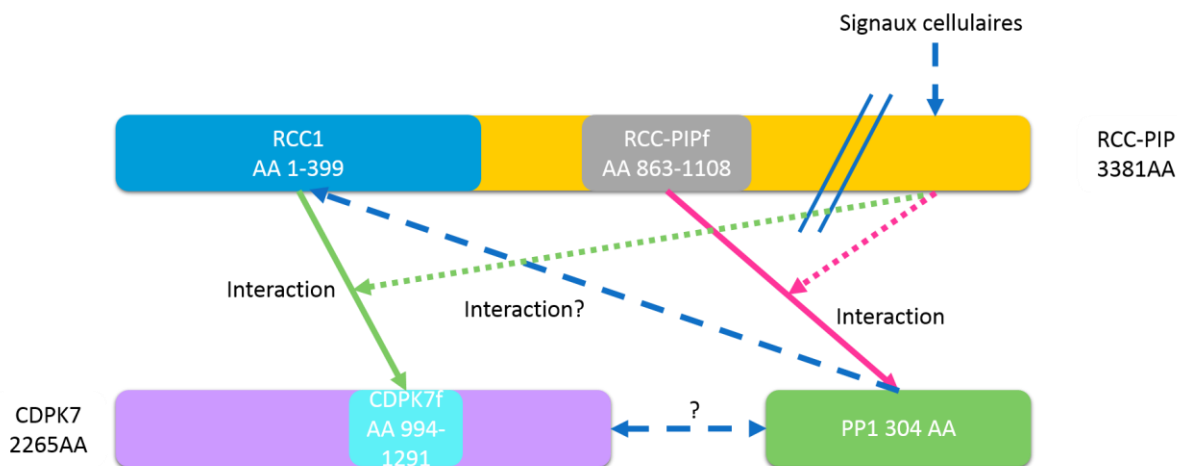


Figure 49: Lien entre RCC-PIP et ses partenaires. En jaune est représentée la protéine RCC-PIP, en bleu le fragment contenant les motifs RCC1 et en gris le fragment de RCC-PIP obtenu suite au criblage de la banque d'ADNc de *P. falciparum* avec PfPP1. Tandis que PfPP1 est représentée en vert et CDPK7 en mauve. Le fragment de CDPK7 obtenu suite au criblage de banque d'ADNc de *P. falciparum* avec les motifs RCC1 de RCC-PIP est indiqué en turquoise. Il se pourrait que les signaux cellulaires soient en mesure d'activer l'interaction de RCC-PIP avec la kinase CDPK7 (flèches vertes) et/ou avec la phosphatase PP1 (flèches roses). Les flèches en pointillés désignent les potentiels liens entre ces trois protéines qui ne sont pas déterminés, ainsi que le lien entre les signaux cellulaires et les interactions entre RCC-PIP et les deux enzymes, qui n'est pas démontré.

L'existence de protéines capables d'interagir avec des kinases et des phosphatases, a été démontrée notamment chez l'homme. En effet, il existe des protéines AKAP (A-Kinase Anchoring Proteins) qui permettent d'interagir à la fois avec la PKA et une phosphatase (**NYGREN ET SCOTT 2015**). La protéine AKAP220 est capable d'interagir notamment avec la PP1 via le motif d'interaction RVxF dégénéré (**SCHILLACE ET SCOTT 1999**). Ces protéines AKAPs ont un rôle dans la signalisation cellulaire en séquestrant ou non les enzymes en fonction des signaux qu'elle reçoit (**LANGEBERG ET SCOTT 2015**). Par conséquent, nous pourrions imaginer que la partie Ct de RCC-PIP permette de recevoir des signaux cellulaires qui détermineraient son interaction avec CDPK7 et/ou PP1. Mais il est à noter que ces protéines AKAPs ne sont pas identifiées chez *Plasmodium*.

Chez les mammifères, il a été démontré que la protéine TD-60, possédant sept répétitions de motifs RCC1 et sept de motifs RCC1\_2, est nécessaire au recrutement de la kinase Aurora-B afin de réguler le clivage de la cellule (**MOLLINARI ET AL. 2003**). Néanmoins, l'interaction directe entre ces deux protéines n'a pas été observée, mais cela est plausible puisque TD-60 possède un rôle de protéine cargo. Cela tend à confirmer qu'une protéine

possédant des motifs RCC1 est en mesure de réguler l'activité d'une kinase en modifiant sa localisation. De plus, cette protéine interagit avec une petite GTPase Rac1. Il aurait été intéressant d'étudier si RCC-PIP est capable d'interagir également avec l'une des protéines appartenant aux petites GTPases (ou protéines G) puisque ces protéines sont décrites chez *Plasmodium*.

RCC-PIP interagissant à la fois avec PfPPP1 et PfCDPK7, nous avons étudié si une interaction existe entre PfPPP1 et PfCDPK7. Les premiers résultats obtenus par GST pull-down indiquent que ces deux protéines ne seraient pas en mesure d'interagir. Néanmoins, cette interaction ne serait pas impossible puisque l'existence de phosphatase phosphorylée a été démontrée. C'est le cas de PfPPKL dont l'activité est régulée par son niveau de phosphorylation (GUTTERY ET AL. 2012).

Nous avons également émis l'hypothèse que PfPPP1 pourrait interagir avec la protéine recombinante RCC. En effet, lors de l'analyse de la séquence de la protéine RCC-PIP, nous avons identifié un motif RVxF en amont des motifs RCC1. Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction entre ces deux protéines en double hybride de levure, GST pull-down et test de type ELISA.

A côté de l'interaction des motifs RCC1 avec des protéines, il a été montré que la protéine RCC1 humaine ou de Xénope, interagit avec de l'ADN, et cette liaison est favorisée par l'interaction de RCC1 avec les histones H2A et H2B (SEKI, HAYASHI, ET NISHIMOTO 1996; NEMERGUT ET AL. 2001; HADJEBI ET AL. 2008; TAN 2012). Fait intéressant, ces histones ont été retrouvées lors du criblage de la banque d'ADNc de *P. falciparum* en utilisant PfPPP1 comme appât (HOLLIN ET AL. 2016). La liaison entre les motifs RCC1 de RCC-PIP et l'ADN pourrait être observée par la réalisation d'un gel retard. Si une interaction est observée, cela indiquerait que RCC-PIP pourrait avoir pour rôle de ramener la phosphatase à ses partenaires/substrats, et donc avoir un rôle à jouer dans la condensation de la chromatine. Il a également été démontré que les histones, en se liant à XerCC1, stimulent son activité catalytique. XerCC1 est d'ailleurs impliquée dans la mise en place du gradient Ran-GTP qui conduit à l'assemblage de l'enveloppe nucléaire, le transport nucléaire et d'autres événements se déroulant dans ce compartiment cellulaire (NEMERGUT ET AL. 2001).

## E. Le rôle de RCC-PIP chez *Plasmodium* et sa localisation

### 1) Chez *P. falciparum*

La réalisation d'un Knock-In chez *P. falciparum* a démontré l'accessibilité du locus du gène *RCC-PIP* en insérant un tag -HA en Ct. Cependant, 51 semaines de culture sous pression de sélection ont été nécessaires avant d'observer, par génotypage, l'intégration de la construction au génome du parasite. Nous avons également effectué un Knock-Out de *RCC-PIP* chez *P. falciparum*, mais l'intégration du plasmide n'a pas encore été détectée au bout de 41 semaines de cultures. Il est nécessaire d'attendre 10 semaines de plus avant de se prononcer sur une éventuelle essentialité du gène pour la survie du parasite, puisque c'est le

temps qui était nécessaire à l'intégration du Knock-In. Si, au bout de ce laps de temps l'intégration du KO n'est toujours pas détectée, nous pourrions supposer que RCC-PIP est essentielle à la survie du parasite.

Néanmoins, la réalisation de KO en utilisant le vecteur pCAM-BSD permet uniquement de voir si le gène est essentiel ou non. Or, s'il est indispensable à la survie du parasite, il n'y a aucun moyen de savoir à quel stade RCC-PIP intervient. Ainsi l'idéal serait d'utiliser un système inducible de KO chez le parasite. Peu d'études utilisant ce système chez *P. falciparum* ont été publiées. L'équipe du Dr. Blackman a mis au point une approche mettant en jeu le système Cre/Lox (Figure 50. A) (COLLINS, ET AL. 2013). Une construction contenant le gène d'intérêt, suivi d'un site LoxP, de la région 3'UTR du gène *pbdhfr*, du gène de la *dhfr* humaine (résistance à l'antibiotique WR99210), d'un nouveau site LoxP et de la cassette DiCre. Il a été démontré que l'ablation de la région 3'UTR peut inhiber l'expression du gène d'intérêt. Dans ce système la région 3'UTR a été modifiée en remplaçant par la région 3'UTR de *pbdhfr*, ce qui ne modifie pas pour autant l'expression du gène (YEOH ET AL. 2007). Ensuite le système Cre/Lox est utilisé en ajoutant de la rapamycine, ce qui permet la dimérisation de la recombinase DiCre et par conséquent l'excision de l'ADN se situant entre les deux sites LoxP. Ainsi le gène d'intérêt ne présente plus de région 3'UTR, et donc de site de polyadénylation, ce qui devrait conduire à l'inhibition de son expression. Cependant, il existe un site de polyadénylation dans la cassette DiCre qui, se retrouve alors à proximité du gène d'intérêt, et permet donc l'expression de celui-ci. Malgré cela, ils ont tout de même démontré que l'excision via la rapamycine présente une efficacité proche de 100 %.

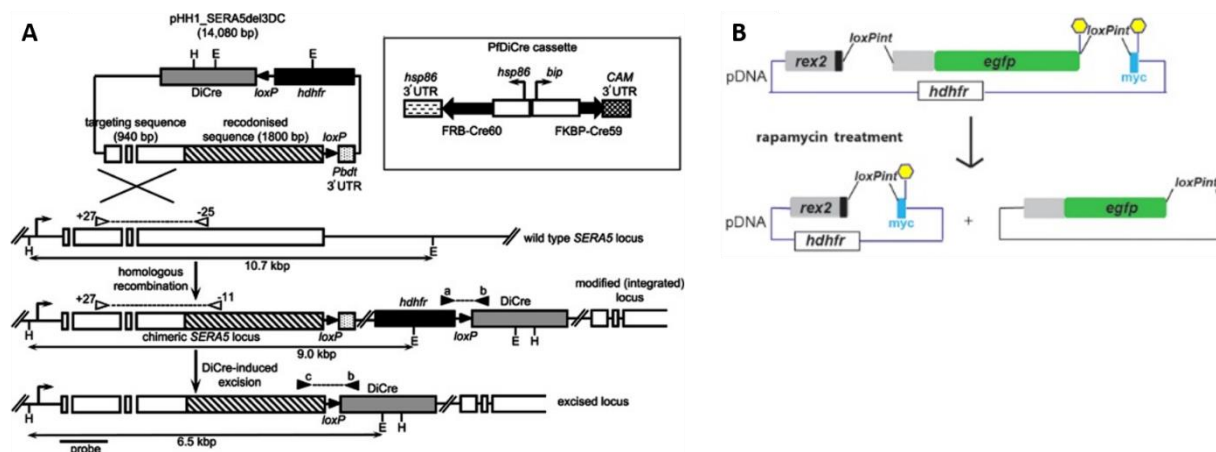


Figure 50 : Systèmes de Knock-Out conditionnel chez *P. falciparum*. A) La construction est réalisée en insérant la séquence d'intérêt dans un vecteur contenant la région 3'UTR du gène *pbdhfr* et le gène *hdhfr* qui permet de sélectionner les parasites contenant la construction. A cela, s'ajoutent une cassette DiCre détaillée dans l'encart en haut à droite, et deux sites LoxP se situant l'un en 5' du gène *hdhfr* et l'autre en 3' du gène *pbdhfr*. D'après (COLLINS, DAS, ET AL. 2013). B) Amélioration du système DiCre : une construction contenant le gène d'intérêt avec un site LoxP interne est réalisée. Elle présente également une cassette pour la GFP suivie d'un stop et d'un second site LoxP, d'un second stop et d'un tag myc. La recombinase Cre, dont la cassette est déjà présente chez le parasite, est activée par dimérisation en ajoutant la rapamycine, ce qui permet l'excision. D'après (JONES ET AL. 2016).

En s'appuyant sur ces premiers travaux, Jones et al. ont amélioré le système (JONES ET AL. 2016). Pour cela, ils utilisent une souche de *P. falciparum* exprimant la cassette DiCre précédemment utilisée par Collins et al (COLLINS, DAS, ET AL. 2013). Ces parasites sont



transfectés avec une construction contenant : le gène d'intérêt avec un site LoxP interne, la GFP suivie d'un codon stop, un second site LoxP, un codon stop et un tag myc (**Figure 50. B**) (**JONES ET AL. 2016**). Une fois intégrée dans le génome, la rapamycine peut être ajoutée. Ainsi, les sous-unités de la recombinase Cre sont dimérisées et le fragment d'ADN se situant entre les sites LoxP est excisé. Cependant, l'efficacité de recombinaison n'est pas de 100 %, mais la présence de parasites recombinants peut être vérifiée facilement par PCR, ou bien grâce au tag GFP qui permet de les observer par western-blot et/ou par immunofluorescence.

Cependant, cette approche, ainsi que le KO classique, peuvent être longs car *P. falciparum* possède un faible taux de recombinaison. Mais depuis peu, la technique du CRISPR-Cas9, qui est en cours de mise au point au laboratoire, permet d'intégrer les constructions en quelques jours (**GHORBAL ET AL. 2014**). Cette technique consiste à transfecter deux plasmides chez le parasite. Le premier contient l'endonucléase Cas9, ainsi qu'une cassette de résistance à la DSM1 (Dihydroorotate dehydrogenase) (**Figure 51**). Le second plasmide permet la synthèse de l'ARN guide grâce à des petits éléments régulateurs nucléaires qui pourront recruter l'ARN polymérase III, et contient le modèle de l'ADN donneur pour la réparation par recombinaison homologue. Ce second plasmide porte lui aussi une résistance à un antibiotique : human dihydrofolate reductase ou WR99210. L'endonucléase Cas9 sera exprimée transitoirement afin de couper l'ADN cible et de permettre la réparation par recombinaison homologue par ajout du gène modifié (**GHORBAL ET AL. 2014**).

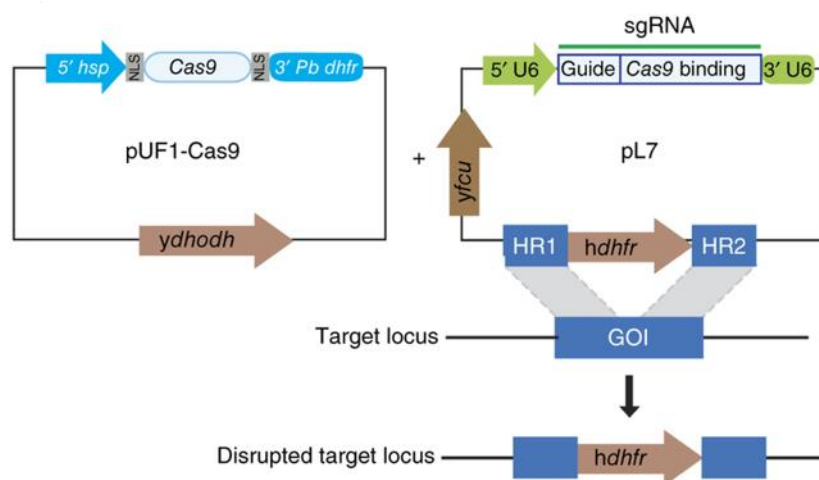


Figure 51 : Knock-Out par CRISPR-Cas9. Pour cela, deux plasmides sont transfectés. Le premier contient l'endonucléase Cas9 qui permet de couper l'ADN, et le gène de résistance à DSM1. Le second comporte le nécessaire à la synthèse de l'ARN guide, le modèle de l'ADN donneur et la cassette de résistance au WR99210. D'après (**GHORBAL ET AL. 2014**).

Une autre alternative existe afin d'étudier le rôle d'une protéine parasitaire : il s'agit d'utiliser *P. berghei*, espèce spécifique du rongeur, chez qui il est plus aisé de générer des parasites KO.

## 2) Chez *P. berghei*

Nous avons choisi d'utiliser *P. berghei* pour différentes raisons. Tout d'abord pour son côté pratique puisque l'efficacité de transfection et de recombinaison est plus élevée que

chez *P. falciparum*, et que l'on peut étudier le cycle complet du parasite reproductible en laboratoire. Nous avons également choisi ce modèle puisque RCC-PIP est présente chez *P. berghei*. Néanmoins, l'homologie entre PfRCC-PIP et PbRCC-PIP est assez faible (36 %), mais elle se concentre majoritairement sur les motifs RCC1 ainsi que la région obtenue lors du criblage avec PfPP1. On peut ainsi imaginer que son rôle principal chez *Plasmodium* soit conservé. La différence d'homologie peut être due à la différence de taille entre ces deux protéines puisque PbRCC-PIP est bien plus courte. Enfin, récemment l'équipe du Dr Soldati a mis au point un plasmide permettant l'obtention de KO conditionnel (KOc) dans cette espèce (PINO ET AL. 2012). L'approche du Knock-Out conditionnel permet d'obtenir des parasites viables et d'observer l'impact de l'extinction du gène par ajout d'AnhydroTétracycline (ATc) à chaque stade de développement du parasite (PINO ET AL. 2012). Nous avons donc utilisé ce système, réalisé la construction avec PbRCC-PIP, et effectué la transfection. Puis nous avons vérifié l'intégration du plasmide dans le génome de *P. berghei* par génotypage, et la production de la protéine qui est alors tagguée -HA par western-blot. Les parasites obtenus ont ensuite été clonés. Les premiers essais d'extinction du gène par ajout d'ATc ne sont, à ce jour, pas très concluants puisque nous étions dans l'incapacité d'observer la protéine chez le témoin non traité par western-blot. De plus, nous avons réalisé un suivi de parasitémie des parasites KOc traités ou non à l'ATc, mais aucun effet n'est observé sur la croissance du parasite. Donc soit l'ATc n'est pas en mesure d'éteindre le gène, soit RCC-PIP n'est pas essentiel à la survie du parasite.

Cependant, il est à noter que le système de KOc chez *P. berghei* avec ce même plasmide a été utilisé dans deux études, et l'extinction des gènes *ptex88*, *prf* et *nmt* n'est pas efficace à 100 %. En effet, il a été observé par western-blot que les protéines sont malgré tout produites, même si l'efficacité de l'extinction des gènes est tout de même estimée aux alentours de 85-95 % (CHISHOLM ET AL. 2016; PINO ET AL. 2012). De plus, Chisholm et al ont observé que l'effet du traitement ATc est variable d'une expérience à l'autre.

A ce jour, nous ne possédons donc pas d'information claire concernant l'importance de la protéine RCC-PIP, quant à la survie du parasite. Pour contourner ce souci, nous pourrions réaliser un Knock-Out classique également chez *P. berghei*. Le résultat peut être très rapide car le taux de recombinaison est plus élevé chez *P. berghei*, et la linéarisation de la construction contribue à cette efficacité. De plus, le cycle de *P. berghei* est bien plus rapide, puisqu'il n'est que de 22 h contre 48 h pour *P. falciparum*, ce qui permet une intégration plus rapide. Cependant, cette approche nous permettra uniquement d'observer l'essentialité du gène, et non le rôle de RCC-PIP à chaque stade de développement du parasite.

Une autre approche pourrait être utilisée, il s'agit du système GOMO pour Gene Out, Marker Out développé chez *P. berghei* et *P. yoelii* (MANZONI ET AL. 2014). Ce système permet de remplacer le gène d'intérêt par une cassette fluorescente ou luminescente (Gene Out), puis de retirer le marqueur de sélection (Marker Out) afin de faciliter par la suite l'analyse phénotypique et les modifications génétiques (Figure 52). Les cassettes utilisées sont celle de la GFP ou celle de la GFP liée à la luciférase (GFP-Luc), et sont placées sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Le plasmide contient également deux gènes placés sous le contrôle



d'un seul promoteur : un gène de fusion hDHFR- $\gamma$ FCU afin de sélectionner les parasites possédant l'intégration, et un gène codant pour la protéine fluorescente mCherry. Les gènes rapporteurs de la GFP ou GFP-Luc et mCherry sont suivis chacun d'un fragment d'ADN de 1 kb correspondant à la région 3'UTR de PbDHFR-TS qui permettent l'expression des gènes rapporteurs. Ces régions 3'UTR sont également à l'origine de la recombinaison responsable de l'excision des cassettes hDHFR-  $\gamma$ FCU et mCherry. Afin d'obtenir l'intégration finale, cinq étapes sont nécessaires. Tout d'abord, les parasites sont transfectés et injectés chez une première souris traitée à la pyriméthamine, puis les parasites exprimant la GFP et la protéine mCherry sont triés au FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) et injectés dans une seconde souris. Celle-ci est traitée au 5-FC (5-fluorocytosine) afin de sélectionner les parasites ne possédant pas le gène  $\gamma$ FCU. Les parasites sont à nouveau triés au FACS afin de sélectionner les parasites exprimant uniquement la GFP et injectés à une troisième souris. Ce système est donc basé sur une sélection positive puis une sélection négative par tri cellulaire. De façon intéressante, ces étapes de tri permettent de s'affranchir du clonage des parasites. Ce clonage étant habituellement réalisé par dilution limite chez la souris, le système GOMO doit donc permettre de générer rapidement des parasites génétiquement modifiés, tout en utilisant un nombre restreint de souris.

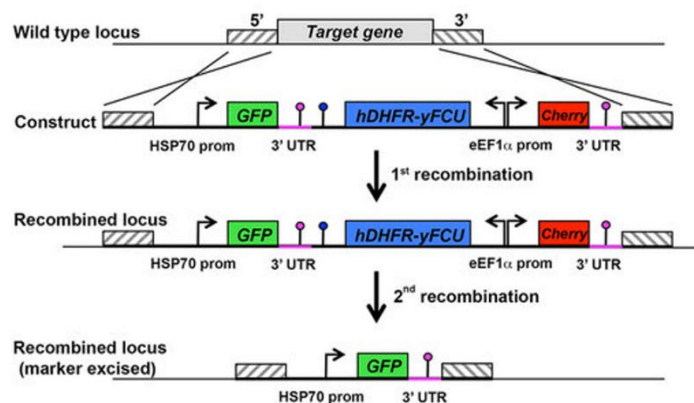


Figure 52 : Système GOMO chez *P. berghei*. La construction contient une cassette codant pour la GFP ou GFP-Luc, qui est placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Elle présente également les gènes hDHFR- $\gamma$ FCU fusionnés et une cassette codant pour la protéine mCherry qui sont sous le contrôle d'un seul promoteur. Les gènes rapporteurs de la GFP ou GFP-Luc et mCherry sont suivis d'un fragment d'ADN identique de 1 kb correspondant à la région 3'UTR de PbDHFR-TS. Ces régions sont à l'origine du Knock-Out du gène grâce à une recombinaison homologue (d'après (MANZONI ET AL. 2014)).

## F. Localisation chez *Plasmodium*

Les différentes constructions n'ont pas permis de démontrer l'importance de RCC-PIP chez *Plasmodium*, mais elles nous ont servi à déterminer la localisation de RCC-PIP chez *P. falciparum* et *P. berghei*. Que ce soit chez l'une ou l'autre des deux espèces de *Plasmodium* disponibles au laboratoire, nous avons pu déterminer une localisation de RCC-PIP au niveau du cytoplasme avec un signal périnucléaire intense.

Cette localisation de RCC-PIP est compatible avec son interaction avec PfPPP1 puisque la phosphatase est retrouvée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau (DAHER ET AL. 2006). Cependant, la localisation de PfCDPK7 est périnucléaire au stade anneau. Puis, elle se dirige vers les structures vésiculaires aux stades matures du parasite (trophozoïte et schizonte) (KUMAR ET AL. 2014). Par conséquent, il serait intéressant d'observer la localisation de RCC-PIP au stade anneau afin de confirmer qu'elle pourrait être en mesure d'interagir avec PfCDPK7 à ce stade.

Cependant, cette localisation périnucléaire de RCC-PIP, soulève des questions quant à son rôle potentiel dans le transport de protéines et/ou dans la condensation de la chromatine. En effet, si RCC-PIP a un rôle dans l'import/export des protéines, nous aurions pu nous attendre à observer la protéine à la fois dans le noyau et le cytoplasme du parasite. De plus, les motifs RCC1 de la protéine du même nom chez l'Homme sont impliqués dans la régulation de la condensation des chromosomes ce qui implique que la protéine RCC1 se situe plutôt dans le noyau (SEKI, HAYASHI, ET NISHIMOTO 1996). Or, RCC-PIP se situerait plutôt en périphérie du noyau ce qui suggère que les motifs RCC1 ne se trouvent pas suffisamment proches des chromosomes pour pouvoir réguler leur condensation. Nous pourrions supposer que RCC-PIP serait transmembranaire, les motifs RCC1 étant alors localisés dans le noyau. Cette hypothèse serait envisageable dans le cas de *P. falciparum* puisque le tag HA détecté par les anticorps utilisés pour la localisation se situe en Ct, alors que les motifs RCC1 se situent en Nt de la protéine. Cependant, d'une part aucun domaine transmembranaire n'est prédit dans la séquence de RCC-PIP et, d'autre part, nous observons la même localisation chez *P. berghei* alors que dans ce cas le tag HA se situe du côté Nt de la protéine. Cette dernière observation suggère donc que les motifs RCC1 ne se situeraient pas dans le noyau. Notons malgré tout que cela peut être dû au fait que le promoteur de RCC-PIP soit modifié chez ces parasites transfectés, contrairement au promoteur de la construction du KI chez *P. falciparum*. Pour contourner cela, nous pourrions réaliser un Knock-In chez *P. berghei*, permettant d'obtenir la protéine fusionnée à un tag GFP, et dont l'expression serait contrôlée par le promoteur endogène de PbRCC-PIP.

Pour confirmer la localisation de RCC-PIP, nous pourrions extraire les fractions nucléaires et cytoplasmiques du parasite et réaliser une IP avec l'antisérum dirigé contre RCC-PIP<sub>fc</sub>, sous réserve qu'il soit capable de reconnaître la protéine endogène. Il semblerait que ça soit le cas, puisqu'il est capable de reconnaître la protéine lors de la localisation par immunohistochimie. Puis nous réaliserons un western-blot afin de détecter la fraction dans laquelle RCC-PIP se situe. Nous pourrions également observer les immunofluorescences réalisées précédemment par microscopie électronique afin de détecter plus finement la localisation de la protéine. Cela nous permettrait de vérifier si cette localisation est cohérente avec l'interactome disponible sur PlasmoDB et string-DB. Par exemple, PfRON3 et 4 se situent dans les rhoptries et nos données actuelles ne permettent pas de déterminer si RCC-PIP se trouve également dans ce compartiment (ZHAO ET AL. 2014; ALEXANDER ET AL. 2006).

Au cours de ces recherches, nous avons pu identifier deux partenaires de PfPP1 : RCC-PIP et CLP. Nous avons confirmé l'interaction de CLP avec PfPP1, et nous avons démontré que ce partenaire ne présentait pas de fonction régulatrice sur l'activité enzymatique de PP1 *in vitro*.

Ensuite nous nous sommes attachés à étudier RCC-PIP qui démontre également une capacité à interagir avec PfPP1 par différentes approches. Mais contrairement à CLP, RCC-PIP serait en mesure de réguler l'activité phosphatase de PP1. Par conséquent nous avons choisi de nous focaliser sur cette protéine. L'analyse de la séquence a mis en évidence un motif RVxF qui pourrait être impliqué dans la liaison entre RCC-PIP et PfPP1. Cela a été confirmé par la réalisation de mutagenèses dirigées de ce motif qui conduisent à l'abolition de cette interaction par différentes approches. Nous avons également observé la présence de motifs RCC1 dont nous avons étudié l'interactome. Ainsi une interaction a été déterminée entre ces motifs RCC1 et la kinase PfCDPK7, suggérant que RCC-PIP soit une plateforme permettant la liaison de deux enzymes avec des activités antagonistes. Pour finir, l'étude du rôle chez *Plasmodium* a été entreprise par génétique inverse. La réalisation d'un Knock-In chez *P. falciparum* a permis de vérifier l'accessibilité du locus. Et nous sommes actuellement en attente de l'observation d'une éventuelle intégration du Knock-out qui nous permettrait de conclure quant à l'importance de RCC-PIP pour la survie du parasite. Nous avons également entrepris la réalisation d'un Knock-out conditionnel de RCC-PIP chez *P. berghei*, dont nous essayons d'éteindre le gène par ajout d'AnhydroTétracycline (ATc). Finalement, nous avons déterminé la localisation périnucléaire de RCC-PIP chez *P. falciparum* et *P. berghei*.

Les différents résultats obtenus sur la protéine RCC-PIP, protéine spécifique de *Plasmodium*, permettent d'approfondir nos connaissances sur le réseau de régulation par modifications post-traductionnelles impliquant PfPP1. Même s'il reste beaucoup d'études à réaliser pour préciser le rôle de RCC-PIP chez le parasite, le fait que cette protéine soit impliquée dans la régulation de PfPP1 et qu'elle soit spécifique du parasite pourrait en faire une excellente cible thérapeutique, et ainsi ouvrir de nouvelles voies de recherche pour des traitements antipaludiques.





# Bibliographie



**A**

- Abdi, Abdirahman, Sylvain Eschenlauer, Luc Reininger, et Christian Doerig. 2010. « SAM Domain-Dependent Activity of PfTKL3, an Essential Tyrosine Kinase-like Kinase of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (19): 3355-69. doi:10.1007/s00018-010-0434-3.
- Abdi, Abdirahman I., Teresa G. Carvalho, Jonathan M. Wilkes, et Christian Doerig. 2013. « A Secreted *Plasmodium Falciparum* Kinase Reveals a Signature Motif for Classification of Tyrosine Kinase-like Kinases ». *Microbiology (Reading, England)* 159 (Pt 12): 2533-47. doi:10.1099/mic.0.070409-0.
- Adl, Sina M., Brian S. Leander, Alastair G. B. Simpson, John M. Archibald, O. Roger Anderson, David Bass, Samuel S. Bowser, et al. 2007. « Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists ». *Systematic Biology* 56 (4): 684-89. doi:10.1080/10635150701494127.
- Adl, Sina M., Alastair G. B. Simpson, Mark A. Farmer, Robert A. Andersen, O. Roger Anderson, John R. Barta, Samuel S. Bowser, et al. 2005. « The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists ». *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5): 399-451. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
- Agnandji, Selidji T., José F. Fernandes, Emmanuel B. Bache, et Michael Ramharter. 2015. « Clinical Development of RTS,S/AS Malaria Vaccine: A Systematic Review of Clinical Phase I-III Trials ». *Future Microbiology* 10 (10): 1553-78. doi:10.2217/fmb.15.90.
- Agnandji, Selidji Todagbe, Bertrand Lell, Solange Solmeheim Soulanoudjingar, José Francisco Fernandes, Béatrice Peggy Abossolo, Cornelia Conzelmann, Barbara Gaelle Nfono Ondo Methogo, et al. 2011. « First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children ». *The New England Journal of Medicine* 365 (20): 1863-75. doi:10.1056/NEJMoa1102287.
- Ahmed, M. A., et J. Cox-Singh. 2015. « *Plasmodium Knowlesi* - an Emerging Pathogen ». *ISBT Science Series* 10 (Suppl 1): 134-40. doi:10.1111/voxs.12115.
- Alexander, David L., Shirin Arastu-Kapur, Jean-Francois Dubremetz, et John C. Boothroyd. 2006. « *Plasmodium falciparum* AMA1 Binds a Rhoptry Neck Protein Homologous to TgRON4, a Component of the Moving Junction in *Toxoplasma gondii* ». *Eukaryotic Cell* 5 (7): 1169-73. doi:10.1128/EC.00040-06.
- Alonso, Pedro L., Jahit Sacarlal, John J. Aponte, Amanda Leach, Eusebio Macete, Pedro Aide, Betuel Sigauque, et al. 2005. « Duration of Protection with RTS,S/AS02A Malaria Vaccine in Prevention of *Plasmodium Falciparum* Disease in Mozambican Children: Single-Blind Extended Follow-up of a Randomised Controlled Trial ». *Lancet (London, England)* 366 (9502): 2012-18. doi:10.1016/S0140-6736(05)67669-6.
- Alonso, Pedro L., Jahit Sacarlal, John J. Aponte, Amanda Leach, Eusebio Macete, Jessica Milman, Inacio Mandomando, et al. 2004. « Efficacy of the RTS,S/AS02A Vaccine against *Plasmodium Falciparum* Infection and Disease in Young African Children: Randomised Controlled Trial ». *Lancet (London, England)* 364 (9443): 1411-20. doi:10.1016/S0140-6736(04)17223-1.
- Aly, Ahmed S. I., Ashley M. Vaughan, et Stefan H. I. Kappe. 2009. « Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host ». *Annual Review of Microbiology* 63: 195-221. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073403.
- Amino, Rogerio, Sabine Thiberge, Béatrice Martin, Susanna Celli, Spencer Shorte, Friedrich Frischknecht, et Robert Ménard. 2006. « Quantitative Imaging of *Plasmodium*



- Transmission from Mosquito to Mammal ». *Nature Medicine* 12 (2): 220-24. doi:10.1038/nm1350.
- Anamika, null, N. Srinivasan, et A. Krupa. 2005. « A Genomic Perspective of Protein Kinases in Plasmodium Falciparum ». *Proteins* 58 (1): 180-89. doi:10.1002/prot.20278.
- Antony, Hiasindh Ashmi, et Subhash Chandra Parija. 2016. « Antimalarial Drug Resistance: An Overview ». *Tropical Parasitology* 6 (1): 30-41. doi:10.4103/2229-5070.175081.
- Aurrecochea, Cristina, John Brestelli, Brian P. Brunk, Jennifer Dommer, Steve Fischer, Bindu Gajria, Xin Gao, et al. 2009. « PlasmoDB: A Functional Genomic Database for Malaria Parasites ». *Nucleic Acids Research* 37 (Database issue): D539-543. doi:10.1093/nar/gkn814.
- Azevedo, Mauro F., Paul R. Sanders, Efrosinia Krejany, Catherine Q. Nie, Ping Fu, Leon A. Bach, Gerhard Wunderlich, Brendan S. Crabb, et Paul R. Gilson. 2013. « Inhibition of Plasmodium Falciparum CDPK1 by Conditional Expression of Its J-Domain Demonstrates a Key Role in Schizont Development ». *The Biochemical Journal* 452 (3): 433-41. doi:10.1042/BJ20130124.

## **B**

- Baer, Kerstin, Christian Klotz, Stefan H. I. Kappe, Thomas Schnieder, et Ute Frevert. 2007. « Release of Hepatic Plasmodium Yoelii Merozoites into the Pulmonary Microvasculature ». *PLoS Pathogens* 3 (11): e171. doi:10.1371/journal.ppat.0030171.
- Baird, J. K. 1998. « Age-Dependent Characteristics of Protection v. Susceptibility to Plasmodium Falciparum ». *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92 (4): 367-90.
- Bajsa, Joanna, Stephen O. Duke, et Babu L. Tekwani. 2008. « Plasmodium Falciparum Serine/Threonine Phosphoprotein Phosphatases (PPP): From Housekeeper to the "Holy Grail" ». *Current Drug Targets* 9 (11): 997-1012.
- Baker, David A. 2010. « Malaria Gametocytogenesis ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 172 (2): 57-65. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.03.019.
- Barik, S. 1993. « Expression and biochemical properties of a protein serine/threonine phosphatase encoded by bacteriophage lambda. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (22): 10633-37. doi:10.1073/pnas.90.22.10633.
- Barik, S., R. E. Taylor, et D. Chakrabarti. 1997. « Identification, Cloning, and Mutational Analysis of the Casein Kinase 1 cDNA of the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum. Stage-Specific Expression of the Gene ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (42): 26132-38.
- Barry, Alyssa, et Diana Hansen. 2016. « Naturally Acquired Immunity to Malaria ». *Parasitology* 143 (2): 125-28. doi:10.1017/S0031182015001778.
- Baum, Jake, Tim-Wolf Gilberger, Freddy Frischknecht, et Markus Meissner. 2008. « Host-Cell Invasion by Malaria Parasites: Insights from Plasmodium and Toxoplasma ». *Trends in Parasitology* 24 (12): 557-63. doi:10.1016/j.pt.2008.08.006.
- Bazzi, Marco, Davide Mantiero, Camilla Trovesi, Giovanna Lucchini, et Maria Pia Longhese. 2010. « Dephosphorylation of  $\gamma$ H2A by Glc7/Protein Phosphatase 1 Promotes

- Recovery from Inhibition of DNA Replication ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (1): 131-45. doi:10.1128/MCB.01000-09.
- Beeson, James G., Damien R. Drew, Michelle J. Boyle, Gaoqian Feng, Freya J. I. Fowkes, et Jack S. Richards. 2016. « Merozoite Surface Proteins in Red Blood Cell Invasion, Immunity and Vaccines against Malaria ». *FEMS Microbiology Reviews*, janvier. doi:10.1093/femsre/fuw001.
- Ben Mamoun, C., I. Y. Gluzman, C. Hott, S. K. MacMillan, A. S. Amarakone, D. L. Anderson, J. M. Carlton, et al. 2001. « Co-Ordinated Programme of Gene Expression during Asexual Intraerythrocytic Development of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Revealed by Microarray Analysis ». *Molecular Microbiology* 39 (1): 26-36.
- Beraldo, Flávio H., Fabiana M. Almeida, Aline M. da Silva, et Céilia R. S. Garcia. 2005. « Cyclic AMP and Calcium Interplay as Second Messengers in Melatonin-Dependent Regulation of Plasmodium Falciparum Cell Cycle ». *The Journal of Cell Biology* 170 (4): 551-57. doi:10.1083/jcb.200505117.
- Bhattacharyya, Mrinal K., Zheng Hong, Darin Kongkasuriyachai, et Nirbhay Kumar. 2002. « Plasmodium Falciparum Protein Phosphatase Type 1 Functionally Complements a glc7 Mutant in Saccharomyces Cerevisiae ». *International Journal for Parasitology* 32 (6): 739-47.
- Bi, Xiaolin, Tamara Jones, Fatima Abbasi, Heuijung Lee, Brian Stultz, Deborah A. Hursh, et Mark A. Mortin. 2005. « Drosophila Caliban, a Nuclear Export Mediator, Can Function as a Tumor Suppressor in Human Lung Cancer Cells ». *Oncogene* 24 (56): 8229-39. doi:10.1038/sj.onc.1208962.
- Billker, Oliver, Sandrine Dechamps, Rita Tewari, Gerald Wenig, Blandine Franke-Fayard, et Volker Brinkmann. 2004. « Calcium and a Calcium-Dependent Protein Kinase Regulate Gamete Formation and Mosquito Transmission in a Malaria Parasite ». *Cell* 117 (4): 503-14.
- Bischoff, Emmanuel, et Catherine Vaquero. 2010. « In Silico and Biological Survey of Transcription-Associated Proteins Implicated in the Transcriptional Machinery during the Erythrocytic Development of Plasmodium Falciparum ». *BMC Genomics* 11: 34. doi:10.1186/1471-2164-11-34.
- Blisnick, Thierry, Laetitia Vincensini, Gamou Fall, et Catherine Braun-Breton. 2006a. « Protein phosphatase 1, a Plasmodium falciparum essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites ». *Cellular Microbiology* 8 (4): 591-601. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00650.x.
- Bojang, K. A., P. J. Milligan, M. Pinder, L. Vigneron, A. Allouche, K. E. Kester, W. R. Ballou, et al. 2001. « Efficacy of RTS,S/AS02 Malaria Vaccine against Plasmodium Falciparum Infection in Semi-Immune Adult Men in The Gambia: A Randomised Trial ». *Lancet (London, England)* 358 (9297): 1927-34. doi:10.1016/S0140-6736(01)06957-4.
- Bojang, Kalifa, Paul Milligan, Margaret Pinder, Tom Doherty, Amanda Leach, Opokua Ofori-Anyinam, Marc Lievens, et al. 2009. « Five-Year Safety and Immunogenicity of GlaxoSmithKline's Candidate Malaria Vaccine RTS,S/AS02 Following Administration to Semi-Immune Adult Men Living in a Malaria-Endemic Region of The Gambia ». *Human Vaccines* 5 (4): 242-47.
- Bosch, Jürgen, Matthew H. Paige, Akhil B. Vaidya, Lawrence W. Bergman, et Wim G. J. Hol. 2012. « Crystal Structure of GAP50, the Anchor of the Invasion Machinery in the Inner Membrane Complex of Plasmodium Falciparum ». *Journal of Structural Biology* 178 (1): 61-73. doi:10.1016/j.jsb.2012.02.009.

- Bozdech, Zbynek, Manuel Llinás, Brian Lee Pulliam, Edith D. Wong, Jingchun Zhu, et Joseph L. DeRisi. 2003. « The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium Falciparum* ». *PLoS Biology* 1 (1): E5. doi:10.1371/journal.pbio.0000005.
- Bracchi, V., G. Langsley, J. Thélou, W. Eling, et P. Ambroise-Thomas. 1996. « PfKIN, an SNF1 Type Protein Kinase of *Plasmodium Falciparum* Predominantly Expressed in Gametocytes ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 76 (1-2): 299-303.
- Bracchi-Ricard, V., S. Barik, C. Delvecchio, C. Doerig, R. Chakrabarti, et D. Chakrabarti. 2000. « PfPK6, a Novel Cyclin-Dependent Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Protein Kinase from *Plasmodium Falciparum* ». *The Biochemical Journal* 347 Pt 1 (avril): 255-63.
- Brochet, Mathieu, Mark O. Collins, Terry K. Smith, Eloise Thompson, Sarah Sebastian, Katrin Volkmann, Frank Schwach, et al. 2014. « Phosphoinositide Metabolism Links cGMP-Dependent Protein Kinase G to Essential Ca<sup>2+</sup> Signals at Key Decision Points in the Life Cycle of Malaria Parasites ». *PLoS Biology* 12 (3): e1001806. doi:10.1371/journal.pbio.1001806.
- Bruce, M. C., P. Alano, S. Duthie, et R. Carter. 1990. « Commitment of the Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* to Sexual and Asexual Development ». *Parasitology* 100 Pt 2 (avril): 191-200.
- Burghaus, P. A., et K. Lingelbach. 2001. « Luciferase, When Fused to an N-Terminal Signal Peptide, Is Secreted from Transfected *Plasmodium Falciparum* and Transported to the Cytosol of Infected Erythrocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (29): 26838-45. doi:10.1074/jbc.M100111200.

## C

- Cabrera, Ana, Susann Herrmann, Dominik Warszta, Joana M. Santos, Arun T. John Peter, Maya Kono, Sandra Debrouver, et al. 2012. « Dissection of Minimal Sequence Requirements for Rhoptry Membrane Targeting in the Malaria Parasite ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13 (10): 1335-50. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01394.x.
- Cai, Chengzhong, Kai A. Carey, Dmitry A. Nedosekin, Yulian A. Menyayev, Mustafa Sarimollaoglu, Ekaterina I. Galanzha, Jason S. Stumhofer, et Vladimir P. Zharov. 2016. « In Vivo Photoacoustic Flow Cytometry for Early Malaria Diagnosis ». *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, avril. doi:10.1002/cyto.a.22854.
- Chakrabarti, Debopam, Thiago Da Silva, Jennifer Barger, Steve Paquette, Hetal Patel, Shelley Patterson, et Charles M. Allen. 2002. « Protein Farnesyltransferase and Protein Prenylation in *Plasmodium Falciparum* ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 42066-73. doi:10.1074/jbc.M202860200.
- Chan, Maurice, Doreen S. H. Tan, et T. S. Sim. 2007. « *Plasmodium Falciparum* Pyruvate Kinase as a Novel Target for Antimalarial Drug-Screening ». *Travel Medicine and Infectious Disease* 5 (2): 125-31. doi:10.1016/j.tmaid.2006.01.015.
- Chen, Yueqin, Dayadevi Jirage, Diana Caridha, April K. Kathcart, Edison A. Cortes, Richard A. Denuff, Jeanne A. Geyer, Sean T. Prigge, et Norman C. Waters. 2006. « Identification of an Effector Protein and Gain-of-Function Mutants That Activate Pfmrk, a Malarial

- Cyclin-Dependent Protein Kinase ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 149 (1): 48-57. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.04.004.
- Chidley, Christopher, Hirohito Haruki, Miriam Grønlund Pedersen, Evelyne Muller, et Kai Johnsson. 2011. « A Yeast-Based Screen Reveals That Sulfasalazine Inhibits Tetrahydrobiopterin Biosynthesis ». *Nature Chemical Biology* 7 (6): 375-83. doi:10.1038/nchembio.557.
- Chisholm, Scott A., Emma McHugh, Rachel Lundie, Matthew W. A. Dixon, Sreejoyee Ghosh, Meredith O'Keefe, Leann Tilley, Ming Kalanon, et Tania F. de Koning-Ward. 2016. « Contrasting Inducible Knockdown of the Auxiliary PTEX Component PTEX88 in *P. Falciparum* and *P. Berghei* Unmasks a Role in Parasite Virulence ». *PloS One* 11 (2): e0149296. doi:10.1371/journal.pone.0149296.
- Christophides, George K. 2005. « Transgenic Mosquitoes and Malaria Transmission ». *Cellular Microbiology* 7 (3): 325-33. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00495.x.
- Coleman, Bradley I., et Manoj T. Duraisingh. 2008. « Transcriptional Control and Gene Silencing in *Plasmodium Falciparum* ». *Cellular Microbiology* 10 (10): 1935-46. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01203.x.
- Coleman, Bradley I., Kristen M. Skillman, Rays H. Y. Jiang, Lauren M. Childs, Lindsey M. Altenhofen, Markus Ganter, Yvette Leung, et al. 2014. « A *Plasmodium Falciparum* Histone Deacetylase Regulates Antigenic Variation and Gametocyte Conversion ». *Cell Host & Microbe* 16 (2): 177-86. doi:10.1016/j.chom.2014.06.014.
- Collins, Christine R, Sujaan Das, Eleanor H Wong, Nicole Andenmatten, Robert Stallmach, Fiona Hackett, Jean-Paul Herman, Sylke Müller, Markus Meissner, et Michael J Blackman. 2013. « Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle ». *Molecular Microbiology* 88 (4): 687-701. doi:10.1111/mmi.12206.
- Collins, Christine R., Fiona Hackett, Malcolm Strath, Maria Penzo, Chrislaine Withers-Martinez, David A. Baker, et Michael J. Blackman. 2013. « Malaria Parasite cGMP-Dependent Protein Kinase Regulates Blood Stage Merozoite Secretory Organelle Discharge and Egress ». *PLoS Pathogens* 9 (5): e1003344. doi:10.1371/journal.ppat.1003344.
- Coppi, Alida, Ramya Natarajan, Gabriele Pradel, Brandy L. Bennett, Eric R. James, Mario A. Roggero, Giampietro Corradin, Cathrine Persson, Rita Tewari, et Photini Sinnis. 2011. « The Malaria Circumsporozoite Protein Has Two Functional Domains, Each with Distinct Roles as Sporozoites Journey from Mosquito to Mammalian Host ». *The Journal of Experimental Medicine* 208 (2): 341-56. doi:10.1084/jem.20101488.
- Costanzo, Michael, Anastasia Baryshnikova, Jeremy Bellay, Yungil Kim, Eric D. Spear, Carolyn S. Sevier, Huiming Ding, et al. 2010. « The Genetic Landscape of a Cell ». *Science (New York, N.Y.)* 327 (5964): 425-31. doi:10.1126/science.1180823.
- Cowman, Alan F., Drew Berry, et Jake Baum. 2012. « The Cellular and Molecular Basis for Malaria Parasite Invasion of the Human Red Blood Cell ». *The Journal of Cell Biology* 198 (6): 961-71. doi:10.1083/jcb.201206112.
- Cowman, Alan F., et Brendan S. Crabb. 2006. « Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites ». *Cell* 124 (4): 755-66. doi:10.1016/j.cell.2006.02.006.

- Cui, Liwang, Qi Fan, Long Cui, et Jun Miao. 2008. « Histone Lysine Methyltransferases and Demethylases in Plasmodium Falciparum ». *International Journal for Parasitology* 38 (10): 1083-97. doi:10.1016/j.ijpara.2008.01.002.
- Cui, Long, Jun Miao, et Liwang Cui. 2007. « Cytotoxic Effect of Curcumin on Malaria Parasite Plasmodium Falciparum: Inhibition of Histone Acetylation and Generation of Reactive Oxygen Species ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (2): 488-94. doi:10.1128/AAC.01238-06.

## D

- Dacks, Joel B., Giselle Walker, et Mark C. Field. 2008. « Implications of the New Eukaryotic Systematics for Parasitologists ». *Parasitology International* 57 (2): 97-104. doi:10.1016/j.parint.2007.11.004.
- Daher, Wassim, Edith Browaeys, Christine Pierrot, H el ene Jouin, Daniel Dive, Edwige Meurice, Colette Dissous, et al. 2006a. « Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by PflRR1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite Plasmodium falciparum ». *Molecular Microbiology* 60 (3): 578-90. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05119.x.
- Daher, Wassim, Raymond Pierce, et Jamal Khalife. 2007. « Census, Molecular Characterization and Developmental Expression of Leucine-Rich-Repeat Proteins in Plasmodium Falciparum ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 155 (2): 161-66. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.07.001.
- Daher, Wassim, et Dominique Soldati-Favre. 2009. « Mechanisms Controlling Glideosome Function in Apicomplexans ». *Current Opinion in Microbiology* 12 (4): 408-14. doi:10.1016/j.mib.2009.06.008.
- Debierre-Grockiego, Françoise, et Ralph T. Schwarz. 2010. « Immunological Reactions in Response to Apicomplexan Glycosylphosphatidylinositols ». *Glycobiology* 20 (7): 801-11. doi:10.1093/glycob/cwq038.
- Deng, Wensheng, et David A. Baker. 2002. « A Novel Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Is Expressed in the Ring Stage of the Plasmodium Falciparum Life Cycle ». *Molecular Microbiology* 44 (5): 1141-51.
- Desai, Meghna, Feiko O. ter Kuile, François Nosten, Rose McGready, Kwame Asamoah, Bernard Brabin, et Robert D. Newman. 2007. « Epidemiology and Burden of Malaria in Pregnancy ». *The Lancet. Infectious Diseases* 7 (2): 93-104. doi:10.1016/S1473-3099(07)70021-X.
- Dieckmann-Schuppert, A., E. Bause, et R. T. Schwarz. 1993. « Studies on O-Glycans of Plasmodium-Falciparum-Infected Human Erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-Transferase in Malaria Parasites ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 216 (3): 779-88.
- — —. 1994. « Glycosylation Reactions in Plasmodium Falciparum, Toxoplasma Gondii, and Trypanosoma Brucei Brucei Probed by the Use of Synthetic Peptides ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1199 (1): 37-44.
- Dieckmann-Schuppert, A., S. Bender, M. Odenthal-Schnittler, E. Bause, et R. T. Schwarz. 1992. « Apparent Lack of N-Glycosylation in the Asexual Intraerythrocytic Stage of Plasmodium Falciparum ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 205 (2): 815-25.



- Dobbs, Katherine R., et Arlene E. Dent. 2016. « Plasmodium Malaria and Antimalarial Antibodies in the First Year of Life ». *Parasitology* 143 (2): 129-38. doi:10.1017/S0031182015001626.
- Dobson, V. Bracchi, D. Chakrabarti, et S. Barik. 2001. « Characterization of a Novel Serine/Threonine Protein Phosphatase (PfPPJ) from the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 115 (1): 29-39.
- Dobson, Kar, Kumar, B. Adams, et S. Barik. 2001. « A Novel Tetratricopeptide Repeat (TPR) Containing PP5 Serine/Threonine Protein Phosphatase in the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum ». *BMC Microbiology* 1: 31.
- Dobson, S., T. May, M. Berriman, C. Del Vecchio, A. H. Fairlamb, D. Chakrabarti, et S. Barik. 1999. « Characterization of Protein Ser/Thr Phosphatases of the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum: Inhibition of the Parasitic Calcineurin by Cyclophilin-Cyclosporin Complex ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 99 (2): 167-81.
- Dobson, Sean, Rajinder Kumar, Valerie Bracchi-Ricard, Scott Freeman, Samer W. K. Al-Murrani, Corey Johnson, Zahi Damuni, Debopam Chakrabarti, et Sailen Barik. 2003. « Characterization of a Unique Aspartate-Rich Protein of the SET/TAF-Family in the Human Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum, Which Inhibits Protein Phosphatase 2A ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 126 (2): 239-50.
- Doerig, C., C. Doerig, P. Horrocks, J. Coyle, J. Carlton, A. Sultan, D. Arnot, et R. Carter. 1995. « Pfcrk-1, a Developmentally Regulated cdc2-Related Protein Kinase of Plasmodium Falciparum ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 70 (1-2): 167-74.
- Doerig, Julian C. Rayner, Artur Scherf, et Andrew B. Tobin. 2015. « Post-Translational Protein Modifications in Malaria Parasites ». *Nature Reviews. Microbiology* 13 (3): 160-72. doi:10.1038/nrmicro3402.
- Dorin, D., P. Alano, I. Boccaccio, L. Cicéron, C. Doerig, R. Sulpice, D. Parzy, et C. Doerig. 1999. « An Atypical Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Homologue Expressed in Gametocytes of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum. Identification of a MAPK Signature ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 29912-20.
- Dorin, D., K. Le Roch, P. Sallicandro, P. Alano, D. Parzy, P. Poulet, L. Meijer, et C. Doerig. 2001. « Pfnck-1, a NIMA-Related Kinase from the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Biochemical Properties and Possible Involvement in MAPK Regulation ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 268 (9): 2600-2608.
- Dorin, Dominique, Jean-Philippe Semblat, Patrick Poulet, Pietro Alano, J. P. Dean Goldring, Christina Whittle, Shelley Patterson, Debopam Chakrabarti, et Christian Doerig. 2005. « PfPK7, an Atypical MEK-Related Protein Kinase, Reflects the Absence of Classical Three-Component MAPK Pathways in the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *Molecular Microbiology* 55 (1): 184-96. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04393.x.
- Dorin-Semblat, Dominique, Claudia Demarta-Gatsi, Romain Hamelin, Florence Armand, Teresa Gil Carvalho, Marc Moniatte, et Christian Doerig. 2015. « Malaria Parasite-Infected Erythrocytes Secrete PfCK1, the Plasmodium Homologue of the Pleiotropic Protein Kinase Casein Kinase 1 ». *PLoS One* 10 (12): e0139591. doi:10.1371/journal.pone.0139591.
- Dorin-Semblat, Dominique, Neils Quashie, Jean Halbert, Audrey Sicard, Caroline Doerig, Elizabeth Peat, Lisa Ranford-Cartwright, et Christian Doerig. 2007. « Functional Characterization of Both MAP Kinases of the Human Malaria Parasite Plasmodium

- Falciparum by Reverse Genetics ». *Molecular Microbiology* 65 (5): 1170-80. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05859.x.
- Dorin-Semblat, Dominique, Sophie Schmitt, Jean-Philippe Semblat, Audrey Sicard, Luc Reiningger, Dean Goldring, Shelley Patterson, et al. 2011. « Plasmodium Falciparum NIMA-Related Kinase Pfnek-1: Sex Specificity and Assessment of Essentiality for the Erythrocytic Asexual Cycle ». *Microbiology (Reading, England)* 157 (Pt 10): 2785-94. doi:10.1099/mic.0.049023-0.
- Dorin-Semblat, Dominique, Audrey Sicard, Caroline Doerig, Lisa Ranford-Cartwright, et Christian Doerig. 2008. « Disruption of the PfPK7 Gene Impairs Schizogony and Sporogony in the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *Eukaryotic Cell* 7 (2): 279-85. doi:10.1128/EC.00245-07.
- Droucheau, Eliane, Aline Primot, Virginie Thomas, Denise Mattei, Marie Knockaert, Chris Richardson, Pina Sallicandro, et al. 2004. « Plasmodium Falciparum Glycogen Synthase Kinase-3: Molecular Model, Expression, Intracellular Localisation and Selective Inhibitors ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1697 (1-2): 181-96. doi:10.1016/j.bbapap.2003.11.023.
- Dudha, Namrata, Jyoti Rana, Sreejith Rajasekharan, Reema Gabrani, Amita Gupta, Vijay Kumar Chaudhary, et Sanjay Gupta. 2015. « Host-pathogen Interactome Analysis of Chikungunya Virus Envelope Proteins E1 and E2 ». *Virus Genes* 50 (2): 200-209. doi:10.1007/s11262-014-1161-x.
- Duffy, Michael F., Shamista A. Selvarajah, Gabrielle A. Josling, et Michaela Petter. 2012. « The Role of Chromatin in Plasmodium Gene Expression ». *Cellular Microbiology* 14 (6): 819-28. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01777.x.
- Dvorak, J. A., L. H. Miller, W. C. Whitehouse, et T. Shiroishi. 1975. « Invasion of Erythrocytes by Malaria Merozoites ». *Science (New York, N.Y.)* 187 (4178): 748-50.
- Dvorin, Jeffrey D., Derek C. Martyn, Saurabh D. Patel, Joshua S. Grimley, Christine R. Collins, Christine S. Hopp, A. Taylor Bright, et al. 2010. « A Plant-like Kinase in Plasmodium Falciparum Regulates Parasite Egress from Erythrocytes ». *Science (New York, N.Y.)* 328 (5980): 910-12. doi:10.1126/science.1188191.

## E

- Fan, Qi, Jun Miao, Long Cui, et Liwang Cui. 2009. « Characterization of PRMT1 from Plasmodium Falciparum ». *The Biochemical Journal* 421 (1): 107-18. doi:10.1042/BJ20090185.
- Färber, P. M., R. Graeser, R. M. Franklin, et B. Kappes. 1997. « Molecular Cloning and Characterization of a Second Calcium-Dependent Protein Kinase of Plasmodium Falciparum ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 87 (2): 211-16.
- Fennell, Clare, Sharon Babbitt, Ilaria Russo, Jonathan Wilkes, Lisa Ranford-Cartwright, Daniel E. Goldberg, et Christian Doerig. 2009. « PfelK1, a Eukaryotic Initiation Factor 2alpha Kinase of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum, Regulates Stress-Response to Amino-Acid Starvation ». *Malaria Journal* 8: 99. doi:10.1186/1475-2875-8-99.
- Fernandez-Pol, Sebastian, Zdenek Slouka, Souvik Bhattacharjee, Yana Fedotova, Stefan Freed, Xiuli An, Anthony A. Holder, et al. 2013. « A Bacterial Phosphatase-like Enzyme of the

- Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Possesses Tyrosine Phosphatase Activity and Is Implicated in the Regulation of Band 3 Dynamics during Parasite Invasion ». *Eukaryotic Cell* 12 (9): 1179-91. doi:10.1128/EC.00027-13.
- Fichera, M. E., et D. S. Roos. 1997. « A Plastid Organelle as a Drug Target in Apicomplexan Parasites ». *Nature* 390 (6658): 407-9. doi:10.1038/37132.
- Field, S. J., J. C. Pinder, B. Clough, A. R. Dluzewski, R. J. Wilson, et W. B. Gratzer. 1993. « Actin in the Merozoite of the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 25 (1): 43-48. doi:10.1002/cm.970250106.
- Flick, Kirsten, et Qijun Chen. 2004. « Var Genes, PfEMP1 and the Human Host ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 134 (1): 3-9.
- Florens, Laurence, Michael P. Washburn, J. Dale Raine, Robert M. Anthony, Munira Grainger, J. David Haynes, J. Kathleen Moch, et al. 2002. « A Proteomic View of the Plasmodium Falciparum Life Cycle ». *Nature* 419 (6906): 520-26. doi:10.1038/nature01107.
- Francia, Maria E., Jean-Francois Dubremetz, et Naomi S. Morrisette. 2015. « Basal Body Structure and Composition in the Apicomplexans Toxoplasma and Plasmodium ». *Cilia* 5: 3. doi:10.1186/s13630-016-0025-5.
- Freitas-Junior, Lucio H., Rosaura Hernandez-Rivas, Stuart A. Ralph, Dvorak Montiel-Condado, Omar K. Ruvalcaba-Salazar, Ana Paola Rojas-Meza, Liliana Mâncio-Silva, et al. 2005. « Telomeric Heterochromatin Propagation and Histone Acetylation Control Mutually Exclusive Expression of Antigenic Variation Genes in Malaria Parasites ». *Cell* 121 (1): 25-36. doi:10.1016/j.cell.2005.01.037.
- French, Jarrod B., Yana Cen, et Anthony A. Sauve. 2008. « Plasmodium Falciparum Sir2 Is an NAD<sup>+</sup>-Dependent Deacetylase and an Acetyllysine-Dependent and Acetyllysine-Independent NAD<sup>+</sup> Glycohydrolase ». *Biochemistry* 47 (38): 10227-39. doi:10.1021/bi800767t.
- Fréville, Aline, Katia Cailliau-Maggio, Christine Pierrot, Géraldine Tellier, Hadidjatou Kalamou, Sophia Lafitte, Alain Martoriati, Raymond J. Pierce, Jean-François Bodart, et Jamal Khalife. 2013. « Plasmodium Falciparum Encodes a Conserved Active Inhibitor-2 for Protein Phosphatase Type 1: Perspectives for Novel Anti-Plasmodial Therapy ». *BMC Biology* 11: 80. doi:10.1186/1741-7007-11-80.
- Fréville, Aline, Isabelle Landrieu, M. Adelaida García-Gimeno, Jérôme Vicogne, Muriel Montbarbon, Benjamin Bertin, Alexis Verger, et al. 2012. « Plasmodium Falciparum Inhibitor-3 Homolog Increases Protein Phosphatase Type 1 Activity and Is Essential for Parasitic Survival ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (2): 1306-21. doi:10.1074/jbc.M111.276865.
- Fréville, Aline, Géraldine Tellier, Audrey Vandomme, Christine Pierrot, Jérôme Vicogne, François-Xavier Cantrelle, Alain Martoriati, Katia Cailliau-Maggio, Jamal Khalife, et Isabelle Landrieu. 2014. « Identification of a Plasmodium Falciparum Inhibitor-2 Motif Involved in the Binding and Regulation Activity of Protein Phosphatase Type 1 ». *The FEBS Journal* 281 (19): 4519-34. doi:10.1111/febs.12960.

## G

- Gantz, Valentino M., Nijole Jasinskiene, Olga Tatarenkova, Aniko Fazekas, Vanessa M. Macias, Ethan Bier, et Anthony A. James. 2015. « Highly Efficient Cas9-Mediated Gene Drive for Population Modification of the Malaria Vector Mosquito Anopheles Stephensi ».



- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (49): E6736-6743. doi:10.1073/pnas.1521077112.
- Gardner, Malcolm J., Neil Hall, Eula Fung, Owen White, Matthew Berriman, Richard W. Hyman, Jane M. Carlton, et al. 2002. « Genome Sequence of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* ». *Nature* 419 (6906): 498-511. doi:10.1038/nature01097.
- Ghorbal, Mehdi, Molly Gorman, Cameron Ross Macpherson, Rafael Miyazawa Martins, Artur Scherf, et Jose-Juan Lopez-Rubio. 2014. « Genome Editing in the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* Using the CRISPR-Cas9 System ». *Nature Biotechnology* 32 (8): 819-21. doi:10.1038/nbt.2925.
- Gilson, Paul R., et Brendan S. Crabb. 2009. « Morphology and Kinetics of the Three Distinct Phases of Red Blood Cell Invasion by *Plasmodium Falciparum* Merozoites ». *International Journal for Parasitology* 39 (1): 91-96. doi:10.1016/j.ijpara.2008.09.007.
- Gilson, Paul R., Thomas Nebl, Damjan Vukcevic, Robert L. Moritz, Tobias Sargeant, Terence P. Speed, Louis Schofield, et Brendan S. Crabb. 2006. « Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5 (7): 1286-99. doi:10.1074/mcp.M600035-MCP200.
- Glushakova, Svetlana, Dan Yin, Tao Li, et Joshua Zimmerberg. 2005. « Membrane Transformation during Malaria Parasite Release from Human Red Blood Cells ». *Current Biology: CB* 15 (18): 1645-50. doi:10.1016/j.cub.2005.07.067.
- Gornicki, Piotr. 2003. « Apicoplast Fatty Acid Biosynthesis as a Target for Medical Intervention in Apicomplexan Parasites ». *International Journal for Parasitology* 33 (9): 885-96.
- Gowda, D. C., P. Gupta, et E. A. Davidson. 1997. « Glycosylphosphatidylinositol Anchors Represent the Major Carbohydrate Modification in Proteins of Intraerythrocytic Stage *Plasmodium Falciparum* ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (10): 6428-39.
- Graeser, R., B. Wernli, R. M. Franklin, et B. Kappes. 1996. « *Plasmodium Falciparum* Protein Kinase 5 and the Malarial Nuclear Division Cycles ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 82 (1): 37-49.
- Green, Judith L., Roxanne R. Rees-Channer, Stephen A. Howell, Stephen R. Martin, Ellen Knuepfer, Helen M. Taylor, Munira Grainger, et Anthony A. Holder. 2008. « The Motor Complex of *Plasmodium Falciparum*: Phosphorylation by a Calcium-Dependent Protein Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (45): 30980-89. doi:10.1074/jbc.M803129200.
- Guizetti, Julien, et Artur Scherf. 2013. « Silence, Activate, Poise and Switch! Mechanisms of Antigenic Variation in *Plasmodium Falciparum* ». *Cellular Microbiology* 15 (5): 718-26. doi:10.1111/cmi.12115.
- Guttery, David S., Benoit Poulin, David J. P. Ferguson, Balázs Szöör, Bill Wickstead, Paula L. Carroll, Chandra Ramakrishnan, et al. 2012. « A Unique Protein Phosphatase with Kelch-like Domains (PPKL) in *Plasmodium* Modulates Ookinete Differentiation, Motility and Invasion ». *PLoS Pathogens* 8 (9): e1002948. doi:10.1371/journal.ppat.1002948.
- Guttery, David S., Benoit Poulin, Abhinay Ramaprasad, Richard J. Wall, David J. P. Ferguson, Declan Brady, Eva-Maria Patzewitz, et al. 2014a. « Genome-Wide Functional Analysis of *Plasmodium* Protein Phosphatases Reveals Key Regulators of Parasite Development

and Differentiation ». *Cell Host & Microbe* 16 (1): 128-40. doi:10.1016/j.chom.2014.05.020.

## H

- Hadjebi, Ouadah, Eduard Casas-Terradellas, Francesc R. Garcia-Gonzalo, et Jose Luis Rosa. 2008. « The RCC1 Superfamily: From Genes, to Function, to Disease ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1783 (8): 1467-79. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.03.015.
- Halbert, Jean, Lawrence Ayong, Leila Equinet, Karine Le Roch, Mary Hardy, Dean Goldring, Luc Reininger, Norman Waters, Debopam Chakrabarti, et Christian Doerig. 2010. « A Plasmodium Falciparum Transcriptional Cyclin-Dependent Kinase-Related Kinase with a Crucial Role in Parasite Proliferation Associates with Histone Deacetylase Activity ». *Eukaryotic Cell* 9 (6): 952-59. doi:10.1128/EC.00005-10.
- Haldar, Kasturi, Sean C. Murphy, Dan A. Milner, et Terrie E. Taylor. 2007. « Malaria: Mechanisms of Erythrocytic Infection and Pathological Correlates of Severe Disease ». *Annual Review of Pathology* 2: 217-49. doi:10.1146/annurev.pathol.2.010506.091913.
- Hall, Neil, et Jane Carlton. 2005. « Comparative Genomics of Malaria Parasites ». *Current Opinion in Genetics & Development* 15 (6): 609-13. doi:10.1016/j.gde.2005.09.001.
- Hall, Neil, Marianna Karras, J. Dale Raine, Jane M. Carlton, Taco W. A. Kooij, Matthew Berriman, Laurence Florens, et al. 2005. « A Comprehensive Survey of the Plasmodium Life Cycle by Genomic, Transcriptomic, and Proteomic Analyses ». *Science (New York, N.Y.)* 307 (5706): 82-86. doi:10.1126/science.1103717.
- Hammond, Andrew, Roberto Galizi, Kyros Kyrou, Alekos Simoni, Carla Siniscalchi, Dimitris Katsanos, Matthew Gribble, et al. 2016. « A CRISPR-Cas9 Gene Drive System Targeting Female Reproduction in the Malaria Mosquito Vector Anopheles Gambiae ». *Nature Biotechnology* 34 (1): 78-83. doi:10.1038/nbt.3439.
- Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, et et al. 2010. « ANcestry and pathology in king tutankhamun's family ». *JAMA* 303 (7): 638-47. doi:10.1001/jama.2010.121.
- Hills, Tanya, Anubhav Srivastava, Kodjo Ayi, Amy K. Wernimont, Kevin Kain, Andrew P. Waters, Raymond Hui, et Juan C. Pizarro. 2011. « Characterization of a New Phosphatase from Plasmodium ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 179 (2): 69-79. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.06.001.
- Ho, M., et N. J. White. 1999. « Molecular Mechanisms of Cytoadherence in Malaria ». *The American Journal of Physiology* 276 (6 Pt 1): C1231-1242.
- Hoffman, Stephen L., Johan Vekemans, Thomas L. Richie, et Patrick E. Duffy. 2015. « The March Toward Malaria Vaccines ». *American Journal of Preventive Medicine, Advancing Vaccines and Immunization Issues, Insights, and Innovations*, 49 (6, Supplement 4): S319-33. doi:10.1016/j.amepre.2015.09.011.
- Holland, Zoë, Renaud Prudent, Jean-Baptiste Reiser, Claude Cochet, et Christian Doerig. 2009. « Functional Analysis of Protein Kinase CK2 of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *Eukaryotic Cell* 8 (3): 388-97. doi:10.1128/EC.00334-08.
- Hollin, Thomas, Caroline De Witte, Astrid Lenne, Christine Pierrot, et Jamal Khalife. 2016. « Analysis of the Interactome of the Ser/Thr Protein Phosphatase Type 1 in

- Plasmodium Falciparum ». *BMC Genomics* 17 (1): 246. doi:10.1186/s12864-016-2571-z.
- Howe, Ruth, Megan Kelly, John Jimah, Dana Hodge, et Audrey R. Odom. 2013. « Isoprenoid Biosynthesis Inhibition Disrupts Rab5 Localization and Food Vacuolar Integrity in Plasmodium Falciparum ». *Eukaryotic Cell* 12 (2): 215-23. doi:10.1128/EC.00073-12.
- Hughes, Katie R., Nisha Philip, G. Lucas Starnes, Sonya Taylor, et Andrew P. Waters. 2010. « From Cradle to Grave: RNA Biology in Malaria Parasites ». *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA* 1 (2): 287-303. doi:10.1002/wrna.30.

## I

- Issar, Neha, Emeric Roux, Denise Mattei, et Artur Scherf. 2008. « Identification of a Novel Post-Translational Modification in Plasmodium Falciparum: Protein Sumoylation in Different Cellular Compartments ». *Cellular Microbiology* 10 (10): 1999-2011. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01183.x.
- Iwanaga, Tatsuya, Tatsuki Sugi, Kyousuke Kobayashi, Hitoshi Takemae, Haiyan Gong, Akiko Ishiwa, Fumi Murakoshi, et al. 2013. « Characterization of Plasmodium Falciparum cdc2-Related Kinase and the Effects of a CDK Inhibitor on the Parasites in Erythrocytic Schizogony ». *Parasitology International* 62 (5): 423-30. doi:10.1016/j.parint.2013.05.003.

## J

- Jain, Vidhan, Avinash C. Nagpal, Pradeep K. Joel, Manmohan Shukla, Mrigendra P. Singh, Rasik B. Gupta, Aditya P. Dash, et al. 2008. « Burden of Cerebral Malaria in Central India (2004-2007) ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79 (4): 636-42.
- Janse, Chris J., et Andrew P. Waters. 2007. « The Exoneme Helps Malaria Parasites to Break out of Blood Cells ». *Cell* 131 (6): 1036-38. doi:10.1016/j.cell.2007.11.026.
- Jiang, Lubin, Jianbing Mu, Qingfeng Zhang, Ting Ni, Prakash Srinivasan, Kempaiah Rayavara, Wenjing Yang, et al. 2013. « PfSETvs Methylation of Histone H3K36 Represses Virulence Genes in Plasmodium Falciparum ». *Nature* 499 (7457): 223-27. doi:10.1038/nature12361.
- Johnston, Stephanie P., Norman J. Pieniazek, Maniphet V. Xayavong, Susan B. Slemenda, Patricia P. Wilkins, et Alexandre J. da Silva. 2006. « PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria ». *Journal of Clinical Microbiology* 44 (3): 1087-89. doi:10.1128/JCM.44.3.1087-1089.2006.
- Jomaa, H., J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Türbachova, et al. 1999. « Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs ». *Science (New York, N.Y.)* 285 (5433): 1573-76.
- Jones, Matthew L., Mark O. Collins, David Goulding, Jyoti S. Choudhary, et Julian C. Rayner. 2012. « Analysis of Protein Palmitoylation Reveals a Pervasive Role in Plasmodium Development and Pathogenesis ». *Cell Host & Microbe* 12 (2): 246-58. doi:10.1016/j.chom.2012.06.005.

- Jones, Matthew L., Sujaan Das, Hugo Belda, Christine R. Collins, Michael J. Blackman, et Moritz Treeck. 2016. « A versatile strategy for rapid conditional genome engineering using loxP sites in a small synthetic intron in *Plasmodium falciparum* ». *Scientific Reports* 6 (février). doi:10.1038/srep21800.
- Jones, Matthew L., Chwen L. Tay, et Julian C. Rayner. 2012. « Getting Stuck in: Protein Palmitoylation in *Plasmodium* ». *Trends in Parasitology* 28 (11): 496-503. doi:10.1016/j.pt.2012.08.009.
- Josling, Gabrielle A., et Manuel Llinás. 2015. « Sexual Development in *Plasmodium* Parasites: Knowing When It's Time to Commit ». *Nature Reviews Microbiology* 13 (9): 573-87. doi:10.1038/nrmicro3519.

## K

- Kappes, B., J. Yang, B. W. Suetterlin, K. Rathgeb-Szabo, M. J. Lindt, et R. M. Franklin. 1995. « A *Plasmodium Falciparum* Protein Kinase with Two Unusually Large Kinase Inserts ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 72 (1-2): 163-78.
- Kassim, O. O., K. A. Ako-Anai, S. E. Torimiro, G. P. Hollowell, V. C. Okoye, et S. K. Martin. 2000. « Inhibitory Factors in Breastmilk, Maternal and Infant Sera against in Vitro Growth of *Plasmodium Falciparum* Malaria Parasite ». *Journal of Tropical Pediatrics* 46 (2): 92-96.
- Kato, Nobutaka, Tomoyo Sakata, Ghislain Breton, Karine G. Le Roch, Advait Nagle, Carsten Andersen, Badry Bursulaya, et al. 2008. « Gene Expression Signatures and Small-Molecule Compounds Link a Protein Kinase to *Plasmodium Falciparum* Motility ». *Nature Chemical Biology* 4 (6): 347-56. doi:10.1038/nchembio.87.
- Kato, Atsushi Sudo, Kyouzuke Kobayashi, Yukinobu Tohya, et Hiroomi Akashi. 2008. « Characterization of *Plasmodium Falciparum* Protein Kinase 2 ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 162 (1): 87-95. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.07.007.
- Keeley, Anthony, et Dominique Soldati. 2004. « The Glideosome: A Molecular Machine Powering Motility and Host-Cell Invasion by Apicomplexa ». *Trends in Cell Biology* 14 (10): 528-32. doi:10.1016/j.tcb.2004.08.002.
- Keeling, Patrick J. 2009. « Chromalveolates and the Evolution of Plastids by Secondary Endosymbiosis ». *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 56 (1): 1-8. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00371.x.
- Kehr, Sebastian, Esther Jortzik, Claire Delahunty, John R. Yates, Stefan Rahlfs, et Katja Becker. 2011. « Protein S-Glutathionylation in Malaria Parasites ». *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (11): 2855-65. doi:10.1089/ars.2011.4029.
- Kester, Kent E., James F. Cummings, Opokua Ofori-Anyinam, Christian F. Ockenhouse, Urszula Krzych, Philippe Moris, Robert Schwenk, et al. 2009. « Randomized, Double-Blind, Phase 2a Trial of *Falciparum* Malaria Vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in Malaria-Naive Adults: Safety, Efficacy, and Immunologic Associates of Protection ». *The Journal of Infectious Diseases* 200 (3): 337-46. doi:10.1086/600120.
- Kimura, E. A., A. S. Couto, V. J. Peres, O. L. Casal, et A. M. Katzin. 1996. « N-Linked Glycoproteins Are Related to Schizogony of the Intraerythrocytic Stage in *Plasmodium Falciparum* ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (24): 14452-61.

- Knockaert, M., N. Gray, E. Damiens, Y. T. Chang, P. Grellier, K. Grant, D. Fergusson, et al. 2000. « Intracellular Targets of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Identification by Affinity Chromatography Using Immobilised Inhibitors ». *Chemistry & Biology* 7 (6): 411-22.
- Kumar, Alla Musiyenko, Eugene Cioffi, Anja Oldenburg, Brian Adams, Vira Bitko, S. Sri Krishna, et Sailen Barik. 2004. « A Zinc-Binding Dual-Specificity YVH1 Phosphatase in the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum, and Its Interaction with the Nuclear Protein, Pescadillo ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 133 (2): 297-310.
- Kumar, Rajinder, Brian Adams, Anja Oldenburg, Alla Musiyenko, et Sailen Barik. 2002. « Characterisation and Expression of a PP1 Serine/Threonine Protein Phosphatase (PfPPP1) from the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum: Demonstration of Its Essential Role Using RNA Interference ». *Malaria Journal* 1 (avril): 5.
- Kumar, Rajinder, Alla Musiyenko, Anja Oldenburg, Brian Adams, et Sailen Barik. 2004. « Post-Translational Generation of Constitutively Active Cores from Larger Phosphatases in the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum: Implications for Proteomics ». *BMC Molecular Biology* 5 (juillet): 6. doi:10.1186/1471-2199-5-6.
- Kumar, Anuj Tripathi, Ravikant Ranjan, Jean Halbert, Tim Gilberger, Christian Doerig, et Pushkar Sharma. 2014. « Regulation of Plasmodium Falciparum Development by Calcium-Dependent Protein Kinase 7 (PfCDPK7) ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29): 20386-95. doi:10.1074/jbc.M114.561670.
- Kumar, Ankush Vaid, Chiang Syin, et Pushkar Sharma. 2004. « PfPKB, a Novel Protein Kinase B-like Enzyme from Plasmodium Falciparum: I. Identification, Characterization, and Possible Role in Parasite Development ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 24255-64. doi:10.1074/jbc.M312855200.
- Kutuzov, Mikhail A., et Alexandra V. Andreeva. 2012. « Prediction of Biological Functions of Shewanella-like Protein Phosphatases (Shelphs) across Different Domains of Life ». *Functional & Integrative Genomics* 12 (1): 11-23. doi:10.1007/s10142-011-0254-z.

## L

- Langeberg, Lorene K., et John D. Scott. 2015. « Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 16 (4): 232-44. doi:10.1038/nrm3966.
- Lasonder, Edwin, Judith L. Green, Grazia Camarda, Hana Talabani, Anthony A. Holder, Gordon Langsley, et Pietro Alano. 2012. « The Plasmodium Falciparum Schizont Phosphoproteome Reveals Extensive Phosphatidylinositol and cAMP-Protein Kinase A Signaling ». *Journal of Proteome Research* 11 (11): 5323-37. doi:10.1021/pr300557m.
- Lasonder, Edwin, Moritz Treeck, Mahmood Alam, et Andrew B. Tobin. 2012. « Insights into the Plasmodium Falciparum Schizont Phospho-Proteome ». *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 14 (10): 811-19. doi:10.1016/j.micinf.2012.04.008.
- Le Roch, K., C. Sestier, D. Dorin, N. Waters, B. Kappes, D. Chakrabarti, L. Meijer, et C. Doerig. 2000. « Activation of a Plasmodium Falciparum cdc2-Related Kinase by Heterologous p25 and Cyclin H. Functional Characterization of a P. Falciparum Cyclin Homologue ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (12): 8952-58.
- Le Roch, Karine G., Yingyao Zhou, Peter L. Blair, Muni Grainger, J. Kathleen Moch, J. David Haynes, Patricia De La Vega, et al. 2003. « Discovery of Gene Function by Expression



- Profiling of the Malaria Parasite Life Cycle ». *Science (New York, N.Y.)* 301 (5639): 1503-8. doi:10.1126/science.1087025.
- Leang, Rithea, Amy Barrette, Denis Mey Bouth, Didier Menard, Rashid Abdur, Socheat Duong, et Pascal Ringwald. 2013. « Efficacy of Dihydroartemisinin-Piperaquine for Treatment of Uncomplicated Plasmodium Falciparum and Plasmodium Vivax in Cambodia, 2008 to 2010 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (2): 818-26. doi:10.1128/AAC.00686-12.
- Leykauf, Kerstin, Moritz Treeck, Paul R. Gilson, Thomas Nebl, Thomas Bräulke, Alan F. Cowman, Tim W. Gilberger, et Brendan S. Crabb. 2010. « Protein Kinase a Dependent Phosphorylation of Apical Membrane Antigen 1 Plays an Important Role in Erythrocyte Invasion by the Malaria Parasite ». *PLoS Pathogens* 6 (6): e1000941. doi:10.1371/journal.ppat.1000941.
- Li, J. L., et D. A. Baker. 1997. « Protein Phosphatase Beta, a Putative Type-2A Protein Phosphatase from the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 249 (1): 98-106.
- . 1998. « A Putative Protein Serine/Threonine Phosphatase from Plasmodium Falciparum Contains a Large N-Terminal Extension and Five Unique Inserts in the Catalytic Domain ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 95 (2): 287-95.
- Li, J. L., D. A. Baker, et L. S. Cox. 2000. « Sexual Stage-Specific Expression of a Third Calcium-Dependent Protein Kinase from Plasmodium Falciparum ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1491 (1-3): 341-49.
- Li, J. L., G. A. Targett, et D. A. Baker. 2001. « Primary Structure and Sexual Stage-Specific Expression of a LAMMER Protein Kinase of Plasmodium Falciparum ». *International Journal for Parasitology* 31 (4): 387-92.
- Lim, Daniel C., Brian M. Cooke, Christian Doerig, et Jeroen P. J. Saeij. 2012. « Toxoplasma and Plasmodium Protein Kinases: Roles in Invasion and Host Cell Remodelling ». *International Journal for Parasitology* 42 (1): 21-32. doi:10.1016/j.ijpara.2011.11.007.
- Lindenthal, Christoph, et Mo-Quen Klinkert. 2002. « Identification and Biochemical Characterisation of a Protein Phosphatase 5 Homologue from Plasmodium Falciparum ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 120 (2): 257-68.
- Llinás, Manuel, et Joseph L. DeRisi. 2004. « Pernicious Plans Revealed: Plasmodium Falciparum Genome Wide Expression Analysis ». *Current Opinion in Microbiology* 7 (4): 382-87. doi:10.1016/j.mib.2004.06.014.
- Lopez-Rubio, Jose Juan, Alisson M. Gontijo, Marta C. Nunes, Neha Issar, Rosaura Hernandez Rivas, et Artur Scherf. 2007. « 5' Flanking Region of Var Genes Nucleate Histone Modification Patterns Linked to Phenotypic Inheritance of Virulence Traits in Malaria Parasites ». *Molecular Microbiology* 66 (6): 1296-1305. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06009.x.
- Lopez-Rubio, Jose-Juan, Liliana Mancio-Silva, et Artur Scherf. 2009. « Genome-Wide Analysis of Heterochromatin Associates Clonally Variant Gene Regulation with Perinuclear Repressive Centers in Malaria Parasites ». *Cell Host & Microbe* 5 (2): 179-90. doi:10.1016/j.chom.2008.12.012.
- Low, Huiyu, Chun Song Chua, et Tiow-Suan Sim. 2009. « Regulation of Plasmodium Falciparum Pfnek3 Relies on Phosphorylation at Its Activation Loop and at Threonine 82 ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66 (18): 3081-90. doi:10.1007/s00018-009-0101-8.

**M**

- Macedo, Cristiana S. de, Ralph T. Schwarz, Adriane R. Todeschini, Jose O. Previato, et Lucia Mendonça-Previato. 2010. « Overlooked Post-Translational Modifications of Proteins in *Plasmodium Falciparum*: N- and O-Glycosylation -- a Review ». *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 105 (8): 949-56.
- MacKintosh, C., K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen, et G. A. Codd. 1990. « Cyanobacterial Microcystin-LR Is a Potent and Specific Inhibitor of Protein Phosphatases 1 and 2A from Both Mammals and Higher Plants ». *FEBS Letters* 264 (2): 187-92.
- Mahipal, Amit, et Mokenge Malafa. 2016. « Importins and exportins as therapeutic targets in cancer ». *Pharmacology & Therapeutics*. Consulté le juillet 11. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.020.
- Malkin, Elissa M., Anna P. Durbin, David J. Diemert, Jetsumon Sattabongkot, Yimin Wu, Kazutoyo Miura, Carole A. Long, et al. 2005. « Phase 1 Vaccine Trial of Pvs25H: A Transmission Blocking Vaccine for *Plasmodium Vivax* Malaria ». *Vaccine* 23 (24): 3131-38. doi:10.1016/j.vaccine.2004.12.019.
- Mamoun, C. B., et D. E. Goldberg. 2001. « *Plasmodium* Protein Phosphatase 2C Dephosphorylates Translation Elongation Factor 1beta and Inhibits Its PKC-Mediated Nucleotide Exchange Activity in Vitro ». *Molecular Microbiology* 39 (4): 973-81.
- Mamoun, C. B., D. J. Sullivan, R. Banerjee, et D. E. Goldberg. 1998. « Identification and Characterization of an Unusual Double Serine/Threonine Protein Phosphatase 2C in the Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (18): 11241-47.
- Mancio-Silva, Liliana, Jose Juan Lopez-Rubio, Aurélie Claes, et Artur Scherf. 2013. « Sir2a Regulates rDNA Transcription and Multiplication Rate in the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* ». *Nature Communications* 4: 1530. doi:10.1038/ncomms2539.
- Manzoni, Giulia, Sylvie Briquet, Veronica Risco-Castillo, Charlotte Gaultier, Selma Topçu, Maria Larisa Ivănescu, Jean-François Franetich, Bénédicte Hoareau-Coudert, Dominique Mazier, et Olivier Silvie. 2014. « A Rapid and Robust Selection Procedure for Generating Drug-Selectable Marker-Free Recombinant Malaria Parasites ». *Scientific Reports* 4: 4760. doi:10.1038/srep04760.
- Marsh, K., et R. J. Howard. 1986. « Antigens Induced on Erythrocytes by *P. Falciparum*: Expression of Diverse and Conserved Determinants ». *Science (New York, N.Y.)* 231 (4734): 150-53.
- McConkey, G. A., M. J. Rogers, et T. F. McCutchan. 1997. « Inhibition of *Plasmodium Falciparum* Protein Synthesis. Targeting the Plastid-like Organelle with Thiostrepton ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (4): 2046-49.
- McRobert, Louisa, Cathy J. Taylor, Wensheng Deng, Quinton L. Fivelman, Ross M. Cummings, Spencer D. Polley, Oliver Billker, et David A. Baker. 2008. « Gametogenesis in Malaria Parasites Is Mediated by the cGMP-Dependent Protein Kinase ». *PLoS Biology* 6 (6): e139. doi:10.1371/journal.pbio.0060139.
- Merckx, Anaïs, Karine Le Roch, Marie-Paule Nivez, Dominique Dorin, Pietro Alano, Gustavo J. Gutierrez, Angel R. Nebreda, et al. 2003. « Identification and Initial Characterization of Three Novel Cyclin-Related Proteins of the Human Malaria Parasite *Plasmodium*

- Falciparum ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (41): 39839-50. doi:10.1074/jbc.M301625200.
- Merckx, Anaïs, Marie-Paule Nivez, Guillaume Bouyer, Pietro Alano, Gordon Langsley, Kirk Deitsch, Serge Thomas, Christian Doerig, et Stéphane Egée. 2008. « Plasmodium Falciparum Regulatory Subunit of cAMP-Dependent PKA and Anion Channel Conductance ». *PLoS Pathogens* 4 (2): e19. doi:10.1371/journal.ppat.0040019.
- Miao, Jun, Qi Fan, Long Cui, Xiaolian Li, Haiyan Wang, Gang Ning, Joseph C. Reese, et Liwang Cui. 2010. « The MYST Family Histone Acetyltransferase Regulates Gene Expression and Cell Cycle in Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *Molecular Microbiology* 78 (4): 883-902. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07371.x.
- Miao, Jun, Matthew Lawrence, Victoria Jeffers, Fangqing Zhao, Daniel Parker, Ying Ge, William J. Sullivan, et Liwang Cui. 2013. « Extensive Lysine Acetylation Occurs in Evolutionarily Conserved Metabolic Pathways and Parasite-Specific Functions during Plasmodium Falciparum Intraerythrocytic Development ». *Molecular Microbiology* 89 (4): 660-75. doi:10.1111/mmi.12303.
- Miller, Louis H., Dror I. Baruch, Kevin Marsh, et Ogobara K. Doumbo. 2002. « The Pathogenic Basis of Malaria ». *Nature* 415 (6872): 673-79. doi:10.1038/415673a.
- Mishra, S. K., S. Mohanty, S. K. Satpathy, et D. N. Mohapatra. 2007. « Cerebral Malaria in Adults -- a Description of 526 Cases Admitted to Ispat General Hospital in Rourkela, India ». *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 101 (3): 187-93. doi:10.1179/136485907X157004.
- Mitra, Pallabi, Enna Dogra Gupta, Tajali Sahar, Alok K. Pandey, Poonam Dangi, K. Sony Reddy, Virander Singh Chauhan, et Deepak Gaur. 2016. « Evidence for the Nucleo-Apical Shuttling of a Beta-Catenin Like Plasmodium falciparum Armadillo Repeat Containing Protein ». *PLoS ONE* 11 (2). doi:10.1371/journal.pone.0148446.
- Mollinari, Cristiana, Caroline Reynaud, Stephanie Martineau-Thuillier, Solange Monier, Sylvie Kieffer, Jerome Garin, Paul R. Andreassen, et al. 2003. « The Mammalian Passenger Protein TD-60 Is an RCC1 Family Member with an Essential Role in Prometaphase to Metaphase Progression ». *Developmental Cell* 5 (2): 295-307.
- Moon, Robert W., Cathy J. Taylor, Claudia Bex, Rebecca Schepers, David Goulding, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, David A. Baker, et Oliver Billker. 2009. « A Cyclic GMP Signalling Module That Regulates Gliding Motility in a Malaria Parasite ». *PLoS Pathogens* 5 (9): e1000599. doi:10.1371/journal.ppat.1000599.
- Morlon-Guyot, Juliette, Laurence Berry, Chun-Ti Chen, Marc-Jan Gubbels, Maryse Lebrun, et Wassim Daher. 2014. « The Toxoplasma Gondii Calcium-Dependent Protein Kinase 7 Is Involved in Early Steps of Parasite Division and Is Crucial for Parasite Survival ». *Cellular Microbiology* 16 (1): 95-114. doi:10.1111/cmi.12186.
- Möskes, Christian, Petra A. Burghaus, Barbara Wernli, Ursula Sauder, Markus Dürrenberger, et Barbara Kappes. 2004. « Export of Plasmodium Falciparum Calcium-Dependent Protein Kinase 1 to the Parasitophorous Vacuole Is Dependent on Three N-Terminal Membrane Anchor Motifs ». *Molecular Microbiology* 54 (3): 676-91. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04313.x.
- Mota, M. M., G. Pradel, J. P. Vanderberg, J. C. Hafalla, U. Frevert, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, et A. Rodríguez. 2001. « Migration of Plasmodium Sporozoites through Cells before Infection ». *Science (New York, N.Y.)* 291 (5501): 141-44. doi:10.1126/science.291.5501.141.



- Müller, Ingrid B., Julia Knöckel, Marie-Luise Eschbach, Bärbel Bergmann, Rolf D. Walter, et Carsten Wrenger. 2010. « Secretion of an Acid Phosphatase Provides a Possible Mechanism to Acquire Host Nutrients by Plasmodium Falciparum ». *Cellular Microbiology* 12 (5): 677-91. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01426.x.
- Murphy, S. C., et J. G. Breman. 2001. « Gaps in the Childhood Malaria Burden in Africa: Cerebral Malaria, Neurological Sequelae, Anemia, Respiratory Distress, Hypoglycemia, and Complications of Pregnancy ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64 (1-2 Suppl): 57-67.

## N

- Nagaraj, Viswanathan Arun, Dasari Prasad, Pundi N. Rangarajan, et Govindarajan Padmanaban. 2009. « Mitochondrial Localization of Functional Ferrochelatase from Plasmodium Falciparum ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 168 (1): 109-12. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.05.008.
- Nemergut, M. E., C. A. Mizzen, T. Stukenberg, C. D. Allis, et I. G. Macara. 2001. « Chromatin Docking and Exchange Activity Enhancement of RCC1 by Histones H2A and H2B ». *Science (New York, N.Y.)* 292 (5521): 1540-43. doi:10.1126/science.292.5521.1540.
- Nisbet, R. E. R., et J. L. McKenzie. 2016. « Transcription of the Apicoplast Genome ». *Molecular and Biochemical Parasitology*, juillet. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.07.004.
- Nunes, Marta C., J. P. Dean Goldring, Christian Doerig, et Artur Scherf. 2007. « A Novel Protein Kinase Family in Plasmodium Falciparum Is Differentially Transcribed and Secreted to Various Cellular Compartments of the Host Cell ». *Molecular Microbiology* 63 (2): 391-403. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05521.x.
- Nunes, Marta C., Mami Okada, Christine Scheidig-Benatar, Brian M. Cooke, et Artur Scherf. 2010. « Plasmodium Falciparum FIKK Kinase Members Target Distinct Components of the Erythrocyte Membrane ». *PloS One* 5 (7): e11747. doi:10.1371/journal.pone.0011747.
- Nygren, Patrick J., et John D. Scott. 2015. « Therapeutic strategies for anchored kinases and phosphatases: exploiting short linear motifs and intrinsic disorder ». *Frontiers in Pharmacology* 6 (juillet). doi:10.3389/fphar.2015.00158.

## O

- Ockenhouse, C. F., P. F. Sun, D. E. Lanar, B. T. Welde, B. T. Hall, K. Kester, J. A. Stoute, et al. 1998. « Phase I/IIa Safety, Immunogenicity, and Efficacy Trial of NYVAC-Pf7, a Pox-Vectored, Multiantigen, Multistage Vaccine Candidate for Plasmodium Falciparum Malaria ». *The Journal of Infectious Diseases* 177 (6): 1664-73.

**P**

- Painter, Heather J., Tracey L. Campbell, et Manuel Llinás. 2011. « The Apicomplexan AP2 Family: Integral Factors Regulating Plasmodium Development ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 176 (1): 1-7. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.11.014.
- Pandey, Rajan, Asif Mohammed, Christine Pierrot, Jamal Khalife, Pawan Malhotra, et Dinesh Gupta. 2014. « Genome Wide in Silico Analysis of Plasmodium Falciparum Phosphatome ». *BMC Genomics* 15: 1024. doi:10.1186/1471-2164-15-1024.
- Patzewitz, Eva-Maria, David S. Guttery, Benoit Poulin, Chandra Ramakrishnan, David J. P. Ferguson, Richard J. Wall, Declan Brady, Anthony A. Holder, Balázs Szöőr, et Rita Tewari. 2013. « An Ancient Protein Phosphatase, SHLP1, Is Critical to Microneme Development in Plasmodium Ookinetes and Parasite Transmission ». *Cell Reports* 3 (3): 622-29. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.032.
- Pendyala, Prakash Rao, Lawrence Ayong, Jennifer Eatrises, Melissa Schreiber, Connie Pham, Ratna Chakrabarti, David A. Fidock, Charles M. Allen, et Debopam Chakrabarti. 2008. « Characterization of a PRL Protein Tyrosine Phosphatase from Plasmodium Falciparum ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 158 (1): 1-10. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.11.006.
- Perez-Cervera, Yobana, Grégoire Harichaux, Jörg Schmidt, Françoise Debierre-Grockiego, Vanessa Dehennaut, Ulrike Bieker, Edwige Meurice, Tony Lefebvre, et Ralph T. Schwarz. 2011. « Direct Evidence of O-GlcNAcylation in the Apicomplexan Toxoplasma Gondii: A Biochemical and Bioinformatic Study ». *Amino Acids* 40 (3): 847-56. doi:10.1007/s00726-010-0702-4.
- Philip, Nisha, Heli J. Vaikkinen, Laurence Tetley, et Andrew P. Waters. 2012. « A Unique Kelch Domain Phosphatase in Plasmodium Regulates Ookinete Morphology, Motility and Invasion ». *PLoS One* 7 (9): e44617. doi:10.1371/journal.pone.0044617.
- Pierrot C, Dive D, et Khalife J. 2008. « Biofutur DOSSIER : Un jeu de cache-cache et de détournement des défenses de l'hôte. » <http://biofutur.revuesonline.com/article.jsp?articleId=12384>.
- Pino, Paco, Sarah Sebastian, Eunbin Arin Kim, Erin Bush, Mathieu Brochet, Katrin Volkmann, Elyse Kozlowski, Manuel Llinás, Oliver Billker, et Dominique Soldati-Favre. 2012a. « A tetracycline-repressible transactivator system to study essential genes in malaria parasites ». *Cell Host and Microbe*. doi:10.1016/j.chom.2012.10.016.
- Ponts, Nadia, Anita Saraf, Duk-Won D. Chung, Alona Harris, Jacques Prudhomme, Michael P. Washburn, Laurence Florens, et Karine G. Le Roch. 2011. « Unraveling the Ubiquitome of the Human Malaria Parasite ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (46): 40320-30. doi:10.1074/jbc.M111.238790.
- Ponts, Nadia, Jianfeng Yang, Duk-Won Doug Chung, Jacques Prudhomme, Thomas Girke, Paul Horrocks, et Karine G. Le Roch. 2008. « Deciphering the Ubiquitin-Mediated Pathway in Apicomplexan Parasites: A Potential Strategy to Interfere with Parasite Virulence ». *PLoS One* 3 (6): e2386. doi:10.1371/journal.pone.0002386.
- Pradel, G., et U. Frevort. 2001. « Malaria Sporozoites Actively Enter and Pass through Rat Kupffer Cells prior to Hepatocyte Invasion ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33 (5): 1154-65. doi:10.1053/jhep.2001.24237.

## Q

- Qari, S. H., Y. P. Shi, I. F. Goldman, B. L. Nahlen, M. Tibayrenc, et A. A. Lal. 1998. « Predicted and Observed Alleles of Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1), a Potential Malaria Vaccine Antigen ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 92 (2): 241-52.
- Qian, Feng, Yimin Wu, Olga Muratova, Hong Zhou, Gelu Dobrescu, Peter Duggan, Lambert Lynn, et al. 2007. « Conjugating Recombinant Proteins to Pseudomonas Aeruginosa ExoProtein A: A Strategy for Enhancing Immunogenicity of Malaria Vaccine Candidates ». *Vaccine* 25 (20): 3923-33. doi:10.1016/j.vaccine.2007.02.073.

## R

- Rangarajan, Radha, Amy K. Bei, Deepa Jethwaney, Priscilla Maldonado, Dominique Dorin, Ali A. Sultan, et Christian Doerig. 2005. « A Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates Male Gametogenesis and Transmission of the Malaria Parasite Plasmodium Berghei ». *EMBO Reports* 6 (5): 464-69. doi:10.1038/sj.embor.7400404.
- Ranjan, Ravikant, Anwar Ahmed, Samudrala Gourinath, et Pushkar Sharma. 2009. « Dissection of Mechanisms Involved in the Regulation of Plasmodium Falciparum Calcium-Dependent Protein Kinase 4 ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (22): 15267-76. doi:10.1074/jbc.M900656200.
- Reininger, Luc, Oliver Billker, Rita Tewari, Arunima Mukhopadhyay, Clare Fennell, Dominique Dorin-Semblat, Caroline Doerig, et al. 2005. « A NIMA-Related Protein Kinase Is Essential for Completion of the Sexual Cycle of Malaria Parasites ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (36): 31957-64. doi:10.1074/jbc.M504523200.
- Reininger, Luc, Rita Tewari, Clare Fennell, Zoe Holland, Dean Goldring, Lisa Ranford-Cartwright, Oliver Billker, et Christian Doerig. 2009. « An Essential Role for the Plasmodium Nek-2 Nima-Related Protein Kinase in the Sexual Development of Malaria Parasites ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (31): 20858-68. doi:10.1074/jbc.M109.017988.
- Reiter, Katherine H., Anita Ramachandran, Xue Xia, Lauren E. Boucher, Jürgen Bosch, et Michael J. Matunis. 2016. « Characterization and Structural Insights into Selective E1-E2 Interactions in the Human and Plasmodium Falciparum SUMO Conjugation Systems ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (8): 3860-70. doi:10.1074/jbc.M115.680801.
- Renault, L., N. Nassar, I. Vetter, J. Becker, C. Klebe, M. Roth, et A. Wittinghofer. 1998. « The 1.7 Å Crystal Structure of the Regulator of Chromosome Condensation (RCC1) Reveals a Seven-Bladed Propeller ». *Nature* 392 (6671): 97-101. doi:10.1038/32204.
- Resh, Marilyn D. 2013. « Covalent Lipid Modifications of Proteins ». *Current Biology: CB* 23 (10): R431-435. doi:10.1016/j.cub.2013.04.024.
- Roestenberg, Meta, Anne C. Teirlinck, Matthew B. B. McCall, Karina Teelen, Krystelle Nganou Makamdop, Jorien Wiersma, Theo Arens, et al. 2011. « Long-Term Protection against Malaria after Experimental Sporozoite Inoculation: An Open-Label Follow-up Study ». *Lancet (London, England)* 377 (9779): 1770-76. doi:10.1016/S0140-6736(11)60360-7.

- Rogers, William O., Rithy Sem, Thong Tero, Pheaktra Chim, Pharath Lim, Sinuon Muth, Duong Socheat, Frédéric Arieu, et Chansuda Wongsrichanalai. 2009. « Failure of Artesunate-Mefloquine Combination Therapy for Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria in Southern Cambodia ». *Malaria Journal* 8: 10. doi:10.1186/1475-2875-8-10.
- Rogerson, Stephen J., Lars Hviid, Patrick E. Duffy, Rose F. G. Leke, et Diane W. Taylor. 2007. « Malaria in Pregnancy: Pathogenesis and Immunity ». *The Lancet. Infectious Diseases* 7 (2): 105-17. doi:10.1016/S1473-3099(07)70022-1.
- RTS,S Clinical Trials Partnership. 2015. « Efficacy and Safety of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine with or without a Booster Dose in Infants and Children in Africa: Final Results of a Phase 3, Individually Randomised, Controlled Trial ». *Lancet (London, England)* 386 (9988): 31-45. doi:10.1016/S0140-6736(15)60721-8.

## S

- Sacarlal, Jahit, Pedro Aide, John J. Aponte, Montse Renom, Amanda Leach, Inácio Mandomando, Marc Lievens, et al. 2009. « Long-Term Safety and Efficacy of the RTS,S/AS02A Malaria Vaccine in Mozambican Children ». *The Journal of Infectious Diseases* 200 (3): 329-36. doi:10.1086/600119.
- Sato, Shigeharu. 2011. « The Apicomplexan Plastid and Its Evolution ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68 (8): 1285-96. doi:10.1007/s00018-011-0646-1.
- Sato, Shigeharu, et R. J. M. Wilson. 2002. « The Genome of Plasmodium Falciparum Encodes an Active Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase ». *Current Genetics* 40 (6): 391-98. doi:10.1007/s00294-002-0273-3.
- Schillace, R. V., et J. D. Scott. 1999. « Association of the Type 1 Protein Phosphatase PP1 with the A-Kinase Anchoring Protein AKAP220 ». *Current Biology: CB* 9 (6): 321-24.
- Schmitt, Anja, et Angel R. Nebreda. 2002. « Signalling Pathways in Oocyte Meiotic Maturation ». *Journal of Cell Science* 115 (12): 2457-59.
- Schneider, Achim G., et Odile Mercereau-Puijalon. 2005. « A New Apicomplexa-Specific Protein Kinase Family: Multiple Members in Plasmodium Falciparum, All with an Export Signature ». *BMC Genomics* 6: 30. doi:10.1186/1471-2164-6-30.
- Seder, Robert A., Lee-Jah Chang, Mary E. Enama, Kathryn L. Zephir, Uzma N. Sarwar, Ingelise J. Gordon, LaSonji A. Holman, et al. 2013. « Protection against Malaria by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccine ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6152): 1359-65. doi:10.1126/science.1241800.
- Seki, T., N. Hayashi, et T. Nishimoto. 1996. « RCC1 in the Ran Pathway ». *Journal of Biochemistry* 120 (2): 207-14.
- Sherman, Irwin W., Shigetoshi Eda, et Enrique Winograd. 2003. « Cytoadherence and Sequestration in Plasmodium Falciparum: Defining the Ties That Bind ». *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 5 (10): 897-909.
- Sidhu, Amar Bir Singh, Stephanie Gaw Valderramos, et David a. Fidock. 2005. « pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in Plasmodium falciparum ». *Molecular Microbiology* 57 (4): 913-26. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04729.x.
- Silva-Neto, Mário A. C., Geórgia C. Atella, et Mohammed Shahabuddin. 2002. « Inhibition of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Blocks Morphological Differentiation of

- Plasmodium Gallinaceum Zygotes to Ookinetes ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 14085-91. doi:10.1074/jbc.M107903200.
- Silvestrini, F., P. Alano, et J. L. Williams. 2000. « Commitment to the Production of Male and Female Gametocytes in the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *Parasitology* 121 Pt 5 (novembre): 465-71.
- Singh, Shailja, Kunal R. More, et Chetan E. Chitnis. 2014. « Role of Calcineurin and Actin Dynamics in Regulated Secretion of Microneme Proteins in Plasmodium Falciparum Merozoites during Erythrocyte Invasion ». *Cellular Microbiology* 16 (1): 50-63. doi:10.1111/cmi.12177.
- Siribal, Saranya, Michael Weinfeld, Feridoun Karimi-Busheri, J. N. Mark Glover, Nina K. Bernstein, Danny Aceytuno, et Porntip Chavalitsheewinkoon-Petmitr. 2011. « Molecular Characterization of Plasmodium Falciparum Putative Polynucleotide Kinase/Phosphatase ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 180 (1): 1-7. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.06.007.
- Solyakov, Lev, Jean Halbert, Mahmood M. Alam, Jean-Philippe Semblat, Dominique Dorin-Semblat, Luc Reininger, Andrew R. Bottrill, et al. 2011. « Global Kinomic and Phospho-Proteomic Analyses of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *Nature Communications* 2: 565. doi:10.1038/ncomms1558.
- Spielmann, Tobias, et Tim-Wolf Gilberger. 2010. « Protein export in malaria parasites: do multiple export motifs add up to multiple export pathways? » *Trends in Parasitology* 26 (1): 6-10. doi:10.1016/j.pt.2009.10.001.
- Sturm, Angelika, Rogerio Amino, Claudia van de Sand, Tommy Regen, Silke Retzlaff, Annika Renneberg, Andreas Krueger, Jörg-Matthias Pollok, Robert Menard, et Volker T. Heussler. 2006. « Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5791): 1287-90. doi:10.1126/science.1129720.
- Surolia, N., et A. Surolia. 2001. « Triclosan Offers Protection against Blood Stages of Malaria by Inhibiting Enoyl-ACP Reductase of Plasmodium Falciparum ». *Nature Medicine* 7 (2): 167-73. doi:10.1038/84612.
- Syin, C., D. Parzy, F. Traincard, I. Boccaccio, M. B. Joshi, D. T. Lin, X. M. Yang, K. Assemat, C. Doerig, et G. Langsley. 2001. « The H89 cAMP-Dependent Protein Kinase Inhibitor Blocks Plasmodium Falciparum Development in Infected Erythrocytes ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 268 (18): 4842-49.

## **I**

- Talevich, Eric, Andrew B. Tobin, Natarajan Kannan, et Christian Doerig. 2012. « An Evolutionary Perspective on the Kinome of Malaria Parasites ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 367 (1602): 2607-18. doi:10.1098/rstb.2012.0014.
- Talman, Arthur M., Olivier Domarle, F. Ellis McKenzie, Frédéric Arieu, et Vincent Robert. 2004. « Gametocytogenesis: The Puberty of Plasmodium Falciparum ». *Malaria Journal* 3 (juillet): 24. doi:10.1186/1475-2875-3-24.

- Tan, Song. 2012. « Deciphering How the Chromatin Factor RCC1 Recognizes the Nucleosome: The Importance of Individuals in the Scientific Discovery Process ». *Biochemical Society Transactions* 40 (2): 351-56. doi:10.1042/BST20110734.
- Tarning, Joel. 2016. « Treatment of Malaria in Pregnancy ». *The New England Journal of Medicine* 374 (10): 981-82. doi:10.1056/NEJMe1601193.
- Taylor, Helen M., Louisa McRobert, Munira Grainger, Audrey Sicard, Anton R. Dluzewski, Christine S. Hopp, Anthony A. Holder, et David A. Baker. 2010. « The Malaria Parasite Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Plays a Central Role in Blood-Stage Schizogony ». *Eukaryotic Cell* 9 (1): 37-45. doi:10.1128/EC.00186-09.
- Tellier, Géraldine, Astrid Lenne, Katia Cailliau-Maggio, Alejandro Cabezas-Cruz, James J. Valdés, Alain Martoriat, El M. Aliouat, et al. 2016. « Identification of Plasmodium falciparum Translation Initiation eIF2 $\beta$  Subunit: Direct Interaction with Protein Phosphatase Type 1 ». *Infectious Diseases*, 777. doi:10.3389/fmicb.2016.00777.
- Tewari, Ursula, Alex, Ulrike, Inna, Peng, Arnab, et Oliver. 2010. « The Systematic Functional Analysis of Plasmodium Protein Kinases Identifies Essential Regulators of Mosquito Transmission ». *Cell Host & Microbe*, octobre 21, sect. volume 8, Issue 4.
- Tonkin, Christopher J., Céline K. Carret, Manoj T. Duraisingh, Till S. Voss, Stuart A. Ralph, Mirja Hommel, Michael F. Duffy, et al. 2009. « Sir2 Paralogs Cooperate to Regulate Virulence Genes and Antigenic Variation in Plasmodium Falciparum ». *PLoS Biology* 7 (4): e84. doi:10.1371/journal.pbio.1000084.
- Trager, W, et J B Jensen. 1976. « Human malaria parasites in continuous culture. » *Science (New York, N.Y.)* 193 (4254): 673-75.
- Trager, William. 2005. « What Triggers the Gametocyte Pathway in Plasmodium Falciparum? » *Trends in Parasitology* 21 (6): 262-64. doi:10.1016/j.pt.2005.04.005.
- Trecek, Moritz, John L. Sanders, Joshua E. Elias, et John C. Boothroyd. 2011. « The Phosphoproteomes of Plasmodium Falciparum and Toxoplasma Gondii Reveal Unusual Adaptations within and beyond the Parasites' Boundaries ». *Cell Host & Microbe* 10 (4): 410-19. doi:10.1016/j.chom.2011.09.004.
- Trelle, Morten B., Adriana M. Salcedo-Amaya, Adrian M. Cohen, Hendrik G. Stunnenberg, et Ole N. Jensen. 2009. « Global Histone Analysis by Mass Spectrometry Reveals a High Content of Acetylated Lysine Residues in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *Journal of Proteome Research* 8 (7): 3439-50. doi:10.1021/pr9000898.
- Tuteja, Renu. 2007. « Malaria - an Overview ». *The FEBS Journal* 274 (18): 4670-79. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x.

## U

- Udeinya, I. J., et K. Van Dyke. 1981a. « 2-Deoxyglucose: Inhibition of Parasitemia and of Glucosamine Incorporation into Glycosylated Macromolecules, in Malarial Parasites (Plasmodium Falciparum) ». *Pharmacology* 23 (3): 171-75.
- . 1981b. « Concurrent Inhibition by Tunicamycin of Glycosylation and Parasitemia in Malarial Parasites (Plasmodium Falciparum) Cultured in Human Erythrocytes ». *Pharmacology* 23 (3): 165-70.



- Umlas, J, et J N Fallon. 1971. « New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis. » *The American journal of tropical medicine and hygiene* 20 (4): 527-29.
- Urban, B. C., D. J. Ferguson, A. Pain, N. Willcox, M. Plebanski, J. M. Austyn, et D. J. Roberts. 1999. « Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes Modulate the Maturation of Dendritic Cells ». *Nature* 400 (6739): 73-77. doi:10.1038/21900.

## V

- Vaid, Ankush, et Pushkar Sharma. 2006. « PfPKB, a Protein Kinase B-like Enzyme from Plasmodium Falciparum: II. Identification of Calcium/Calmodulin as Its Upstream Activator and Dissection of a Novel Signaling Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (37): 27126-33. doi:10.1074/jbc.M601914200.
- Vaid, Ankush, Divya C. Thomas, et Pushkar Sharma. 2008. « Role of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-PfPKB Signaling Pathway in Erythrocyte Invasion by Plasmodium Falciparum ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5589-97. doi:10.1074/jbc.M708465200.
- Vandomme, Audrey, Aline Fréville, Katia Cailliau, Hadidjatou Kalamou, Jean-François Bodart, Jamal Khalife, et Christine Pierrot. 2014. « PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator of Plasmodium Falciparum: Identification of Its Residues Involved in Binding to and Activation of PP2A ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (2): 2431-53. doi:10.3390/ijms15022431.
- Vaucel, M., et Y. Féron. 1968. « [Introduction into the French language of the word "paludisme"] ». *Bulletin De La Société De Pathologie Exotique Et De Ses Filiales* 61 (4): 585-96.
- Vembar, Shruthi Sridhar, Dorothea Droll, et Artur Scherf. 2016. « Translational Regulation in Blood Stages of the Malaria Parasite Plasmodium Spp.: Systems-Wide Studies Pave the Way ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, mai. doi:10.1002/wrna.1365.
- Vernes, A, J D Haynes, P Tapchaisri, J L Williams, E Dutoit, et C L Diggs. 1984. « Plasmodium falciparum strain-specific human antibody inhibits merozoite invasion of erythrocytes. » *The American journal of tropical medicine and hygiene* 33 (2): 197-203.
- Vicogne, Jerome, Katia Cailliau, David Tulasne, Edith Browaeys, Yu Tao Yan, Veronique Fafeur, Jean Pierre Vilain, Dominique Legrand, Jacques Trolet, et Colette Dissous. 2004. « Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth Schistosoma mansoni. » *The Journal of biological chemistry* 279 (36): 37407-14. doi:10.1074/jbc.M313738200.
- Virshup, David M., et Shirish Shenolikar. 2009. « From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover ». *Molecular Cell* 33 (5): 537-45. doi:10.1016/j.molcel.2009.02.015.
- Volz, Jennifer C., Richard Bártfai, Michaela Petter, Christine Langer, Gabrielle A. Josling, Takafumi Tsuboi, Frank Schwach, et al. 2012. « PfSET10, a Plasmodium Falciparum Methyltransferase, Maintains the Active Var Gene in a Poised State during Parasite Division ». *Cell Host & Microbe* 11 (1): 7-18. doi:10.1016/j.chom.2011.11.011.

W

- Waller, R. F., M. B. Reed, A. F. Cowman, et G. I. McFadden. 2000. « Protein Trafficking to the Plastid of Plasmodium Falciparum Is via the Secretory Pathway ». *The EMBO Journal* 19 (8): 1794-1802. doi:10.1093/emboj/19.8.1794.
- Wang, Lihui, Claire Delahunty, Judith Helena Prieto, Stefan Rahlfs, Esther Jortzik, John R. Yates, et Katja Becker. 2014. « Protein S-Nitrosylation in Plasmodium Falciparum ». *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (18): 2923-35. doi:10.1089/ars.2013.5553.
- Wang, Y., Z. Wang, B. H. Joshi, R. K. Puri, B. Stultz, Q. Yuan, Y. Bai, et al. 2013. « The Tumor Suppressor Caliban Regulates DNA Damage-Induced Apoptosis through p53-Dependent and -Independent Activity ». *Oncogene* 32 (33): 3857-66. doi:10.1038/onc.2012.395.
- Ward, Pauline, Leila Equinet, Jeremy Packer, et Christian Doerig. 2004. « Protein Kinases of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum: The Kinome of a Divergent Eukaryote ». *BMC Genomics* 5 (octobre): 79. doi:10.1186/1471-2164-5-79.
- Wilkes, Jonathan M., et Christian Doerig. 2008. « The Protein-Phosphatome of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». *BMC Genomics* 9: 412. doi:10.1186/1471-2164-9-412.
- Witkowski, B., N. Khim, S. Kim, A. Domergue, V. Duru, et D. Menard. 2016. « [Multiple and successive treatment failures in a patient infected by Plasmodium falciparum in Cambodia and treated by dihydroartemisinin-piperaquine] ». *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique (1990)*, avril. doi:10.1007/s13149-016-0487-4.
- Wright, Megan H., Barbara Clough, Mark D. Rackham, Kaveri Rangachari, James A. Brannigan, Munira Grainger, David K. Moss, et al. 2014. « Validation of N-Myristoyltransferase as an Antimalarial Drug Target Using an Integrated Chemical Biology Approach ». *Nature Chemistry* 6 (2): 112-21. doi:10.1038/nchem.1830.
- Wu, Yimin, Craig Przysiecki, Elizabeth Flanagan, Sheila N. Bello-Irizarry, Roxana Ionescu, Olga Muratova, Gelu Dobrescu, et al. 2006. « Sustained High-Titer Antibody Responses Induced by Conjugating a Malarial Vaccine Candidate to Outer-Membrane Protein Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (48): 18243-48. doi:10.1073/pnas.0608545103.

Y

- Yeoh, Sharon, Rebecca A. O'Donnell, Konstantinos Koussis, Anton R. Dluzewski, Keith H. Ansell, Simon A. Osborne, Fiona Hackett, et al. 2007. « Subcellular Discharge of a Serine Protease Mediates Release of Invasive Malaria Parasites from Host Erythrocytes ». *Cell* 131 (6): 1072-83. doi:10.1016/j.cell.2007.10.049.
- Yeoman, Jeffrey A., Eric Hanssen, Alexander G. Maier, Nectarios Klonis, Bohumil Maco, Jake Baum, Lynne Turnbull, Cynthia B. Whitchurch, Matthew W. A. Dixon, et Leann Tilley. 2011. « Tracking Glideosome-Associated Protein 50 Reveals the Development and Organization of the Inner Membrane Complex of Plasmodium Falciparum ». *Eukaryotic Cell* 10 (4): 556-64. doi:10.1128/EC.00244-10.
- Yokoyama, D., A. Saito-Ito, N. Asao, K. Tanabe, M. Yamamoto, et T. Matsumura. 1998. « Modulation of the Growth of Plasmodium Falciparum in Vitro by Protein



Serine/Threonine Phosphatase Inhibitors ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247 (1): 18-23. doi:10.1006/bbrc.1998.8730.

## Z

- Zhang, Min, Clare Fennell, Lisa Ranford-Cartwright, Ramanavelan Sakthivel, Pascale Gueirard, Stephan Meister, Anat Caspi, et al. 2010. « The Plasmodium Eukaryotic Initiation Factor-2alpha Kinase IK2 Controls the Latency of Sporozoites in the Mosquito Salivary Glands ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (7): 1465-74. doi:10.1084/jem.20091975.
- Zhang, Min, Satish Mishra, Ramanavelan Sakthivel, Beatriz M. A. Fontoura, et Victor Nussenzweig. 2016. « UIS2: A Unique Phosphatase Required for the Development of Plasmodium Liver Stages ». *PLoS Pathogens* 12 (1): e1005370. doi:10.1371/journal.ppat.1005370.
- Zhang, Min, Satish Mishra, Ramanavelan Sakthivel, Margarito Rojas, Ravikant Ranjan, William J. Sullivan, Beatriz M. A. Fontoura, Robert Ménard, Thomas E. Dever, et Victor Nussenzweig. 2012. « PK4, a Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ ) Kinase, Is Essential for the Development of the Erythrocytic Cycle of Plasmodium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (10): 3956-61. doi:10.1073/pnas.1121567109.
- Zhang, Zhuo, Huirong Yang, et Hengbin Wang. 2014. « The Histone H2A Deubiquitinase USP16 Interacts with HERC2 and Fine-tunes Cellular Response to DNA Damage ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (47): 32883-94. doi:10.1074/jbc.M114.599605.
- Zhao, Xin, Zhiguang Chang, Zhiwei Tu, Shengchao Yu, Xiaoyan Wei, Jianhua Zhou, Huijun Lu, Ning Jiang, et Qijun Chen. 2014. « PfrON3 is an erythrocyte-binding protein and a potential blood-stage vaccine candidate antigen ». *Malaria Journal* 13 (décembre). doi:10.1186/1475-2875-13-490.
- Zhao, Y., B. Kappes, J. Yang, et R. M. Franklin. 1992. « Molecular Cloning, Stage-Specific Expression and Cellular Distribution of a Putative Protein Kinase from Plasmodium Falciparum ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 207 (1): 305-13.





# Annexes



○ Annexe 1 :

**Analysis of the interactome of the Ser/Thr Protein Phosphatase  
type 1 in *Plasmodium falciparum***

Thomas Hollin, Caroline De Witte, Astrid Lenne, Christine Pierrot et Jamal  
Khalife

Article publié en 2016 dans BMC Genomics

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC4794898/>



○ **Annexe 3 : Aligement entre CLP et Caliban.**

**Aligement de la région Nt : 37 % d'identité**

CLP	3	KQRLTALDIRAIVTLCKKNIVGCIVTNIYNI SNKIYVIKC--SRKEQKLFVLVEAEKRIH	60
		K R DI V +K +VG V IY++ NK Y+ + + +K+ L+E+ R H	
Caliban	2	KTRFNTFDIICGVAELQK-LVGWRVNIYDQVNDKTYLFRMQGTGAVEKVTLLIESGTRFH	60
CLP	61	ITEWKREKDVMPSSFMTMKLRKHLRSRKISNIKQLGADRVIDIQFGYDEKASHLIVELYIA	120
		T ++ K++ PS F+MKLRKHL+++++ ++Q+G+DR++D QFG + A H+I+ELY	
Caliban	61	TTRFEWPKNMAPSGFMSMKLRKHLKKNRLEKVVQMGSDRIVDFQFGTGDAAYHVILELYDR	120
CLP	121	GNIIILTDENYKILSILKSNDTVMGKKNVNDIYNVE	156
		GN+ILTD L IL+ + ++ + + Y VE	
Caliban	121	GNVILTDYELTTLYILRPHTEGENLRFAMREKYPVE	156

**Aligement de la région centrale (400 à 800 AA) : 38 % d'identité**

CLP	460	SFDDYNLCVDTYFSKLELSKYDQKQEITKSKNAITKVDKIKLDHERRIEQLEKEVLLKK	519
		+F+ + VD ++S E K D + + + + A+ K+ +K DH +R+E+L K + +K	
Caliban	318	TFESFMEAVDEFYSTQESQKID-MKTLQQEREALKKLSNVKNDHAKRLEELTKVQDVDRK	376
CLP	520	KITLIQLNDVLIIEGIKLMRSALSTSANWEKIWEHIKIFKQEHPIAVRIKSVNFKNCM	579
		K LI N L++ I+ ++SA+++ +W I E +K + +A IK + + +	
Caliban	377	KAELITSNQLSDVNAIRAVQSAIASQLSWPDIHELKVAQANGDAVASSIKQLKLETNHI	436
CLP	580	DYLLSDCDDRKGNKMGDDGDDDDDDGDDNNNNNKSCVKPKTFAVTINLNSVYGNIE	639
		+LSD +N+ + P+ V ++L S + N	
Caliban	437	SLMLSDPY-----DNDEDDDLKDPEVTVDVLDLALSANAR	473
CLP	640	DYQRLRKKAAEEKIRKTKMATDFAVKVEKKNKNDNNKQKQKAKSSVQIQKLRKVWFE	699
		+++ A +K +KT A+ A+K E+K +Q K ++ I K RKV+WFE	
Caliban	474	RYYDMKRSAAQKEKKTVDASQKALKSAERK-----TQQTLKEVRTISNIVKARKVWFE	527
CLP	700	KFWWFISSENYLVIAGRDAQNEILFRYFQKNDIYVHADIHGAASCIKPNPYKDTPIPD	759
		KF+WFISSENYLVI GRDA QNE++ +RY + DIYVHA+I GA+S II+NP + IP	
Caliban	528	KFYWFISSENYLVIGGRDAQNELIVKRYMRPKDIYVHAEIQGASSVIIQNPTGEE-IPP	586
CLP	760	KTLSEAGQLAICRSSAWNKIITSAWVYVYQVSKSAPSGEYLKTSFVIRGKKNYLPHV	819
		KTL EAG +AI S AW+ K++T+++WV +QVSK+AP+GEYL TGSF+IRGKKN+LP	
Caliban	587	KTLLEAGSMAISYSVAWDKVVVTSYVWVTSQVSKTAPTGEYLATGSFMIRGKKNFLPSC	646
CLP	820	KLEMGFCVLFQIE	832
		L MG +LF++E	
Caliban	647	HLTMLSLFLFKLE	659

**Aligement de la région Ct : 35 % d'identité**

CLP	1964	ENKNENKNENKNENENENKNKNVHLLRGARTKKKRMKKYKEQEDDE-ESRLLHMKI	2022
		E+K K E + ++ KN + RG + K K+MK+KYK+Q+D+E E R++ +K	
Caliban	785	EDKARAKQEAQEVPPVSSEPKNPSQVKRGQKGLKMKQKYKDQDEEREIRMMILKS	844
CLP	2023	IGSKMMKHEIEMPKKKEELKPFEMQNKYKGPKEVITNYEKINEDDMDIKLNEIHKLTNS	2082
		G + + + +K E K + K PK + + +E + ++ ++ LT	
Caliban	845	SGKEKQASADKVVSESTKEYVKEPSAAPKNPV-ELDDADEVPVGGDVVLSLTGQ	903
CLP	2083	PNEGDNLSFAIPMCAPYSAIQTHKYKIKLVPGNTTK	2118
		P+EGD L FAIP+ APY A+Q +K+K+KL PG K+	
Caliban	904	PHEGDELLFAIPVVAQALQNYKFKVKTPTGTGKR	939



○ Annexe 4 : Séquence protéique de RCC-PIP

MVSIEKKGSKIHVFLINNPkendkkkedalsntkdnniskenkgdknekninnneeivkgdekdsnehksnerveeiithkiyhpq  
VKIVKVCSCGRHIGFLSASGKIYCWHLNLNDFDKNPVYLLVDNIIKHKFIHDVSCGENHIAFLSKFEGELFTYGDNTYAO LGISYNS  
NNNNNNNIDHNNNNNIDNNNNNIDNNNNNIDNNNNNIDHNNNNNIDHNNNNNICNDDGILDNLTFNKLYNNNNN  
NNKLKNYKVKYVHKVNTQNNIVKAYASDKFTLFTLIEGILYGVLINEHLLKGD MNKDKINKILT KPHVINTNNSIFKKSIGHNFI  
LGVDMHNDVYSWGKNEKQVLGHTNNANDSHYPKIDNLSKANFISAG KICICITSDEDIYIWDGNYGNKPNLIKNFDSMHIN  
NNFLIGISPOQNIWVKNIHNLSHGYYINNLKINLCSSYDNLII GVENLDINSKENYNKHLHVSTSQTKNEISKIQNITQNNSDLHADI  
SDKKN SIDIVNTHISMVSDEVK GNDQNDLEKLNMD EMIKIEIDTKG DGDGDIKDGDIKDGDDIKDGDGDIKDGDDIKD  
GDKIKYGDNINDDNTNDDDNKDGDKIKYGDGKNNVVNLSDKNIDSSDVKSANDTYSQKSEKNIHNKKIDDIFKESNTQFH  
NEKEIYFFTNDVYEKNSFLQNDNKSKIEKNKETYLL ENSLKENPNISMNNNETNKNCDYHTSNCNIKDNINITYTNDDIK  
SLLNVEDASVDFNINSSKKEKDPKNNEEVGNLDVRKNILENNMKNDFNKNKNVTINDEQN DSEEIYNSKQDDVSCDDSS  
VNKDIRKNNYEGIPVVEVQDDEYEENEQDND DDDDDDEDGDDDDDED DDDDDHHDNDNDNKYHIVNYDDDT  
NNEYEDEESFLSTNFYGEKNNSDNINHKNIIIINKVSDKNIVLKSSLKSSSSDGIKKSVSF SKYVYDLAKNNYEP MNFKSFDDIT  
MSEMDQDDNINVTIPEHTFSQSTNKKIYEKDMNNDTSDNTLDTINNYESTFEMKDNLKEKKNQGKDLLNSHKQNEKEVIQI  
NHLITNMKNNTLKEELKNNNNHYEYVKNIN EDICKNDVNNLGT DSTKNNFGVTPSLDSTKNNFGVTPSLDSTKNNFGVTPS  
LDSTKNNFGVTPSLDSTKNNFGVTHNL DSTKNNFGVTPNL DSTKNNFGVTHNL DSTKNNFGVTPSLDSTKNNFGVTPSLDSIIK  
FSDEEKEQIYNKTLNNTFYNTKESNK FIEEEKKVNISLDPNKDNKDNNNINNNYEEIHKDGYILRNRYRTNENMEEQKKNSSFLI  
NQININNSNINKKHMD ELGLIHNNNNNNKYVND ESKYTFINIEEGQDNEKENHINEPNVKNFIHIENVKNNKKYIYTESFMKN  
NNNNNIYDNNNSNYYDNYTNVMKNKIKTCTKYTYKNVLKNRHKIYNTYDYNIRRGKNIKFVLTNCNYKTNLVKVHSM  
KKTKNVVIQNKMYDLLKLNKDHNIKLLYNHLYLIKQREAHILRVRYKGYLNKGNHISRKQQNNNIKKRSISSFLNQD  
NSNDNSDVNSFNIIKNIHYINDDIEKNKSNEYKVDNDDNNSNMLKKEKKNTKDKNTKDKNTKDKNTKDKNTKDKNTKDK  
KNTKDKNTKDKNTNITKKNNSYMSDNYLYNDNKSDSNIAQKEKIIIIKKKKKNIQNDKNNENNLLLYEKYIINISKPLDL  
DQKKWTSSIIKSKKDENVTRKYNDN NIVNKRSTLDNKKKNKVDMKYDHLNLLKSQVNGKKNIDEQNDQIISDNLSSSP  
KTKKNIVASKKIKTTKNGIKSNKRSSSVILANELIEKRNKILSDDTSKLLFMSYLVNTQNKNYSSINYYDDNNNYDDNNNYDD  
NNNYDDDDNNNYDDNNNYDDDDNNNNNSC SIRRNEKKRIPLKIKRNASATFIH SVNNYKKNDETYNTFSRIKNCNYSDTD  
KRKTPAHYVENISMSSYPFVENQINNKMEY EKYSKNITKNQITSEQDKMNSLYFDEVKKIKDDSTFLYNNVNYGKSIVHDD  
NNMDHINGNDYNMKKNKISKQTNVYSLIKQKTEKNIGTTSNRNVTKKIKEKIQKKNETDDEHMNIVNPQRNQHETDILLFD  
DESKKIKKKNKENDSSTNKETKLLKLLWTKIEDMKNNMMEEKRKKKNVNDSSNNNNNNNNYNSNYYFNINEHRDN  
YDNIVINKSNPPNYKNFNNLIDD TQIEVENTCDK KYKILLSNVKDKLYKNKIKEEKDKKYIRKIYKDMKH IYNEYNNMKKEKE  
HAKKSIEYLKFLLENTVIKSNEMLRINKNSFEHYIEKIQKENILKNELDEESYQH HYDLQQLVCKIKELEKSKEEAINQNEEYKKI  
MDLCSECDTLKKEIELKNIDDQKIHIEKEKKKKYILK KIENALKIWENDYNMLKDKYNNLISSNEQVINNEILKNEINKLDQ  
VCNKENIIHNKMD EIQINQKYILLTKECNLKN EYVPNESD TVYKKNMEEYKKNIDNLQNELLSKQNQLRYKDERILFLQDE  
QKTYLK YFNISKGLN NIMDKL KESYNINVKNEEYMEIILTNFIN TIINNLEDIKEFTNEKLDKIIHIFD NSLKNKLLPVHNYNNI  
SDQNSFLKSRNGLPLSEHSSNENITNKMNTNKNNNKNRNNANANNYNNQDNTLNCTTNNVNLSSNSKNQHLQK M VIEE  
MDDILNLEEIKENQLSHNDLLSVKNKT VQVTNELVDINKNENNYNGEEFNSNNIYDDHHCSDSNENSDYLNKYDQDVQN  
VPCDMNMKCEKRKYKNINSNVHHLRKGKNMNQSEINNSVSNMGNDTIKREDQH GKHSQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH  
QH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH GKHDQH  
HNQH DQH DQH DQHD ELLNMDEQQT DGHMIFPNVRKKHKNEGTNKKGNRKYINASNLEHVNSNGINKKHDEQYLGTQIRE  
LSSYDIKNMSNNEKVN LKGPLPNQMSSYIKKNEKQLKEKETEERRNLDQERNRDDICLSDHIDYCNNDYSNNHNFDDQN  
ICDDQNICDDQNICDDQNICDDQNICDDQNICDDQNICDDQSFCD DQNICDDQSFCD DQSFCD DQSFCD DQSFCD  
NQSFCDNQSFCD DQSFCD FEPQMNHKTQLKEITNNHLSNDKNEKTEKKNLKNHINYTTKTVSKNITNEQELYKNCKRKEKKL  
FNDMLDKIFDTPMDNTSMKNMNSNIQNL IENNIKNIYGTEDY

La séquence protéique correspondant au fragment RCC est indiquée en orange, et le fragment RCC-PIP en vert. Les motifs RCC1 sont surlignés en bleu et les motifs RVxF en rouge.

○ **Annexe 5 : Positionnement des amorces pour la réalisation des PCR par chevauchement sur de l'ADN rétro-transcrit.**

**ATGGTATCTATAGAAAAGAAAG**GAGCAAATACATGTGTTTCTTATAAATAATCCTAAGGAGAATGATAAAAAAAAAAGA  
 AGATGCATTAAGTAATACAAAAGATAATAATATAAGCAAAGAAAAAAGGGTGATAAAAATGAAAAGAATATAAATAATA  
 ATGAAGAAATTGTAAAAGGTGATGAGAAAGATAGTAATGAACATAAGAGTAATGAAAGGGTTGAAGAAATCATTACTCA  
 TAAAAATATCATCCACAAGTAAAAATTGTAAGGTAAGTTGTGGAAAAAGAATAATTGGTTTTCTGCAGCGTCAGGTAA  
 AATATATTGTTGGCACTTGAATGAATTAATGATTTTGATAAGAATGTACCATATTTATTAGTAGATAATATAATAAACAT  
 AAGTTTATACACGATGTTAGTTGTGGTGA AACCATATAGCTTTCTTATCTAAAGAAGGAGAATTATTTACATATGGTGATA  
 ATACCTATGCCCACTAGGAATATCATATAACAGCAATAATAATAAACAACAATATTGATCATAATAAACAACAATAT  
 TGATAATAATAAACAACAATATTGATAATAATAAACAACAATATTGATAATAAACAACAACAATATTGATCATAAT  
 AATAACAACAATATTGATCATAATAATAAACAATTTGTTGTAATGATGATGGTATACTTGATCTAAACTTTTTAACAAATT  
 ATATAATAATAATAATAAACAATTA AAAAATTATAAAAAATATAAAAGTACACAAAAGTGAATACACAAAATAATAT  
 TGTAAAATGTGCATATGCTTCAGACAAATTTACTATTTTTAACCATTTGAAGGTATTTTATATGGTGTGGTTAATAAATG  
 AACATTTACTTAAAGGAGATATGAATAAAGATAAAATTAATAAAATATTAACAAAACCATGTTATAAATACAAAATAATAT  
 ATCTTTTAAAAAATTTCCATAGGACATAATTTTATTCTAGGTGTAGATATGCACAAT **GATGTATATTCCTGGGG**AAAAAT  
 GAAAAAGGCGTGTAGGACATACTAATAATGCCAATGATTCTCATTATCCAAAAAATAGATAATCTATCTAAAGCCAAC  
 TTTATTAGTGCAGGAAAAATAT **GCATATGTATAACATCAGACG**AAGATATATATATATGGGGTGATAATTATGGGAATAAA  
 CCAAATTAATTA AAAAATAAATTTGATTCTATGCATATTAATAATAATTTTCTATTGGTATATCCCAAAAAAATATATG  
 GGTAAAAAATATTCATAATCTCTCACATGGATATTATATAAATAATCTTAAAAATAAACTGTGTTTCGTCATATGATAATTTAA  
 TAATAGGAGTAGAAAAATTTGGATATCAACTCTAAGGAAAATTATAATAAACATCTCCATGTTTCAACTAGCCAAACAAAA  
 ATGAAATCAGTAAGATACAAAATATTACCCAAAATAATAGTGATTTACATGCAGATATTTCTGATAAAAAAATCCATCGA  
 TATTGTTAATACGCATATTAGTATGGTGTCTGATGAGGTAAAGGGAAATGATCAGAACGATTTGGAAAACTTAATATGGA  
 TGAATGAAAATTGAAAAATCGACACCAAAGGAGATGGTGATAAAAATAAAGATGGTGATAAAAATAAAGATGGTGAT  
 AAAATAAAGATGGTGATGACATAAAGATGGTGATGACATAAAGATGGTGATGACATAAAGATGGTGATAAAAATAA  
 AATATGGTGATAACATAAATGATGATGATAACCAAATGATGATGATAACATAAAGATGGTGATAAAAATAAATATGGT  
 GATGGCAAAAACAATGTTGTCGTCAACCTTTCTGATAAGAATATCGATTTCATCAGATGTCAAATCGGCAAAATGATACTTATT  
 CTCAAAAAGTGAGAAAAATATTCATAATAAAAAAATTGATGATATATTTAAAGAATCAAATACACAATTTTCATAATGAAA  
 AAGAAATATATTCCTTTTTTACAAATGATGTGTATGAAAAAATAGTTTTCTACAAAATGATAATAAAGCAAAATAGAAA  
 AAAATAAGAAAGAAACATATTTATTAGAAAATAGTTTAAAGAAAATAATCCAAATATTTCTATGAATAATAATGAAACAA  
 ATAATAAAT **GTAATGATTACCATAC**TAATTGTAATATAAAGACAATAATATAAATACCTATACAAATGATGATAAAA  
 ATTCTCTTTATFAAA **TGTTGAAGATGCATCTGTAG**ATTTTAATATAAATAATAGTAAAAAAGAAAAGGATCCCAAAAATAAT  
 GAAGAGGTGGGGTAAATTTAGATGTAAGAAAAAATATTTGGAAAATAACATGAAAAATGATACTTTTAATAATAAAAA  
 TAATGTTACCATAAATGATGAACAAAATGATAGTGAAGAATATATATAAATCTAAACAAGATGATGTTAGTTGTGATGA  
 TTCAAGTGTGAATAAAGATATAAGAAAAAATAATTATGAAGGGATACCCGTAGTTGAAGTACAAGATGATGAATATTATG  
 AGGAAAACGAACAAGATAATGATGATGATGATGATGATGATGAAGATGATGGTGAAGATGATGATGATGAAGATGA  
 TGATGATGAAGATGATGATCATCATCATGATGATAACAACGATGATAATAAATACCATATTGTTAATTATGATGATGATAC  
 AATAACGAATATGAAGATGAAGAAAGTTTTTATCTACAAATTTTATGGAGAAAAAACAATTCAGATAATATAAATCA  
 TAAAAATATTATTATAATTAATAAAAAAGTATCCGACAAAGATAATATTGTTTTAAAATCATCTTTAAAAAATCTTCAAGTA  
 GTGATGGTATAAAAAAAGTGTGTCCTTTCTAAGTATGTATATGATTTAGCTAAGAATAATTACGAACCTATGAATTTTAA  
 ATCTTTTGTGATATTAATGTCCGAAATG **GATCAAGACGATAACATAAATGTTACAATACCTGAACATACATTTAGTCAA**  
 TCAACAAATAAAAAAATATATGAAAAGGACATGAATAAT **GATACTAGTGATAACACTTTAG**ATACCATAAATAATTATGAA  
 TCAACATTTGAAATGAAGGACAATTTAAAGGAAAAAAGATAATCAAGGTAAGGATTTTAAATAGTCACAAGCAAAA  
 TGAAAAAGAAGTTATTCAAATAAATCATCTCATAACAAATATGAATAAAAAATAACTCTAAAGGAAGAACTAAAAAATAA  
 TAATAATCATTATGAGTATGTA AAAAAGAATATAAATGAAGATATATGTA AAAATGATGTGAATAATTTAGGAACGGATA  
 GTACAAAAAATAATTT **GGTGTAAACCCAGTTTGG**ATAGTACAAAAAATAATTTTGGTGTAAACCCAGTTTGGATAGTA  
 CAAAAAATAATTTTGGTGTAAACCCAGTTTGGATAGTACAAAAAATAATTTTGGTGTAAACCCAGTTTGGATAGTACAAA  
 AAAATAATTTTGGTGTAAACACAATTTGGATAGTACAAAAAATAATTTTGGTGTAAACCCAATTTGGATAGTACAAAA  
 ATAATTTTGGTGTAAACACAATTTGGATAGTACAAAAAATAATTTTGGTGTAAACCCAGTTTGGATAGTACAAAAAATA  
 ATTTTGGTGTAAACCCAGTTTGGATAGTATTATAAATTTTCTGATGAAGAAAAAGAACAATATAAACA AAACCTTTGAA  
 CAATACCTTTTACAATACAAAGGAGTCAAATAAATTTATTGAGGAGGAAAAAAGGTTAATATTTCTTTAGATCCAAA  
 CAAGGATAATAAAGATAACAATAATAAATAAATAACTATGAAGAAATTCATAAGGATGGATATAT **CTTCGTAATTATCG**

TACAAATGAAAAATATGGAAGAACAAAAAACAATTCGTTTTTTCTTATAAATCAAATATAAATATAAATAGTAATATA  
AATAAAAAACACATGGACGAATTGGGTTTGATTCATAATAATAATAATAAATATGTAAATGATGAATCGAAATATACA  
TTTATTAATATTGAAGAAGGAAAAACAAGATAATGAAAAGGAGAATCATATAAATGAACCAAATGTTAAGAATAATTTTATA  
CATATTGAAAATGTAAAAATAAAAAAATATATATACACAGAAAGTTTTATGAAAAATAATAATAATAATATATAT  
GATAATAATAATAGTAATAATTATATATATGATAATTACTAATGTGATGAAAAATAAATCAAGACGTGTTGTACAAAAT  
ATACATATAAGAATGTTTTAAAAAATAGACATAAAATATATAATACAAATTATGATTATGTTAATATTAGAAGAGGAAAAA  
ATATAAAATTTGTCTTAACAAATTGTAAATTATAAGACTAATGTTTTAAAAGTTAAACATAGTATGAAAAAACAAGAAAAA  
TGTGATAATACAAAATAAAATGTATGACTTGTTAAAAAATTAAAAAATAAAGATCATAATATAAAATTATTATACAATCAT  
TTATATTTAATAAAAACAAAGGGAAGCACATATTTAAGAGTAAGGAATTATAAAGTAGGATATCTAAATAAAGGGAATCAT  
ATTTCTCGTAAACAACAAAATAATAATATTATAAAAAGAAAAGAAGTATATCTTCTTTTTCTTAAATCAACAAGATAATTC  
AAATGATAATTCGGATGTTAATTCATTTAATATTATAAAAAATATTCATTATATAAATGATGATATAGAAAAAATAAATCG  
AATGAATATTATAAAATGTAGATAATGATGATGATAATAAGTAATATGTTGAAGAAAGAAAAGAAAAAATAACAAA  
AGACAAAAATACAAAAGACAAAAATACAAAAGACAAAAATACAAAAGACAAAAATACAAAAGACAAAAATACAAAAGAC  
AAAAATACAAAAGACAAAAATACAAAAGACAAAAATACAAATATAACTAAAAAGAATAATCTTACATGGTTTCAGATAAT  
TATATATTATATAATGATAATAAAAAAAGTGATAGTAATATAGCACAAAAAGAAAAATTATAATAAAAAAATAAAAAA  
AAAAATATACAAAATGATAAAAAATAAAAAAATGAAAAAATTTGTTATTATATGAAAAATATATTATTAATAATATAA  
GTA  
AACCGTTAGACTTGGATCAAAAAAATGGACATCTAGCATTATTAATCCAAAAAAGATGAAAATGTTACAAGGAAA  
TATAATGATGATAATAATATTGTTAATAAAAGGAGTACATCACTTGATAACAAAAAATAAAGTAGTAGATATGAAA  
TATAAGGATCATCTAAATTTATTAATCACAAGTTAATAAAGGAAAAAATAAATAGATGAACAAAATGATCAAATTATT  
TCAGATAATTTGTCTTCATCACCAAAAAACAAAAAATAAATTTGTAGCATCAAAAAAATAAATACTACAAAAATGGA  
ATAAAATCAAATAAAGAAGTAGTTCTGTTATATTAGCGAATGAATTAATTGAAAAAGAAAATTTAAAAATTTGTCCGAT  
GATACATCAAAAAAATTATTATTTATGTCTTACTTAAATGTTAATACACAAAAATAAAATTATTCTTCTATTAATTATGATGA  
TAATAATAATTATGATGATAATAATAATTATGATGATAACAATAATTATGATGATGATGATAACAATAATTATGATGATAAC  
AATAATTATGATGATGATGATAACAATAATAATAATAGTTGTAGTAGTATTAGAAGGAATGAAAAAAGGATACCCCTTA  
AAAATTAAGAGAACGCATCAGCAAGATTTATCCATAGTGTCAATAATTATAAAAAAATGACGAAACATATAACACCTTC  
TCAAGAATTAATAAATTGTAATTACTATTCCGATACAGATAAAAGAAAAACACCTGCACATTATGTAGAAAAATATCAGCATG  
TCATCTTACCCTTTTGTGAAAAATCAGATAAATAATAAATGGAATATGAAAAATATAGTAAGGATAATATAACTAAAAATC  
AAATCACAAGTGAACAAGATAAAATGAATTCCTTATATTTTGTAGGATGAAAAAGATAAAAAAGGATGATTCCACATTTT  
CTCTATATAACAATGTTAATTATGGTAAGAGCATAGTTCATGATGATAATAACATGGACCATATTAATGGTAATGATTATAA  
TATGAAGAAGAATAAATAAGCAACAACAATGTATATTCATTAATTAACAAAAAGAAAACAGAAAAGAATATAGGAA  
CTACATCGAATAGAAATGTTACCAAGAAGATTAAGAAAAGATTCAAAAAGAAAAAATAAATGAACTGATGATGAACATATG  
AATATTGTGAATCCACAAAGGAATCAACACGAGACCGACATTCTTCTATTTGATGATGAAAGTAAAAAGATAAAAAAGAAT  
AAGAAAGAAAATGATAGTACTAATAAGGAACTAAAAAGAAGTTATTAAAAAAATTATGGACAAAAATAGAAGACAT  
GAAAAATAATATGATGGAAGAAAAAAGAAAAAATAAATGTAATGTAATGAAATGCTTCGAATTAATAAAAAATCTT  
TTGAACATTATATAGAAAAAATCAAAAAGAAAATAATTTTTAAAAAATGAATTAGATGAAGAATCCTACCAACATCATT  
TGATTTACAACAAGTATTTGTAATAAAGGAATTAGAGAAATCTAAGAAGAAGCTATAAACCAAAATGAAGAATATA  
ATAAAAAAGATAATGGATTTATGTTCCGAATGTGACTTTAAAAAAGAAAAGAAATAGAATTAACAAAAATATAGATGATC  
AGAAAATACATATAGAAAAAGAAAAGAAAAAATAATTTTTAAAAAATCGAAAATGCTTTAAAAATATGGGAA  
AATGATTACAATATGTTAAAAGATAAATAATAATTTAATATCATCAAACGAACAAGTTATAAATAATAATGAGATATTAA  
AAAATGAAATAAATAAATTAAGATCAAGTGTGTAATAAAGAAAATATTATTCATAATAAGATGGATGAAATTAATCAAA  
TAAATCAAAAATATATATTATAACAAAAGAATGTAATCTAAAAATGAATATGTA  
CCTAATGAATCGGATACGGTATATA  
AAAAATATAAAAAATGGAAGAATATTATAAAAAAATATAGACAATTTACAAAATGAGTTATTATCTAAACAAAA  
CCAAT  
TAAGATATAAAGATGAACGAATTTTATTTTACAAGATGAACAAAAAATTTTAAAAAATATTTTAAATATATCTAAAGG  
ATTAATAATATTATGGATAAATTAAGAAAAGTTATAATATTAATGTGAAAAATGAAGAATATATGGAATAATTTCTTAC  
CAATTTTATAACTATTATAAACAATTTAGAAGATTTAAGAATTTAAAAAATAAAGAAAATTAAGATAAATTTATT  
CATATATTTGATAATTCATTAAGAATAATAAATTATTACCTGTTCAATTAACAATATATCTGATCAGAATAGTTTCTT  
AAATCAAGGAATGGACTACCTTATCTGAGCATAGTAGTAATGAGAATAATATTACAAACAAGATGAACACAAATAAAAAA

AACAATAAAAAATAGAAATAATAATGCTAATAATAATTATAATAATCAAGACAATACTTTAAATTGTACAACAAATAATGTAC  
TCAACTCTTCTAATAATTCAAAGAATCAACATCTCCAAAAATGGTCATAGAAGAAATGGATGATATATTAATTTGTTAGA  
AGAAATTAAGAAAAACCAATTATCTCACAACGATTTATTATCCGTAAAAATAAACAGTCCAAGTAACAAATGAGCTTGT  
AGATATTAATAAGAACGAAAATAATTATAATAACGGTGAAGAATTAATAGTAATAACATATATGATGATCATCATTGTTCT  
ATAGATTCTAATGAAAACAGTGATTATCTCAAAAATGTATATGATCAAGACGTGCAAAAATGTACCATGTGACATGAATATG  
AAATGTGAAAAAGGAAATATAAAAATATTAATAGTAATGTGCACCATAATTTAAGAAAAGGGAAAAATAAAATGAATCA  
ATCGGAAATTAATAATTCTGTATCTAATATGGGTAATGATACAATAAAA **CGTGAGGATCAACATGGTAAAC**CACAGTCAACA  
TGGTAAACATGATCAACATGGTAAACATGATCAACATGGTAAACATGATCAACATGGTAAACATGATCAACATGGTAAAC  
ATGATCAACATGGTAAAC **CATGATCAACATGGTAAACATG**ATCAACATGGTAAACATGATCAACATGGTAAACATGATCAAC  
ATGGTAAACATGATCAACATGGTAAACATGATCAACATGGTAAACATGATCAACATGGTAAACATAACCAACATGATCAAC  
ATGACCAACATGATCAACATGGTAAACATAACCAACATGATCAGCATGACCAACATGACCAACACGATGAGCTACTAAACA  
TGGATGAACACAAACAGATGGTCATATGATATTCCTCAATGTAAGAAAAAACATAAAAAATGAAGGAACCAATAAAAAA  
GGCAATCGAAAATATAAATGCTTCCAATCTAGAACATGTTAATAGTAATGGTATTAATAAAAAACACGATGAACAATAT  
TTAGGAACACAAATAAGGGAATTAAGTTCTTATGATATCAAAAATAATATGAGTAATAATGAGAAAGTAAATCTCAAAGG  
ACCCTTACCAACCAAAATGAGCAGTTATATAAAAAAAATAAAGAAAAGCAATTAAGAAAAGAAAACAGAAGAAAGA  
AGGAACCTCGATCAAGAAAAGGAATCGAGATGATATCTGCCTAAGTGATCATATAGATTATTGTAACAATAAAGATTATTCT  
AATAACCACAATTTTTTTGACGACCAAAATATATGTGATGACCAAAATATATGTGACGACCAAAATATATGTGACGACCAA  
AATATATGTGATGACCAAAATATATGTGACGACCAAAATATATGTGACGACCAAAATATATGTGACGACCAAAATATATGT  
GACGACCAAAAGTTTTTGTGATGACCAAAATATATGTGATGACCAAAAGTTTTTGTGATGACCAAAAGTTTTTGTGATGACCAA  
AGTTTTTGTGATGACCAAAAGTTTTTGTGATAACCAAAAGTTTTTGTGATAACCAAAAGTTTTTGTGATGACCAATCTTTCTTTGA  
GCCTCAGATGAACCATAAAAAACCAATTAAGAAAATACCAACAACATTTGTCGTCAAATGACAAAAATGAAAAGAC  
GGAAAAAAAATTTGAAGAACCATATAAATTATAACAACAAAAAACTGTTTCTAAGAATATAACAAATGAACAGGAGT  
TATATAAAAATTGTAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAATTTCAATGATATGTTAGATAAAAATTTTGATACACCTATGGATA  
ATACATCAATGAATAAAAATATGTCCAATATACAAAACCTAATAGAAAATAATATAAAAAATTTTAT **GGTACAGAAGATT**  
**ATTATG**

*Le couple d'amorces 1 est surligné en jaune, le couple 2 en rose, le couple 3 en bleu, le couple 4 en vert, le couple 5 en bordeaux, le couple 6 en gris, le couple 7 en vert foncé. Le couple 8 est écrit en bleu, le couple 9 en vert et le couple 10 en rose.*

- **Annexe 6 : Alignement entre PfrCC-PIP et PbRCC-PIP**

PBANKA_082080.pro	1	-MSTDIRGSKINLEITINDVNNND-----CKDVKTESLTFVDKQEADNININEKKKEIITH
Pf3D7_091990.pro	1	MVSTIEKKGSKIHVLELNNPKENDKKKEDALSNTKDNNISKENKGDKNEKNINNNNEIIVKGDEKDSNEHKSNERVEEITH
PBANKA_082080.pro	56	KIYYPQVKIVKVSCKGKSIIAEFLSQIGKIYCWHLDNKEDCDKNVPYLLIDNILKNKTIHIVSSGSHIAFVSKGDLFTYG
Pf3D7_091990.pro	81	KIYYPQVKIVKVSCKGRRIIGFASASGKIYCWHLNELNDFDKNVYPLLVDNIIKHKFIHIVSCGENHIAFLSKGELFTYG
		RVXF
		RCC1 2
PBANKA_082080.pro	136	NNSHGQLGNMIEDDHKNGENDKNEENCKAPSN-----
Pf3D7_091990.pro	161	DNTYAQLGISYNSNNNNNNNIDHNNNNNIDNNNNNNIDNNNNNNIDHNNNNNIDHNNNNNICNDDGILDLT
		Consensus RCC1
PBANKA_082080.pro	168	-----HKTYKVYKVNLESNIIKKNVYCSDKYTLYLITDGLLYGGLINENFLKSKLNQNKINKTLLHPHL
Pf3D7_091990.pro	241	FNKLYNNNNNNNKLKNYKKYKVEKVNTONNIIVKCAVASDKFTLELTTEGILYGVGLINEHLLKGMKDKINKILTTPHV
PBANKA_082080.pro	233	IDTNNIAFKKITIGNNFILAISNNNVYSWGNNINGSLGHG-NFLDYEPNKIENLKNVNFINAGKISLCKTIDGDIYIV
Pf3D7_091990.pro	321	INTNNISFKKISIGENFILGVDHNDVYSWGKNEKGVLGHTNNANDSHYPKKIDNLSKANFISAGKICICITSDEDIYIV
		Consensus RCC1
PBANKA_082080.pro	312	GGTYGNKPNIKKNKFDLHINNNTIIGLCSKKNMWTKNINTSSHGYIINNLKINLISSYDNLIIGVDNFLQSDNVVDAKM
Pf3D7_091990.pro	401	GDNYGNKPNLIKKNKFDLHINNNTIIGISPOKNIWVKNIHNLSHGYIINNLKINLCSYDNLIIGVENLDINSKENYKX
PBANKA_082080.pro	392	GSTSDKNSNSLLETNSESVSNNGKDAKEDAKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDAKDDVKDDAKDDAKDDAKDD
Pf3D7_091990.pro	481	LHVSTSQTKNEISKIQNITQNNSDLHADISDKKNSIDIVNTHISMVSDVEVKNDQNDLEKLNMDKIEKIDTKGDGDKI
PBANKA_082080.pro	472	DAKDDAKDDAKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDDVKDD
Pf3D7_091990.pro	561	KDGDKIKDGDKIKDGDGDKDGDGDKDGDGDKDGDGDKDGDGDKDGDGDKDGDGDKDGDGDKDGDGDKDGDGDKDGDGDKD
PBANKA_082080.pro	532	THQKATNSDKPNNFRNLLNNNKDDVCDLKN-----YNENGEVHN-FKQDINENKIKSEPTLKYGEET
Pf3D7_091990.pro	641	SDVKSANDTYSQKSEKNIHNKKIDDIFKESNTQFHNEKEIYSFFTNDVYEKNSFLQNDNKSKEKNEKETYLLNSLKEN
PBANKA_082080.pro	593	NQNDIVPSNNGNNNSNNSNLLNICFNEKTYGQTPNSIPDNPIIDNSFSVKAFFIEGKNEKTKNKIN-----GLN
Pf3D7_091990.pro	721	NPNISMNNNETNNKCNQDYHTSNCNIKDNNINTYTNDIKFSLNVEDASVDENINNSKKEKDPKNNNEVGVNLDVRKNIL
PBANKA_082080.pro	662	NSDLINFSESEYNEIQTKESIPFNFPICKIPNDSNYIDN-----INNNDDSIFFMDSNYNDKKEIHN
Pf3D7_091990.pro	801	ENNMKNDTFENKNNVTINDEQNDSEYIYNSKQDDVSCDDSSVNKDIRKNNYEGIPVVEVQDDEYYEENEQNDDDDDDD
PBANKA_082080.pro	725	IKLNMENEN--IDNIKYSRKFISNDQVEINNDCDMNEELNKYYDEEDDFSTNFGY-LSESDYLDKNI IIIIN---NDE
Pf3D7_091990.pro	881	EDDGEDDDDDDEDDEDDDDHHHDDNNDNKYHIVNYDDDTNNEYEDESEFSLSTNFGYGEKNSDNINHKNI IIIINKKVS DK

PBANKA\_082080.pro 799 NNPNLKSAKKTTPSTTDTIKTVSE SKYTYDLERNSEYEPININVDYDGNIDESDYDKDS--EYSDDSCQENRNDQLNESNI  
 Pf3D7\_0919900.pro 961 DNIVLKSSLKSSSSDGIKSVSE SKYVYDLAKNNYEPNFKSFDDITMSEMDQDDNINVTIPEHTFSQSTNKKIYEKDM  
 RVXF

PBANKA\_082080.pro 877 MDFEANNIDNITCREYFNFNDQAYLKVESDDP-----NEVDVYDINKDSEHNFKNYKQ  
 Pf3D7\_0919900.pro 1041 NNDTSDNTLDITINNYESTFEMKDNLEKKNQOGKDLLNSHKQNEKEVIQINHLITNMNKNNTLKEELKNNNNHYEYVKKN

PBANKA\_082080.pro 932 LEGSTICNTDSILNNAATNMD-----TIFLNENNNNIVDIKHKDKIYNSEKSSNNI  
 Pf3D7\_0919900.pro 1121 INEDICKNDVNNLGTDS TKNNFGVTPSLDSTKNNFGVTPSLDSTKNNFGVTPSLDSTKNNFGVTPSLDSTKNNFGVTHNL

PBANKA\_082080.pro 982 HLIKNI-----ENIKMEINHKEYCQNGELDMNNTDLYVEGGSIEKYESTS-----SEEKNNLKNIEFENTKIL  
 Pf3D7\_0919900.pro 1201 DSTKNNFGVTPNLDSTKNNFGVTHNLDSTKNNFGVTPSLDSTKNNFGVTPSLDSIIKFSDEEKEQIYNKTLNNTFYNTKE

PBANKA\_082080.pro 1045 SSVYIRDHKTOMNNSQP-----NMDLSYNDITEN-----KFNDKNCITNNITNMDILNKYKNYN  
 Pf3D7\_0919900.pro 1281 SNKFLLEEKKKVNIISLDPNKDNKDNNINNNYEEIHKDGYILRNYRTNENMEEQKNNSSFLLINQNLININSNINKHMD

PBANKA\_082080.pro 1099 INVCTNON-----TENVELNTICTNNEEDDIYIFNINNELYNGNIN-----  
 Pf3D7\_0919900.pro 1361 LGLIHNNNNNKYVNDESKYTFINIEEGQDNEKENHINEPNVKNNFIHIENVKNKKKIYIYTESFMKNNNNNNIYDNNNSN

PBANKA\_082080.pro 1139 -----FDMLKEEIKKIRKAKYNNKKILNYEKKR-----KNGKYRLHIILLNDIIFNIKKILKIR  
 Pf3D7\_0919900.pro 1441 NYIYDNYTNVMKNKIKTCCTKYTKNVLKNRHKIYNTNYDYVNIIRGKNIKFVLTNCNYKTNVILKVHSMKKTKKYVITQ

PBANKA\_082080.pro 1194 YNISKKNIKKIYLTKSMKNYYQNMILKNOKIEIENEIKSFPMRLRTNKKRIDTIDMSN-----  
 Pf3D7\_0919900.pro 1521 NKMYDLLKLLKNKDNHNIKLLYNHLYLIKQREAHILRVRNYKVGYLNKGNHISRKQONNNI IKKRSISSFSLNQDQNSND

PBANKA\_082080.pro 1251 -----YNKHDDVINLNTPISONEQSNLIKNOPTKKKHSTIINNIFCKIVTNNKNT  
 Pf3D7\_0919900.pro 1601 NSDVNSFNIIKNIHYINDDIEKNKSNEYKKNVDNDDNNSNMLKKEKKKNTKDKNTKDKNTKDKNTKDKNTKDKNTKDKN

PBANKA\_082080.pro 1304 ISEVGR-----NCKNTNKILTSQNVLKNEKKNHVLIINTKNKAPSSENNFIQKKKIQLKS  
 Pf3D7\_0919900.pro 1681 TKDKNTKDKNTNITKKNNSYMVSDNYILYNDNKKSDSNIAQKEKII IKKKKKKNIQNDKNKNENNLLLYEKYIINNISK

PBANKA\_082080.pro 1360 EQLFVSAIGLTNFCNKQVKPETVVSINDD----INNRGYVMDNOKIINIKGEYYKE-----NDKDIDISNNFSIST  
 Pf3D7\_0919900.pro 1761 PLDLQKQWTSSI IKS KKKDENVTRKYNDNNI VNKRRSTLNDKKNKVVDMKYKDHLLNLLKSQVKNKGNKIIDEQNDQII

PBANKA\_082080.pro 1427 QNGMPLEATNNTNNYNCMHLSTYKNGNKKDYQISQLRKATHIITYNTDNGNLI PKSOIKSLQNEKNCLSKSSSRFGKVPF

Pf3D7\_0919900.pro 1841 SDNLS SSPKTKKKNIIVASKKIKTKNGIKSNKRSSSVILANELTEKRNKNI SDDTSKLLFMSYLVNVTQNKNYSSINY

PBANKA\_082080.pro 1507 NINSEKEIFNNLSEVGKNLNENSPGNVNMKNIVCVNGELEDNYTTN-INGKMLKKKI IKKGSPLYNMNNINIKKTETSD

Pf3D7\_0919900.pro 1921 DDNNNYDDNNNYDDNNNYDDDDNNNYDDNNNYDDDDNNNNNSCSSIRRNEKKRIPLKIKRNASATFIHSVNNYKKNDETY

PBANKA\_082080.pro 1586 SSEINKETSDLN-----HTIQTKPSIVTKMDNKKINKKKK

Pf3D7\_0919900.pro 2001 NTESRIKNCNYSDTDKRKTPAHYVENISMSSYPFVENQINNMEYEKYSKDNI TKNQITSEQDKMNSLYFDEVKKTIKKD

PBANKA\_082080.pro 1622 AQELI IYNNP-----IDNETTNVKSKNMISTKNETSODSIVLLSKKKK-----GINSILLNKS KIKPSKMCIT

Pf3D7\_0919900.pro 2081 DSTFSLYNNVNYGKSIVHDDNNMDHINGNDYNMKKNKISKQTNVYSLIKQKTEKNIGTTSNRNVTRKIKKEKI QKKNET

PBANKA\_082080.pro 1686 DTDNCNYNEEEKHNSKSVSILLLKGNENKTKNVNEN-----VEYYTNNDCCKKTKILKNEKKEIKC

Pf3D7\_0919900.pro 2161 DDEHMNI VNPQRNQHETDILLFDES KKI KKNKKNENDSSTNKETKKKLLKLLWTKIEDMKNNMEEKRKKKKNNVNDSS

PBANKA\_082080.pro 1747 MKKYISEENSRONKIONIEVFLDENEKKKKKK KKSMLINKIDNNINDEEYYIN--CDNYKNIKNNLETNIN KKNY-

Pf3D7\_0919900.pro 2241 SNNNNNNNNYNSNNYFNINEHRDNYDNIVINKSNPPNYNKFNNNLIDDTQIEVENTCDKKYKILLSNVKDKLYKNI KE

PBANKA\_082080.pro 1823 ----IKYAKRMLKDIKYIMIEYNNIKNEKEEMYKONNYLRFLLESTVVKTNEIRINKNSIQTYIEKIONENKILKNELD

Pf3D7\_0919900.pro 2321 EKKDKYIRKIYKDMKHIIYNEYNNMKKEKEHAKKSIEYLKFLLENTVIKSNEMLRINKNSFEHYIEKIQKENNILKNELD

PBANKA\_082080.pro 1900 EESHQHYYDLQQLV NKILSIEKVKENVIKONGEYNNKLSLISKOCEQYKLKEKKLLRNLDKYIKFAKRRKKKKK--INDL

Pf3D7\_0919900.pro 2401 EESYQHYYDLQQLVCKIKELEKSKEEAINQNEEYNNKIMDL CSECDTLKKKEIELNKNIDDQKIHIEKEKKKKYILKKI

PBANKA\_082080.pro 1978 KNSIKIFENNYNELKENYNSIKNYNHELLTKNDQKDETVNLKTOLKEKDIIIAQYTEQINTS-----

Pf3D7\_0919900.pro 2481 ENALKIWENDYNMLKDKYNNLISSNEQVINNNEILKNEINKLKDQVCNKENI IHNKMEINQINQYILLTKECNLKNEY

PBANKA\_082080.pro 2040 --NINNIIYSKHQKNTSILDIIKHNGDMLNSSKEL SINDDLEVASKTCTNIEFEKREPLDMFNISYKDNKIKPEEANK

Pf3D7\_0919900.pro 2561 VPNESDTVYKKYKNMEEYKKNIDNLQNELLSKQNLRYKDERILFLQDEQKTYLKYFNI SKGLNNIMDKLKESYNIN V

PBANKA\_082080.pro 2119 KIEFLVNPFLDNLIKRTLLKNVDPNRD-KEMDKLQEKLI DVLNEFVKNNKMETSYNIN-----

Pf3D7\_0919900.pro 2641 KNEEYMEIILTNEINNTIINNLEDIKEFKTNEKIKDKIITHIFDNSLKNNKLLPVHNNNISDQNSFLKSRNGLPLSEHSSN

PBANKA\_082080.pro 2174 -----KDENDKLVFLDNLDSCTEEYKKGIKNDYKSDNAEKV ISSLESIK-----

Pf3D7\_0919900.pro 2721 ENNITNKMNTNKNNNKRNRRNNNANNYNNQDNTLNCITNNVNLSSNNSKNQHLQK MVEEMDDILNLL EEIKENQLSHNDL







