HAL open science

Analyse de l'interactome de la Ser/Thr protéine phosphatase de type 1 (PP1) chez plasmodium falciparum : caractérisation moléculaire et fonctionnelle de Gametocyte EXported Protein 15

Thomas Hollin

To cite this version:

Thomas Hollin. Analyse de l'interactome de la Ser/Thr protéine phosphatase de type 1 (PP1) chez plasmodium falciparum : caractérisation moléculaire et fonctionnelle de Gametocyte EXported Protein 15. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S020 . tel-01968039

HAL Id: tel-01968039

https://theses.hal.science/tel-01968039v1

Submitted on 2 Jan 2019

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

Thomas HOLLIN

Le 22 Septembre 2017

Analyse de l'interactome de la Ser/Thr Protéine Phosphatase de Type 1 (PP1) chez *Plasmodium falciparum* : Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de Gametocyte EXported Protein 15

Devant le jury composé de :

Professeur **Jean-François BODART**	Président
Professeur **Rachel CERDAN**	Rapporteur
Professeur **Philippe GRELLIER**	Rapporteur
Docteur **Anaïs MERCKX**	Examinateur
Docteur **Jamal KHALIFE**	Directeur de thèse

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

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

Thomas HOLLIN

Le 22 Septembre 2017

Analyse de l'interactome de la Ser/Thr Protéine Phosphatase de Type 1 (PP1) chez *Plasmodium falciparum* : Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de Gametocyte EXported Protein 15

Devant le jury composé de :

Professeur **Jean-François BODART**	Président
Professeur **Rachel CERDAN**	Rapporteur
Professeur **Philippe GRELLIER**	Rapporteur
Docteur **Anaïs MERCKX**	Examinateur
Docteur **Jamal KHALIFE**	Directeur de thèse

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

Cette thèse a été réalisée au sein de

l'équipe 2 du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

sous la direction du Dr J. Khalife.

Un séjour dans le laboratoire du Dr P. Alano

de l'Institut Supérieur de la Santé de Rome a été réalisé

pour l'apprentissage de la culture et de la purification

de gamétocytes de *P. falciparum*

et la réalisation d'expériences d'immunofluorescence.

La première partie de cette thèse a été publiée dans

BMC Genomics (2016, 17:246).

Résumé

L'un des obstacles majeurs au développement de nouveaux antipaludiques est notre connaissance limitée de la biologie parasitaire et la rareté des cibles thérapeutiques potentielles identifiées. Les interactions protéines-protéines sont impliquées et essentielles dans divers processus biologiques incluant les modifications post-traductionnelles. Les interactions substrats-kinases ou phosphatases sont considérées comme une liaison transitoire et jouent un rôle central et essentiel dans le cycle cellulaire de *Plasmodium*. La Ser/Thr Protéine Phosphatase de Type 1 (PP1), l'une des phosphatases majeurs des eucaryotes, est essentielle à la survie du parasite *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme. Elle est régulée par diverses sous-unités régulatrices dont plus de 200 ont été identifiées chez l'Homme, mais seulement 4 chez *Plasmodium*.

Afin d'explorer le réseau de régulation de la *P. falciparum* PP1 (PfPP1), nous avons utilisé trois approches complémentaires pour caractériser l'interactome de la PfPP1. La purification par co-affinité suivie d'une analyse par spectrométrie de masse a identifié 6 protéines interagissant avec la PfPP1 dont 3 contenaient le motif consensus d'interaction RVxF, 2 autres le motif Fxx[RK]x[RK], également connu pour interagir avec la phosphatase et une protéine avec les deux motifs de liaison. Le criblage par double hybride chez la levure a identifié 134 protéines dont 30 présentent le motif RVxF et 20 ont le motif de liaison Fxx[RK]x[RK]. Le criblage *in silico* du génome de *P. falciparum*, en utilisant une séquence consensus du motif RVxF, a révélé 55 partenaires potentiels de la PfPP1. Afin de confirmer l'interaction de certaines protéines, 35 partenaires candidats ont été validés par un test d'interaction de type ELISA. Les résultats ont permis de détecter aussi bien des partenaires conservés de la PP1 qu'un nombre élevé d'interacteurs spécifiques à la PP1 du parasite et montrent une grande diversité dans les fonctions biologiques impliquant la PP1 chez *Plasmodium*.

Parmi ces candidats, un partenaire appelé Gametocyte EXported Protein 15 (GEXP15) a été sélectionné et caractérisé. Cette protéine est surexprimée chez les gamétocytes, stade responsable de la transmission du parasite chez le moustique et son interaction avec la PP1 a été confirmée par double hybride chez la levure et GST pull-down. L'utilisation d'un mutant a démontré que la formation du complexe était RVxF-dépendante. Le rôle de GEXP15, comme activateur de l'activité phosphatase de la PfPP1, a été montré *in vitro*. L'étude chez *P. berghei* a permis de mettre en évidence la co-localisation des deux protéines et la présence du complexe chez le parasite. L'exploration de la fonction biologique de GEXP15 chez *P. falciparum* et *P. berghei* est en cours. Les résultats préliminaires, obtenus à partir de parasites mutants délétés pour GEXP15, indiqueraient que la protéine a une influence sur le cycle sanguin de *P. berghei*.

Plasmodium, PP1, interactome, GEXP15, motif RVxF

Abstract

A major obstacle in the development of novel anti-malarials is our limited knowledge of basic parasite biology and the paucity of identified potential intervention targets. Protein-protein interactions are involved and essential in broad range of biological processes including the post-translational modifications. Substrate-kinase or phosphatase interactions are considered as transient binding and play a central and essential role in *Plasmodium* cell cycle. The Ser/Thr Protein Phosphatase Type 1 (PP1), one of the main contributors of eukaryotic phosphatase activity, is essential to malaria parasite *Plasmodium falciparum* and is highly regulated by many regulatory subunits. In humans, there are about 200 distinct regulators, however, only 4 have been so far reported in *Plasmodium*.

To explore the *P. falciparum* PP1 (PfPP1) regulatory network as complete as possible, we carried out three complementary approaches to characterize the PfPP1 interactome. Co-affinity purification followed by mass spectrometry-based proteomics identified 6 PfPP1 interacting proteins of which 3 contained the RVxF consensus binding motif, 2 partners with a Fxx[RK]x[RK] binding motif, one with both binding motifs. The yeast two-hybrid screening identified 134 proteins of which 30 have the RVxF binding motif and 20 contain the Fxx[RK]x[RK] binding motif. The *in silico* screen of the *P. falciparum* genome using a consensus RVxF motif as template revealed the presence of 55 potential PfPP1 interacting proteins. As further demonstration, 35 candidate partners were validated in an independent ELISA-based assay using recombinant proteins. The data reports several conserved PP1 interacting proteins as well as a high number of specific interactors to PfPP1, indicating a high diversity of biological functions for PP1 in *Plasmodium*.

Among these candidates, one partner assigned as Gametocyte EXported Protein 15 (GEXP15) has been selected and characterized. This protein is over-expressed during gametocyte stage, responsible for the transmission of the parasite in the mosquito and its interaction with PP1 was validated by yeast two-hybrid and GST pull-down. The use of a mutant demonstrated that the formation of the complex was RVxF-dependent. The role of GEXP15 as an activator, *in vitro*, of the phosphatase activity of PfPP1 was shown. The study in the parasite *P. berghei* revealed a co-localization and interaction of GEXP15 and PP1c. The biological function of GEXP15 is being investigated in *P. falciparum* and *P. berghei*. Preliminary results, obtained from mutant parasites deleted for GEXP15, would indicate that the protein is involved in the *P. berghei* multiplication.

Plasmodium, PP1, interactome, GEXP15, RVxF motif

"The parasite has been killing children, injuring children, and sapping the strength of whole populations for tens of thousands of years...
Now, we can chart a course to end it."
Bill Gates, 2011

Sommaire

Résumé **v**

Sommaire **xi**

Liste des figures **xiii**

Liste des tableaux **xv**

Abréviations **xvii**

Introduction **3**

Cadre et objectifs **65**

Résultats **69**

Matériel et méthodes **89**

Discussion **97**

Bibliographie **111**

Annexes I **139**

Annexes II **173**

Table des matières **175**

Liste des figures

Introduction

1 **Illustration de différents stades de *Plasmodium falciparum* observés par Laveran sur du sang frais** 4
2 **Comparaison morphologique entre deux apicomplexes** 6
3 **Phylogénie entre différentes espèces de *Plasmodium* infectant les primates, rongeurs ou oiseaux** 7
4 **Pays endémiques au paludisme entre 2000 et 2015** 8
5 **Modélisation de l'endémie causée par *P. falciparum* en Afrique en 2000 et 2015** 9
6 **Proportion de la population ou des foyers à risques possédant et/ou dormant sous une moustiquaire imprégnée d'insecticide** . . . 10
7 **Répartition des résistances aux insecticides observées entre 2005 et 2017** 12
8 **Propagation de la résistance à la chloroquine** 20
9 **Cycle de vie de *P. falciparum*** 23
10 **Carte du monde représentant les espèces d'anophèle dominantes dans la transmission du paludisme** 24
11 **Schéma représentant le passage des sporozoïtes dans le foie** 27
12 **Invasion des hépatocytes par les sporozoïtes selon deux voies** . . . 28
13 **Attachement du mérozoïte de *P. falciparum* au globule rouge** . . . 29
14 **Invasion du globule rouge par les mérozoïtes de *P. falciparum*** . . 30
15 **Etapes du cycle érythrocytaire et de la gamétogenèse chez *P. falciparum*** 33
16 **Régulation épigénétique des gènes *var* chez *P. falciparum*** 38
17 **Régulation post-traductionnelles au cours du cycle de vie de *P. falciparum*** 39
18 **Analyse phénotypique des mutants phosphatases de *P. berghei*** . . 43
19 **Alignement de différentes PP1c** 46
20 **Modélisation de la structure de la PP1c** 47
21 **Cycle de vie proposé pour la PP1c** 51
22 **Modèle de la régulation de la fixation de la PP1c sur les kinétochores** 55

23 **Implication de différents partenaires de la PP1c au cours du cycle cellulaire** 57
24 **Régulation du métabolisme du glycogène par la PP1c** 60
25 **Effet sur la croissance de *P. falciparum* des peptides synthétiques basés sur PfI2** 62

Résultats et discussion

26 **Prédiction de la structure secondaire de PfGEXP15 par PSIPRED** 71
27 **Alignement global entre les protéines PfGEXP15 et PbGEXP15** . 72
28 **Motifs potentiels d'interaction de type RVxF et portions protéiques de PfGEXP15 et PbGEXP15 utilisées** 72
29 **Expression de PfGEXP15 et PbGEXP15** 73
30 **Interaction de PfGEXP15 et PbGEXP15 avec la PfPP1c chez la levure** 75
31 **Interaction directe entre GEXP15 et PfPP1c par GST pull-down** . 76
32 **Effet de PfGEXP15 et PbGEXP15 sur l'activité de la PfPP1c** . . . 77
33 **Localisation de PfGEXP15 chez des gamétocytes jeunes de *P. falciparum*** 78
34 **Knock-in de PbGEXP15 chez *P. berghei*** 80
35 **Localisation de PbPP1c et PbGEXP15 chez des trophozoïtes de *P. berghei*** 80
36 **Immunoprécipitation du complexe PbGEXP15-PbPP1c** 81
37 **Knock-out de PfGEXP15 chez *P. falciparum*** 82
38 **Knock-out de PbGEXP15 chez *P. berghei*** 83
39 **Knock-out inductible de PbGEXP15 chez *P. berghei*** 84
40 **Représentation Weblogo de l'alignement des motifs RVxF putatifs des protéines criblées *in silico*** 99
41 **Réseaux d'interaction de la PfPP1** 101
42 **Environnement génétique de PfGEXP15** 102
43 **Délétion de régions répétées chez GEXP15 de *P. berghei*** 104
44 **Reconnaissance des protéines recombinantes de GEXP15 par des sérums de rats infectés par *P. berghei*** 109

Liste des tableaux

Introduction

1 **Molécules utilisées pour lutter contre le paludisme** 17
2 **Traitements antipaludiques actuels** 19
3 **Kinome putatif de *P. falciparum*** 41
4 **Phosphatome putatif de *P. falciparum*** 42

Résultats

5 **Récapitulatif de l'ensemble des transfections réalisées pour GEXP15 chez *P. falciparum* et *P. berghei*** 85

Abréviations

Å	Angström
ACT	Thérapie combinée à base d'artémisinine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
AID	Auxin inducible degron
AMA1	Apical membrane antigen 1
ApiAP2	Apicomplexan Apetela2
aPK	Atypical protein kinase
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATc	Anhydrotétracycline
BSD	Blasticidine
CamK	kinase Ca^{2+}/calmoduline-dépendante
CDK	Kinase dépendante des cyclines
CI	Contre-indication
CLK	CDC like kinase
CREB	cAMP/calcium response element-binding kinase
CSP	Circumsporozoite protein
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHPS	Dihydroptéroate synthase
DTT	Dithiothréitol
EBL	Erythrocyte binding-like
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ePK	eukaryotic protein kinase
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FHA	Forkhead-associated
FPKM	Fragments Per Kilobase Million
FT	Facteur de transcription
Gac1p	Glycogen accumulation 1
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible
GEXP15	Gametocyte exported protein 15
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GST	Glutathion S-transférase
HRP2	Histidine-rich protein 2
HSPG	Heparan sulfate proteoglycan
I1	Inhibiteur 1
I2	Inhibiteur 2
I3	Inhibiteur 3
IC_{50}	Concentration inhibitrice médiane
IP	Immunoprécipitation
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IUP	Intrinsically disordered protein
KAHRP	Knob associated his-rich protein
KNL1	Kinetochore-null protein 1
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LRR1	Leucine rich repeat protein 1
LSA3	Liver stage antigen 3
MAEBL	Merozoite apical erythrocyte binding-ligand
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
Mb	Mégabase
MII	Moustiquaire imprégnée d'insecticide
MLCK	Myosin light-chain kinase
MS	Mass spectrometry
MSP	Merozoite surface protein
MTOC	Centre organisateur des microtubules
NEK	NIMA-related kinase
Nima	Never in mitosis gene A
NIPP1	Nuclear inhibitor of PP1
NLS	Nuclear localization signal
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open reading frame
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
PAP2	Poly(A) RNA polymerase protein 2
PfCRT	*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter
PfEMP1	*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1
PfHP1	*Plasmodium falciparum* heterochromatin protein 1
PfMDR1	*Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1
PfRh	*Plasmodium falciparum* reticulocyte binding homologue
PfSBP1	*Plasmodium falciparum* skeleton-binding protein 1
PIB	Produit intérieur brut
PIP	PP1 interacting protein
pLDH	parasite lactate dehydrogenase
PLK1	Polo-like kinase 1
PLP1	Perforin-like protein 1
pNPP	para-nitrophényl phosphate
PNUTS	Phosphatase nuclear targeting subunit
PP1	Protéine phosphatase de type 1
pRb	Protéine rétinoblastome
PRC2	Polycomb repressive complexe 2

PTEX	*Plasmodium* translocon of exported proteins
QBC	Quantitative buffy coat
RIFIN	Repetitive interspersed family
RIO	Right open reading frame
RON	Rhoptry neck protein
RPA	Protéine de réplication A
SD	Synthetic Defined
Shp1	Suppressor of high copy protein phosphatase 1
SPECT	Sporozoite microneme protein essential for cell traversal
STE	Sterile
STEVOR	Sub-telomeric variable open reading frame
TKL	Tyrosine kinase-like
TRAP	Thrombospondin-related adhesive protein
TyrK	Tyrosine kinase
UIS2	Up-regulated in infective sporozoites 2
uORF	upstream open reading frame
UTR	Untranslated transcribed region
VAR	Variant antigen
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Y2H	Yeast two-hybrid
Ypi1	Yeast phosphatase inhibitor 1

Introduction

Introduction

A Le paludisme

I Le paludisme : de Toutânkhamon à Ronald Ross

Toutânkhamon a-t-il succombé au paludisme ? Depuis la découverte de son tombeau en 1922, la mort du pharaon fait débat. La consanguinité de sa lignée serait à l'origine de sa santé précaire mais deux facteurs ont été avancés comme étant prépondérants dans sa mort, une fracture à la jambe et un paludisme (Hawass *et al.* 2010). La présence de cette maladie a également été détectée sur des momies encore plus anciennes, qui date d'il y a 4000 ans environ, confirmant que l'origine du paludisme est très probablement antérieure à cette époque (Nerlich *et al.* 2008). Celle-ci pourrait remonter jusqu'à 50000-100000 ans auparavant dans le cas du parasite le plus fatal pour l'Homme (Joy *et al.* 2003).

L'un des écrits les plus anciens concernant le paludisme est le papyrus d'Ebers (1500 av JC), qui fait allusion à des fièvres mortelles pouvant correspondre à la maladie. En effet, la région du Nil était très propice à cette époque au développement et à la propagation du paludisme. Par la suite, en Inde, Charaka et Susruta font état de fièvres liées aux piqûres d'insectes (Gupta *et al.* 2014) et à la même époque, Hippocrate décrit des fièvres à fréquences variables.

Le paludisme continua de ravager le monde et les différentes époques, de l'empire romain (Marciniak *et al.* 2016) en passant par la traite négrière, à l'origine de l'introduction de la maladie en Amérique du Sud (Yalcindag *et al.* 2012). Certains des plus grands noms de l'Histoire, tels qu'Alexandre le Grand et Genghis Khan, auraient succombé à la malaria alors que d'autres comme Christophe Colomb ou George Washington ont été porteurs à un moment donné de leur vie.

En 1717, Giovanni Maria Lancisi décrit dans son ouvrage "De noxiis paludum effluviis eorumque remediis", la pigmentation noire qu'il observe sur des rates et cerveaux. Il suppose que le moustique et les zones marécageuses seraient impliqués (Cook et Webb 2000) et utilise le mot mal'aria signifiant mauvais air. Paludisme, lui, dérive du latin "palus" signifiant marais.

Mais les premières découvertes scientifiques s'enchaîneront plus particulièrement vers les années 1880. Tout d'abord, la bactérie *Bacillus malariae* fut présentée comme responsable du paludisme par Tommasi-Crudeli et Klebs (Cox 2010). Dans le même temps,

Laveran, un officier de l'armée française présent en Algérie, observa en 1878 à Bône, des corps sphériques et des formes en croissant très pigmentées au niveau des globules rouges (FIGURE 1). Puis en 1880 à Constantine, il confirma ses premières observations en visualisant l'ex-flagellation d'un gamétocyte mâle. Il est alors sûr de lui et présente ses résultats. Le paludisme serait causé par un protozoaire *Oscillaria malariae* et le moustique aurait une implication.

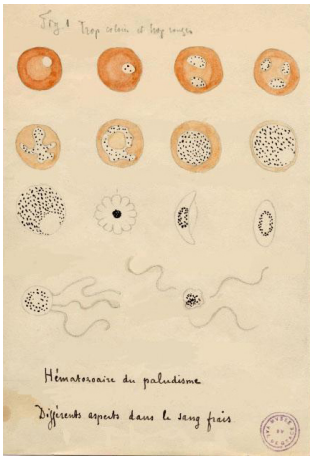

FIGURE 1 – Illustration de différents stades de *Plasmodium falciparum* observés par Laveran sur du sang frais. Les étapes d'ex-flagellation et les structures pigmentées, à l'origine de la découverte, sont particulièrement représentées (par Laveran, 1880).

Cependant, la communauté scientifique, pour qui à cette époque, seules les bactéries étaient responsables des maladies, rejeta ces travaux. Mais peu à peu, cette découverte fut confirmée et validée au cours des années qui suivirent. Le prix Nobel de médecine fut décerné à Alphonse Laveran en 1907.

Ce fut en 1897, que Ronald Ross prouva scientifiquement que le moustique, alors largement soupçonné, était le transmetteur du paludisme. Il démontra, après des collaborations avec Laveran et Manson, que *Culex fatigans* transmet le parasite *Proteosoma relictum*, responsable de la malaria chez les oiseaux. Lors d'une piqûre de moustique, les parasites continuent leur développement dans l'intestin de l'insecte puis migrent dans les glandes salivaires. En 1898, Grassi démontra que le moustique est également le vecteur chez l'Homme (Cox 2010). Ross recevra le prix Nobel de médecine en 1902.

II *Plasmodium* : un parasite apicomplexe

Autour des années 1885, trois scientifiques Italiens, Camillo Golgi, Ettore Marchiafava et Angelo Celli étudient le protozoaire responsable de la malaria. Le premier, Golgi, montre que les fièvres peuvent être tierces ou quartes selon la fréquence de celles-ci, 48h ou 72h respectivement (Cox 2010). Ces fièvres sont liées à l'éclatement des globules rouges infectées et au relargage des parasites dans le sang. Il attribue la différence de fréquence à deux espèces de parasites distinctes, *Haemamoeba vivax* et *Haemamoeba malariae*. Ettore Marchiafava et Angelo Celli identifient, quant à eux, le parasite de Laveran, *Laverania malariae*, qu'ils distinguent des parasites de Golgi et utilisent le terme *Plasmodium*. Plus

tard, ces parasites ont été renommés *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae* pour ceux décrits par Golgi et *Plasmodium falciparum* pour celui de Marchiafava et Celli.

1 Généralités des *Apicomplexa*

Plasmodium, le parasite responsable du paludisme, est un eucaryote, du sous-règne des *Harosa*, division *Alveolata* et embranchement *Apicomplexa* (ou *Sporozoa*). Plus de 6000 espèces y sont classées mais ce nombre pourrait être bien plus conséquent que cela ($>10^6$) (Adl *et al.* 2007). La subdivision des apicomplexes diverge selon les époques (Levine 1970) mais aussi selon les études (Morrison 2009). Cependant, ils peuvent être regroupés en deux classes *Conoidasida* et *Aconoidasida*, qui sont subdivisées en *Coccidia* et *Gregarinia* pour la première classe, *Piroplasmida* et *Haemosporororida* pour la seconde (Morrison 2009 ; Perkins *et al.* 2000). Les apicomplexes sont principalement des parasites intracellulaires obligatoires (Morrissette et L. D. Sibley 2002). Parmi ceux-ci, on trouve par exemple, *Cryptosporidium parvum* (*Coccidia*), les genres *Theileria* et *Babesia* (*Piroplasmida*), *Toxoplasma gondii* (*Coccidia*) et les *Plasmodium* (*Haemosporororida*).

Apicomplexa vient du latin apex et complexus faisant référence au complexe apical, caractéristique de ce phylum. En plus des différents éléments composant ce complexe, d'autres organites sont aussi distinctifs (Figure 2) (Levine *et al.* 1980) :

Conoïde : Structure composée de microtubules qui sont disposés en spirale formant un cône au pôle apical du parasite. Il pourrait permettre de faciliter mécaniquement la pénétration des cellules hôtes (Morrissette et L. D. Sibley 2002). Il est absent chez les *Aconoidasida*.

Anneau polaire apical : Centre organisateur des microtubules. Il sert de point d'ancrage pour les microtubules subpelliculaires. Ces derniers dont le nombre et la forme divergent selon les genres, jouent un rôle dans la forme du parasite (Morrissette et L. D. Sibley 2002).

Complexe membranaire interne : Composé de sacs alvéolaires aplatis, le complexe se situe juste en dessous de la membrane plasmique du parasite formant ainsi une pellicule de trois couches. Il est lié avec la membrane plasmique et les microtubules subpelliculaires, ce qui lui permet d'assurer une certaine stabilité structurale et de servir de point d'ancrage au complexe actine-myosine (C. R. Harding et Meissner 2014). L'espace entre la membrane plasmique et le complexe pourrait également servir dans le stockage du calcium dont l'utilisation par les kinases calcium-dépendent a été démontrée (Holder *et al.* 2012).

Micronèmes : Organites allongés jouant un rôle dans l'invasion des cellules hôtes en sécrétant des protéines qui permettront l'interaction avec la cellule cible (Blackman et Bannister 2001).

Rhoptries : Organites sécrétoires en forme de club de golf ou de la lettre Rho dont elles tirent leur nom. Le nombre varie en fonction du genre. Le mérozoïte de *P. falciparum* en possède 2 alors qu'il y en a 8 chez le tachyzoïte de *T. gondii*. Le contenu, constitué de protéines et de lipides, est libéré au cours de l'internalisation du parasite et pourrait jouer un rôle dans la formation de la vacuole parasitophore. Celle-ci permet au parasite de se protéger au sein de la cellule hôte et de créer un environnement propice à sa multiplication (Blackman et Bannister 2001).

Granules denses : Vésicules sécrétrices qui, une fois le processus d'invasion complété, migrent vers le complexe membranaire interne et libèrent par exocytose leur contenu dans la vacuole parasitophore (Blackman et Bannister 2001).

Apicoplaste : Ses quatre membranes prouvent que cet organite est issu d'une endosymbiose secondaire d'une algue rouge. Il est présent chez *T. gondii* et *P. falciparum* mais semble avoir été perdu par certains apicomplexes comme *Cryptosporidium* spp.. L'apicoplaste se situe, à tous les stades, à proximité de l'unique mitochondrie et leur activité semble être dépendante l'une de l'autre. Il possède un génome circulaire de 35kb et code dans la plupart des espèces moins de 50 protéines. En effet, une grande partie des gènes originaires de cette endosymbiose ont été transférés sur l'ADN nucléaire. L'apicoplaste est indispensable à la survie du parasite et héberge différentes voies métaboliques comme la synthèse d'acides gras (Lim et McFadden 2010).

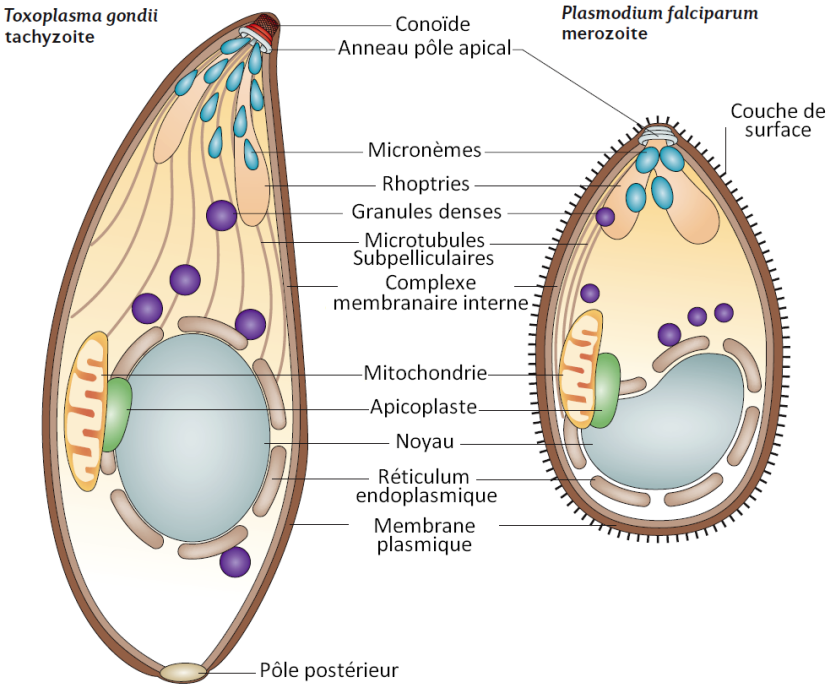

Figure 2 – Comparaison morphologique entre deux apicomplexes. Les parasites de ce phylum sont très polarisés et possèdent des organites spécifiques. Le complexe apical comprend les rhoptries, les micronèmes et les microtubules issus de l'anneau apical. L'échelle de représentation du tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* (10 µm) et du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* (1.5 µm) n'est pas respectée (d'après (Baum *et al.* 2006)).

Dans le cas de *Plasmodium* (Figure 2), celui-ci ne possède pas de conoïde (*Aconoidasida*) mais contient l'anneau apical, les trois types d'organites de sécrétion, le complexe membranaire interne et les microtubules subpelliculaires. Il dispose également d'une seule et unique mitochondrie et aussi d'un apicoplaste (Baum *et al.* 2006).

2 Phylogénie de *Plasmodium*

En 2013, plus de 200 espèces de *Plasmodium* ont été recensées, mais ce nombre est probablement plus important encore (Martins et Daniel-Ribeiro 2013). Les parasites infectent divers métazoaires qui peuvent être des reptiles, oiseaux ou mammifères. Il est intéressant de noter que les hôtes vertébrés ont tous comme vecteur des moustiques de la famille *Culicidae*, sauf dans le cas particulier de *P. mexicanum* dont le vecteur fait partie de la famille des *Psychodidae* (Ayala et D. Lee 1970). Les oiseaux et reptiles ont principalement comme vecteurs des *Culicinae* alors que les mammifères sont exclusivement infectés par des moustiques du genre *Anopheles* (Martinsen *et al.* 2008). On peut donc envisager que la spécialisation des *Anopheles* est liée au changement des *Plasmodium* ciblant les mammifères.

Cinq espèces de parasites sont décrites comme pouvant affecter l'Homme. Parmi celles-ci, on retrouve les trois espèces décrites à l'origine par Laveran et Golgi, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae*, auxquelles s'est ajoutée *Plasmodium ovale* en 1914 (Stephens 1914). La cinquième et dernière espèce est *Plasmodium knowlesi*. Ce parasite a tout d'abord été identifié en 1932 comme infectant les macaques (Knowles *et al.* 1932). Le premier cas humain n'a été décrit qu'en 1965, suite au retour d'un Américain ayant contracté la malaria au cours d'un séjour en Malaisie (Chin *et al.* 1965). Il est intéressant de noter que *P. falciparum*, l'espèce la plus virulente pour l'Homme, ne semble pas être forcément plus proche d'un point de vue évolutif des autres espèces infectant l'Homme mais plutôt de *P. reichenowi*, une espèce que l'on retrouve chez le chimpanzé (Figure 3).

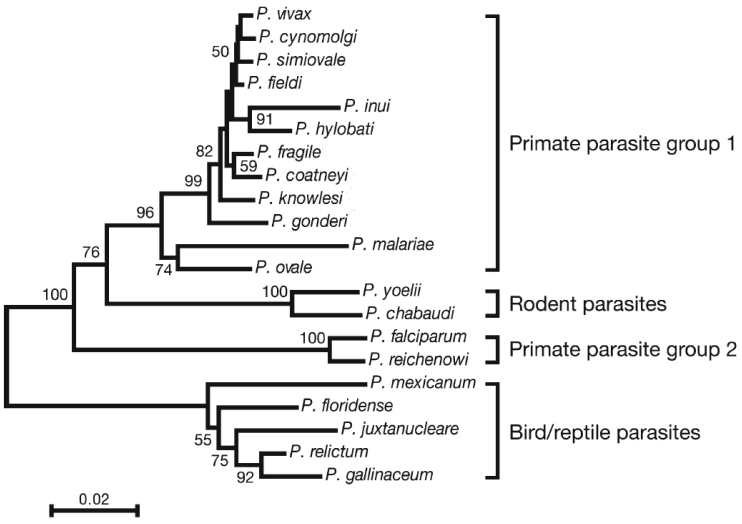

Figure 3 – Phylogénie entre différentes espèces de *Plasmodium* infectant les primates, rongeurs ou oiseaux. Neighbour-Joining construit à partir des séquences en acides aminés des trois protéines mitochondriales et avec la distance γ de 0,3. Les valeurs de bootstrap sont indiquées sur l'arbre phylogénétique et constituées sur 1000 réplications (d'après (Hayakawa *et al.* 2008)).

Parmi les espèces de parasites présentes chez le rongeur, outre *P. yoelii* et *P. chabaudi* indiquées sur la Figure 3, on peut inclure *P. berghei* qui est un modèle classique d'étude expérimentale.

III Le paludisme : un enjeu majeur de santé publique

1 Des chiffres élevés mais des chiffres en baisse

429 000. C'est l'estimation du nombre de décès dus au paludisme dans le monde en 2015 selon l'OMS alors que le nombre de cas est d'environ 212 millions (WHO 2016). Ces chiffres sont difficiles à évaluer puisque la maladie est présente dans des zones où la couverture médicale est parfois insuffisante. Cette maladie est présente dans 91 pays endémiques réparties sur le continent Africain, Sud Américain et Asiatique (FIGURE 4) même si la moitié de la population mondiale se situe dans une zone à risques.

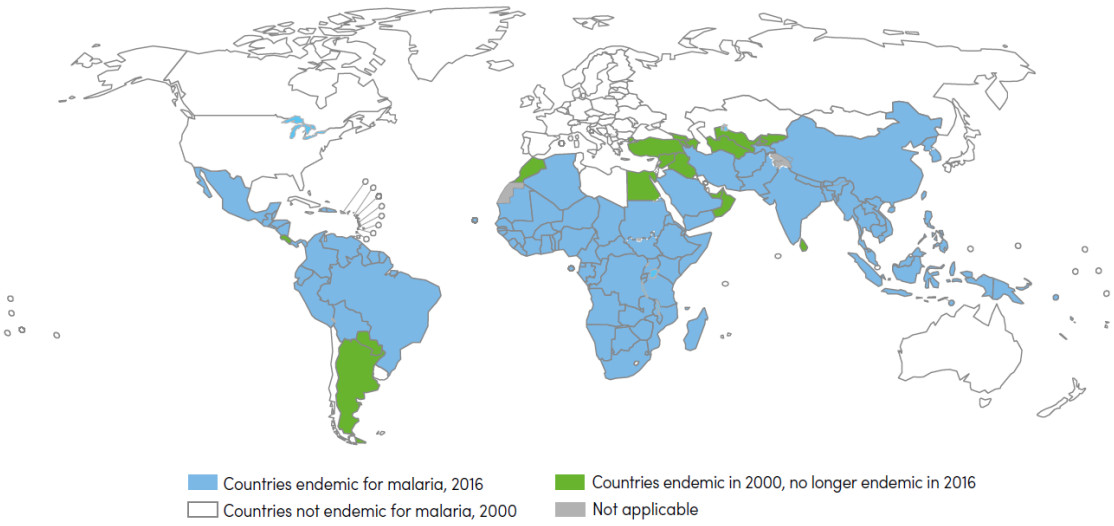

FIGURE 4 – Pays endémiques au paludisme entre 2000 et 2015. 91 pays sont considérés comme endémiques en 2015. Un pays est considéré comme ayant éliminé le paludisme si aucun cas n'est détecté pendant 3 années consécutives (d'après (WHO 2016)).

En 2015, l'OMS a estimé que 90% des cas et 92% des morts causés par le paludisme se situent en Afrique et 7% et 6% respectivement en Asie du Sud-Est. Une vaste majorité des cas (76%) et des décès (75%) se situent uniquement dans 13 pays, 12 Africains et l'Inde. Le Nigeria représente à lui seul 29% de l'ensemble des cas recensés dans le monde et 26% des décès. Les enfants de moins de 5 ans correspondent à 70% des décès, ce qui correspond à un enfant mort toutes les deux minutes. *P. vivax* représente 4% des cas mondiaux mais atteint les 41% en excluant l'Afrique et a causé environ 3100 décès alors que 99% des décès sont dus à *P. falciparum*.

Entre 2000 et 2015, la morbidité a diminué de 41% et la mortalité a chuté de 62% et dans le cas des enfants de moins de 5 ans de 69% (FIGURE 5). Ces baisses auraient permis de sauver 6.8 millions de personnes et contribuent à la hausse de la longévité qui a été observée en Afrique même si le paludisme n'est pas le seul facteur ayant permis d'obtenir ces résultats (contribution de l'ordre de 70%). Durant cette période, 17 pays ont réussi à éliminer le paludisme et en 2015, 10 autres pays étaient sur le point de s'en débarrasser avec moins de 1000 cas observés (WHO 2016).

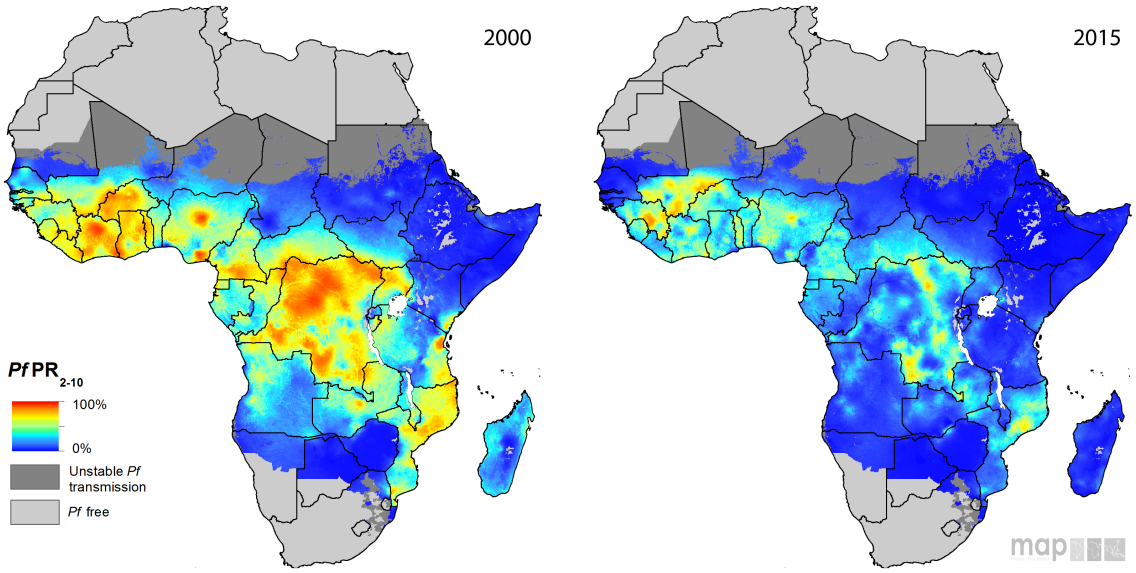

Figure 5 – Modélisation de l'endémie causée par *P. falciparum* en Afrique en 2000 et 2015. Les cartes montrent le pourcentage d'enfants âgés entre 2 et 10 ans infectés par *P. falciparum* dans les pays Africains endémiques durant l'année 2000 et 2015. PfPR=*Plasmodium falciparum* parasite rate (d'après (Bhatt *et al.* 2015)).

2 Impact financier

La diminution observée dans le nombre de cas et de décès au cours des 15 dernières années a eu un impact non négligeable sur le PIB des pays affectés. En effet, l'estimation de la valorisation économique se chiffre à environ 2000 milliards de dollars dans le monde dont 1800 pour le continent africain, ce qui représente 44% du PIB des pays endémiques.

En 2015, le financement mondial pour lutter contre le paludisme était de 2.9 milliards de dollars dont 32% venant des pays endémiques et 35% des États-Unis. La France et la fondation Bill & Melinda Gates représentent respectivement 3.2% et 1.2% (WHO 2016). Cet argent est employé dans les systèmes de santé, la prévention et le traitement. Le Fonds mondial centralise 45% du financement total, qui le réattribue en fonction des besoins. 611 millions de dollars ont été attribués en 2014 en recherche et développement pour la lutte contre le paludisme. Ces fonds sont principalement répartis en trois domaines, les anti-paludiques (35%), les vaccins (28%) et la recherche fondamentale (27%).

3 Les objectifs 2030

L'OMS a fixé comme objectif une réduction de 90% du nombre de cas et de décès en 2030 par rapport aux chiffres de 2015, ce qui correspond à environ 42 000 décès par an. Le deuxième objectif est d'éliminer le paludisme dans 35 pays endémiques et d'empêcher la réapparition dans les nouveaux pays exempts. Des objectifs intermédiaires ont été fixés pour 2020 et 2025 (WHO 2016). Cependant, afin d'atteindre ces objectifs, l'OMS estime que le budget pour lutter contre le paludisme doit doubler d'ici 2020.

IV Une once de prévention vaut une livre de guérison

Cette citation de Benjamin Franklin (1750) prend tout son sens lorsque l'on parle de lutter contre le paludisme. En effet, au cours du XXe siècle, le drainage des eaux stagnantes et le défrichage de la végétation aquatique ont permis d'éradiquer les stades larvaires du moustique et ainsi du paludisme en France et aussi dans plusieurs autres pays (Kitron et Spielman 1989). Cependant, dans les zones les plus à risques, les conditions climatiques ne sont pas toujours propices à l'assèchement des eaux stagnantes, limitant fortement la réduction des populations de moustiques. Les diminutions récentes du nombre de cas et de décès sont principalement dues à une meilleure prévention qui passe par une sensibilisation de la population et l'utilisation de moustiquaires, moyen le plus efficace.

1 Éviter la piqûre

Selon une étude réalisée entre 2000 et 2015 sur l'Afrique, environ 450 millions de cas cumulés, auraient été évités uniquement par l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII). Cette méthode de prévention aurait contribué à hauteur de 68% des cas totaux évités (Bhatt *et al.* 2015). Cette diminution a été rendue possible puisqu'entre 2013 et 2015, 510 millions de MII ont été délivrées en Afrique Subsaharienne. Cependant, seulement 53% de cette population dort sous une MII en 2015 même si ce nombre est en forte augmentation par rapport aux 5% constatés en 2005 (Figure 6). Malgré cette hausse, il reste donc un effort à faire pour que l'ensemble de la population ait accès à ce moyen de protection.

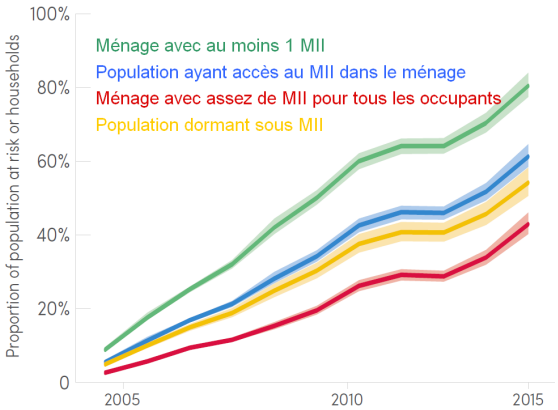

Figure 6 – Proportion de la population ou des foyers à risques possédant et/ou dormant sous une moustiquaire imprégnée d'insecticide (MII) (d'après (WHO 2016)).

Un autre moyen permettant de limiter les risques de piqûre est l'utilisation d'insecticides soit en portant des vêtements longs imprégnés soit par pulvérisation des foyers. Il a été estimé que l'utilisation des sprays d'insecticides à l'intérieur aurait contribué à une diminution des cas de 13% entre 2000 et 2015 (Bhatt *et al.* 2015). Il y aurait 3.7% de la population vivant dans une zone à risques qui se protège avec cette méthode.

Seulement 57% de la population Sub-saharienne se protège avec les MII ou les insecticides, ce qui est en hausse par rapport aux années précédentes (37% en 2010) mais reste

encore insuffisant dans l'optique d'éradiquer la malaria (WHO 2016).

Mais la principale inquiétude est suscitée par l'apparition de résistances envers les principaux insecticides utilisés. Quatre classes d'insecticides sont disponibles, les pyréthrinoïdes, organochlorés (DDT), carbamates et les organophosphates. Les pyréthrinoïdes sont les insecticides les plus répandus puisqu'ils sont les seuls imprégnés sur les moustiquaires. Mais depuis déjà de nombreuses années, de plus en plus de cas de résistances sont recensés quel que soit le pays endémique touché et quelle que soit l'espèce d'*Anopheles* impliquée (IR Mapper 2017). Plus des 3/4 des pays endémiques ont recensé une résistance aux pyréthrinoïdes mais son impact sur une éventuelle inefficacité des MII n'est pas encore clairement établi (WHO 2016).

Les insecticides à base de pyréthrinoïdes ou de DDT ciblent les canaux sodiques voltage-dépendants situés dans les neurones des moustiques. Ils permettent de retarder la fermeture des canaux entraînant une perte d'excitabilité induisant ainsi la mort des cellules et de l'organisme. Les mutations L1014F ou L1014S du canal sodique sont les substitutions les plus courantes qui ont été décrites comme pouvant permettre aux anophèles de résister aux insecticides (Martinez-Torres *et al.* 1998 ; Ranson *et al.* 2000). Il a également été montré qu'une sur-expression de certains cytochromes P450 provoquerait une métabolisation des insecticides occasionnant une détoxification de ceux-ci (Ranson *et al.* 2011).

Cette inquiétude vis-à-vis des résistances est même accrue par l'émergence de moustiques multi-résistants. En effet, les pyréthrinoïdes et le DDT possèdent le même mode d'action ce qui par conséquent favorise l'apparition de moustiques résistants aux deux insecticides (Ranson *et al.* 2000). La hausse d'activité des oxydases permettrait également de détoxifier à la fois les pyréthrinoïdes et les carbamates (Brooke *et al.* 2001).

L'OMS recensa en 2010 60 pays ayant déclaré l'apparition de résistances envers une classe d'insecticides sur les 73 pays endémiques dont les données sont disponibles (Figure 7). Des résistances ont même été signalées dans 50 pays pour au moins deux classes d'insecticides (WHO 2016). Ces chiffres indiquent clairement que de nouveaux insecticides seront nécessaires dans le futur et que la dépendance notamment aux pyréthrinoïdes doit être réduite et contrôlée.

2 Chimioprophylaxie

En moyenne 2169 cas de paludisme sont rapportés en France chaque année. Bien que le pays soit non endémique, ces cas correspondent à des personnes déclarant le paludisme de retour d'un voyage effectué principalement en Afrique (Tatem *et al.* 2017). Ces chiffres sont élevés, puisque la France est le pays présentant le plus de cas importés, et pourraient être encore plus important sans chimioprophylaxie. En effet, il est fortement conseillé aux futurs voyageurs visitant un pays endémique, de se faire prescrire des antipaludiques. Ceux-ci vont empêcher la multiplication des parasites lors du cycle érythrocytaire. La chimoprophylaxie ne garantit pas une efficacité de 100%, c'est pourquoi l'utilisation de moustiquaires et d'insecticides reste nécessaire et qu'en cas de fièvre, la consultation d'un spécialiste est indispensable. Différents antipaludiques sont disponibles sur le marché, la chloroquine seule ou en association avec le proguanil, l'atovaquone-proguanil, la doxycycline et la méfloquine (Santé publique France 2015). Le choix d'utilisation ou d'association se fait sur la base de plusieurs données : la zone visitée (résistances, intensité), la période et la durée du séjour et aussi la physiologie du patient. Ces médicaments sont souvent à prendre avant, pendant

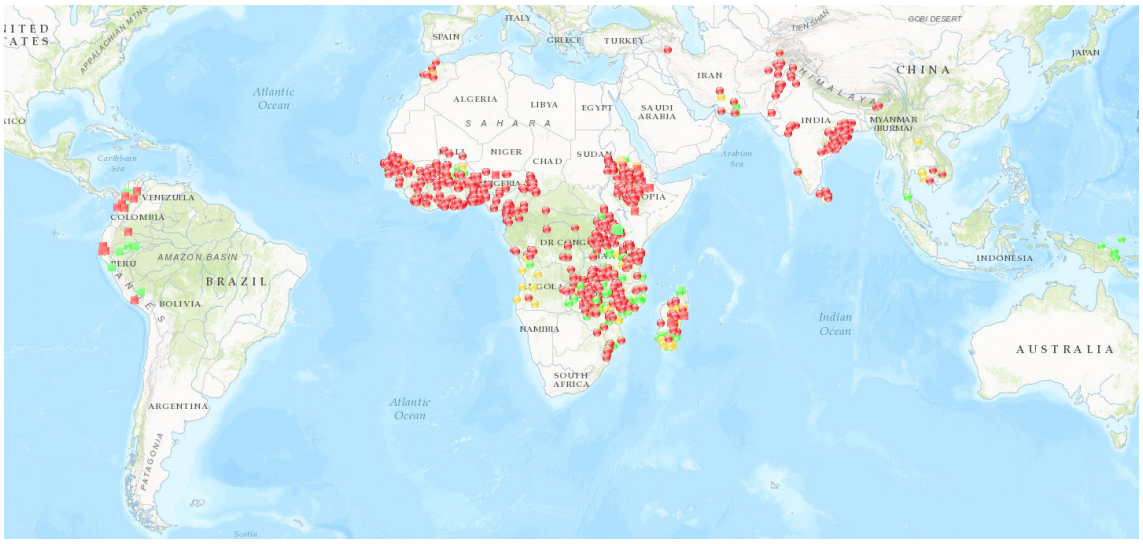

Figure 7 – Répartition des résistances aux insecticides observées entre 2005 et 2017. La plupart des pays endémiques ont répertorié des cas de résistances par *Anopheles* spp. aux insecticides de différentes classes. Les cas confirmés, possibles et de susceptibilités sont indiqués en rouge, orange et vert respectivement (d'après (IR Mapper 2017)).

et après le séjour. Ils sont également plus ou moins bien tolérés par l'organisme et une attention particulière doit être portée dans le cas des femmes enceintes (Santé publique France 2015).

Un traitement préventif est conseillé dans le cas des femmes enceintes et des nouveau-nés vivant dans les zones à forte transmission. Bien que l'utilisation de sulfadoxine-pyriméthamine chez les enfants en bas âge a montré son efficacité en diminuant les cas cliniques et le risque d'anémie (Aponte *et al.* 2009), celle-ci n'est pour l'instant pas ancrée dans les politiques antipaludiques des pays endémiques (WHO 2016).

Un autre type de traitement préventif, par intermittence saisonnière, a été adopté par certains pays Africains. L'utilisation d'amodiaquine associée avec de la sulphadoxine-pyriméthamine permet de réduire d'environ 75% les cas de paludisme sévère chez les enfants de moins de 5 ans (Meremikwu *et al.* 2012).

3 Vaccins

L'un des plus grands espoirs pour l'éradication de la malaria repose sur la création d'un vaccin efficace qui permettrait de protéger les populations. De nombreux vaccins sont en cours de test ou l'ont été (WHO 2017). Certains vaccins sont basés sur un seul antigène (RTS,S/AS01) alors que d'autres utilisent une combinaison de plusieurs antigènes afin d'accroître le nombre de cibles parasitaires (MuStDO5), ou afin de cibler différentes étapes du cycle (NYVAC-Pf7). Cependant, ces deux derniers vaccins n'ont pas montré une protection suffisante chez les volontaires testés, ce qui a entrainé l'arrêt des essais cliniques (Ockenhouse *et al.* 1998 ; Richie *et al.* 2012).

De nombreux autres vaccins n'ont pas obtenu les effets escomptés et seulement un seul candidat vaccin est pour l'instant à un stade avancé. Il s'agit du RTS,S/AS01 développé par GlaxoSmithKline qui se base sur des régions répétées de la protéine pré-érythrocytaire circumsporozoïte (CSP) de *P. falciparum*. Il est le seul vaccin à avoir atteint les essais cliniques de phase III dont les résultats montrent une meilleure efficacité chez les enfants de plus de 5 mois par rapport aux nouveau-nés. En effet, l'efficacité vaccinale est de 56% pour les enfants contre 31% pour les nourrissons, 12 mois après la troisième injection. Cette efficacité décroît au fur et à mesure, passant de 56% au 12ème mois à 46% au 18ème mois (Agnandji *et al.* 2015). Après l'avis positif de l'Agence Européenne des Médicaments, en 2015, l'OMS préconise une utilisation du RTS,S/AS01 dans trois zones Africaines pour recueillir encore davantage de données (WHO 2016).

L'utilisation de sporozoïtes atténués par irradiation (Clyde *et al.* 1973), par knock-out (Kublin *et al.* 2017) ou en combinaison avec la chloroquine (Mordmüller *et al.* 2017), permet également de protéger les individus et reste une piste étudiée pour immuniser les individus.

V Symptômes

Malgré l'existence de différents moyens de prophylaxie, 212 millions de cas de paludisme ont été recensés en 2015. A la suite d'une piqûre par un anophèle femelle, l'individu ne présente des symptômes qu'après 7 à 30 jours. Ce délai s'explique par le fait que ces signes cliniques ne sont visibles qu'à partir du cycle érythrocytaire du parasite et non pas auparavant (phase hépatique). Ces manifestations dépendent du statut immunitaire de l'hôte, de l'espèce de *Plasmodium* impliquée et de l'âge ou du nombre d'infections déjà subies par l'individu. En effet, les individus plus âgés des zones à forte transmission, acquièrent une certaine immunité après de multiples infections permettant de réduire le nombre d'accès palustres et leur sévérité (Baird 1998). Les enfants de moins de 5 ans vivant dans les zones endémiques, les voyageurs demeurant dans les pays non endémiques, sont ceux qui ont le plus de risques de développer des formes sévères du paludisme.

1 Accès palustres simples

Hormis dans les régions à forte transmission, les symptômes de primo-invasion ne permettent pas forcément de diagnostiquer immédiatement le paludisme. Une personne infectée peut être prise de maux de tête, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, vertiges, frissons... (Chandar *et al.* 1989). Une succession d'accès palustres apparaît par la suite avec une sensation de froid entraînant des frissons intenses et des tremblements. Puis une fièvre élevée ($\simeq$ 40°C) survient, suivie ensuite par des sueurs abondantes et un état de fatigue, synonyme de la fin de l'accès palustre. Ces accès durent quelques heures et correspondent à la libération des parasites lors de l'éclatement des globules rouges. Les accès palustres reviennent tous les 48h (fièvres tierces) dans le cas de *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* alors que pour *P. malariae*, le cycle est de 72h (fièvres quartes). Les fréquences coïncident avec la durée du cycle érythrocytaire de l'espèce impliquée.

2 Accès palustres graves

Chez les femmes enceintes ou individus non immuns (jeunes enfants et voyageurs) les conséquences du paludisme sur l'organisme peuvent être plus importantes. On peut observer une hépatomégalie, splénomégalie, anémie sévère, hypoglycémie, ictère, insuffisance rénale et/ou une acidose métabolique (Chandar *et al.* 1989). Ces manifestations doivent être soignées afin d'éviter un aggravement de la situation qui peut aller jusqu'à la mort si la défaillance est importante.

On parle d'accès pernicieux ou de neuropaludisme lorsqu'il y a une atteinte cérébrale. Le critère prédominant est le coma, même si bien sûr ses origines peuvent être diverses. La détresse respiratoire, l'insuffisance rénale, l'acidose, l'hypoglycémie et les convulsions peuvent être également des signaux d'alarmes. Bien que le neuropaludisme touche principalement les jeunes enfants, celui-ci peut également affecter les adultes (Mishra *et al.* 2007). Sans un diagnostic rapide, il peut entraîner la mort en quelques heures ou jours. Les causes provoquant cet accès ne sont pas encore clairement définies et deux hypothèses ont été émises. L'une suppose que les globules rouges infectés obturent les capillaires sanguins provoquant une anoxie du cerveau, ce qui peut provoquer coma puis mort de l'individu (White *et al.* 2013). La deuxième est l'hypothèse d'inflammation (Maegraith 1948) qui suppose que la libération de molécules toxiques par les parasites entraîne une réaction disproportionnée du système immunitaire et provoquerait ainsi une perte de la barrière hémato-encéphalique, une accumulation de leucocytes, coagulopathie... (Martins et Daniel-Ribeiro 2013). Ces deux hypothèses ne sont pas forcément contradictoires et une synergie peut même être envisageable. Une insuffisance hépatique aiguë combinée à la rupture de la barrière hémato-encéphalique pourraient être une condition nécessaire et suffisante pour entraîner un paludisme cérébral (Martins et Daniel-Ribeiro 2013).

VI Diagnostic

En cas de suspicion d'infection par *Plasmodium*, différents types de tests existent afin d'établir un diagnostic fiable et de proposer un traitement adapté.

1 Par microscopie

La réalisation d'un frottis sanguin est la technique basique afin de détecter la présence ou non de parasites. Elle est facile à réaliser et nécessite une coloration au Giemsa et un objectif x100 au microscope. Cependant, le coup d'oeil d'un expert est requis pour déterminer la présence de parasites dans le cas des faibles parasitémies ou pour identifier l'espèce impliquée (Tangpukdee *et al.* 2009). Cette technique ne permet pas une analyse à haut débit et est assez inaccessible pour certaines zones endémiques. La réalisation d'une goutte épaisse concentre les parasites facilitant le dépistage de ceux-ci (seuil de détection $\simeq$ 20 parasites/µL) mais pas l'identification de l'espèce (Wongsrichanalai *et al.* 2007).

Une autre technique nommée QBC (Quantitative Buffy Coat), est basée sur la coloration par acridine orange qui, lorsqu'il se fixe à l'ADN du parasite, émet après excitation un spectre d'émission à 525nm (vert). Cette méthode est efficace avec *P. falciparum* (5 parasites/µL) mais semble être moins sensible dans les autres cas. Ce moyen nécessite bien sûr un matériel plus onéreux que les précédents procédés surtout si la lecture se fait non

pas avec un microscope à fluorescence (Tangpukdee *et al.* 2009) mais par cytométrie en flux (Wongsrichanalai *et al.* 2007).

2 Par réaction en chaîne par polymérase (PCR)

L'amplification de gènes parasitaires est une technique récente ayant une forte spécificité et sensibilité (1-5 parasites/µL). Elle peut permettre de discriminer l'espèce impliquée et de déceler si le parasite présente des résistances connues, ce qui facilitera la prise en charge du patient. Cependant le coût et les besoins matériels sont des freins à l'utilisation routinière de cette technique dans les pays endémiques (Tangpukdee *et al.* 2009).

3 Par tests de diagnostic rapide

Dans un souci de rapidité et de simplicité pour les individus potentiellement porteurs, différents tests de diagnostic rapide ont vu le jour. La détection se fait à partir d'une goutte de sang ($\simeq$ 10µL) et par immunochromatographie avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène parasitaire. Même si une grande majorité des tests ne détectent que *P. falciparum* ou ne différencient qu'une infection par *P. falciparum* ou par une autre espèce, certains par l'utilisation d'anticorps ciblant des antigènes espèces spécifiques permettent de discerner *P. falciparum* et *P. vivax* (Wongsrichanalai *et al.* 2007). Les trois principaux antigènes utilisés sont l'Histidine-Rich Protein 2 (HRP2), l'aldolase et la parasite Lactate DeHydrogenase (pLDH). Le seuil de détection est de l'ordre de 200 parasites/µL. Cette méthode est devenue incontournable puisque 314 millions de tests ont été vendus en 2014 contre 46 millions en 2008 (WHO 2015b). La positivité du test doit être confirmée par la suite par une observation microscopique.

Cette liste est non exhaustive et de nombreux autres procédés ont été mis au point comme la technique LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification) ou basés sur l'utilisation de la cytométrie en flux ou de la spectrométrie de masse (Tangpukdee *et al.* 2009).

VII Traitements et résistances

Une fois un diagnostic positif établi, diverses molécules naturelles ou synthétiques sont utilisables afin d'éliminer les parasites. Les médicaments sont prescrits selon l'espèce impliquée, l'avancée de la maladie et la localisation du patient.

1 Historique des antipaludiques naturels

Deux molécules naturelles, la quinine et l'artémisinine, sont utilisées depuis des siècles pour lutter contre le paludisme.

La quinine fut découverte par les Jésuites dans la cordillère des Andes, qui remarquèrent que les indigènes utilisaient de l'extrait d'écorce des arbres quinquina. Elle fut exportée en Europe sous le nom de poudre des Jésuites au cours du XVIe siècle mais ce n'est qu'en 1817, que Pelletier et Caventou isolent la quinine. Elle fut par la suite supplantée par différents dérivés synthétiques comme la chloroquine, la méfloquine ou l'atovaquone (Meshnick et Dobson 2001).

Décrite en 168 avant JC, l'artémisinine est utilisée contre la fièvre depuis plus de 2000 ans dans la médecine chinoise. Elle est issue de la plante *Artemisia annua* ou qing hao en chinois. Ses propriétés actives ont été seulement démontrées en 1967 lors d'un criblage afin d'identifier des remèdes contre le paludisme, puis elle fut purifiée en 1972 (Meshnick et Dobson 2001). En 2015, Youyou Tu a reçu le prix Nobel de physiologie et médecine pour ses travaux sur l'artémisinine.

2 Molécules antipaludiques actuelles

Les premiers grands efforts ont été menés au cours de la seconde guerre mondiale afin de fabriquer des antipaludiques de synthèse. En effet, la destruction des plantations permettant l'approvisionnement en quinine a provoqué la nécessité de découvrir de nouveaux médicaments (Meshnick et Dobson 2001). De nos jours, des milliers de composés ont été testés et pour la plupart leur potentiel antipaludique ou leur toxicité ont été jugés incompatibles avec leur usage en tant que médicaments.

Les antipaludiques utilisés actuellement peuvent être regroupés en 4 groupes, les dérivés quinoléiques et ceux de l'artémisinine, les antifolates et les antibiotiques. L'ensemble de ces groupes est décrit ci-dessous et résumé dans le Tableau 1.

Dérivés quinoléiques Ce premier groupe contient principalement la chloroquine et la quinine. Ces molécules sont basées sur un composé aromatique hétérocyclique C_9H_7N nommé quinoléine (Marella *et al.* 2013). Ils jouent essentiellement un rôle au niveau de la vacuole digestive du parasite en empêchant la formation de l'hémozoïne et ainsi de la détoxification de l'hème sauf pour la primaquine et l'atovaquone (Antony et Parija 2016). Quatre classes de molécules composent ce groupe :

4-aminoquinoléines Cette classe contient l'amodiaquine et la chloroquine qui fut le premier antipaludique de synthèse produit et utilisé massivement à partir des années 1950 (Meshnick et Dobson 2001). Une dizaine d'années plus tard, des cas de résistance à la chloroquine ont été recensés et sont largement répandus de nos jours. La chloroquine présente quelques effets indésirables notamment au niveau gastro-intestinal mais les réactions sévères sont peu fréquentes (Travassos et Laufer 2011). Dans le cas de l'amodiaquine dont la structure est très analogue à la chloroquine, sa toxicité paraît plus importante particulièrement lors d'une utilisation à long terme (Travassos et Laufer 2011).

Amino-alcools Ces molécules possèdent à la fois un groupement amine et un groupement alcool (Delves *et al.* 2012). Dans cette classe, on trouve la quinine qui est maintenant utilisée pour les formes sévères, la méfloquine, l'halofantrine et la luméfantrine. Parmi ces 4 molécules, seule la luméfantrine ne présenterait aucun risque de toxicité cardiaque (Travassos et Laufer 2011). La méfloquine est suspectée d'accroître le risque de désordre neuropsychologique et est donc contre-indiquée pour les personnes présentant déjà ces symptômes (Antony et Parija 2016 ; Travassos et Laufer 2011).

8-aminoquinoléines Il n'existe pour l'instant qu'une seule molécule faisant partie de ce groupe qui soit utilisée couramment comme antipaludique. La primaquine, dont le site d'action reste non élucidé (Antony, 2016), est utilisée pour éliminer

Tableau 1 – Molécules utilisées pour lutter contre le paludisme. Récapitulatif des antipaludiques les plus courants ainsi que leur site d'action chez le parasite. [a] : (Travassos et Laufer 2011), [b] : (Antony et Parija 2016), [c] : (Delves *et al.* 2012), [d] : (Fidock *et al.* 2004).

	Classe	Nom	Site d'action
Dérivés quinoléiques	4-aminoquinoléines[a,b,c]	Chloroquine	Vacuole digestive[b,d]
		Amodiaquine	
		Piperaquine	
	Amino-alcools[b,c]	Quinine	Vacuole digestive[b]
		Méfloquine	
		Halofantrine	
		Luméfantrine	
	8-aminoquinoléines[a,b,c]	Primaquine	Inconnu[a,b]
	Naphthoquinones[b]	Atovaquone	Mitochondrie[a,b,d]
Dérivés de l'artémisinine	Endoperoxyde[a,b,c]	Artémisinine	Cytosol ?[d] Vacuole ?[d]
		Artésunate	
		Artéméther	
	Antifolates[a,b]	Sulfadoxine	Métabolisme des folates[a,b]
		Pyriméthamine	
		Proguanil	
Antibiotiques[a,b,c]		Tétracycline	Apicoplaste[a,b,c,d]
		Doxycycline	
		Clindamycine	

les formes dormantes, hypnozoïtes, de *P. vivax* et *P. ovale* (Travassos et Laufer 2011). Elle est contre-indiquée pour les personnes déficientes en glucose-6-phosphate déshydrogénase chez qui elle favorise l'hémolyse (Antony et Parija 2016).

Naphthoquinones Cette classe contient l'atovaquone, un 1,4-naphthoquinone, qui bloque la chaîne respiratoire mitochondriale du parasite en ciblant le cytochrome bc1 (Antony et Parija 2016 ; Travassos et Laufer 2011).

Dérivés de l'artémisinine Utilisé depuis plus de 2000 ans en Chine, la prescription de l'artémisinine dans le monde ne date que d'une quarantaine d'années. Ce groupe se compose de trois molécules majeures, l'artémisinine, l'artésunate et l'artéméther qui sont les antipaludiques les plus utilisés dans les pays endémiques. Ce sont des endoperoxydes, c'est-à-dire qu'ils possèdent un résidu peroxyde au niveau de leur cycle aromatique (Delves *et al.* 2012). L'artémisinine est un composé naturel alors que l'artésunate et l'artéméther

sont semi-synthétiques. Ils provoqueraient la formation de radicaux libres chez le parasite entraînant la mort de celui-ci. L'artésunate est privilégié à la quinine dans les cas de paludisme sévère puisque les endoperoxydes sont les antipaludiques les plus efficaces (Travassos et Laufer 2011).

Antifolates Ils se divisent en antifoliques comme la sulfadoxine et antifoliniques tels que la pyriméthamine et le proguanil. Ils opèrent sur la voie des folates qui est essentielle à la synthèse des acides nucléiques. La sulfadoxine est un inhibiteur de la dihydroptéroate synthase (DHPS) alors que la pyriméthamine est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR) (Antony et Parija 2016 ; Travassos et Laufer 2011).

Antibiotiques Trois antibiotiques sont principalement utilisés : la tétracycline, la doxycycline et la clindamycine. Ils sont connus pour inhiber la synthèse protéique chez les procaryotes (Travassos et Laufer 2011) et semblent jouer un rôle au niveau de l'apicoplaste chez *Plasmodium* (Fidock *et al.* 2004). Cet effet est intéressant puisque l'on sait que l'apicoplaste est un organite issu de l'endosymbiose secondaire d'un procaryote. On peut donc supposer que c'est cette origine qui permet à ces antibiotiques d'avoir un effet sur l'apicoplaste (Travassos et Laufer 2011). Les antibiotiques n'ont pas des propriétés antipaludiques suffisamment fortes pour être prescrites en monothérapie. La tétracycline n'est pas indiquée chez la femme enceinte et les jeunes enfants.

3 Traitements actuels

Depuis l'apparition des cas de résistance aux antipaludiques, l'OMS a modifié sa politique de prise en charge des patients avec l'arrêt des monothérapies et l'utilisation de combinaisons antipaludiques. Les thérapies combinées à base d'artémisinine (ACT) sont les plus employées notamment pour leur efficacité et leur bonne tolérance (WHO 2015a). Parmi ces ACT, on trouve essentiellement l'artéméther + luméfantrine, l'artésunate + amodiaquine, l'artésunate + méfloquine, la dihydroartémisinine + piperaquine et l'artésunate + sulfadoxine–pyriméthamine (Tableau 2). D'autres associations peuvent être réalisées comme l'atovaquone + proguanil ou la quinine + antibiotique. Ces combinaisons ont été conçues pour avoir la meilleure efficacité possible et pour éliminer les parasites mono-résistants. Mais elles sont également basées sur l'emploi d'au moins deux molécules de classes différentes pour freiner l'apparition de souches multi-résistantes.

4 Résistance aux antipaludiques

De nos jours, des cas de résistance aux antipaludiques sont sans cesse reportés. Ces différents phénomènes de résistance sont en réalité une tolérance accrue des différentes molécules pour le parasite. Seuls la primaquine et les antibiotiques ne semblent pas montrer de perte d'efficacité (Antony et Parija 2016).

De façon assez surprenante, les premières détections de cas résistants ont toujours été enregistrés dans la région du Mékong sans que l'on sache vraiment la raison (Roberts 2016) avec d'abord la chloroquine dans les années 1950 suivie par la sulfadoxine-pyriméthamine, la méfloquine et plus récemment l'artémisinine et la piperaquine.

Tableau 2 – Traitements antipaludiques actuels. Récapitulatif des combinaisons antipaludiques recommandées par l'OMS selon la sévérité des cas, l'espèce de *Plasmodium* impliquée et l'état/âge du patient (WHO 2015a). ACT : thérapie combinée à base d'artémisinine. CI : contre-indication.

Espèces impliquées et sévérité du cas	Adulte et Enfant	Femme enceinte (1er trimestre)
P. falciparum Cas non compliqué	artéméther + luméfantrine artésunate + amodiaquine artésunate + méfloquine dihydroartémisinine + piperaquine artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine	quinine + clindamycine
P. vivax *P. ovale* *P. malariae* *P. knowlesi* Cas non compliqué stades sanguins	ACT ou chloroquine (sauf si résistance)	quinine
P. vivax *P. ovale* Hypnozoïtes	primaquine (CI : déficience G6PD)	chloroquine jusqu'à fin allaitement puis primaquine (CI : déficience en G6PD)
Cas sévère	artésunate (intraveineuse ou intramusculaire) au moins 24h puis en cachets pendant 3 jours alternatives : artéméther ou quinine	

En 1960, les premiers cas de tolérance à la chloroquine sont décrits en Thaïlande/Cambodge et en Amérique du Sud. Ceux-ci seraient même apparus dès 1957 dans l'Asie du Sud (Roberts, 2016). Peu-à-peu la tolérance s'est répandue dans les pays voisins et également en Afrique à partir des années 1970 (Figure 8). Cette résistance semblerait être conférée principalement par différentes mutations sur les protéines PfCRT, PfMDR1 (Antony et Parija 2016). La protéine PfCRT (*Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter) se situe sur la membrane de la vacuole digestive. Plusieurs mutations ont été décrites comme contribuant à l'apparition de parasites résistants mais la mutation K76T semblerait être prépondérante (Sidhu *et al.* 2002). La PfCRT mutée fonctionnerait alors comme un transporteur ou canal entraînant le transport de la chloroquine en dehors de la vacuole digestive, son site d'action (Sanchez *et al.* 2007). *P. falciparum* Multiple Drug

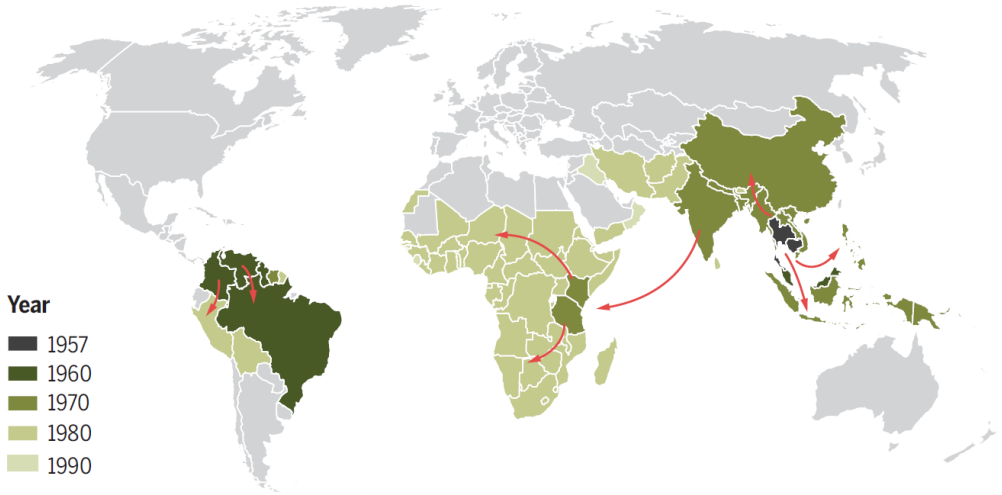

Figure 8 – Propagation de la résistance à la chloroquine. Provenant à l'origine de la région du Mékong et du nord de l'Amérique du Sud, la résistance à la chloroquine s'est répandue peu à peu, pays par pays et continent par continent pour affecter la grande majorité des pays endémiques (d'après (Roberts 2016)).

Resistance 1 (PfMDR1) ou P-glycoprotéine homologue 1 présente une homologie avec une protéine bactérienne impliquée dans le transport membranaire et est localisée au niveau de vacuole digestive (Duraisingh et Cowman 2005). Des mutations spécifiques ou une augmentation du nombre de copies du gène (Sidhu *et al.* 2006) ont été décrites comme permettant la résistance à la chloroquine mais aussi à d'autres antipaludiques comme les amino-alcools ou les dérivés de l'artémisinine (Antony et Parija 2016 ; Duraisingh et Cowman 2005).

Dans le cas de l'artémisinine, les premiers cas de résistance ont été recensés en 2009 dans la région du Mékong (Dondorp *et al.* 2009) et celle-ci s'est répandue peu à peu dans les pays voisins. Elle est conférée principalement par des mutations sur la région en hélices de la protéine Kelch 13 (K13) (Ariey *et al.* 2014). Il n'existe pas qu'un seul type de parasite mutant sur K13 mais une grande diversité de mutations qui apparaissent indépendamment les unes des autres. Certaines de ces mutations conférant la résistance sont présentes en Afrique depuis plusieurs années, ainsi que de nouvelles mutations sans que cela n'ait occasionné l'apparition de résistant (C. H. Sibley 2015). Cependant, en 2017, un premier cas de résistance a été démontré en Afrique avec l'apparition d'un polymorphisme encore jamais décrit (M579I) sur K13 (Lu *et al.* 2017). Il a été observé que les parasites tolérants à l'artémisinine ont un développement ralenti au début de leur cycle. Ce ralentissement permettrait une expression accrue des protéines impliquées dans la réponse au stress, compensant la perte ou la diminution de la fonction de K13, ce qui octroierait le phénomène de tolérance (C. H. Sibley 2015). En plus des mutations sur la protéine K13 ou une augmentation du nombre de copie de PfMDR1, des mutations impliquant d'autres protéines seraient aussi responsables des cas de résistance à l'artémisinine (Mukherjee *et al.* 2017).

D'autres résistances sont également décrites comme les mutations sur les protéines cytochrome b, DHPS et DHFR conférant une tolérance à l'atovaquone, la sulfadoxine et

la pyriméthamine respectivement (Antony et Parija 2016).

Mais l'une des plus grandes inquiétudes pour le futur concerne les parasites multi-résistants (Roberts 2016) dont le traitement nécessitera probablement la découverte de nouveaux antipaludiques efficaces.

Cependant, il est important de noter que certains parasites de *P. berghei* tolérants à l'atovaquone et mutés au niveau du cytochrome b, sont viables au cours du cycle érythrocytaire mais incapables d'effectuer un cycle complet (Goodman *et al.* 2016). Cette observation met en évidence que les mutations engendrant des phénomènes de tolérance et observées en laboratoire ou sur le terrain, peuvent ne pas forcément se propager.

B *Plasmodium falciparum* : biologie d'un parasite atypique

I Génome et protéome de *P. falciparum*

1 Génome

P. falciparum est l'espèce la plus mortelle pour l'Homme. En 2002, la souche 3D7 de *P. falciparum*, dérivée de la souche NF54, a été séquencée entièrement (Gardner *et al.* 2002). Le parasite possède 14 chromosomes de taille allant de 0.6 à 3.26 mégabases (Mb) et l'ensemble du génome nucléaire fait 22.8 Mb. L'une des caractéristiques spécifiques de *P. falciparum* est sa richesse en A/T qui est de 80.6% et monte jusqu'à 90% dans les régions non codantes. A propos des gènes, ils ont été estimés au nombre de 5300, ce qui est légèrement plus faible que l'estimation faite pour *Saccharomyces cerevisiae* (5800), qui possède un génome moins grand (12 Mb). Ces gènes ont pour la majorité au moins 1 intron (53.9%) et font en moyenne 2.3 kb, introns exclus. Cependant, 15.5% de ces gènes ont une taille supérieure à 4 kb alors que le pourcentage chez *S. pombe* et *S. cerevisiae* n'est que de 3% environ (Gardner *et al.* 2002).

Les espèces de *Plasmodium* contiennent également un génome mitochondrial. Celui-ci est extrêmement réduit avec une taille de 6 kb et 3 Open Reading Frames (ORFs), les sous-unités I et III du cytochrome c oxydase et le cytochrome b. Leur traduction se fait grâce à plusieurs ARNr présents dans le génome mitochondrial. Ces ARNr sont déficients en régions importantes mais cela serait compensé par l'association avec des protéines ribosomales provenant du noyau. Ces dernières seraient plus larges qu'à l'accoutumée et contrebalanceraient les domaines manquants en formant avec les ARNr, des mitoribosomes (Vaidya et Mather 2009). Issue d'une endosymbiose, la mitochondrie a vu une grande partie de ses gènes être transférés au niveau du génome nucléaire. Il a été estimé que plus de 200 gènes nucléaires codent une protéine qui se dirigera vers la mitochondrie (Gardner *et al.* 2002).

L'apicoplaste de *P. falciparum* fait 35 kb et code 30 protéines, 25 ARNt et 2 ARNr en duplicate (Wilson *et al.* 1996). Presque toutes les protéines jouent un rôle dans l'expression des gènes. On retrouve par exemple 17 protéines ribosomales. La transcription des gènes de l'apicoplaste pourrait se révéler être polycistronique (Wilson *et al.* 1996). L'apicoplaste est issu également d'une endosymbiose mais cette fois-ci secondaire et entre 500 et 800 gènes nucléaires encoderaient une protéine de cet organite (Gardner *et al.* 2002 ; Waller *et al.* 2000). Ces protéines sont guidées vers l'apicoplaste via une séquence bipartite. Tout d'abord, en N-terminal, un peptide signal permettrait à la protéine d'être dirigée vers le

système sécrétoire puis un peptide de transit servirait à l'import dans l'apicoplaste (Waller *et al.* 2000).

2 Protéome

L'analyse du génome de *P. falciparum* a permis de prédire à 5300, le nombre de protéines codées. 60% de ces protéines putatives ne présentent pas d'homologue chez un autre organisme (Gardner *et al.* 2002). Ce chiffre montre à quel point *Plasmodium* s'est éloigné des autres eucaryotes au cours de l'évolution. Il faut néanmoins tenir compte que la richesse en A/T pourrait masquer en partie l'homologie existante entre certains gènes. Une étude protéomique sur les stades sporozoïtes, trophozoïtes, mérozoïtes et gamétocytes a permis de mettre en évidence que 46% de ces protéines prédites, soit 2415, sont produites au cours de ces stades dont plus de la moitié sont hypothétiques (Florens *et al.* 2002). Il est intéressant de noter que seulement 6% de ces protéines détectées sont communes aux quatre stades et que celles-ci ont des fonctions basiques nécessaires à chaque stade comme des facteurs de transcription, des histones ou des protéines ribosomales... (Florens *et al.* 2002).

II Description générale du cycle de vie de *P. falciparum*

En 1901, Grassi publie la toute première description du cycle de vie complet de *P. falciparum* (Grassi 1901).

Lors d'un repas sanguin d'un anophèle femelle infecté par *Plasmodium*, des sporozoïtes sont injectés chez l'Homme et vont migrer via la circulation sanguine puis s'établir dans les hépatocytes (Tuteja 2007). Dans ces cellules, pendant 9 à 16 jours, les parasites vont se multiplier et former des mérozoïtes, forme infectante des globules rouges. Dans les cas de *P. vivax* et *P. ovale*, les sporozoïtes vont être capables dans les hépatocytes de passer dans un stade de dormance, hypnozoïtes, qui sont responsables de la résurgence des symptômes plusieurs mois après l'infection. Lorsque les dizaines de milliers de mérozoïtes issus du stade hépatocytaire atteignent le système sanguin, ils envahissent les globules rouges et se multiplient. Le cycle érythrocytaire se met alors en place avec le développement et la division du parasite à travers les stades anneaux, trophozoïtes et schizontes. Le mérozoïte initial a maturé, en un cycle de 48h pour *P. falciparum*, en 16 à 22 parasites qui vont au moment de la rupture de la membrane du globule rouge, permettre d'envahir de nouveaux érythrocytes sous leur forme infectante de mérozoïtes. C'est au cours de ce relargage des parasites et du contenu de la cellule infectée, que les symptômes du paludisme apparaissent. Une voie d'échappement au cycle érythrocytaire, la gamétogenèse, va permettre la transmission des parasites au moustique afin d'assurer la pérennité du cycle. Un faible pourcentage des parasites va se diriger vers cette voie pour se développer en gamétocytes mâles et femelles dont le processus de maturation dure une dizaine de jours. Lors d'un nouveau repas sanguin, le moustique femelle ingère anneaux, trophozoïtes et schizontes, qui seront digérés, mais aussi des gamétocytes qui eux seront activés et débuteront la phase sexuée avec la formation de gamètes mâles et femelles dans la lumière de l'intestin. La fécondation entre un gamète mâle et femelle permet de former un zygote puis un ookinète mobile, qui va migrer jusqu'à la face externe de la paroi de l'intestin où il va s'établir. L'ookinète immobile, nommé l'oocyste, va subir plusieurs cycles de multiplication entraînant la formation

des sporozoïtes. Après la rupture de l'oocyste, les sporozoïtes migrent jusqu'aux glandes salivaires où ils restent infectieux pendant un ou deux mois. Au cours du prochain repas sanguin, ils seront transmis à un nouvel hôte vertébré et entameront un nouveau cycle (Tuteja 2007).

Les différentes étapes du cycle complet de *P. falciparum* sont illustrées dans la FIGURE 9 et leurs mécanismes sont décrits plus précisément par la suite.

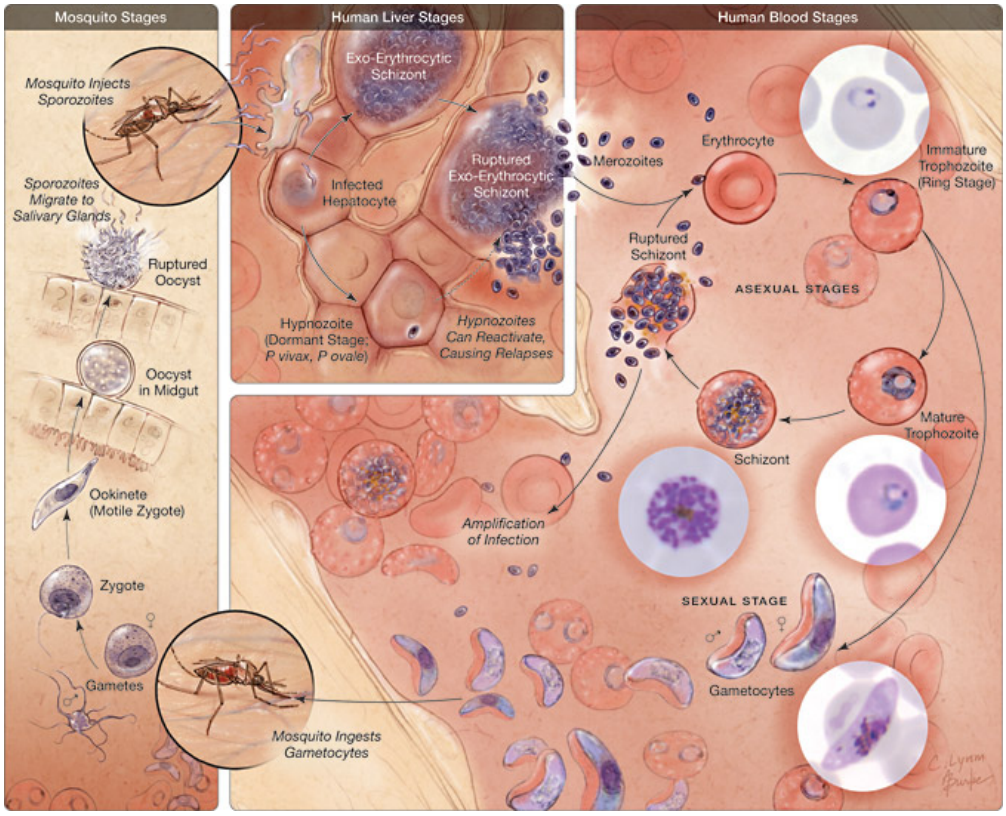

FIGURE 9 – Cycle de vie de *P. falciparum*. Le cycle sexué et la formation des sporozoïtes se déroulent chez l'anophèle femelle (cadre de gauche). Le repas sanguin de l'anophèle va permettre l'infection de l'Homme avec le début de la phase hépatique (cadre du milieu). Les sporozoïtes vont ensuite se diviser en des milliers de mérozoïtes qui vont atteindre la circulation sanguine et réaliser le cycle érythrocytaire (cadre de droite). La formation des gamétocytes et leur ingestion par l'anophèle va permettre de compléter le cycle de *P. falciparum* (d'après (Griffith *et al.* 2007)).

III De l'anophèle à l'Homme

1 Les anophèles

Le paludisme est transmis à l'Homme uniquement par des moustiques du genre *Anopheles*. Seules les femelles prennent un repas sanguin et sont donc des vecteurs potentiels de la maladie. Le genre *Anopheles* contient 465 espèces décrites et 50 non nommées. Parmi celles-ci, 70 peuvent être vecteurs de la malaria dont 41 sont dominantes (FIGURE 10) (Sinka *et al.* 2012).

En Afrique, les trois espèces les plus infectantes et les plus répandues sont *An. gambiae*, *An. funestus* et *An. arabiensis* (FIGURE 10). La distribution de ces espèces dépend de plusieurs critères environnementaux. En effet, les précipitations moyennes et maximales, l'altitude ou la température minimale influent sur leur répartition (Sinka *et al.* 2010). Les larves de *An. funestus* se développent principalement dans des eaux semi ou totalement permanentes alors que celles de *An. gambiae* préfèrent les eaux temporaires issues des pluies. Ces eaux stagnantes transitoires sont fortement liées à l'activité humaine, ce qui permet, entre autres, à *An. gambiae* d'être l'un des plus importants vecteurs du paludisme humain.

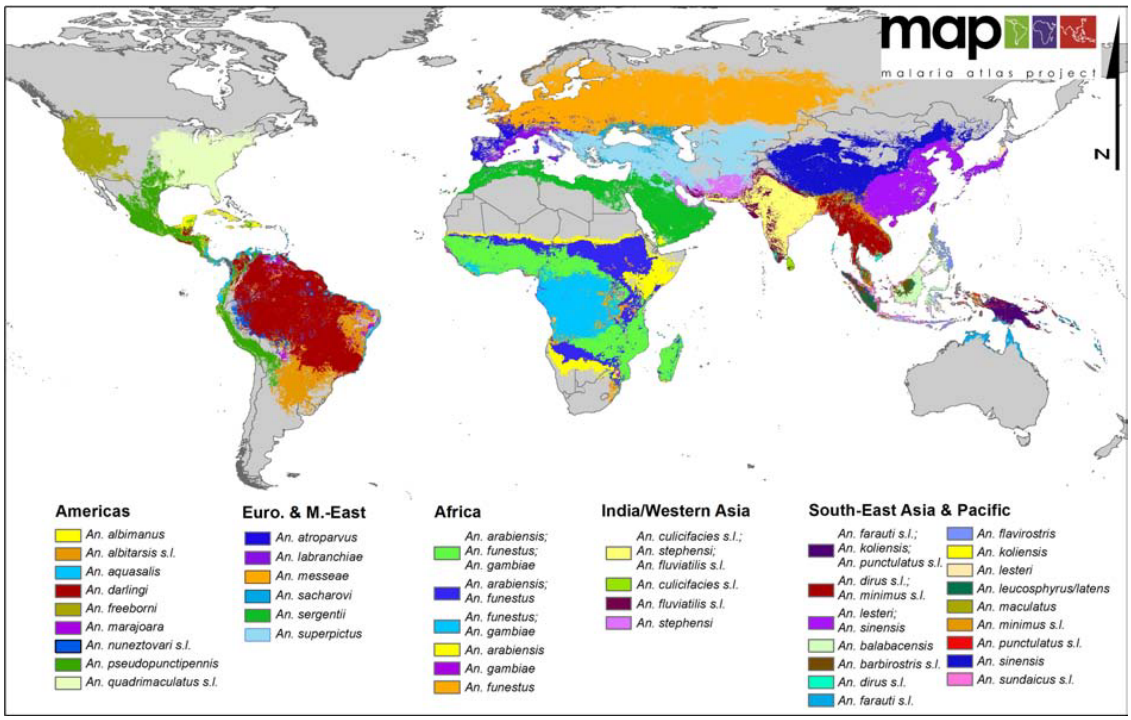

FIGURE 10 – Carte du monde représentant les espèces d'anophèle dominantes dans la transmission du paludisme (d'après (Sinka *et al.* 2012)).

Les études sur les anophèles sont importantes afin d'améliorer la lutte anti-vectorielle en fonction de la distribution géographique des différentes espèces. Outre le fait de connaître les conditions optimales du développement des larves, l'analyse des prises de repas pour chaque espèce permet de moduler les moyens à mettre en place pour prévenir les piqûres. *An arabiensis* est décrit comme ayant principalement un comportement zoophilique (se nourrit majoritairement des animaux plutôt que l'Homme), exophagique (repas sanguin à l'extérieur des habitations) et exophile (vit à en dehors des bâtiments après le repas) (Sinka *et al.* 2010). Ces comportements montrent que les traitements à l'intérieur des habitations sont peu efficaces sur cette espèce de moustique se nourrissant et vivant surtout à l'extérieur. A l'inverse, *An. gambiae*, tout comme *An. funestus*, sont plutôt décrits comme étant anthropophiles (se nourrit davantage sur les Hommes que les animaux), endophagiques et endophiliques (prend ses repas et reste à l'intérieur) (Sinka *et al.* 2010). Dans ces cas-là,

l'utilisation d'insecticides à l'intérieur des bâtiments et les moustiquaires imprégnées sont particulièrement conseillées. Cependant, plusieurs études remarquent que ces comportements peuvent être variables. Par exemple, il a été montré qu'en Afrique de l'Ouest, les repas sanguins de *An. arabiensis* sur l'Homme ont lieu dans 80-100% des cas à l'intérieur des habitations et que le moustique y reste. A l'inverse, en Afrique de l'Est, *An arabiensis* se nourrit plutôt auprès du bétail et reste à l'extérieur (Tirados *et al.* 2006). Une variabilité du comportement est également observable chez les autres espèces d'anophèles et pourrait être due à un polymorphisme permettant une adaptation de l'espèce à son environnement local (Sinka *et al.* 2010).

Ces comportements versatiles et la co-implantation des différentes espèces (FIGURE 10) ne favorisent pas la mise en place d'un traitement anti-vectoriel plus ciblé selon l'espèce impliquée dans la transmission du paludisme.

Une approche innovante et ambitieuse a été exposée récemment afin de contrer la propagation des parasites par les moustiques : la génération de mutant récessif par l'utilisation du système CRISPR-Cas9, permet lorsque le gène cible est impliqué dans la gamétogenèse, de réduire très fortement la formation de larves viables chez les femelles homozygotes (Hammond *et al.* 2016). L'objectif serait que ces anophèles femelles stériles réduisent peu-à-peu la population sauvage en propageant la mutation et ainsi l'infertilité.

2 L'infection

Dans la paroi de l'intestin de l'anophèle, les milliers de sporozoïtes libérés lors de la rupture de l'oocyste, vont migrer via l'hémolymphe jusqu'aux glandes salivaires. Ils vont se fixer à la lamelle basale des cellules acineuses des glandes puis vont traverser l'une des cellules sécrétrices (Matuschewski 2006). Le mécanisme n'est pas encore totalement élucidé mais les protéines CircumSporozoïte (CSP), Merozoite Apical Erythrocyte Binding-Ligand (MAEBL) et Thrombospondin-Related Adhesive (TRAP) sont impliquées. Les cellules sont organisées en lobes et forment au centre une cavité extracellulaire connectée aux canaux salivaires. Les sporozoïtes dans la cavité se regroupent et sont considérés comme matures, à savoir hautement infectieux et mobiles, ce qui n'est pas le cas des sporozoïtes à leur sortie de l'oocyste. Cette maturation pourrait être acquise au fur et à mesure du passage dans l'hémolymphe et de l'invasion des cellules acineuses (Matuschewski 2006).

Il a été montré pour *P. berghei*, que la plupart des sporozoïtes accumulés dans la cavité, sont accolés et donc immobiles mais que les parasites libres présentent une motilité par glissement (jusqu'à 2 μms^{-1}) (Frischknecht *et al.* 2004). L'utilisation de la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, entraîne une absence de mouvement indiquant qu'il est probablement actine-myosine dépendant. Les moustiques peuvent accumuler plusieurs milliers de sporozoïtes dans les cavités mais très peu sont observés dans les canaux. Cette colonisation se fait activement, ce qui nécessite un mouvement des parasites dont seulement une faible proportion en est encore capable (Frischknecht *et al.* 2004).

Au cours d'une piqûre, l'anophèle libère via ses glandes salivaires, différents anticoagulants, antihistaminiques, vasodilatateurs... afin de favoriser ensuite le repas sanguin. C'est durant cette étape que les parasites sont injectés à l'Homme (Garcia *et al.* 2006). Très peu de sporozoïtes sont inoculés au cours de la salivation et ce nombre est estimé entre une quinzaine (Rosenberg *et al.* 1990) et moins de 200 (Garcia *et al.* 2006 ; Prudêncio *et al.*

2006). Dans le cas de *P. berghei*, 50 sporozoïtes sont libérés après une minute de salivation (Frischknecht *et al.* 2004) et seuls les parasites présents dans les conduits étroits des canaux salivaires sont libérés. Même après une salivation excessive (10 min), les sporozoïtes présents dans les cavités des glandes salivaires ne sont pas délivrés et les derniers sporozoïtes sont libérés bien avant la fin de la salivation (Frischknecht *et al.* 2004). Ces résultats montrent que la faible inoculation de parasites est suffisante pour infecter l'hôte et permet de maintenir une certaine réserve pour de futures infections et de ne pas déclencher une forte réponse du système immunitaire.

IV Phase hépatique

1 Accès aux hépatocytes

Les sporozoïtes injectés chez l'Homme le sont principalement au niveau du derme, qu'ils vont traverser jusqu'à atteindre le système sanguin. L'artère hépatique ou la veine porte permet aux parasites d'atteindre les sinusoïdes hépatiques. Ils y sont retenus par interaction entre les protéines parasitaires CSP et TRAP avec l'unique protéoglycane héparane sulfate du foie (HSPG) et vont se diriger ensuite par glissement vers leur site de passage (Pradel *et al.* 2004).

Afin de rejoindre les hépatocytes, destination finale des sporozoïtes, ils doivent se frayer un chemin à travers une barrière composée de deux types cellulaires : les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer (Figure 11) (Garcia *et al.* 2006). Les cellules endothéliales possèdent des fenestrations qui ne sont pas assez larges pour le passage des sporozoïtes. Les cellules de Kupffer, macrophages présents dans le foie, sont décrites comme étant le passage préférentiel des sporozoïtes pour franchir la barrière sinusoïdale (Frevert *et al.* 2006 ; Prudêncio *et al.* 2006). 60% des passages se font par les cellules de Kupffer alors que 17% uniquement à travers les cellules endothéliales (Tavares *et al.* 2013 ; A. S. P. Yang et Boddey 2017). Ces macrophages doivent être ancrés dans la couche cellulaire et non dans la lumière du sinusoïde afin de permettre aux parasites d'avoir un accès aux hépatocytes. Il est intéressant de remarquer que les sporozoïtes sont capables de traverser ces macrophages sans subir de dommages alors que le rôle des cellules de Kupffer est justement d'éliminer, entre autres, les corps étrangers (Frevert *et al.* 2006). Le parasite entre à l'intérieur des cellules de Kupffer sans rompre leur membrane plasmique mais en formant une vacuole qui pourrait servir de protection (Prudêncio *et al.* 2006). L'interruption du gène codant la protéine Sporozoite microneme Protein Essential for Cell Traversal (SPECT) de *P. berghei* a montré son importance dans la traversée de la barrière sinusoïdale (Ishino *et al.* 2004).

2 Infection non productive et productive

Une fois la barrière sinusoïdale franchie, les sporozoïtes se retrouvent dans l'espace de Disse, qu'ils vont traverser afin d'atteindre les hépatocytes.

Lorsque les sporozoïtes arrivent au niveau des hépatocytes, ils peuvent les traverser (infection non-productive) ou s'y installer et se multiplier (infection productive) (Figure 12).

Lorsque le parasite franchit la cellule, il le fait en formant une vacuole transitoire (Risco-Castillo *et al.* 2015). Le mécanisme d'entrée n'est pas encore parfaitement connu mais ne semble pas être dépendant des organites sécréteurs du parasite. Il a été montré que la

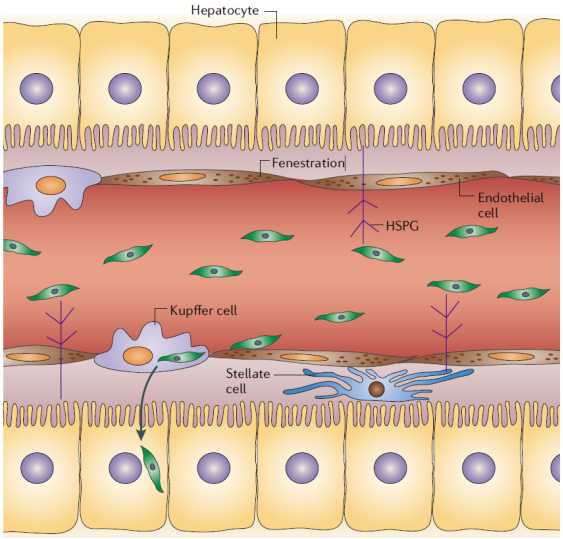

Figure 11 – Schéma représentant le passage des sporozoïtes dans le foie. Une fois les sinusoïdes hépatiques atteints, les sporozoïtes doivent se frayer un chemin à travers la barrière cellulaire pour atteindre l'espace de Disse puis les hépatocytes. L'entrée se fait par le biais des cellules de Kupffer, qui sont ancrées à la barrière (d'après (Prudêncio *et al.* 2006)).

Perforin-Like Protein 1 (PLP1) de *P. yoelii*, un parasite du rongeur, devient active après une acidification de la vacuole, signe d'une fusion avec un lysosome. Cette activation permet au parasite de sortir de la vacuole et de survivre avant de subir une lyse (Risco-Castillo *et al.* 2015).

Lors d'une invasion productive, le sporozoïte entre dans l'hépatocyte via la formation d'une jonction. Cette jonction est dépendante de la sécrétion des rhoptries et entre autres, des protéines RON (Rhoptry Neck Proteins) et va permettre au parasite d'être propulsé dans la cellule et de former une vacuole parasitophore (Figure 12). Des souris déficientes en CD81 ne subissent pas d'invasion productive mais montrent une invasion non productive de *P. yoelii* (Silvie *et al.* 2003). L'importance de CD81 a également été démontrée chez *P. falciparum* avec l'utilisation d'anticorps ciblant CD81 et bloquant l'infection (Silvie *et al.* 2003). En revanche, chez *P. berghei*, l'invasion peut être CD81-dépendante ou indépendante. Le mécanisme impliquant CD81 n'est pas encore élucidé mais il ne semble pas y avoir d'interaction directe entre CD81 et des protéines du sporozoïte (Risco-Castillo *et al.* 2013).

Les facteurs favorisant l'une ou l'autre voie ne sont pas encore totalement clarifiés mais il semblerait que les sporozoïtes effectuent au début, des phases non productives puis après 30 à 60 min, entrent en phase productive (Risco-Castillo *et al.* 2015). Les protéines décrites comme étant impliquées dans les deux voies d'invasion ont été répertoriées dans une revue récente (A. S. P. Yang et Boddey 2017).

Il est intéressant de noter que les sporozoïtes sont capables d'envahir ou de passer à travers une large diversité de cellules (glandes salivaires, cellules épithéliales, cellules de Kupffer et hépatocytes).

Au cours d'une invasion productive, le parasite subit entre 13 et 14 cycles mitotiques

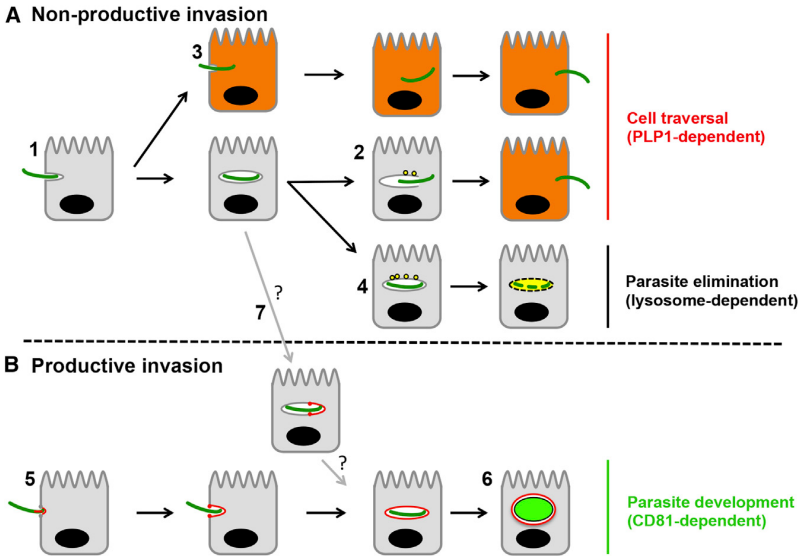

Figure 12 – Invasion des hépatocytes par les sporozoïtes selon deux voies. A. L'invasion non-productive permet au sporozoïte de franchir la cellule en formant une vacuole (**1**). La perforine PLP1 entraîne la libération du parasite avant (**3**) ou après (**2**) la formation complète de la vacuole. En l'absence ou en cas de défaillance de PLP1, les lysosomes dégradent le parasite (**4**) provoquant son élimination. **B.** L'invasion productive du parasite dans l'hépatocyte en formant une jonction (**5**), induit la constitution d'une vacuole parasitophore (**6**). Le parasite va alors pouvoir s'établir au sein de la cellule et se multiplier. Il n'a pas encore été démontré si un sporozoïte en phase non productive était capable ou non de passer en phase productive au cours de la même invasion (**7**) (d'après (Risco-Castillo *et al.* 2015)).

(Gerald *et al.* 2011) pendant 2 à 10 jours, phase qui est asymptomatique et obligatoire. Le processus de multiplication est encore largement inconnu (Prudêncio *et al.* 2006). Après cette période, plusieurs dizaines de milliers de mérozoïtes sont contenus dans l'hépatocyte, dont la superficie peut être multipliée par 70 (Vaughan *et al.* 2012), et vont être libérés dans le sang. Il a été montré chez *P. berghei*, que cette libération se fait par détachement de la cellule infectée ou par formation de mérosomes, vésicules formées à partir de l'hépatocyte (Sturm *et al.* 2006). Les mérozoïtes sont libérés dans le cytoplasme du vestige de l'hépatocyte après la rupture de la vacuole parasitophore et occupent tout l'espace de la vésicule. La constitution des mérosomes par bourgeonnement permet leur libération dans les sinusoïdes hépatiques. Ce mécanisme permettrait d'assurer la libération des mérozoïtes dans la circulation sanguine sans phagocytose par les macrophages. La présence des mérosomes a également été confirmée chez des souris ayant subi une xénogreffe d'hépatocytes humains infectées par *P. falciparum* (Vaughan *et al.* 2012).

V Cycle érythrocytaire

Une fois dans le sang, les mérozoïtes peuvent infecter un globule rouge et démarrer le cycle érythrocytaire.

1 L'invasion des érythrocytes

Le mérozoïte est l'un des plus petits parasites connus, mesurant environ 1.6 µm de long pour 1 µm de large (Bannister *et al.* 2000). Il contient au niveau du pôle apical tous les organites sécréteurs nécessaires au processus d'invasion : rhoptries, micronèmes et granules denses, alors que le noyau se situe au niveau du pôle basal.

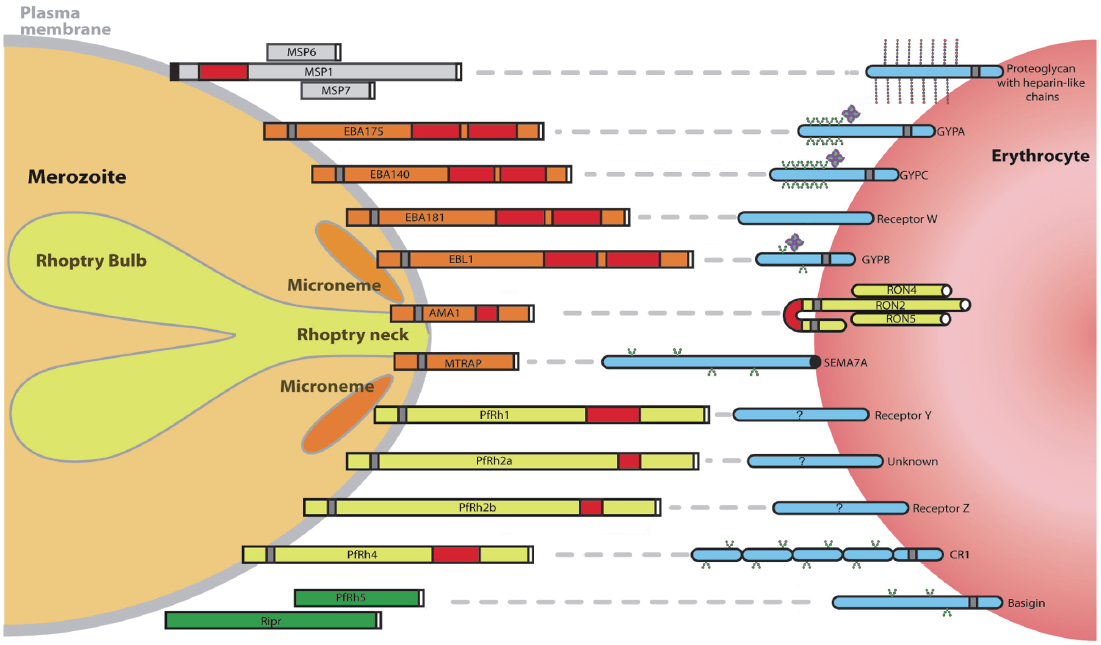

Figure 13 – Attachement du mérozoïte de *P. falciparum* au globule rouge. Schématisation des interactions connues entre les protéines parasitaires et les récepteurs érythrocytaires (d'après (Weiss *et al.* 2015)).

Lorsque le mérozoïte se retrouve dans le milieu extracellulaire, il subit une hausse de sa concentration cytoplasmique en potassium nécessitant un accroissement de sa concentration calcique. Cette augmentation entraîne la décharge du contenu des micronèmes permettant un attachement réversible avec le globule rouge (Tham *et al.* 2012). Cette interaction se fait via différentes protéines comme celles des familles Erythrocyte Binding-Like (EBL) ou *P. falciparum* Reticulocyte binding homologue (PfRh) qui se lient à des récepteurs présents à la surface des érythrocytes (Figure 13). Par exemple, la libération de la protéine parasitaire EBA-175 va former un complexe avec la glycophorine A (Tham *et al.* 2012 ; Volz *et al.* 2016). Les différentes protéines semblent montrer un effet redondant puisque la délétion unique de l'un des gènes n'empêche pas l'adhésion au globule rouge sauf dans le cas de PfRh5 (Volz *et al.* 2016). Cette dernière ne semble pas être principalement impliquée

dans l'attachement entre le parasite et l'érythrocyte mais plutôt dans les étapes suivantes (Weiss *et al.* 2015). L'interaction peut également impliquer des Merozoite Surface Proteins (MSP) qui sont présentes sur la couche de surface des mérozoïtes (Weiss *et al.* 2015).

Après l'interaction, le parasite va se réorienter pour placer son pôle apical à 90° par rapport à la membrane plasmique du globule rouge, ce qui entraîne une déformation de celle-ci et qui est dépendante des EBA/PfRH (Figure 14) (Weiss *et al.* 2015). Un flux de Ca^{2+} du mérozoïte vers la cellule hôte est alors une étape indispensable au succès de l'invasion. C'est à cette étape que le complexe PfRh5-PfRipr-CyRPA, qui se fixe au récepteur basignine, se montre essentiel pour déclencher le flux calcique en lien avec le relargage des protéines des rhoptries (Volz *et al.* 2016).

Certaines de ces protéines vont former une jonction serrée composée principalement des protéines RON et de Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) (Harvey *et al.* 2014 ; Weiss *et al.* 2015). AMA1 se situe sur la membrane parasitaire et interagit avec RON2, composante du complexe RON présent au niveau de la membrane plasmique de l'érythrocyte (Harvey, 2014). Le rôle précis de AMA1 reste incertain puisque la protéine semble être importante mais parfois dispensable (Harvey *et al.* 2014 ; Yap *et al.* 2014). Cette jonction serrée sert de point d'ancrage pour la traction du parasite au sein de la cellule avec la formation de la vacuole parasitophore. Une fois le parasite internalisé, la jonction serait impliquée pour sceller la membrane plasmique.

Le mérozoïte met en moyenne 30 secondes pour envahir le globule rouge (Volz *et al.* 2016 ; Weiss *et al.* 2015). Ensuite l'échinocytose peut se produire, c'est-à-dire que le globule rouge prend une forme étoilée, ce qui serait une répercussion de l'injection du contenu des rhoptries (Weiss *et al.* 2015). Après quelques minutes, la cellule hôte récupère sa forme d'origine (Figure 14).

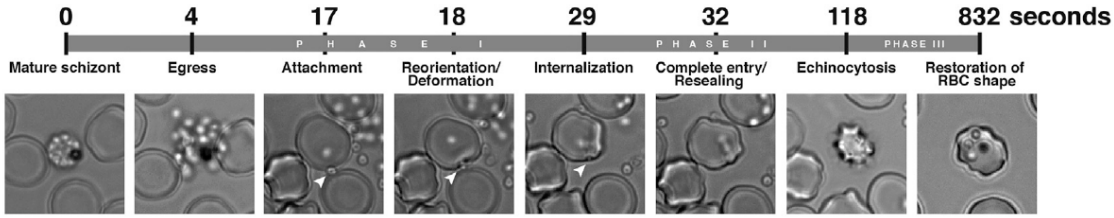

Figure 14 – Invasion du globule rouge par les mérozoïtes de *P. falciparum*. Les différentes étapes du processus d'invasion sont présentées en images ainsi que leur durée. Les flèches blanches indiquent la position du mérozoïte. Les temps donnés sont en secondes (d'après (Volz *et al.* 2016)).

2 Les stades précoces érythrocytaires

Après l'invasion, le parasite se circularise et s'amincit, formant une structure ressemblant à un anneau, ce qui donne le nom à ce stade (Figure 15B). Dans la partie la plus épaisse, on peut identifier le noyau, le réticulum endoplasmique, la mitochondrie et l'apicoplaste. Le reste du parasite présente une structure fine et circulaire avec peu d'organites (Bannister *et al.* 2000). Le parasite est considéré en anneau pendant une douzaine d'heures dans le cas de *P. falciparum*.

L'anneau évolue peu à peu en trophozoïte même s'il y a peu de différence intracellulaire entre les deux hormis un changement de forme et de taille du parasite (FIGURE 15C). L'anneau est même parfois considéré comme une forme du stade trophozoïte. L'augmentation du volume du réticulum endoplasmique et du nombre de ribosomes libres ainsi que la mise en place du complexe golgien prouvent que le parasite accroît son expression protéique (Bannister *et al.* 2000).

Le parasite, au cours de son développement, va récupérer environ 80% de l'hémoglobine de la cellule hôte pour la dégrader. Ce mécanisme va lui permettre de récupérer des acides aminés indispensables à sa croissance et de défavoriser une lyse précoce du globule (Milani *et al.* 2015). La dégradation de l'hémoglobine commence dès le stade anneau mais a surtout lieu chez le trophozoïte au niveau de la vacuole digestive qui contient les protéases nécessaires. L'hémoglobine va être endocytée via le cytostome, invagination située à l'interface entre la membrane plasmique et la vacuole parasitophore, selon un mécanisme actine-myosine dépendant mais encore obscur (Milani *et al.* 2015). Ainsi la vésicule formée est à double membrane et fusionnera par la suite avec la vacuole digestive. Ce processus est encore confus et nécessite de plus amples investigations. Une seconde voie de transport par phagocytose est également envisageable (Milani *et al.* 2015). La dégradation de l'hémoglobine en hème engendre la formation d'un produit toxique pour le parasite avec un risque de rupture membranaire ou de dommages oxydatifs. Afin de contrecarrer ces menaces, le parasite détoxifie les hèmes ferreux libres par cristallisation en hémozoïne, correspondant au pigment malarique. L'implication des lipides, présents dans la vacuole digestive, dans la détoxification de l'hème a été démontrée (Jackson *et al.* 2004). Lors de l'éclatement du globule rouge et de la libération des mérozoïtes, l'hémozoïne est également libérée et se retrouve dans la circulation sanguine, processus en partie responsable des fièvres.

Des modifications de la cellule hôte ont également lieu. Cela est rendu possible par l'exportation d'environ 10% des protéines totales parasitaires. Ces exportations dans le globule rouge favoriseraient l'absorption des nutriments mais aussi fragiliseraient la membrane plasmique par interaction avec les protéines parasitaires qui s'y accumulent. Au fur et à mesure du développement du parasite, des protubérances sont observables au niveau de la membrane de la cellule hôte. Elles correspondent aux knobs où les protéines comme Knob-Associated His-Rich Protein (KAHRP) et *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1) s'amassent (Maier *et al.* 2009). PfEMP1, protéine codée par la famille des gènes *var*, présente un domaine extracellulaire en dehors du globule et est capable d'adhérer aux cellules endothéliales (récepteurs CD36 ou ICAM-1), ce qui maintient les érythrocytes infectés en dehors de la rate et évite ainsi leur destruction. Cette adhérence explique pourquoi seulement les anneaux sont visibles dans la circulation sanguine (Tibúrcio *et al.* 2015b).

La présence des fissures de Maurer, une structure membranaire ressemblant au golgi dans le cytosol de l'érythrocyte infecté, semble jouer un rôle prépondérant dans l'adressage de ces protéines. Les fissures de Maurer sont des vacuoles aplaties à une membrane, d'une largeur de 500 nm et pourraient provenir de la vacuole parasitophore (Mundwiler-Pachlatko et Beck 2013). La position, le nombre et la taille peuvent varier et une diversité entre les souches a été décrite. En effet, la souche 3D7 de *P. falciparum* présente une seule couche contre plusieurs pour les souches NF54, HB3, Dd2, entre autres (Mundwiler-Pachlatko

et Beck 2013). Les fissures de Maurer se mettent en place rapidement après l'invasion et migrent progressivement pour se fixer au stade trophozoïte et se désassembler avant la libération des mérozoïtes. Elles permettraient de faire la connexion entre la vacuole parasitophore et la membrane plasmique du globule rouge. Certaines protéines semblent être des résidentes permanentes de cette structure alors que les protéines destinées à la membrane érythrocytaire ne sont que transitoires, ce qui est le cas de PfEMP1 et des protéines de la famille des RIFIN et STEVOR (Mundwiler-Pachlatko et Beck 2013).

3 Schizogonie

Le stade schizonte correspond à l'étape où le parasite va ou s'est déjà multiplié (Figure 15E) et débute vers la 30ème heure post-invasion. La mitose de *Plasmodium* spp. est fermée contrairement à la mitose ouverte de la plupart des eucaryotes, où la membrane nucléaire est désagrégée puis reformée autour de chaque nouvelle cellule fille. Les mitoses successives de *Plasmodium* sont des endomitoses, à savoir sans division cellulaire et disparition de la membrane nucléaire (Arnot *et al.* 2011). L'une des autres différences notables est l'absence de condensation des chromosomes qui semblent rester assez diffus tout au long de la mitose lors d'observations microscopiques (Gerald *et al.* 2011). Après la réplication de l'ADN, la première mitose a lieu au stade trophozoïte âgé (26-28h post infection) et la durée entre l'entrée en réplication et la fin de la mitose est estimée à 4-6h, ce qui est plus long que chez d'autres organismes comparables (levures) et que les phases de réplication et mitoses suivantes (Arnot *et al.* 2011). Les centres organisateurs des microtubules (MTOCs) sont positionnés sur la membrane nucléaire et les fuseaux mitotiques accrochent les chromosomes au niveau des kinétochores (Gerald *et al.* 2011). L'alignement des chromosomes lors d'une métaphase classique n'est pas clairement démontré chez *Plasmodium*. Par la suite les chromatides sœurs sont séparées et les MTOCs migrent à l'opposé l'un de l'autre. Au lieu de former deux cellules filles avec la constitution de deux nouvelles membranes nucléaires, le parasite va lui diviser son noyau en deux sans division cellulaire (Gerald *et al.* 2011). Il va alors subir des nouveaux cycles mitotiques, pour obtenir une cellule syncyciale, c'est-à-dire multinuclée de 16 à 22 noyaux à 1n. L'absence de synchronisation dans la division nucléaire engendre ce nombre final de mérozoïtes qui n'est pas forcément une puissance de 2 (Arnot *et al.* 2011 ; Gerald *et al.* 2011).

Au cours du stade schizonte, une augmentation des ribosomes libres, du réticulum endoplasmique, la multiplication des mitochondries et des apicoplastes sont observables. Par la suite, les mérozoïtes vont s'individualiser selon un processus très ordonné. Les organites sécréteurs sont formés à partir de vésicules provenant du golgi qui vont se transformer individuellement en micronèmes et granules denses, ou fusionner pour former les rhoptries (Bannister *et al.* 2000). Avant une individualisation complète, une mitochondrie et un apicoplaste, provenant du cytoplasme du schizonte, vont rejoindre chaque nouveau mérozoïte. Le cytosquelette et la couche de surface sont également assemblés. Lorsque la maturation est complétée, la vacuole parasitophore et la membrane du globule rouge sont rompues et permettent la libération des mérozoïtes (Figure 15F) qui vont alors rechercher un nouveau globule rouge à envahir (Bannister *et al.* 2000).

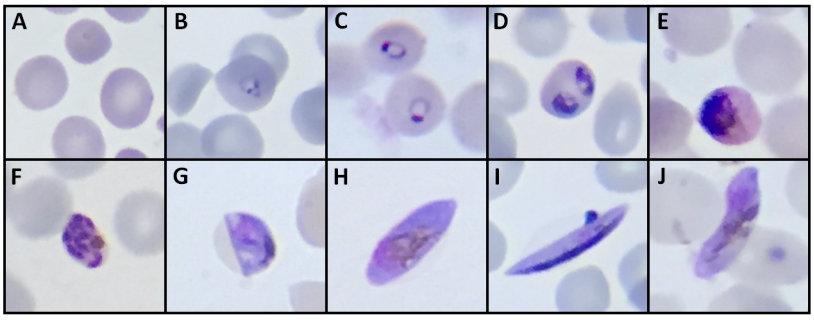

Figure 15 – Etapes du cycle érythrocytaire et de la gamétogenèse chez *P. falciparum*. Les globules rouges sains (A), les stades asexuels anneau (B), trophozoïte jeune (C) et âgé (D), schizonte (E) et mérozoïtes sur le point d'être libérés (F) sont représentés en images, ainsi que les stades sexuels II (G), III (H), IV (I) et le stade mature V (J) (Photos personnelles).

VI Gamétogenèse

Au cours du cycle érythrocytaire, une voie d'échappement permet la formation des gamétocytes, forme de transmission au moustique. Le déclenchement de la gamétogenèse se fait chez une faible proportion (1%) des parasites présents dans la circulation sanguine. Ce faible taux pourrait s'expliquer par une volonté d'échapper au système immunitaire avec les stades asexuels servant de leurre ou afin d'éviter qu'un trop grand nombre de gamétocytes, puis d'ookinètes plus particulièrement, ne se retrouvent chez le moustique et ne soient délétères pour celui-ci (Talman *et al.* 2004). Des changements environnementaux provoquant un stress cellulaire sont à l'origine de cette différenciation en gamétocytes, ce qui entraînerait une variation dans l'expression génétique (Baker 2010). En culture, il a été montré que l'ajout de composés pharmaceutiques, une lyse érythrocytaire ou une parasitémie élevée..., entraînent une production accrue de gamétocytes.

Tous les mérozoïtes provenant d'un même schizonte se dirigent soit vers le cycle érythrocytaire soit vers la gamétogenèse. Dans le cas de la voie sexuelle, ils vont même induire des gamétocytes du même sexe (Silvestrini *et al.* 2000). Ces observations montrent que l'induction en gamétocytes est établie dès le stade trophozoïte/schizonte, avant la division cellulaire. Le ratio entre les gamétocytes mâles et femelles est en faveur de ces dernières même s'il est difficile à estimer puisque les données varient en fonction de la souche, des conditions de culture et de la technique utilisée (Baker 2010 ; Silvestrini *et al.* 2000). Ce rapport sera rééquilibré au niveau des gamètes puisqu'un gamétocyte mâle engendra 8 gamètes mâles chez le moustique contre 1 gamète unique pour la femelle.

Pour *P. vivax*, *P. malariae* ou *P. ovale*, les formes gamétocytaires sont très similaires à un trophozoïte, avec un espace occupé et des pigments plus importants. Dans les cas de *P. falciparum* et *P. reichenowi*, les gamétocytes ont un aspect caractéristique en forme de faux, à l'origine du nom *falciparum* (Dixon, 2012). Cette ressemblance est peu surprenante puisque l'on sait que *P. falciparum* est plus proche du parasite du chimpanzé que de ses homologues infectant l'Homme (Figure 3, page 7). La durée de maturation des gamétocytes est également plus importante, avec une période de 9 à 12 jours. Le développement

des gamétocytes de *P. falciparum* se divise en 5 stades, morphologiquement identifiables (Figure 15G à J) sauf dans le cas du stade I qui est difficilement distinguable d'un trophozoïte mais pour lequel il existe des marqueurs précoces de la gamétogenèse pouvant permettre une identification incontestable (Baker 2010 ; Tibúrcio *et al.* 2015a). Le stade II a une forme en demi-lune (J2-3), alors que le stade III (J3-5) est allongé avec des bords arrondis. Le stade IV (J5-7) présente la même forme allongée mais avec des extrémités pointues (Alano 2007 ; Tibúrcio *et al.* 2012). La classification des différents stades de la gamétogenèse peut varier selon les auteurs (Dixon *et al.* 2012 ; Tibúrcio *et al.* 2012). A partir du stade IV, le sexe peut être apparent, avec un noyau petit et des pigments concentrés pour les femelles et l'inverse pour les mâles (Baker 2010). Les femelles possèdent des corps osmophiles en plus grandes quantités, organites sécréteurs pouvant jouer un rôle dans la sortie des gamètes et la transmission des parasites au moustique (Suárez-Cortés *et al.* 2016).

L'élongation des gamétocytes serait due au complexe membranaire subpelliculaire se situant en dessous de la membrane plasmique et semblable au complexe membranaire interne des mérozoïtes (Dixon *et al.* 2012). Ce complexe permettrait l'ancrage aux microtubules subpelliculaires qui allongeraient le gamétocyte (Baker 2010 ; Dixon *et al.* 2012). Au cours de son élongation, la membrane du globule rouge va également exercer une pression qui va entraîner une déformation du gamétocyte. Au stade V, les microtubules présents aux extrémités sont désassemblés permettant un arrondissement de ces deux zones (Baker 2010 ; Dixon *et al.* 2012).

Au cours de la gamétogenèse, l'expression protéique se révèle différente des stades asexuels. La détection de 200 à 300 transcripts sur-régulés dans les premiers jours montre qu'un changement important s'opère au niveau transcriptomique et protéomique (Alano 2007 ; Florens *et al.* 2002 ; Silvestrini *et al.* 2010). Certains de ces transcrits seront utilisés plus tard comme pour P25 et P28 qui ne sont traduits que chez les gamètes et le zygote (Alano 2007). De même, les protéomes des gamétocytes de sexes différents chez *P. berghei*, montrent des différences puisque sur les 305 protéines exclusivement gamétocytaires détectées chez le mâle et les 170 pour la femelle, seulement 69 protéines sont partagées entre les deux sexes (Khan *et al.* 2005). Bien que peu de protéines de *P. berghei* aient été identifiées comme étant partagées entre les deux sexes, pour *P. falciparum*, le nombre est de 349 ce qui est plus que les protéines gamétocytaires spécifiques du sexe (91 et 171 pour les mâles et femelles respectivement) (Miao *et al.* 2017). L'analyse des données montrent chez le mâle, un enrichissement en protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, qui serviront lors des divisions successives pour former les 8 gamètes. En revanche, pour la femelle, les protéines sont surtout liées à l'apicoplaste et la mitochondrie, dont les deux organites chez le zygote sont d'origines maternelles (Baker 2010), et à des protéines ribosomales (Miao *et al.* 2017).

Au contraire des stades parasitaires du cycle érythrocytaire, ce sont les gamétocytes immatures qui ne sont pas visibles dans la circulation sanguine (Dixon *et al.* 2012). Les gamétocytes présentent une cytoadhérence avec la rate et la moelle osseuse, où le flux sanguin est réduit (Dixon *et al.* 2012 ; Joice *et al.* 2014 ; Tibúrcio *et al.* 2012). Les mécanismes d'interaction semblent être différents puisque les knobs ne sont pas détectables, ainsi que PfEMP1 et d'une manière générale les gènes *var* sont sous-exprimés. L'implication des récepteurs CD36 et ICAM-1 a été étudiée avec des résultats parfois contradictoires (Tibúrcio

et al. 2015b).

Les gamétocytes de stade V sont détachés de leur lieu d'ancrage mais le mécanisme n'est pas encore connu. Il a été supposé soit que les ligands permettant l'adhésion sont dégradés/modifiés soit que le changement de forme du stade mature favorise un détachement et une libération dans la circulation sanguine (Dixon *et al.* 2012). En effet, les gamétocytes séquestrés montrent une rigidité plus importante au niveau de la membrane plasmique du globule rouge. Cette hausse serait due à l'implication des protéines de la famille STEVOR qui se fixent au niveau de la membrane (Tibúrcio *et al.* 2012). Les STEVORs sont déjà décrites comme étant impliquées également dans la séquestration des stades asexuels (Sanyal *et al.* 2012). Un regain de déformabilité chez les gamétocytes matures, par dissociation des protéines STEVORs et dépolymérisation des microtubules, pourrait expliquer la libération des parasites dans le sang (Tibúrcio *et al.* 2012). Une fois libres, les gamétocytes de stade V deviennent infectieux pour les moustiques après 2-3 jours et le restent moins d'une semaine (Tibúrcio *et al.* 2015b).

VII De l'Homme à l'anophèle

Lors du repas sanguin, les gamétocytes matures sont ingérés par l'anophèle et se retrouvent dans son intestin. Les gamètes sont alors formés par différents stimuli environnementaux comme une hausse du pH, la présence de l'acide xanthurénique ou une baisse de la température interne entre l'Homme et le moustique (Bennink *et al.* 2016 ; Billker *et al.* 2004). Ces facteurs permettraient de déclencher une cascade de signalisation entraînant une libération de calcium cytosolique depuis les citernes calciques du parasite. Les ions Ca^{2+} seraient activateurs de protéines kinases calcium-dépendantes (CDPK) comme CDPK1 qui déréprime les ARNm stockés chez la femelle (Sebastian *et al.* 2012). Pour les mâles, CDPK1 participe à l'exflagellation des microgamètes et CDPK4 à la réplication de l'ADN (Bennink *et al.* 2016 ; Billker *et al.* 2004). Deux minutes après la prise du repas sanguin, les gamétocytes s'arrondissent, puis en moins de 10 minutes, la vacuole parasitophore et la membrane plasmique du globule sont rompues permettant la libération des parasites.

Le microgamétocyte mâle réplique rapidement (moins de 15min) trois fois son génome, passant d'un génome haploïde à octaploïde et produisant ensuite par mitose 8 microgamètes mâles exflagellés constitués d'un axonème. Le gamétocyte femelle ne se divise pas et forme un macrogamète (Bennink *et al.* 2016). Trente minutes après l'entrée des gamétocytes, un gamète mâle fertilise le macrogamète femelle et fusionne ainsi que les noyaux. Le processus de fertilisation reste encore largement inconnu.

Quelques heures après, le zygote subit une méiose et devient tétraploïde et le restera jusqu'à la formation des sporozoïtes haploïdes. Il a été démontré qu'au stade zygote/ookinète de *P. berghei*, seuls les gènes maternels sont transcrits et les ARNm traduits sont hérités du macrogamète femelle. Les gènes paternels sont réprimés dans un premier temps puis transcrits *de novo* dans le cas des gènes codant des protéines impliquées dans l'invasion et la formation de l'oocyste (Ukegbu *et al.* 2015). Au cours du développement du zygote en ookinète, le pôle apical et le complexe membranaire interne sont reconstitués (Bennink *et al.* 2016).

L'ookinète est considéré comme mature 20 à 30h après le repas sanguin. Il est alors mobile et migre depuis la lumière de l'intestin jusqu'à l'endothélium. Il doit se débarrasser

de la matrice péritrophique qui tapisse l'intestin. Cette couche protectrice produite par le moustique est lysée par la sécrétion de chitinase (Bennink *et al.* 2016). L'ookinète pénètre l'épithélium de l'intestin par le côté apical et traverse les cellules jusqu'à atteindre la lame basale (Aly *et al.* 2009). Les micronèmes semblent être indispensables pour que le parasite effectue ce trajet selon un mode de traversée rappelant celui des sporozoïtes dans les hépatocytes. L'ookinète se fixe à la lame basale, probablement par interaction avec la laminine et devient immobile, formant ainsi l'oocyste (Aly *et al.* 2009 ; Matuschewski 2006). Pendant 10 à 12 jours, l'oocyste se divise une dizaine de fois et forme un syncytium (Gerald *et al.* 2011). Des invaginations internes formant des lobes, les sporoblastes, vont être le lieu de formation des sporozoïtes (Aly *et al.* 2009 ; Matuschewski 2006). L'oocyste se procure tous les nutriments dont il a besoin via l'hémolymphe du moustique. Après la multiplication en milliers de sporozoïtes, ceux-ci vont être libérés et vont entamer leur processus de migration vers les glandes salivaires et permettre de redémarrer un nouveau cycle.

Au cours des stades ookinètes, oocystes et sporozoïtes, il a été mis en évidence que le microbiote de l'intestion du moustique était important pour le développement. En effet, une richesse accrue en bactéries Gram négatif du genre *Enterobacter* est létale pour la croissance parasitaire chez les anophèles par génération d'un stress oxydatif (Cirimotich *et al.* 2011).

VIII Régulation du cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

Au cours du cycle de vie de *P. falciparum*, différents stades s'enchaînent : sporozoïtes, mérozoïtes, anneaux, trophozoïtes, schizontes, gamétocytes de tous stades, gamètes, zygotes, ookinètes et oocystes. Cette succession nécessite une régulation qui doit être fine, précise et variable selon l'environnement. Différents mécanismes de régulation sont connus chez les eucaryotes et décrits également de manière plus ou moins importante chez *Plasmodium* spp.. L'expression d'une protéine peut être contrôlée en amont, pendant et aussi en aval de sa traduction.

1 Régulation transcriptionnelle

Le premier niveau de régulation possible dans la modulation de l'expression protéique est un contrôle de la transcription du gène en question. Chez *P. falciparum*, différentes études émergent afin de démontrer l'importance que peuvent jouer la structure de l'ADN et les modifications épigénétiques.

Lorsque l'on regarde de plus près le génome de *Plasmodium falciparum*, on remarque la faible proportion de facteurs de transcription (FTs). Il a été estimé en 2004, que le ratio nombre total de gènes sur le nombre total de FTs est de l'ordre de 800 chez le parasite alors qu'il n'est que de 29 chez *S. cerevisiae* (Templeton *et al.* 2004). Différentes raisons pouvaient expliquer ces données, une difficulté à estimer le nombre de FTs au vu de la particularité du génome ou une régulation qui est compensée par d'autres mécanismes. Cependant, depuis cette étude, de nouveaux FTs ont été mis en évidence, ceux de la famille Apetala2, qui a été caractérisée chez les plantes (Balaji *et al.* 2005 ; Kaneko *et al.* 2015). Vingt-sept protéines ApiAP2 sont identifiées chez *P. falciparum* et possèdent 1 à 4 domaines d'interaction avec l'ADN, ce qui porte le nombre à une trentaine de FTs au total.

Vingt-deux ApiAP2 semblent être exprimés de façon stade-dépendante au cours du cycle érythrocytaire, indiquant que ces facteurs de transcription joueraient un rôle spécifique dans l'expression protéique à chaque stade (Balaji *et al.* 2005). PbAP2-O est un facteur de transcription de la même famille que précédemment et son rôle dans l'expression de plus de 500 gènes, soit 10% du génome, a été démontré au stade ookinète de *P. berghei* (Kaneko *et al.* 2015). De la même manière, PfAP2-G est décrit comme étant le facteur de régulation maître dans le contrôle de la transcription des gènes impliqués dans le déclenchement de la gamétogenèse (Kafsack *et al.* 2014 ; Sinha *et al.* 2014). Ces implications dans la transcription à un stade précis, sur une forte proportion du génome, confortent l'hypothèse que le faible nombre de facteurs de transcription est compensé par le fait que ceux-ci sont des régulateurs maîtres et que leur expression successive au cours du cycle assurent une régulation de l'expression des protéines.

L'épigénétique peut également réguler la transcription. Ce phénomène étudié chez plusieurs organismes a permis d'établir qu'en général l'acétylation des histones est liée à une activation de la transcription et que la méthylation est plutôt répressive même si la position et l'équilibre entre les modifications peuvent entraîner des résultats contraires. Différentes études prouvent que ces mécanismes sont également présents chez *Plasmodium* et semblent jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle avec soit un effet activateur (H3K4me3, H3K9ac...) ou soit un effet répresseur (H3K36me2) (Karmodiya *et al.* 2015).

La famille VAR, d'une soixantaine de gènes, code les protéines PfEMP1. La régulation de ces gènes de virulence est l'une des plus étudiée chez *P. falciparum*. Des modifications épigénétiques sont décrites sur les différents gènes *var* et *P. falciparum* Heterochromatin Protein 1 (PfHP1) peut s'associer à la modification répressive H3K9me3 pour maintenir ces gènes sous silence (Flueck *et al.* 2009). Au moment opportun, l'activation de la transcription peut être enclenchée par la fixation de longs ARNs antisens non codants et par un changement épigénétique (H3K9ac, H3K4me2 et H3K4me3) (Amit-Avraham *et al.* 2015). Un modèle de la régulation transcriptionnelle des gènes *var* a été établi et est représenté en Figure 16.

D'autres mécanismes et exemples ont été étudiés et ont fait l'objet d'une revue (Batugedara *et al.* 2017).

2 Régulation post-transcriptionnelle

En 2003, l'analyse du transcriptome de *P. falciparum* a laissé entrevoir que 75% des gènes étaient transcrits au cours du cycle érythrocytaire. Ces ARNm étaient traduits dans la foulée pour assurer la fonction des protéines (Bozdech *et al.* 2003). Cependant, une équipe a étudié la corrélation entre le transcriptome et le protéome de chaque stade et a remarqué qu'en général les transcrits d'un stade donné correspondent plus particulièrement aux protéines du stade suivant sauf dans le cas des trophozoïtes, schizontes et sporozoïtes (Le Roch *et al.* 2004). Par exemple, le transcriptome des mérozoïtes et des gamétocytes ont une meilleure corrélation avec les protéomes des anneaux et des gamètes respectivement. Ce décalage indique qu'il existe bien des mécanismes de régulation post-transcriptonnelle pour une partie des transcrits (Le Roch *et al.* 2004).

Parmi les processus de régulation traductionnelle, il a été démontré que la protéine PfDHFR-TS pouvait réprimer sa propre traduction en se fixant sur son ARNm (Hughes

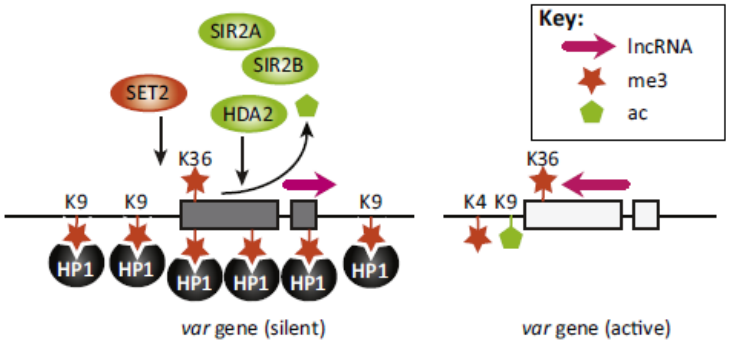

Figure 16 – Régulation épigénétique des gènes *var* chez *P. falciparum*. La déacétylation par les sirtuines SIR2A et SIR2B ou par l'histonedéacetylase HDA2, l'ajout de 3 groupements méthyles par SET2 sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) ainsi que la liaison de PfHP1 entraînent une condensation de l'ADN en hétérochromatine et une mise sous silence des gènes *var*. Un changement des modifications épigénétiques (H3K9ac, H3K4me2 et H3K4me3) et une intervention des longs ARNs antisens non codants vont favoriser une reprise de la transcription (d'après (Batugedara *et al.* 2017)).

et al. 2010 ; Vembar *et al.* 2016). La présence de uORF (upstream Open Reading Frame) a été prouvée chez le parasite et est connue chez l'Homme et la souris. Ce sont des codons starts situés dans l'UTR 5' qui permettent de leurrer le système de traduction du vrai cadre ouvert de lecture (Hughes *et al.* 2010).

La stabilité des ARNm fait également partie des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. Une étude a été réalisée sur la demi-vie des ARNm au cours du cycle érythrocytaire (Shock *et al.* 2007). Au fur et à mesure de la maturation du parasite, la moyenne de la demi-vie des ARNm s'accroît, passant de 9.5min au stade anneau à 65.4min pour un schizonte âgé. Cette hausse ne serait pas due à la transcription d'un groupe de gènes particuliers puisqu'elle est globalement observable chez tous les ARNm quelle que soit la fonction de la protéine codée par la suite. Une partie des protéines, connues comme étant impliquées dans la dégradation des ARNm chez la levure et l'Homme par décoiffage, déadénylation ou formation de l'exosome, ont été identifiées par homologie chez *P. falciparum* (Shock *et al.* 2007).

Des régulations par des ARNs non codants et interactions en *cis* et *trans* sur les UTR des ARNm sont également décrites ainsi que d'autres mécanismes compilés dans deux revues (Hughes *et al.* 2010 ; Vembar *et al.* 2016).

3 Régulation post-traductionnelle

Une fois la protéine traduite, un nouveau palier de régulation peut intervenir. Il s'agit des modifications post-traductionnelles qui mettent en place différents changements sur un ou plusieurs acides aminés et qui semblent être impliquées à tous les stades parasitaires (Figure 17). Chez *P. falciparum*, de nombreuses réactions ont été signalées et sont caractérisées de manière plus ou moins approfondies. Les modifications de type glycolysation, sumoylation sont incertaines ou faiblement étudiées chez le parasite (Doerig *et al.* 2015).

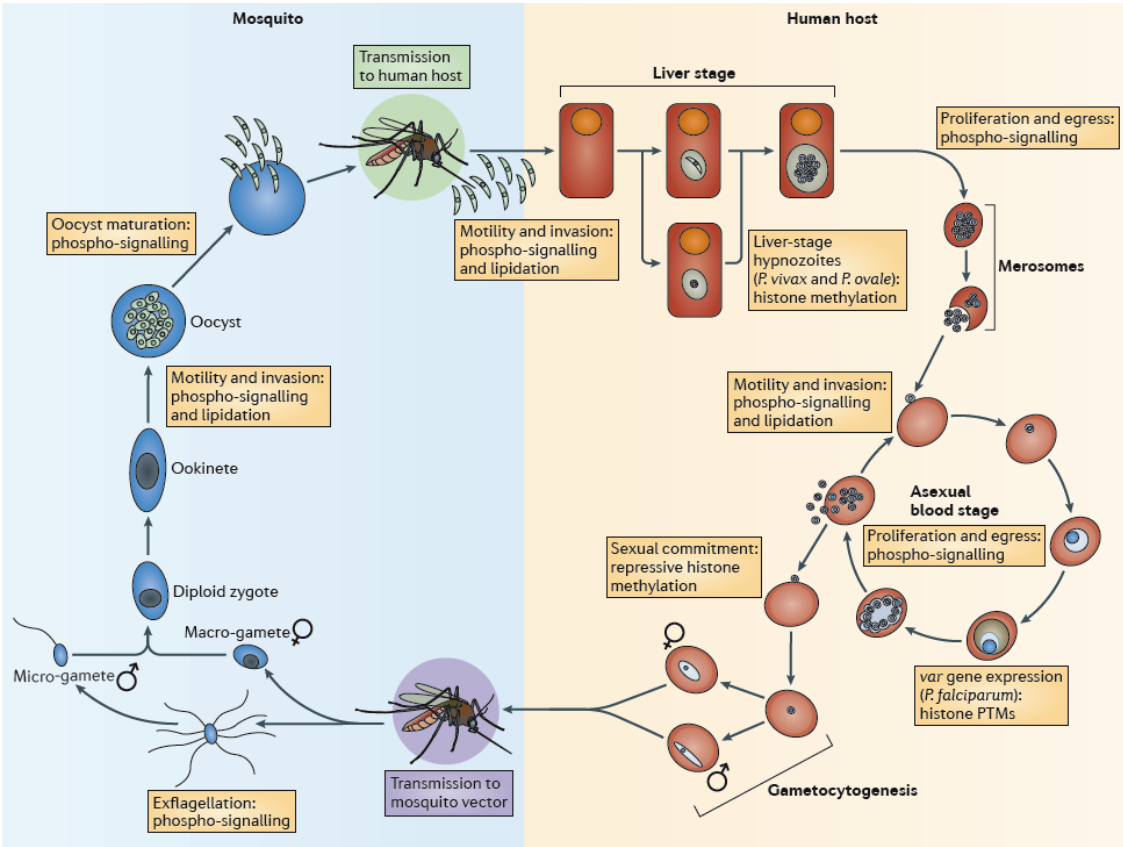

Figure 17 – Régulation post-traductionnelle au cours du cycle de vie de *P. falciparum*. Les modifications post-traductionnelles de type acétylation et méthylation, lipidation ou phosphorylation et déphosphorylation sont décrites comme étant impliquées et essentielles à chaque stade et transition parasitaires. Certaines de ces réactions sont indiquées sur le schéma représentant le cycle de vie de *P. falciparum* (d'après (Doerig *et al.* 2015)).

L'acétylation et la méthylation des protéines parasitaires font partie des phénomènes post-traductionnels les mieux décrits. L'addition réversible de ces groupements acétyle et méthyle respectivement, est notamment connue et référencée dans le cas des histones (Figure 16) dont la conséquence est, entre autres, la régulation du niveau de transcription. Les enzymes assurant les réactions ont été identifiées chez *P. falciparum*. Le parasite possède 10 histones acétyltransférases, 5 histones déacétylases, 13 histones méthyltransférases et 3 histones déméthylases (Doerig *et al.* 2015).

L'ajout lipidique est une modification post-traductionnelle qui résulte souvent en une association avec une membrane cellulaire. Différents types de modifications existent, prénylation, myristoylation, palmitoylation, glypiation (ancre GPI) (Doerig *et al.* 2015). Certaines de ces réactions sont cependant considérées comme étant co-traductionnelles puisqu'elles ont lieu avant l'adressage membranaire et la fin de la synthèse protéique. La prénylation et la myristoylation sont considérées comme étant irréversibles, ce qui n'est pas le cas des deux autres réactions. La palmitoylation semblerait être la modification lipidique la plus abondante chez *P. falciparum* avec près de 8% du protéome total concerné rien qu'au stade schizonte, pourcentage similaire à d'autres eucaryotes (Jones *et al.* 2012). Pour les

autres réactions, le nombre de protéines impliquées serait de l'ordre de plusieurs dizaines (Doerig *et al.* 2015 ; Gisselberg *et al.* 2017).

Les phénomènes de phosphorylation et déphosphorylation impliquent les kinases et les phosphatases respectivement. Ces modifications réversibles sont considérées comme faisant partie des plus abondantes chez les eucaryotes et aussi chez *Plasmodium*. Trois phosphoprotéomes ont permis de détecter 8463 sites de phosphorylation sur 1673 protéines (Treeck *et al.* 2011), 1177 sur 650 (Solyakov *et al.* 2011) et 2541 sur 919 (Lasonder *et al.* 2012), même s'il existe un taux de recouvrement entre ces résultats. Les phosphorylations se situent sur les sérines (84.4%), thréonines (13.2%) et les tyrosines (2.4%) avec des pourcentages assez similaires à ceux relevés chez l'Homme ou la souris (Lasonder *et al.* 2012). L'analyse des phosphoprotéines montre que le phénomène de phosphorylation touche l'ensemble des fonctions biologiques, du métabolisme au cycle cellulaire en passant par la pathogénicité. Ces trois phosphoprotéomes ont été réalisés à chaque fois sur le stade schizonte de *P. falciparum*. On peut alors facilement présager que le nombre de protéines phosphorylées tout au long du cycle parasitaire est supérieur aux données actuelles.

La diversité des modifications post-traductionnelles et leur importance pour la survie et la multiplication des parasites font des enzymes impliquées dans ces réactions, des cibles thérapeutiques envisageables.

C Phosphorylation et déphosphorylation : cas de la Protéine Phosphatase de type 1 et de ses régulateurs

I Le kinome et le phosphatome de *P. falciparum*

1 Le kinome

PLUSIEURS analyses bio-informatiques ont permis d'établir le kinome putatif de *P. falciparum*. Le nombre a été estimé à 85 (Ward *et al.* 2004), 93 (Talevich *et al.* 2011) ou 99 gènes codant une kinase (Anamika *et al.* 2005) soit moins de 2% du génome, pourcentage similaire à l'Homme ou à la levure (Talevich *et al.* 2011). Parmi ces enzymes, on trouve entre 65 et 71 protéines kinases eucaryotes (ePKs), qui peuvent être classées dans des familles décrites et conservées, CK1, CMGC, CamK, AGC, Aurora, Nima, eIF2α (TABLEAU 3). D'autres kinases ne présentent pas une homologie suffisante pour être classées dans les familles connues et sont considérées comme orphelines. Cependant, certaines familles ne sont pas identifiables chez le parasite comme les tyrosines kinases (TyrK), ce qui reste à éclaircir puisque des tyrosines ont été identifiées comme étant phosphorylées chez le parasite (Lasonder *et al.* 2012 ; Solyakov *et al.* 2011 ; Treeck *et al.* 2011). Un phénomène de boucle d'autophosphorylation pourrait être plausible mais des tyrosines phosphorylées ont également été repérées sur des protéines sans activité kinase (Solyakov *et al.* 2011). Cette carence est aussi observable chez les levures et certains eucaryotes unicellulaires. Les MAPKKs, famille des STE, ne sont également pas identifiées chez *P. falciparum* mais aussi de façon générale chez les *Apicomplexa* (Talevich *et al.* 2011), suggérant une divergence de la voie ou un phénomène de compensation (Anamika *et al.* 2005 ; Ward *et al.* 2004).

Par knock-out, il a été démontré que sur 62 des 65 ePKs identifiées chez *P. falciparum* par l'équipe du Dr Doerig (Ward *et al.* 2004), 36 semblent être essentielles durant le cycle érythrocytaire, 12 totalement dispensables et 14 autres probablement (Solyakov *et al.* 2011). Sur les 66 ePks putatives de *P. berghei*, 23 semblent ne pas être essentielles au cours des stades asexuels sanguins (Tewari *et al.* 2010). Seize autres mutants de kinases ne montrent pas de phénotype particulier des stades érythrocytaires à l'ookinète alors que 12 enzymes sont indispensables pour la formation et la migration des sporozoïtes aux glandes salivaires.

Tableau 3 – Kinome putatif de *P. falciparum*. Les différentes protéines kinases potentielles du parasite ont été identifiées et classées selon plusieurs analyses bio-informatiques [a] : (Ward *et al.* 2004), [b] : (Anamika *et al.* 2005), [c] : (Talevich *et al.* 2011), [d] : (Solyakov *et al.* 2011)), [e] : (Nunes *et al.* 2007).

Groupes et familles			Nombre	Fonctions principales décrites chez les eucaryotes ou *Plasmodium*
ePKs (65 à 71)	CK1[a,c,d]		1	Prolifération cellulaire et différenciation Signalisation
	TKL[a,c,d]		3 à 5	
	CMGC	CDK	9	Prolifération cellulaire et différenciation[a] ou épissage des ARNm[a]
		MAPK	2[a,b]	
		GSK3	3[a]	
		CLK	4[d]	
	CamK		12 à 13[a,c,d]	Signalisation calcium-dépendante[a]
	AGC		5[a,b,d]	Signalisation[b]
	Aurora		3[a,c]	Division cellulaire
	Nima		4[a,b,c,d]	Division cellulaire[b]
	eIF2α		3[d]	Régulation traduction[b]
	Orpheline		14 à 19[c,d]	
aPK	RIO		2[a]	Métabolisme des ARNm[a]
	ABC1		2[a]	Réponse au stress oxydatif
FIKK			20[a,e] à 21[c]	Remodelage de la cellule hôte et trafic des protéines exportées[c,e]

Une famille de kinases, assez éloignée des ePKs, a été mise en évidence, les FIKKs, nommées selon le motif distinctif (Phe-Ile-Lys-Lys) et semblent être spécifiques des *Apicomplexa* (Tableau 3). Le nombre élevé de ces kinases chez *P. falciparum* (20 ou 21) paraît atypique puisqu'une seule FIKK est identifiée chez d'autres *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum* (Nunes *et al.* 2007 ; Talevich *et al.* 2011 ; Ward *et al.* 2004).

P. reichenowi possèderait 6 FIKKs confirmant ainsi sa ressemblance avec *P. falciparum* et indiquant que les FIKKs se sont fortement développées au niveau de cette branche de l'évolution (Talevich *et al.* 2011). Ces kinases sont pour la plupart, décrites ou supposées comme étant exportées dans le globule rouge (Nunes *et al.* 2007). La fonction biologique des FIKKs reste encore largement à éclaircir, même si au vu de la localisation, un rôle dans le remodelage de la membrane cellulaire du globule rouge ou dans le trafic des protéines est envisageable.

2 Le phosphatome

La phosphorylation des protéines par les kinases est un phénomène réversible de modification post-traductionnelle. L'activité antagoniste des phosphatases permet d'assurer le retour à un état non phosphorylé. Chez la plupart des eucaryotes, la balance entre kinases et phosphatases est déséquilibrée à l'avantage de ces premières dont la spécificité envers les substrats semble être plus importante. Les analyses du phosphatome de *P. falciparum* ont permis d'identifier entre 34 et 67 phosphatases (Pandey *et al.* 2014 ; Wilkes et Doerig 2008). L'écart important est dû au fait que dans la première étude, seules les phosphoprotéines phosphatases ont été prédites. La balance est alors en prenant les estimations les plus basses, de 1 phosphatase pour 2,5 kinases chez *P. falciparum* contre 1 pour 3,5 chez la souris (561 kinases et 162 phosphatases) (Forrest *et al.* 2003). Ces données montrent qu'en plus d'avoir un nombre plus restreint d'enzymes, le rapport entre les deux est légèrement réduit.

Tableau 4 – Phosphatome putatif de *P. falciparum*. Les différentes protéines phosphatases potentielles du parasite ont été identifiées et classées selon plusieurs analyses bio-informatiques [a] : (Wilkes et Doerig 2008), [b] : (Pandey *et al.* 2014).

Groupes	Nombre	Particularités
Phosphoprotéines phosphatases	16[a] 18[b]	Dépendantes des ions métalliques (Mn^{2+}, Ca^{2+} ...)
Protéines phosphatases 2C	10[a] 11[b]	Dépendantes des ions métalliques (Mn^{2+}, Mg^{2+})
Protéines Tyrosine phosphatases	4[a] 4[b]	Phosphatases tyrosine spécifiques Phosphatases à double spécificité Phosphatases à faible poids moléculaire
Haloacides Déhalogénases	4[a] 10[b]	Réaction catalytique basée sur 1 aspartate
Diverses	24[b]	

Les phosphatases de *P. falciparum* peuvent être classées en 4 familles principales, les phosphoprotéines phosphatases et les protéines phosphatases 2C, les protéines tyrosine phosphatases et les haloacides déhalogénases (Tableau 4). Les deux premières familles

peuvent être classées dans les métallophosphatases. Les autres enzymes sont regroupées dans le groupe divers, qui contient des membres des familles Histidines phosphatases, PAP2_like et Exonuclease-endonucleases phosphatases entre autres. Sur les 67 phosphatases putatives, 44 sont exprimées à la fois aux stades asexuels et gamétocytaires, alors que 3 semblent être exclusives aux schizontes et 4 aux gamétocytes.

Parmi les phosphatases du parasite, 33 n'ont pas d'orthologue chez l'Homme dont 6 sont spécifiques des *Plasmodium* (Pandey *et al.* 2014). De plus, chez *P. berghei*, 16 phosphatases sur les 30 semblent être indispensables à la survie du parasite au cours du cycle érythrocytaire et 6 autres pour les stades chez le moustique (FIGURE 18) (Guttery *et al.* 2014). Parmi celles essentielles au cours du cycle asexuel, on trouve plusieurs des phosphoprotéines phosphatases, dont la PP1c et la PP2A. L'utilisation d'un système de knock-out inductible permettrait de vérifier si l'essentialité de ces phosphatases, entre autres, est uniquement restreinte au cycle asexuel ou si elles sont indispensables à d'autres stades parasitaires.

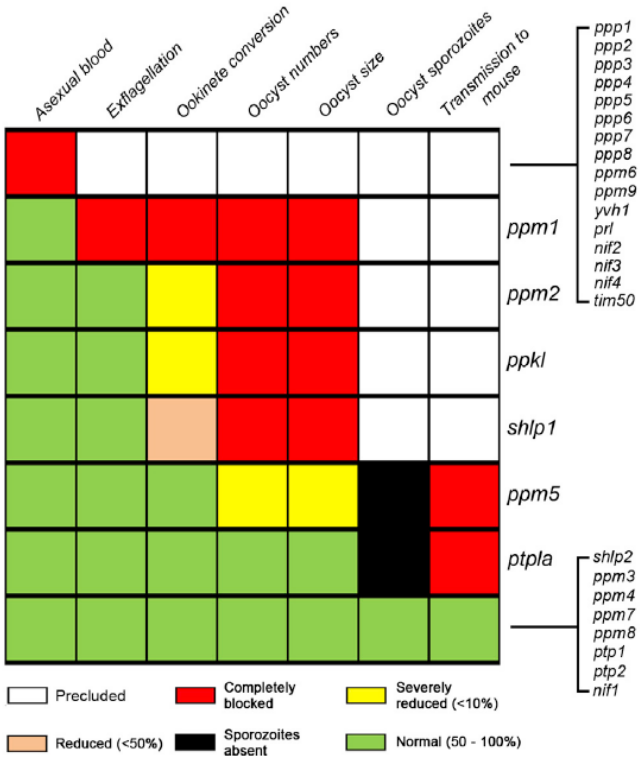

FIGURE 18 – Analyse phénotypique des mutants phosphatases de *P. berghei*. Les 30 phosphatases de *P. berghei* ont été délétées individuellement et les mutants obtenus ont été testés, si possible, à différentes étapes du cycle de vie parasitaire (d'après (Guttery *et al.* 2014)).

Actuellement, environ 40% des kinases putatives de *P. falciparum* ont été caractérisées pour seulement 20% des phosphatases. Bien que l'étude de ces dernières a longtemps été délaissée au profit de celle des kinases, il est maintenant clairement établi que la divergence et l'essentialité des phosphatases peuvent être utiles pour en tirer avantage comme cibles thérapeutiques potentielles. Au laboratoire, nous nous intéressons principalement à

la Protéine Phosphatase de Type 1 chez *Plasmodium*. La PP1 est l'objet d'étude de cette thèse et son mécanisme d'action, ses régulateurs et ses fonctions biologiques sont détaillés ci-dessous.

II La Protéine Phosphatase de Type I : sous-unité catalytique ou PP1c

Deux métallophosphatases, sérine/thréonine phosphatases, contrôlent majoritairement le processus de déphosphorylation chez *P. falciparum*. Il s'agit des Protéines Phosphatases de type I (PP1) et de type 2A (PP2A). Par l'utilisation d'inhibiteurs, l'acide okadaïque et la calyculine A, et de substrats spécifiques, $^{[32p]}$phosphorylase phosphatase et $^{[32p]}$caséine phosphatase, il a été démontré que l'activité de PP1 était prédominante chez le parasite (Yokoyama *et al.* 1998). Au sein du globule rouge sain, l'activité de PP1 semble être faible, voire absente. L'application de ces inhibiteurs entraîne une diminution de la croissance parasitaire en culture *in vitro* (Yokoyama *et al.* 1998). Ce résultat indique que ces phosphatases et notamment la PP1, sont indispensables à la survie du parasite.

1 La PP1c chez les eucaryotes

Afin de maintenir un certain état de phosphorylation au sein d'une cellule, un équilibre doit s'établir entre les kinases et les phosphatases. Longtemps décrites comme ayant une faible spécificité de substrats par rapport aux kinases, les phosphatases compensent leur faible nombre par l'action de sous-unités régulatrices qui vont conférer un contrôle de leur activité.

La Protéine Phosphatase de type I est une holoenzyme constituée d'une sous-unité catalytique, PP1c, et d'une sous-unité régulatrice variable. La PP1c assure l'activité enzymatique et présente, seule, une très forte activité enzymatique puisqu'elle permet d'accélérer l'hydrolyse d'une liaison phospho-monoester très stable (demi-vie 10^{12} ans) par un facteur de 10^{21} (Lad *et al.* 2003). C'est pourquoi une régulation est nécessaire par sa deuxième sous-unité, afin de contrôler et de limiter son activité phosphatase et ainsi d'éviter toute toxicité à la cellule. La PP1c peut également être phosphorylée par CDC2, comme sur sa thréonine 320, ce qui modère son activité (J. Q. Wu *et al.* 2009). Une diminution de l'activité kinase de CDC2, à la fin de la mitose, facilite l'autodéphosphorylation du résidu de la PP1c.

PP1c est également l'une des protéines les plus conservées chez les eucaryotes. Cette conservation serait due au fait que la PP1c est une plateforme interagissant avec une multitude de protéines (Heroes *et al.* 2013). La moindre mutation peut donc avoir des conséquences importantes sur son interactome et ainsi sur sa fonction.

1.1 La PP1c chez les mammifères

La PP1c est codée chez les mammifères par 3 gènes *pp1ca* (PP1α), *ppp1cb* (PP1β/δ) et *ppp1cc* (PP1γ). Ils peuvent former jusqu'à 7 isoformes mais 4 d'entre elles sont considérées comme majoritaires : PP1α, PP1β/δ et PP1γ_1 et γ_2 (Korrodi-Gregório *et al.* 2014). Les trois premières ont une expression ubiquitaire alors que PP1cγ_2 est surexprimée dans les testicules et le sperme (Korrodi-Gregório *et al.* 2014 ; Peti *et al.* 2013). Ces différentes PP1c possèdent une très forte identité au niveau du domaine catalytique d'environ 280

acides aminés. Elles possèdent toutes le motif signature des sérine/thréonine phosphatases, la séquence LRGNHE (Barton *et al.* 1994), qui est conservé chez l'ensemble des PP1c (FIGURE 19). Les variations sont principalement observables dans les régions non catalytiques N- et C-terminales.

1.2 La PP1c chez *Saccharomyces cerevisiae*

La PP1c de *S. cerevisiae* a été mise en évidence la première fois après une analyse de mutants dans la voie métabolique du glycogène (Cannon *et al.* 1994). Le mutant GLC7 qui présente une déficience dans l'accumulation du glycogène, porte une mutation au niveau du gène codant pour la PP1c. La glycogène-synthase reste alors dans un état phosphorylé et inactif. La modification de *glc7* en allèle thermosensible a montré que l'absence de l'enzyme entraîne un blocage de la cellule en phase mitotique (MacKelvie *et al.* 1995).

Une expérience de complémentation de la GLC7 par l'une des isoformes humaines a été effectuée (Gibbons *et al.* 2007) puisque elle possède environ 86% d'identité avec les HsPP1c (Bhattacharyya *et al.* 2002). Les levures présentent le meilleur taux de croissance avec la HsPP1α mais la HsPP1β assure une meilleure accumulation en glycogène. Ce résultat serait dû à une interaction plus importante entre HsPP1β et Gac1p, un régulateur de GLC7 impliqué dans le métabolisme du glycogène chez la levure. Cependant, la sporulation des levures n'est pas assurée pour les mutants complémentés par l'une des PP1c humaines (Gibbons *et al.* 2007). L'ensemble des observations confirme bien le haut degré de conservation de la PP1c au cours de l'évolution des eucaryotes avec de légères adaptations pour chaque organisme.

1.3 La PP1c chez *Plasmodium*

La PP1c de *P. falciparum* (PfPP1c) a été identifiée en 2002 sur le chromosome 14 (Bhattacharyya *et al.* 2002) et correspond à la plus petite PP1c connue (Kumar *et al.* 2002). Son gène, PF3D7_1414400, est d'une longueur de 1560 paires de bases et contient 4 introns (PlasmoDB 2017). Il code une protéine de 304 acides aminés et 35 kDa. La phosphatase possède une homologie de 87% et 83% d'identité avec l'Homme et *S. cerevisiae* respectivement et conserve le motif signature des sérine/thréonine phosphatases, LRGNHE (FIGURE 19) (Bhattacharyya *et al.* 2002). Les plus grandes différences se situent comme dans le cas des autres organismes, en N- et C-terminal. PfPP1c est exprimée à tous les stades présents chez l'Homme (Kumar *et al.* 2002). La PfPP1c a été produite sous forme recombinante au sein du laboratoire et son activité phosphatase a été démontrée envers des substrats non spécifiques (Daher *et al.* 2006).

PfPP1c et GLC7 ne sont pas que des homologues puisque la PP1c du parasite est capable de complémenter le mutant GLC7 et de restaurer un seuil classique de glycogène (Bhattacharyya *et al.* 2002). Une interférence de l'ARNm de PfPP1c a montré une perte de croissance parasitaire, probablement due à un défaut lors de la réplication de l'ADN (Kumar *et al.* 2002). Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution puisqu'il a été démontré par la suite que le mécanisme d'interférence de l'ARN n'est pas fonctionnel chez *P. falciparum* (Baum *et al.* 2009). Un substrat de PfPP1 a été identifié dans les fissures de Maurer. Il s'agit de *P. falciparum* Skeleton-Binding Protein 1 (PfSBP1) dont la déphosphorylation serait nécessaire pour la libération des mérozoïtes (Blisnick *et al.* 2006).

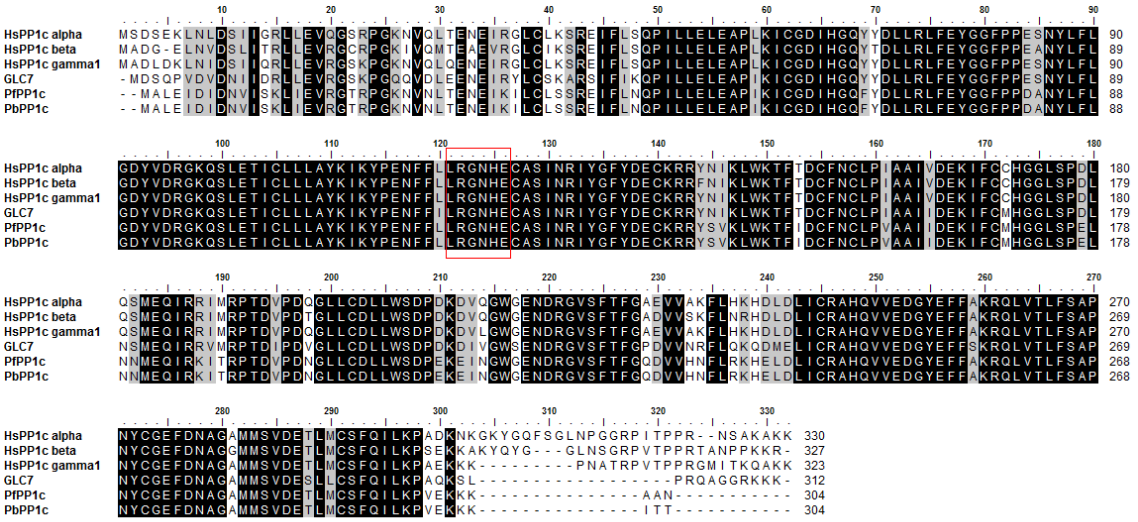

Figure 19 – Alignement de différentes PP1c. Comparaison entre les séquences protéiques des PP1c humaines (HsPP1c alpha, beta, gamma1), de la PP1c de *S. cerevisiae* (GLC7) et des PP1c de *P. falciparum* (PfPP1c) et *P. berghei* (PbPP1c). Le motif signature des sérine/thréonine phosphatases est encadré en rouge. L'alignement a été réalisé par BioEdit et ClustalW.

Son orthologue chez *P. berghei*, PbPP1c, ne possède que deux introns au niveau génomique mais conserve une identité à 99% avec uniquement une variation au niveau des trois derniers acides aminés (Figure 19). La transcription de *pbpp1c* chez le parasite du rongeur semble être importante durant les stades érythrocytaires et de la gamétogenèse, ce qui pourrait suggérer une forte activité au cours de ces stades (M. Zhang *et al.* 2016). L'absence de réussite dans la réalisation d'un knock-out de ce gène au stade schizonte (Figure 18) (Guttery *et al.* 2014 ; M. Zhang *et al.* 2016) ou au stade anneau de *P. falciparum* (données personnelles), laisse également penser que la protéine est essentielle au niveau de ces stades. L'utilisation d'un système de knock-out conditionnel, FlpL/FRT, a permis de montrer que PbPP1c n'est pas essentielle de la formation des sporozoïtes à la libération des mérozoïtes hépatiques (M. Zhang *et al.* 2016). Ces mérozoïtes ne sont en revanche pas infectieux et ne permettent pas la poursuite du cycle parasitaire. Ces résultats sont à la fois attendus et surprenants. En effet, les niveaux en ARNm de PbPP1c sont au maximum lorsque le parasite est dans un globule rouge (cycle érythrocytaire et gamétogenèse) puis faibles chez le moustique et dans le foie, ce qui correspond parfaitement aux stades où la PP1c est essentielle ou non. Cependant, il s'agirait de la première description que la PP1c est dispensable à un moment donné de la vie cellulaire.

2 La PP1c et sa structure

Comme toutes protéines, la structure tridimensionnelle de la PP1c est primordiale afin d'être dans la capacité d'assurer sa fonction. Par cristallographie, il a été observé que le domaine catalytique est en forme ellipsoïdale excluant uniquement les extrémités N- et C-terminales (Goldberg *et al.* 1995). La disposition en 10 hélices α et 15 feuillets β assure une position du site actif au cœur de la protéine. C'est à cet emplacement, au niveau des

feuillets et hélices β_2-α_B-β_3-α_C-β_4, que se fixent les deux ions métalliques indispensables pour la catalyse enzymatique (FIGURE 20A). Des ions Fe^{2+} ou Zn^{2+} seraient requis même si pour la production en bactéries sous forme recombinante, le Mn^{2+} est utilisé (Heroes *et al.* 2015). Ces ions permettent d'activer une molécule H_2O favorisant ainsi une attaque nucléophile du phosphore et une liaison avec l'oxygène chargé négativement du groupe phosphate. Ces métaux contribuent à la spécificité d'action de la PP1c envers les différents substrats et des chaperonnes seraient nécessaires pour charger le site catalytique en ions (Heroes *et al.* 2015). Le site actif se trouve à l'intersection de trois sillons formant ainsi un Y. Ceux-ci sont hydrophobes, acides ou en C-terminal (FIGURE 20B).

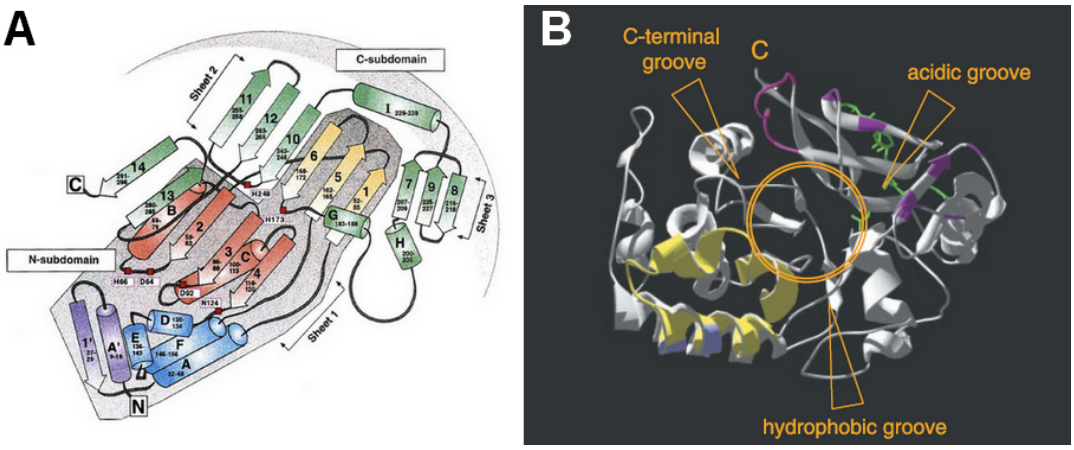

FIGURE 20 – Modélisation de la structure de la PP1c. A. Schématisation de la structure secondaire de la PP1c. Les hélices α et les feuillets β sont représentés par des cylindres et des flèches respectivement. La région N-terminale est en violet, bleu, jaune et rouge (ombre grise) alors que la région C-terminale est en vert. Les hélices α et les feuillets β impliqués dans la fixation des deux ions métalliques sont en rouge ainsi que les acides aminés concernés et leur position (carrés rouges) (d'après (Goldberg *et al.* 1995)). **B.** Structure 3D basée sur le cristal de la PP1c. Les positions des sillons hydrophobes, acides et C-terminal sont indiquées ainsi que l'emplacement, au croisement, du site actif (cercles orange) (d'après (Ceulemans et Bollen 2004)).

Cette structure permet ainsi à la PP1c d'assurer à la fois sa fonction enzymatique en présentant un site actif accessible et aussi en offrant l'opportunité d'interagir avec ses diverses sous-unités régulatrices.

Les premiers inhibiteurs identifiés de la PP1c sont des toxines naturelles telles que l'acide okadaïque, la microcystine-LR, la calyculine A ou la tautomycine entre autres (Lajarín-Cuesta *et al.* 2016). Bien qu'ils ne soient pas spécifiques de la PP1c, ils le sont des métallophosphatases et les IC_{50} sont de l'ordre du nM. L'acide okadaïque et la microcystine-LR se lient à la PP1c via le sillon hydrophobe, le site actif et les feuillets β_{12} et β_{13}, bloquant ainsi l'accessibilité au site actif (Ceulemans et Bollen 2004 ; Goldberg *et al.* 1995).

III La Protéine Phosphatase de Type I : plateforme d'interaction

1 Les divers motifs d'interaction

Dans le but d'assurer les différentes fonctions de la PP1c, divers régulateurs se fixent à la sous-unité catalytique afin de contrôler son activité phosphatase, sa spécificité de substrat ou sa localisation. La formation de cette holoenzyme implique une large variété de motifs d'interaction. Ceux-ci font en moyenne 4 à 8 acides aminés, ce qui permettrait à la PP1c d'avoir jusqu'à 30 sites d'interaction non chevauchables, même si la plupart des partenaires ont des motifs en commun (Bollen *et al.* 2010).

Les régulateurs interagissent avec la PP1c par le biais d'un ou plusieurs motifs d'interaction. Ceux-ci sont identifiés principalement comme étant les motifs RVxF, SILK, $\phi\phi$, Fxx[RK]x[RK] ou MyPhoNE (Ayllón *et al.* 2002 ; Heroes *et al.* 2013). Le premier est décrit comme étant le domaine majeur de liaison avec la phosphatase et est détaillé ci-dessous (III.2). Le motif SILK, lui, se situe majoritairement en amont du RVxF (Bollen *et al.* 2010).

Ces motifs sont soumis à différentes règles. Aucun d'entre eux ne peut se lier à une autre phosphatase que la PP1c, même avec PP2A ou PP2B dont les structures sont assez similaires à la PP1c (Heroes *et al.* 2013 ; Verbinnen *et al.* 2017). Les motifs sont également hautement conservés chez les eucaryotes et leur dégénérescence favorise la malléabilité des interactions.

Le complexe formé entre la PP1c et la sous-unité régulatrice n'est pas forcément qu'un hétérodimère. En effet, il est connu que la phosphatase peut former des trimères transitoires, difficiles à isoler (Heroes *et al.* 2013). Ces partenaires peuvent se fixer sur des sites différents de la PP1c mais également en impliquant le même motif commun. Une compétition a alors lieu mais la présence de motifs additionnels évite une non-fixation des deux régulateurs. Malgré la fixation possible de plusieurs interactants en simultané, la PP1c est considérée comme une plateforme qui interagit avec de nombreux partenaires mais principalement à différents temps ou localisations (Bollen *et al.* 2010). La compétition s'opère aussi entre les sous-unités régulatrices pour former une holoenzyme avec la PP1c. La concentration cellulaire et l'affinité vont permettre à la cellule de réguler la formation des complexes selon ses besoins (Heroes *et al.* 2013). Il est important de noter que la concentration protéique des partenaires est largement supérieure à celle de la sous-unité catalytique afin d'éviter la présence de PP1c seule et son risque d'engendrer une toxicité par déphosphorylation incontrôlée.

La conformation de la PP1c semble être invariante (Peti *et al.* 2013). La fixation d'un régulateur via un motif ne modifie pas la conformation de la PP1c mais va faciliter la liaison à travers des motifs secondaires qui vont permettre de moduler l'activité phosphatase (Bollen *et al.* 2010).

2 Le motif principal d'interaction : RVxF

Le motif principal qui est retrouvé chez près de 70% à 90% des partenaires est le motif RVxF (Bollen *et al.* 2010 ; Peti *et al.* 2013). Il est décrit comme étant primordial dans la plupart des interactions puisque sa mutation empêche généralement la formation du complexe. Il ne modifie pas la structure de la PP1c mais augmente la concentration locale des partenaires et favorise la liaison d'autres sites secondaires impliqués dans la modulation

de l'activité phosphatase et la spécificité de substrat.

Le motif d'interaction RVxF se fixe dans le sillon hydrophobe de la PP1c à environ 20Å du site catalytique (Bollen *et al.* 2010 ; Egloff *et al.* 1997). Plusieurs acides aminés du sillon ont été démontrés comme étant impliqués et importants pour l'interaction. C'est le cas des L242, F256 et F292 de la GLC7 (X. Wu et Tatchell 2001) et I169, L243, F257, L289, C291, F293 de la PP1cγ du rat (Hurley *et al.* 2007 ; Meiselbach *et al.* 2006).

Ce motif dégénéré a comme séquence consensus basique, [RK]-X_{0-1}-[VI]-P-[FW] avec X correspondant à n'importe quel acide aminé et P, tous les résidus sauf la proline (Wakula *et al.* 2003). Ce résidu est exclu puisqu'il est connu pour défavoriser la formation du feuillet β que forme le motif RVxF au cours de son interaction. Par la suite cette séquence consensus a été affinée (Meiselbach *et al.* 2006). La première position doit être occupée par des résidus basiques comme la lysine (K) ou l'arginine (R) et dans une moindre mesure l'histidine (H). Ces acides aminés interagissent avec la surface chargée négativement de la PP1c par formation de liaisons hydrogènes ou ponts salins. En position 2, davantage de résidus sont possibles (AMV) mais les acides aminés basiques (HKR) ou polaires et non chargés sur les chaînes latérales (CNQST) présentent la meilleure affinité. La position 3 est très importante puisqu'elle se fixe au plus profond du sillon hydrophobe de la PP1c. La valine est l'acide aminé présentant la meilleure affinité avec ce site mais elle peut être remplacée dans une moindre mesure par l'isoleucine. Les petits résidus polaires et basiques (CHKNQRST) sont possibles en position 4 alors que le cinquième résidu nécessite une chaîne latérale aromatique hydrophobe (FW). La séquence consensus est alors $[HKR]_1[ACHKMNQRSTV]_2[V]_3[CHKNQRST]_4[FW]_5$ (Meiselbach *et al.* 2006).

Le modèle du motif RVxF de Meiselbach *et al* est beaucoup moins sensible que le motif consensus basique de Wakula *et al*, mais compense par une forte spécificité puisque 90% des protéines possédant cette séquence sont de réels partenaires de la PP1c (Meiselbach *et al.* 2006). La forte dégénérescence proposée par Wakula *et al* permet certainement de ne pas passer à travers la recherche d'un partenaire mais ce court motif peut être présent de façon totalement aléatoire.

La variation des résidus constituant le motif RVxF permet de moduler l'affinité d'interaction avec la PP1c. Les acides aminés basiques en amont ont également une influence sur la force de liaison (Meiselbach *et al.* 2006).

3 Des régulateurs désorganisés

Plus de 70% des partenaires de la PP1c sont des protéines désorganisées (Choy *et al.* 2012). L'absence de structure tridimensionnelle précise permet d'exposer les différents motifs d'interaction et de se lier plus rapidement et efficacement à la phosphatase, voire de s'enrouler autour de celle-ci. En effet, une protéine repliée devrait être 4 fois plus grande pour pouvoir engager autant de sites d'interaction qu'une protéine non repliée. Des structures secondaires, hélices α ou feuillets β, peuvent néanmoins être présents sur ces régulateurs désorganisés (Choy *et al.* 2012). Plus de 2/3 des motifs RVxF identifiés, le sont sur des portions de plus de 100 résidus désorganisés (Bollen *et al.* 2010). En plus de favoriser la formation d'un complexe avec la PP1c, l'absence de conformation 3D avantage la fixation d'autres protéines sur le régulateur.

IV La Protéine Phosphatase de Type I : régulateurs et rôles biologiques

1 Une diversité de régulateurs et de mécanismes

Depuis la découverte de la PP1c et de son système de contrôle, plus de 200 sous-unités régulatrices ont été mises en évidence chez les vertébrés et plus particulièrement l'Homme. Plusieurs listes non exhaustives ont répertorié ces régulateurs (Heroes *et al.* 2013 ; Korrodi-Gregório *et al.* 2014). Cette grande variété permettrait de contrebalancer le nombre de kinases et d'assurer une spécificité lors de la déphosphorylation des substrats.

Les sous-unités régulatrices peuvent être classées en deux groupes, les régulateurs primaires et secondaires. A l'inverse des sous-unités régulatrices primaires, les régulateurs secondaires ne sont, à l'origine, pas des régulateurs et ont seulement acquis cette capacité au cours de leur évolution (Ceulemans *et al.* 2002a). Le fait que la plupart d'entre eux sont des protéines désorganisées, favorise l'apparition de mutations pouvant permettre l'acquisition des courts motifs d'interaction, conservées ou non selon l'apport évolutif (Heroes *et al.* 2013).

Même si environ 30% des sous-unités régulatrices connues n'ont pas de localisation particulière ou d'expression spécifique, la plupart d'entre elles modulent l'activité phosphatase dans le temps et l'espace ou favorisent la déphosphorylation d'un substrat spécifique (Korrodi-Gregório *et al.* 2014). Elles peuvent interagir avec une seule ou plusieurs isoformes de la PP1c, dans un tissu spécifique (Spinophiline dans les neurones) ou être présentes de manière ubiquitaire (Inhibiteur 2), localiser la PP1c dans un compartiment subcellulaire ou une structure particulière (GADD34 dans le réticulum endoplasmique, Repo-Man au niveau des chromosomes). Ce changement de localisation permet d'augmenter la concentration locale de PP1c à un moment donné, favorisant ainsi la déphosphorylation des substrats résidents (Verbinnen *et al.* 2017). Elles peuvent également promouvoir le recrutement de substrats spécifiques en élargissant ou en proposant des sites de liaison secondaires à ces substrats ayant une affinité insuffisante pour la PP1c seule. Les inhibiteurs de la PP1c peuvent bloquer son activité par recouvrement du site catalytique (Inhibiteur 2, NIPP1), du sillon C-terminal (Spinophiline, PNUTS) ou des sillons hydrophobes et acides (Inhibiteur 2). Certains agissent comme des pseudosubstrats (Inhibiteur 1, MYPT1) et doivent alors être phosphorylés pour inhiber l'enzyme (Heroes *et al.* 2013 ; Verbinnen *et al.* 2017).

2 Les régulateurs dans la biogenèse de la PP1c

Décrits comme faisant partie des plus anciens régulateurs de la PP1c et conservés chez l'ensemble des eucaryotes (Ceulemans *et al.* 2002a), l'inhibiteur 2, l'inhibiteur 3 et SDS22 joueraient un rôle prépondérant dans le cycle de vie de la phosphatase (Verbinnen *et al.* 2017).

L'inhibiteur 2 (I2 ou PPP1R2) ou GLC8 chez la levure, serait directement impliqué dans le chargement des ions Fe^{2+} et Zn^{2+} dans le site catalytique de la PP1c, la rendant ainsi active après sa traduction (Figure 21) (Verbinnen *et al.* 2017). Il a été démontré que l'inhibiteur 3 (PPP1R11 ou Ypi1 chez la levure) interagit directement avec SDS22 (PPP1R7) et forme un hétérotrimère avec la PP1c chez l'Homme (Lesage *et al.* 2007) et la levure (Pedelini *et al.* 2007). L'agrégation et la dégradation de l'enzyme seraient ainsi défavorisées. Ce complexe est possible puisque I3 possède un motif RVxF permettant la

liaison avec la PP1c alors que SDS22 interagit à travers ses 11 séquences répétées riches en leucines (LRR) qui se fixent sur un site différent de la phosphatase (X. Wu et Tatchell 2001). Ces deux régulateurs sont connus comme étant enrichis dans le noyau et permettraient ainsi de diriger la PP1c vers celui-ci tout en la maintenant inhibée par effet combinatoire (Lesage *et al.* 2007 ; Pedelini *et al.* 2007 ; Verbinnen *et al.* 2017). Malgré des rôles assez similaires, la surexpression de l'un ne permet pas de compenser la délétion de l'autre chez la levure et entraîne une diminution de la PP1c nucléaire (Pedelini *et al.* 2007).

L'AAA-ATPase Cdc48 et son partenaire Shp1 (Suppressor of High copy protein Phosphatase 1) évitent une accumulation de PP1c non assemblée par interaction transitoire, contribuant à l'assemblage du complexe précédant (Cheng et Chen 2015). Le complexe I3-PP1c-SDS22 permettrait à la fois de conserver la phosphatase sous forme soluble et inhibée/inactivée afin soit de l'exporter vers le noyau, soit de constituer une structure de départ pour la formation d'autres holoenzymes (Figure 21) (Verbinnen *et al.* 2017). L'inhibiteur 2 interviendrait à la fin du cycle pour recycler les ions métalliques et inactiver la PP1c juste avant sa dégradation (Heroes *et al.* 2015 ; Verbinnen *et al.* 2017).

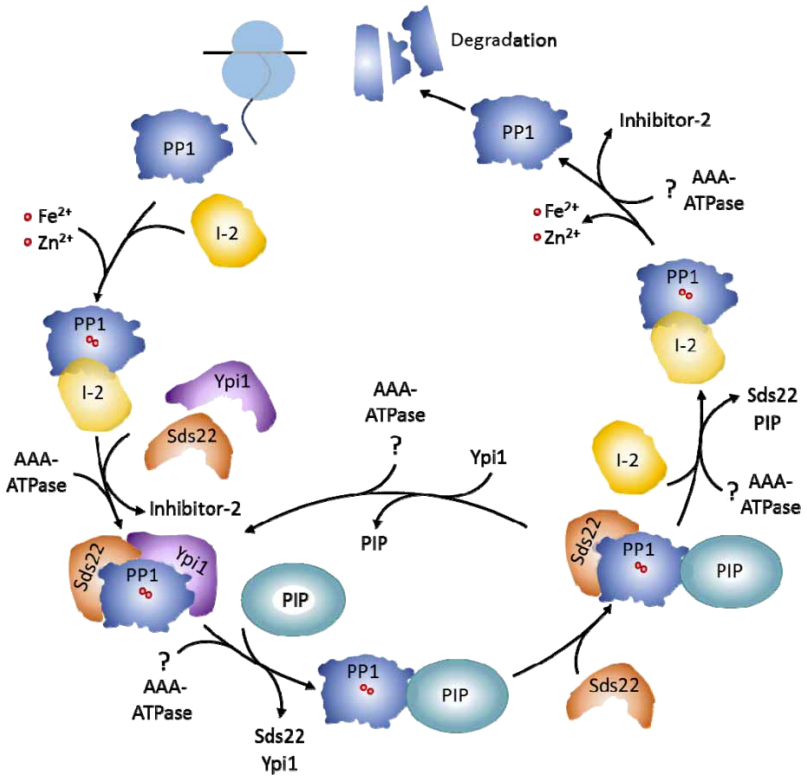

Figure 21 – Cycle de vie proposé pour la PP1c. Après la traduction de la phosphatase, les ions métalliques Fe^{2+} et Zn^{2+} sont incorporés dans le site catalytique. Ce processus nécessiterait l'intervention de chaperonnes, qui pourraient être l'inhibiteur 2 (I2). L'intervention d'une autre chaperonne AAA-type ATPase tout au long du cycle de vie de la phosphatase permettrait d'éviter son agrégation par formation de différents complexes dont celui avec Ypi1 et Sds22. L'inhibiteur 2 interviendrait également à nouveau en amont de la dégradation de PP1c, afin de recycler les ions métalliques. PIP : PP1 interacting protein (d'après (Verbinnen *et al.* 2017)).

Plus de 200 régulateurs de la PP1c sont actuellement connus mais nous allons nous intéresser aux mécanismes d'actions et fonctions biologiques des régulateurs majeurs les plus étudiés.

3 L'inhibiteur 2

3.1 Caractéristiques de l'inhibiteur 2

Tout d'abord, le mécanisme de liaison, entre l'inhibiteur 2 et la PP1c, a été étudié. Trois régions majeures d'interaction ont été identifiées sur I2, correspondant aux domaines KGILK (motif SILK), KKSQKW (motif RVxF) et FEMKRKLHYNE chez I2 des vertébrés (Hurley *et al.* 2007). Le motif RVxF est particulier puisqu'il implique une glutamine à la place de la valine ou de l'isoleucine habituelle. I2 est particulièrement désordonnée mais ses régions d'interaction se réorganisent au cours de la fixation avec la PP1c. Il est intéressant de noter que jusqu'à 10 pseudogènes de I2 sont conservés chez les mammifères (Korrodi-Gregório *et al.* 2013a). Certains d'entre eux, comme PPP1R2P3, semblent même être exprimés dans le sperme (Korrodi-Gregório *et al.* 2013b), mais leur importance n'est pas encore élucidée.

L'inhibition de la PP1c par I2 intervient à trois niveaux (Cannon 2013). Tout d'abord, en occupant une grande partie de la PP1c, du sillon acide et hydrophobe à son site catalytique, l'enzyme est inhibée puisque les différents substrats ne peuvent interagir (Hurley *et al.* 2007). Puis la PP1c peut être inactivée par extraction d'un ion métallique (Bollen *et al.* 2010 ; Cannon 2013). Enfin la tyrosine 149 (Y^{149}) de I2 se situe exactement dans le site catalytique de la PP1c et, par encombrement stérique, empêche au second ion métallique de venir s'y fixer. La phosphatase reste ainsi dans un état inactivé. La phosphorylation de I2 sur la thréonine 72 (T^{72}) ou 74, chez l'Homme et la souris respectivement, permet de restaurer l'activité phosphatase par la fixation du second ion (Cannon 2013). Cette activation par phosphorylation n'entraînerait pas un changement de conformation important de I2 mais plutôt une légère variation de l'interaction entre les deux protéines (Lin *et al.* 2003). La phosphorylation de la T^{72} peut être effectuée par différentes kinases comme GSK3, CDK1 ou ERK (Li *et al.* 2006 ; Puntoni et Villa-Moruzzi 1995 ; Q. M. Wang *et al.* 1995). *In vitro*, GSK3 semble être le meilleur candidat mais *in vivo*, l'implication d'une CDK apparaît plus probable (Leach *et al.* 2003 ; Li *et al.* 2006). GSK3 se lie, *in vitro*, au complexe PP1c-I2 et pas avec I2 seul, ce qui confirmerait que cette phosphorylation de I2 a directement un rôle dans la régulation de l'activité phosphatase (Sakashita *et al.* 2003). D'autres sites de phosphorylation ont également été détectés et notamment la sérine 86 qui, après sa phosphorylation par CK2, favorise celle de la T^{72} par GSK3 (Park et DePaoli-Roach 1994). L'isoforme PPP1R2P3 ne présente que 9 acides aminés de différence avec I2 (PPP1R2) dont la T^{72} et la S^{86}, ce qui suggère que son mécanisme de régulation est assez différent (Korrodi-Gregório *et al.* 2013b).

3.2 L'inhibiteur 2 dans la mitose

En dehors de son rôle dans la charge et la décharge des ions métalliques, l'inhibiteur 2 est impliqué dans la ségrégation des chromosomes et dans la mitose. Durant l'embryogenèse de la drosophile, l'inhibiteur 2 (DmI2) est présent dans le cytoplasme mais se concentre

autour des chromosomes condensés lors de la mitose (W. Wang *et al.* 2008a). De plus, une réduction drastique de la concentration protéique de DmI2 entraîne une mortalité embryonnaire importante. Cette létalité est probablement causée par une désynchronisation des mitoses et une anaphase incomplète due à une ségrégation anormale des chromosomes (W. Wang *et al.* 2008a). L'essentialité de I2 pourrait être liée à son implication dans le complexe PP1c-Nek2 (Eto *et al.* 2002). La kinase Nek2 est un partenaire de la phosphatase et interagit via son motif RVxF (KVHF). Les deux enzymes en se complexant, pourraient s'autoréguler par phosphorylation de l'une et déphosphorylation de l'autre. I2 interviendrait, au moment opportun, afin de déséquilibrer le complexe en faveur de Nek2 et de séparer les chromosomes (Eto *et al.* 2002). Un autre équilibre pourrait aussi être perturbé par l'action de l'inhibiteur 2. Il s'agit de la balance entre les kinases Aurora et PP1c. Aurora A est impliquée et permet une ségrégation correcte des chromosomes au cours de la mitose. Son activité est dépendante de la phosphorylation de sa T^{288} qui est une cible de la PP1. L'inhibiteur 2 semble stimuler l'activité de la kinase non pas indirectement par inhibition de la PP1c mais directement par implication de sa région C-terminale sans modification de l'état de phosphorylation (Satinover *et al.* 2004). Chez *Xenopus*, I2 et Aurora A sont également impliquées dans la transition G2/M (Satinover *et al.* 2006). I2 permettrait l'activation des CDK par augmentation de la concentration en cycline B, étape nécessaire pour l'entrée en mitose, par son rôle d'inhibiteur de la PP1c et aussi par activation de Aurora A. Aurora B est également impliquée dans le bon déroulement de la mitose en phosphorylant plusieurs substrats afin de détacher les microtubules des kinétochores lorsque l'interaction est anormale. I2 par inhibition de la PP1c favorise le maintien de la phosphorylation sur les différents substrats de Aurora B permettant le bon déroulement de la mitose (W. Wang *et al.* 2008b). D'autres régulateurs de la PP1c sont impliqués dans ce contrôle de la déphosphorylation des substrats de Aurora B chez la levure, par exemple en changeant la localisation de la phosphatase (Pinsky *et al.* 2006).

I2 semble être particulièrement phosphorylée sur sa T^{72} au niveau des centrosomes durant la mitose chez l'Homme (Leach *et al.* 2003 ; Li *et al.* 2006) ou la drosophile (W. Wang *et al.* 2008a), suggérant que cette phosphorylation joue un rôle clé dans l'équilibre de la régulation mitotique.

3.3 L'inhibiteur 2 et ses autres fonctions

L'inhibiteur 2 agit également sur la fonction cardiaque chez les mammifères. Sa surexpression chez la souris entraîne une forte diminution de l'activité phosphatase malgré une hausse de l'expression de la PP1c pour essayer de contrebalancer (Kirchhefer *et al.* 2005). La déphosphorylation de la protéine phospholambane sur la S^{16} n'est alors plus réalisée, entraînant une recrudescence de l'entrée de calcium induisant une contraction plus intense du cœur. Ce résultat est validé par le fait que chez une souris surexprimant la PP1c, une hypertrophie et fibrose cardiaque est observée, entraînant une activité du cœur plus faible et une mortalité plus importante (Brüchert *et al.* 2008). En revanche, une souris surexprimant à la fois PP1c et I2 ne montrent aucun de ces effets. I2 est donc capable de restaurer une fonction cardiaque normale par inhibition de la PP1c. Un rôle similaire peut être attribué à l'inhibiteur 1 qui inhibe la PP1c et permet la non-déphosphorylation de la S^{16} et T^{17} sur la phospholambane (Pathak *et al.* 2005).

La PP1 est aussi caractérisée comme étant opposée à la formation de la mémoire, à l'inverse de son substrat, la protéine CREB (cAMP/calcium Response Element-Binding), lorsque cette dernière est phosphorylée sur sa sérine 133. Théoriquement, on pourrait imaginer que l'inhibiteur 2 favorise alors la mémoire par inhibition de la PP1c. Cependant, une étude a démontré que le complexe I2-PP1c est un suppresseur de mémoire au niveau de l'hippocampe des rats et que I2 agit positivement sur l'activité phosphatase (H. Yang *et al.* 2015). Ce complexe est également essentiel dans l'homéostasie synaptique des neurones du cortex et de l'hippocampe. Au cours d'une activité synaptique élevée, l'entrée de calcium va induire la kinase Ca^{2+}/CaM-dépendante MLCK qui va dissocier le complexe I2-PP1c en phosphorylant I2 sur la S^{43}. La phosphatase non-réprimée, va alors pouvoir déphosphoryler un ensemble de substrats permettant un retour à la normale (Siddoway *et al.* 2013). Il est intéressant de noter que la S^{43} fait partie du motif RVxF de I2 et que la dissociation avec la PP1c pourrait être le résultat d'une perte d'affinité du motif RVxF phosphorylé.

L'inhibiteur 2 aurait aussi une importance pour la motilité du sperme (Korrodi-Gregório *et al.* 2013b) mais ce processus ne sera pas décrit dans cette thèse.

4 L'inhibiteur 3 et SDS22

L'inhibiteur 3 (PPP1R11 ou Ypi1 chez la levure) a été identifié plus tardivement comme un régulateur de la PP1c (J. Zhang *et al.* 1998). Il interagit avec la phosphatase via son motif RVxF (KKVEW) (L. Zhang *et al.* 2008). Une seconde région, entre les acides aminés 65 et 77, semble être requise pour sa fonction inhibitrice. I3 possède un NLS (Nuclear Localization Signal) et colocalise avec PP1α au niveau des centrosomes et avec PP1γ_1 dans le nucléole (Huang *et al.* 2005). *In vitro*, I3 se lie aux deux isoformes et non avec la PP1β suggérant une spécificité d'interaction et de localisation.

Décrite précédemment comme étant impliquée dans la biogenèse de la PP1c, SDS22 est caractérisée comme l'une de ses sous-unités régulatrices. Le complexe n'implique pas un motif RVxF mais 11 séquences répétées de 22 acides aminés environ et riches en leucines. En C-terminal, une séquence de 16 à 17 acides aminés, nommée coiffe LRR, servirait à protéger la structure en super-hélice. Ces séquences interagissent avec les hélices α_4, α_5 et α_6 de la phosphatase (Ceulemans *et al.* 2002b). SDS22 est largement décrite comme étant nucléaire malgré l'absence de NLS identifiable (Peggie *et al.* 2002).

L'hétérotrimère I3-SDS22-PP1c serait responsable de la localisation nucléaire de la phosphatase (page 50). La létalité obtenue pour la levure par la délétion de I3 ou de SDS22 serait due à un blocage en anaphase et une anormalité dans la taille des fuseaux mitotiques (MacKelvie *et al.* 1995 ; Pedelini *et al.* 2007). Le complexe SDS22-PP1c est localisable au niveau des kinétochores où il aurait une fonction dans la ségrégation des chromosomes ainsi que dans le relâchement du cortex cellulaire au milieu de l'anaphase (Rodrigues *et al.* 2015). Cette relaxation par déphosphorylation des substrats ezrine, radixine et moésine, trois protéines membranaires se liant au cytosquelette, favoriserait ainsi l'élongation cellulaire puis la cytokinèse.

L'antagonisme entre Aurora B et la PP1 est également régulé par la protéine SDS22. La kinase Aurora B est active lorsque sa T^{232} est autophosphorylée et peut être un substrat de

l'activité phosphatase de PP1c. Un mutant SDS22 chez une levure thermosensible, permet de compenser en partie la perte d'activité d'un mutant d'Aurora B (Peggie *et al.* 2002). Cette observation indiquerait que la diminution en SDS22 provoquerait des niveaux moins élevés en PP1c nucléaire, ce qui compenserait la baisse d'activité du mutant d'Aurora B (Peggie *et al.* 2002 ; Pinsky *et al.* 2006). Au sein du noyau, il a été démontré que la déplétion de SDS22 entraîne une hausse de Aurora B phosphorylée (Posch *et al.* 2010) suggérant que SDS22 participe à la déphosphorylation d'Aurora B par PP1c. SDS22 et Repo-Man, connu et décrit comme pouvant interagir avec la PP1c via son motif RVxF, favorisent également la déphosphorylation des substrats de Aurora B (Wurzenberger *et al.* 2012). Cependant, il a été démontré que SDS22 agit aussi comme un inhibiteur de la PP1c favorisant ainsi le maintien de Aurora B dans un état phosphorylé.

I3, lui, entraverait la formation d'un complexe kinétochorien formé par les protéines SDS22, PP1c et KNL1 (Kinetochore-Null Protein 1). Cette dernière ancre la PP1c, via son motif RVxF, aux kinétochores. Une fois ancrée, l'activité de la phosphatase et la déphosphorylation de Aurora B, peuvent être inhibées par la fixation de SDS22 (Figure 22). I3 limiterait l'interaction de SDS22 avec le complexe PP1c-KNL1 et favoriserait ainsi la déphosphroylation d'Aurora B par la PP1c active (Eiteneuer *et al.* 2014).

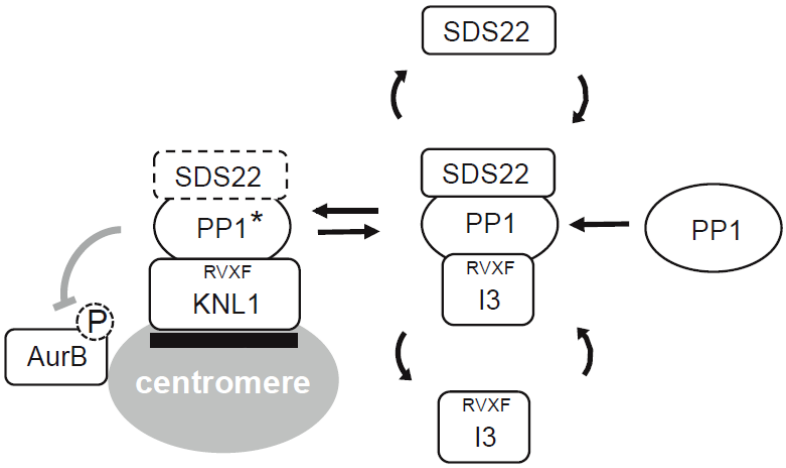

Figure 22 – Modèle de la régulation de la fixation de la PP1c sur les kinétochores. L'ancrage de la PP1c aux kinétochores est dépendante de la protéine KNL1 et favorise la perte d'activité de la kinase Aurora B par déphosphorylation. I3 maintient indirectement la PP1c active, en limitant la fixation de l'inhibiteur SDS22 sur le complexe PP1c-KNL1. PP1* désigne la PP1 active (d'après (Eiteneuer *et al.* 2014)).

Les différences observables selon les études peuvent être expliquées par les techniques ou cellules/organismes utilisés mais aussi par le fait que la régulation se fait finement dans le temps et l'espace. Des phénomènes de modifications post-traductionnelles pourraient également faire varier l'équilibre au moment opportun, comme cela peut être le cas avec la phosphorylation de SDS22 par Polo-Like Kinase 1 (PLK1), qui assurerait une augmentation de l'activité kinase de Aurora B par inhibition de la PP1c (Duan *et al.* 2016). On peut imaginer qu'à certain moment SDS22 n'est pas phosphorylée et joue un rôle dans la déphosphorylation de Aurora B. Même si le rôle exact de SDS22 n'est pas encore totale-

ment éclairci, son essentialité pour la ségrégation des chromosomes et la mitose n'est plus à démontrer.

Une autre fonction a été mise en évidence pour SDS22 : par régulation de l'activité phosphatase de PP1c, elle défavorise la déphosphorylation de RAD53, nécessaire à la désactivation du point de contrôle des dommages à l'ADN (Yao *et al.* 2016).

5 Les autres régulateurs du cycle cellulaire

L'inhibiteur 2, l'inhibiteur 3 et SDS22 ne sont pas les seules sous-unités régulatrices de la PP1c à contrôler son activité au cours du cycle cellulaire. Bien d'autres régulateurs sont connus et décrits pour intervenir à différentes étapes (Figure 23).

En effet, la protéine Phosphatase 1 NUclear Targeting Subunit (PNUTS ou PPP1R10) est un inhibiteur, *in vitro*, de la phosphatase qui interagit via trois sites dont son motif RVxF (KTVTW) et est localisée au niveau du noyau (Allen *et al.* 1998 ; Choy *et al.* 2014 ; Kim *et al.* 2003). PNUTS a été démontrée comme essentielle du début à la fin de la mitose afin de réguler l'activité de la PP1c (Fisher *et al.* 2014). Une surexpression de PNUTS empêche la sortie de mitose ou de méiose probablement par inhibition de la PP1c et la non-déphosphorylation de substrats clés alors que sa déplétion en début et milieu de mitose est aussi problématique. L'expression de PNUTS est élevée durant la mitose pour permettre d'inhiber et de contrôler la déphosphorylation par la PP1c, puis sa chute de concentration, probablement par ubiquitinylation et dégradation, en fin de mitose, favorise l'activité de la phosphatase pour la sortie de mitose (Fisher *et al.* 2014). PNUTS est aussi décrite comme impliquée dans la décondensation des chromosomes à la fin de la mitose selon un processus PP1c-dépendant (Landsverk *et al.* 2005). Son rôle serait de cibler certains substrats de la PP1c plutôt que d'inhiber son activité.

PNUTS régule également l'activité de la PP1c par compétition avec des substrats. Elle présente une affinité 400 fois plus importante avec la PP1c que la protéine rétinoblastome (pRb), qui est un substrat (Choy *et al.* 2014). pRb séquestre le facteur de transcription E2F ce qui maintient la cellule en phase G1. Lorsque pRb est phosphorylée, E2F est libérée et permet à la cellule d'entrer en phase S. La PP1c déphosphoryle pRb dès la fin de la mitose mais sera inhibée pour l'entrée en phase S (Rebelo *et al.* 2015). L'inhibition de la PP1c peut se faire par sa phosphorylation par une CDK mais aussi par compétition entre PNUTS et pRb. Ainsi une forte concentration en PNUTS empêche la déphosphorylation de pRb et la séquestration de E2F. Cependant la PKA, par phosphorylation de PNUTS, nuit à la formation du complexe PNUTS-PP1c permettant par conséquence une déphosphorylation de pRb (Choy *et al.* 2014).

Tout comme SDS22, PNUTS est un acteur de la réponse aux dommages à l'ADN (Landsverk *et al.* 2010). La déplétion en PNUTS entraîne un blocage en phase G2 avec une accumulation de foyers γH2AX, de RAD51 et RPA. PNUTS n'interviendrait pas dans la déphosphorylation des foyers γH2AX une fois la réparation effectuée mais plutôt dans les premières étapes de la mise en place de la réponse.

Au cours de la mitose, la PP1c peut être doublement inhibée. Tout d'abord par phosphorylation inhibitrice de sa T^{320} par CDC2 et aussi par interaction avec l'inhibiteur 1,

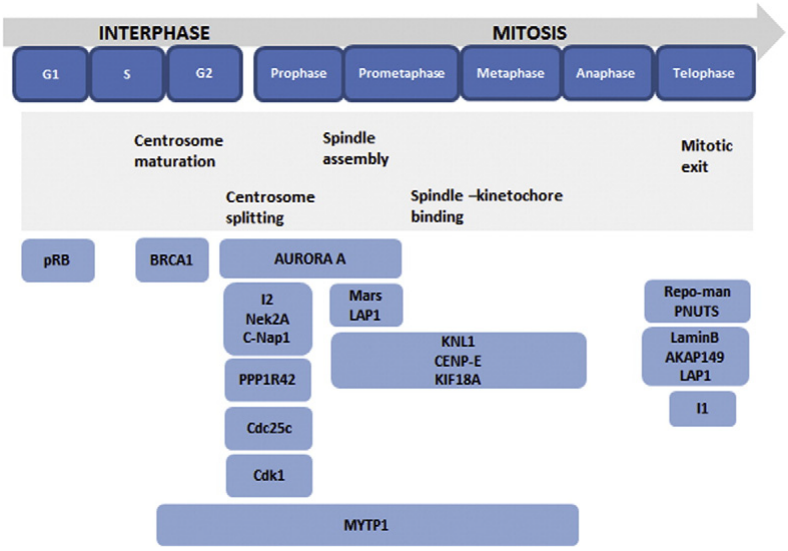

Figure 23 – Implication de différents partenaires de la PP1c au cours du cycle cellulaire. La PP1c est impliquée dans une multitude d'événements nucléaires de l'interphase à la mitose. Certains événements importants du cycle sont indiqués ainsi que le moment d'activité de certains régulateurs ou protéines cibles (d'après (Rebelo *et al.* 2015)).

lui-même phosphorylé sur sa T^{35} par PKA, qui la maintient sous forme inactive par interaction en tant que pseudosubstrat (J. Q. Wu *et al.* 2009). En fin de mitose, la cycline B est dégradée entraînant une diminution de l'activité de la kinase CDC2. En l'absence de cette pression pour maintenir la phosphorylation sur la T^{320} de la PP1c, celle-ci s'autodéphosphoryle, ce qui restaure en partie son activité enzymatique, suffisamment pour activer indirectement la déphosphorylation de l'inhibiteur 1 et son détachement de la PP1c. Une fois non phosphorylée et sans interaction avec I1, la PP1c est complètement active et peut déphosphoryler différents substrats impliqués dans le processus de sortie de mitose (J. Q. Wu *et al.* 2009).

6 Les régulateurs de la synthèse protéique

6.1 Transcription et métabolisme des ARNms

PNUTS, en plus de son motif d'interaction de type RVxF, possède d'autres domaines. En N-terminal, une région similaire au domaine LW du facteur de transcription IIS a été mise en évidence (Zacharchenko *et al.* 2016). Elle est impliquée dans l'initiation de la transcription et l'élongation par l'ARN polymérase II et interagit, entre autres, avec la protéine TOX4. En C-terminal, les multiples séquences répétées RGG, une région riche en histidines et glycines et un domaine en doigt de zinc favorisent son interaction avec l'ARN et l'ADN simple brin (Kim *et al.* 2003). Toutes ces observations indiqueraient que PNUTS, par interaction avec l'ADN ou l'ARN d'un côté et la PP1c de l'autre, permet de localiser la phosphatase afin de déphosphoryler différents substrats. Un complexe se formerait entre PNUTS-TOX4-WDR82-PP1c (ou PTW/PP1) et jouerait un rôle par déphosphorylation dans le maintien de la structure de la chromatine et dans la mitose (J.-H. Lee *et al.* 2010).

Par ailleurs, PNUTS se lierait également à la kinase P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b) impliquée dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II. Dans le cas d'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), le virus recrute P-TEFb pour promouvoir sa propre transcription (Kapoor *et al.* 2015). Il est aussi capable de moduler l'expression des miARNs dont miR-34a qui cible PNUTS. PNUTS régule négativement la transcription du virus en entravant l'interaction cycline T1–CDK9, deux partenaires indispensables à P-TEFb. Au cours d'une infection, les niveaux de miR-34a sont augmentés et PNUTS est davantage ciblé, ce qui ne lui permet pas d'intervenir dans les interactions entre la cycline T1, CDK9 et P-TEFb. La réplication du VIH est alors favorisée (Kapoor *et al.* 2015).

Un autre régulateur majeur de la PP1c est décrit pour son implication dans le métabolisme des ARNms. Il s'agit de Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase 1 (NIPP1 ou PPP1R8) qui forme un complexe avec près d'1/3 des PP1s nucléaires. Trois sites d'interaction avec la PP1c sont identifiés dont le motif RVxF (RVTF) (O'Connell *et al.* 2012). On trouve également le domaine N-terminal Forkhead-Associated (FHA) et la région C-terminale inhibant la PP1c. Le domaine FHA interagit avec des protéines phosphorylées impliquées dans l'épissage des ARNms favorisant ainsi leur déphosphorylation par la PP1c (Boudrez *et al.* 2000). NIPP1 a aussi un rôle dans le recrutement des spliceosomes, par un processus qui semble être PP1-indépendant. Il a été supposé que NIPP1 favorise le recrutement du spliceosome puis une fois l'épissage effectué, recrute la PP1c afin de déphosphoryler différentes protéines pour leur recyclage (Beullens et Bollen 2002).

NIPP1 est également décrit comme un acteur de la triméthylation H3K27 induite par la méthyltransférase EZH2 (Nuytten *et al.* 2008). Cette enzyme fait partie du Polycomb Repressive Complexe 2 (PRC2) qui cause la répression d'une multitude de gènes impliqués dans le développement embryonnaire ou la prolifération cellulaire. PP1c est nécessaire à la liaison entre NIPP1 et différents sites d'interaction sur la chromatine mais est dispensable pour le recrutement du complexe PRC2 par NIPP1 (Van Dessel *et al.* 2010). Celui-ci se produit lorsque EZH2 est phosphorylée, ce qui favorise la liaison du domaine FHA de NIPP1 avec la méthyltransférase (Minnebo *et al.* 2013). La liaison avec NIPP1 permet de garder EZH2 sous cette forme en inhibant l'activité de la PP1c.

6.2 Récupération d'un stress

Dans des conditions de stress, infection, privation..., la cellule diminue globalement sa traduction et sa synthèse protéique. La phosphorylation de eIF2α sur sa S^{51} est impliquée directement dans cette répression.

Deux protéines, Growth Arrest and DNA Damage-inducible (GADD34 ou PPP1R15a) et CReP (PPP1R15b) sont décrites comme favorisant la déphosphorylation de eIF2α et la reprise de la traduction (H. P. Harding *et al.* 2009). Ces deux régulateurs interagissent avec la PP1c et permettraient son recrutement pour cibler eIF2α. Malgré la faible identité entre les deux protéines (22%), des souris mutantes ont montré que GADD34 et CReP ont des fonctions assez similaires qui se recouvrent. De plus, la formation d'un hétérotrimère GADD34-I1-PP1c a été démontrée et pourrait inhiber la déphosphorylation lorsque le moment n'est pas opportun (Connor *et al.* 2001).

eIF2β possède un motif RVxF (KNVKF) et un second motif, et inhibe la PP1c *in vitro* (Wakula *et al.* 2006). Elle interagit avec différentes protéines du complexe de préinitiation de la traduction dont eIF2γ, connue pour se lier avec eIF2α. La déphosphorylation de cette dernière par la PP1 est inhibée, *in vitro*, en présence de eIF2β qui peut être elle-même la cible de la phosphatase (Wakula *et al.* 2006). L'implication de ce régulateur dans le contrôle de la traduction ou de eIF2α est encore largement méconnue.

7 Les régulateurs dans d'autres fonctions biologiques

7.1 L'apoptose

Jouant un rôle prépondérant dans la mitose et de façon générale dans la régulation du cycle cellulaire, la PP1 est aussi décrite comme étant impliquée dans l'apoptose.

Différentes protéines sont identifiées comme étant anti-apoptotiques telles que la famille Bcl-2 contenant entre autres Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w. Bad est une protéine qui induit le déclenchement de l'apoptose lorsqu'elle est déphosphorylée.

Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w ont chacune un motif RVxF et un motif Fxx[RK]x[RK] leur permettant d'interagir avec la PP1c (Ayllón *et al.* 2002, 2001). Il a été montré que Bcl-2 permet par interaction avec la PP1c de cibler Bad et de la déphosphoryler (Ayllón *et al.* 2001). Le même mécanisme a été montré pour Bcl-x_L et Bcl-w, qui sont eux aussi capables de former des hétérotrimères avec Bad et la PP1c (Ayllón *et al.* 2002). Dans ce contexte Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w deviennent pro-apoptotiques. Une modification post-traductionnelle a été proposée pour expliquer ce revirement. La phosphorylation détectée sur ces régulateurs pourrait entraîner un changement dans l'affinité avec les partenaires (Ayllón *et al.* 2002).

La PP1 permettrait également la production des variants pro-apoptotiques Bcl-x_S et de la caspase 9 (Ceulemans et Bollen 2004).

7.2 Les régulateurs dans le métabolisme du glycogène

L'implication de la PP1 dans le métabolisme du glycogène est l'une de ses premières fonctions mises en évidence. La glycogène synthase permet la polymérisation du glucose sanguin en glycogène. Cette réaction entraîne un stockage de celui-ci lorsque sa concentration est trop élevée dans le sang. La glycogène phosphorylase a une action antagoniste puisqu'elle favorise la dépolymérisation du glycogène en glucose afin de réaugmenter la concentration sanguine. Ces enzymes sont toutes les deux des cibles de la PP1c (Ceulemans et Bollen 2004). La déphosphorylation de la glycogène synthase déclenche son activation alors que l'inverse se produit pour la phosphorylase (Figure 24). La phosphorylase kinase contrebalance la réaction de la PP1c en phosphorylant les deux enzymes du glycogène lorsqu'un déstockage est nécessaire mais peut être inactivée également par la PP1c.

Chez les mammifères, 7 régulateurs ont été identifiés et nommés les sous-unités G : G_M, G_L, G_C, G_D, G_E, G_F et G_G (ou PPP1R3A à PPP1R3G) (Ceulemans et Bollen 2004). Toutes présentent la même structure avec un motif d'interaction avec la PP1c de type RVxF et un domaine de liaison au glycogène ou à l'un des substrats de la phosphatase. G_M et G_L sont exprimées principalement dans les muscles striés et le foie respectivement et semblent favoriser la déphosphorylation et l'activation de la glycogène synthase. L'intervention de G_M peut être inhibée par phosphorylation de son motif RVxF.

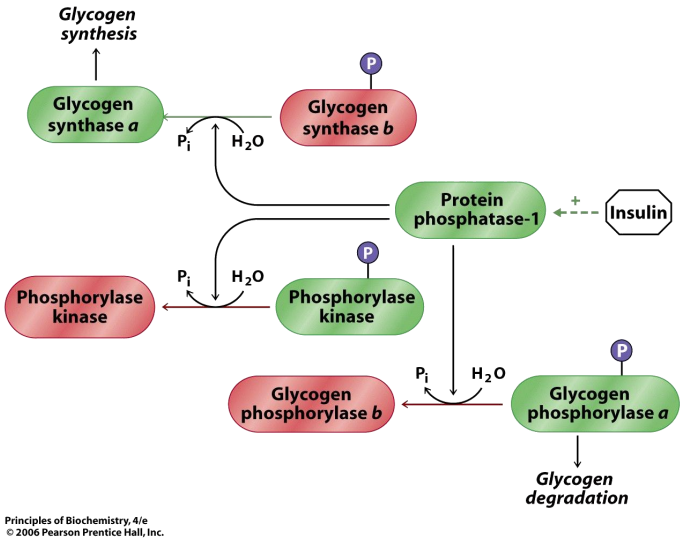

FIGURE 24 – Régulation du métabolisme du glycogène par la PP1c. En présence d'une concentration élevée de glucose dans le sang, l'insuline sécrétée permet l'activation de la PP1c. Celle-ci va déphosphoryler la glycogène synthase et la glycogène phosphorylase a, les rendant active et inactive respectivement. Dans le même temps la phosphorylase kinase va être également inactivée par déphosphorylation par la PP1c afin d'éviter de contrecarrer les actions de la phosphatase. La glycogène synthase active va permettre la polymérisation du glucose en glycogène pendant que son antagoniste la glycogène phosphorylase reste dans un état inactif.

Bien d'autres sous-unités régulatrices de la PP1c sont déjà identifiées et décrites dans les fonctions biologiques citées auparavant. De plus, la PP1 joue également des rôles non abordés mais tout aussi importants. On la retrouve, par exemple, impliquée dans la restructuration actine-myosine pour la contraction musculaire et le cytosquelette avec les régulateurs MYPTs, CPI-17 ou les Neurabines (Ceulemans et Bollen 2004 ; Cohen 2002). PP1c intervient également dans la spermatogenèse et de manière générale dans la structure et motilité du sperme (Korrodi-Gregório *et al.* 2014).

8 Les régulateurs chez *Plasmodium*

Actuellement, très peu de sous-unités régulatrices de la PfPP1c ont été décrites chez *P. falciparum*. Quatre régulateurs, LRR1, I2, I3 et eIF2β, ont été identifiés par génomique comparative et caractérisés au sein du laboratoire. Des homologues des régulateurs majeurs comme PNUTS, NIPP1 et I1, n'ont pas été identifiés chez le parasite et ne semblent pas être conservés, même si la richesse en A/T du génome de *P. falciparum* est un obstacle pour une identification par génomique comparative.

L'inhibiteur 2 est conservé chez *Plasmodium* (PfI2) et présente 28% d'identité avec HsI2 (Fréville *et al.* 2013). PfI2 est plus petite que son orthologue avec notamment un raccourcissement de la partie N-terminale engendrant l'absence du motif SILK. Les motifs HYNE et RVxF sont conservés même si ce dernier présente une séquence plus classique que HsI2, avec la présence d'une isoleucine à la place de la glutamine (KKTISW). La présence d'un motif Fxx[RK]x[RK] a été démontrée par résonance magnétique nucléaire (Fréville

et al. 2014). L'inhibiteur 2 parasitaire interagit avec la PfPP1c dont le motif RVxF est le principal mais non-unique contributeur (Fréville *et al.* 2014). L'absence d'obtention de parasites par knock-out du gène laisse à supposer que la protéine PfI2 est essentielle à la survie parasitaire (Fréville *et al.* 2013).

L'inhibiteur 3 de *P. falciparum* présente 31% d'identité avec son homologue humain et son motif d'interaction de type RVxF est conservé (KVVRW) (Fréville *et al.* 2012). Celui-ci est indispensable à l'interaction avec la PfPP1c même si un site secondaire pourrait être impliqué comme dans le cas de l'Homme. L'échec dans la délétion du gène suggère que PfI3 est essentielle pour la survie du parasite (Fréville *et al.* 2012). De façon surprenante, PfI3 n'est pas capable de complémenter une souche de levure déficience en Ypi1 malgré son interaction avec GLC7. Une partie ou la totalité des fonctions de Ypi1 ne sont probablement pas compensées par PfI3. L'augmentation de l'activité de PfPP1c en présence de PfI3, *in vitro*, tend aussi à confirmer que PfI3 n'est pas l'exact orthologue de Ypi1.

PfLRR1 est une protéine de *P. falciparum* possédant 42% d'identité avec SDS22 de *S. pombe* (Daher *et al.* 2006). 9 LRRs et 1 coiffe LRR sont décrits mais restent suffisants pour se lier à PfPP1c. Son activité inhibitrice envers la phosphatase a été démontrée à la fois *in vitro* et chez *Xenopus*.

Le dernier régulateur identifié à l'heure actuelle chez le parasite est eIF2β (Tellier *et al.* 2016). Malgré une protéine délétée de 33% par rapport à son orthologue humain, elle interagit avec la PfPP1c via deux motifs d'interaction, le motif Fxx[RK]x[RK] conservé (FGEKKK) et un motif RVxF différent de l'Homme (KVAW). La mutation de chaque motif individuellement n'empêche pas la liaison avec la phosphatase par GST pull-down. En revanche la mutation des deux sites en même temps inhibe l'interaction avec la PfPP1c indiquant qu'un seul motif est suffisant pour interagir *in vitro*. En plus de sa liaison avec la phosphatase, PfeIF2β est capable de se complexer avec PfeIF2γ et PfeIF5. Elle est indispensable à la survie du parasite et comme chez l'Homme, le rôle du complexe PfeIF2β-PfPP1c est encore inconnu. L'absence d'homologue identifiable de GADD34 ou CrEP laisse imaginer qu'au cours et après un stress cellulaire, la régulation de la phosphorylation de eIF2α est différente. La déphosphorylation ne se ferait plus par la PfPP1c mais par UIS2 (Up-regulated in Infective Sporozoites 2), une phosphatase décrite comme étant surexprimée chez les sporozoïtes (M. Zhang *et al.* 2016).

Différents peptides synthétiques comprenant une séquence pénétrante afin d'atteindre le parasite et l'un des motifs d'interaction répétés, ont été utilisés pour inhiber la fonction de la PfI2 endogène et observer l'effet sur la croissance parasitaire. Les motifs RVxF et Fxx[RK]x[RK] de PfI2 ont entraîné une diminution de la parasitémie de *P. falciparum* alors que le motif HYNE a eu peu d'effet (Figure 25) (Fréville *et al.* 2013, 2014). Dans le cas d'un peptide I3 (KVVRW), une diminution de la croissance parasitaire est observée (Fréville *et al.* 2013). Ces peptides mimant des motifs d'interaction avec la PfPP1c suggèrent qu'une dérégulation de la phosphatase est délétère pour le parasite. L'utilisation de ces peptides pénétrants pourrait être une technique innovante et ambitieuse afin de lutter contre le paludisme.

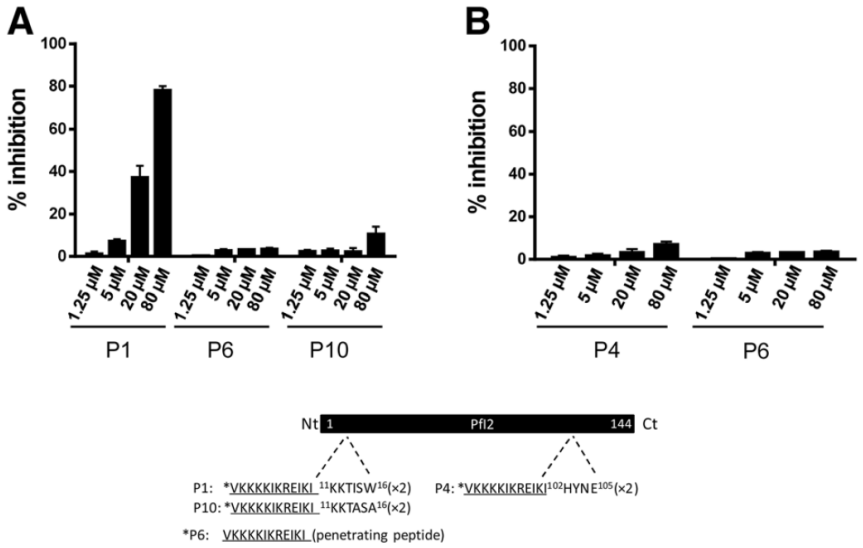

Figure 25 – Effet sur la croissance de *P. falciparum* des peptides synthétiques basés sur PfI2. A. et **B.** Inhibition de la croissance de *P. falciparum* 3D7 par des peptides synthétiques dérivés des motifs d'interaction de PfI2. Une représentation schématique de PfI2 indique les peptides synthétiques basés sur les motifs RVxF (KKTISW) (P1) et HYNE (P4). P6 (peptide pénétrant) et P10 (mutant de P1) ont été utilisés comme témoins négatifs (d'après (Fréville *et al.* 2013)).

Ces 4 protéines semblent avoir conservées leur capacité à interagir et réguler la PfPP1c. Les motifs d'interactions sont globalement identiques même si quelques variations existent. Les tentatives de délétion des différents régulateurs n'ont pas permis d'obtenir de mutants viables suggérant qu'ils sont essentiels à la survie de *P. falciparum*.

Le faible nombre de régulateurs conservés chez *P. falciparum* est en adéquation avec l'apparition des principaux régulateurs primaires au cours de l'évolution des eucaryotes (Ceulemans *et al.* 2002a). Il se révèle clairement qu'au moment de la divergence du règne des *Chromoalveolata*, dont font partie les *Plasmodium*, seuls SDS22, eIF2β et les inhibiteurs 2 et 3 avaient déjà fait leur apparition. Les régulateurs impliqués dans le métabolisme du glycogène, NIPP1, GADD34, PNUTS ou l'inhibiteur 1, entre autres, sont identifiables quasiment uniquement chez les *Unikonta* (Ceulemans *et al.* 2002a).

Cadre et objectifs

Cadre et objectifs

Le paludisme est la première maladie parasitaire au monde. En 2015, 429 000 morts, dont 92% en Afrique, ont été recensés (WHO 2016). Cette parasitose est causée par des apicomplexes du genre *Plasmodium* dont *P. falciparum* est l'espèce la plus virulente pour l'Homme. Tout au long de son cycle de vie, une régulation fine de son protéome est nécessaire et les modifications post-traductionnelles ont été démontrées comme essentielles pour le parasite. Les phosphorylations et déphosphorylations réversibles font partie des modifications les plus abondantes. La génétique inverse et l'utilisation de toxines ou d'inhibiteurs contre les kinases et phosphatases de *Plasmodium* ont montré qu'une majorité de ces enzymes sont indispensables à la survie parasitaire. Au laboratoire nous nous intéressons à la caractérisation de ces phosphatases, dont l'étude a longtemps été délaissée au profit des kinases. La Protéine Phosphatase de Type 1 (PP1) et de Type 2A (PP2A) sont les deux phosphatases majoritaires de *P. falciparum* (Yokoyama *et al.* 1998).

La PP1 est la principale sérine/thréonine phosphatase chez les eucaryotes. Elle se compose d'une sous-unité catalytique, PP1c, qui assure sa fonction de déphosphorylation et qui est extrêmement bien conservée. La deuxième sous-unité variable régule la PP1c et l'ensemble forme l'holoenzyme PP1. Cette régulation peut se faire à différents niveaux, par inhibition ou activation de l'activité enzymatique, par localisation de la PP1c ou en faisant varier la spécificité des substrats. Actuellement, plus de 200 régulateurs de la PP1c ont été identifiés (Heroes *et al.* 2013 ; Korrodi-Gregório *et al.* 2014). Différents motifs d'interaction avec la PP1c sont connus, comme les motifs SILK ou Fxx[RK]x[RK] mais le motif RVxF est décrit chez plus de 70% des régulateurs et est le principal contributeur dans la formation des complexes (Bollen *et al.* 2010 ; Peti *et al.* 2013). La PP1 agit dans de vastes fonctions biologiques comme le contrôle de la mitose, le métabolisme du glycogène, la récupération d'un stress cellulaire, la transcription et la traduction...

L'orthologue de la PP1c chez *P. falciparum* (PfPP1c) est décrit comme essentiel pour le parasite mais la forte identité entre HsPP1c et PfPP1c est un obstacle à son utilisation comme cible thérapeutique.

Peu de sous-unités régulatrices de la PfPP1c sont actuellement décrites chez *P. falciparum* mais elles peuvent être classées en deux groupes. Tout d'abord, le premier contient les 4 régulateurs PfLRR1 (ou SDS22), PfI2, PfI3 et PfeIF2β qui ont été caractérisés au sein du laboratoire comme étant tous conservés et essentiels. Ce faible nombre est en concordance avec l'apparition d'une multitude de régulateurs après la divergence *Unikonta* et *Bikonta*

(Ceulemans *et al.* 2002a). Pour le deuxième groupe, nous estimons que des régulateurs de la phosphatase, spécifiques du parasite, sont identifiables. En effet, environ 60% des protéines prédites sont hypothétiques et ont une fonction encore inconnue (Florens *et al.* 2002 ; Gardner *et al.* 2002). De plus, la PP1c est décrite comme étant impliquée dans la mitose chez de nombreux eucaryotes et le parasite effectue une division cellulaire atypique par endomitose. Tous ces éléments suggèrent que *Plasmodium* possèderait des régulateurs spécifiques de la PfPP1c qui pourront se révéler être des potentielles cibles thérapeutiques.

Le premier objectif de ma thèse a donc été d'identifier ces régulateurs chez *Plasmodium falciparum*. Nous avons pu établir le premier interactome de la PfPP1c par l'utilisation de trois approches complémentaires, une colonne d'affinité avec la phosphatase, un criblage en double hybride chez la levure et une recherche de partenaires basée sur le motif d'interaction de type RVxF.

A partir des différents partenaires potentiels identifiés, nous avons réalisé une caractérisation moléculaire et fonctionnelle de l'un des candidats, spécifique du parasite. Il s'agit de Gametocyte EXported Protein 15 (GEXP15), identifiée par les criblages en double hybride chez la levure et *in silico*. Le deuxième objectif a été de confirmer l'interaction entre GEXP15 et la PfPP1c par différentes approches, *in vitro* et *in vivo*. L'implication de GEXP15 sur l'activité phosphatase et dans la survie parasitaire a été également investiguée.

Résultats

Résultats

A Analyse de l'interactome de la Ser/Thr Protéine Phosphatase de Type 1 chez *Plasmodium falciparum*

Afin d'établir le premier interactome de la PP1c chez *Plasmodium falciparum* et d'identifier des partenaires de la PfPP1c, spécifiques du parasite, plusieurs approches complémentaires ont été utilisées.

Tout d'abord, les premiers partenaires potentiels de la PfPP1c ont été identifiés par le passage d'un extrait de protéines solubles de *P. falciparum* sur une colonne d'affinité, où la PfPP1c recombinante a été liée de manière covalente à des billes de sépharose. Par analyse en spectrométrie de masse, 6 protéines ont été détectées. Elles présentent toutes au moins un motif potentiel d'interaction de type RVxF ou Fxx[RK]x[RK], ce qui conforte les données obtenues (Table 1 et S1 (Annexes I)).

Une seconde approche a permis de cribler une banque d'ADNc de *P. falciparum* par double hybride chez la levure avec la PfPP1c comme appât. Au total, 134 protéines ont été sélectionnées dont la HSP70, précédemment détectée comme pouvant potentiellement interagir avec la PfPP1c (Table 2 et S3 (Annexes I)).

Dans le but de compléter l'interactome de la PfPP1c, un criblage *in silico* a été réalisé sur le génome de *P. falciparum* afin d'identifier des protéines suivant une séquence consensus stringente du motif d'interaction RVxF. Sur les 57 gènes sélectionnés, 1 pseudogène et 1 gène doublement répertorié dans le génome ont été retirés (Table 3 et S4 (Annexes I)). Huit protéines sont communes avec celles identifiées au préalable par le double hybride chez la levure.

L'ensemble de ces trois approches complémentaires a permis de mettre en évidence 186 partenaires potentiels de la PfPP1c (Figure 1 (Annexes I)). Pour valider ces interactions *in vitro*, un test d'interaction de type ELISA a été utilisé. Pour cela, 68 protéines provenant des différentes approches ont été triées pour être produites sous forme de protéines recombinantes (Table S5 (Annexes I)). La complexité du génome de *P. falciparum* et la toxicité éventuelle n'ont permis que l'obtention de 37 protéines recombinantes auxquelles s'ajoutent les H2A et H2B humaines, que nous avons utilisées en remplacement de leur orthologue parasitaire fortement conservé. Le test d'interaction de type ELISA a confirmé l'interaction avec la PfPP1c pour 35 des 39 protéines testées prouvant la robustesse des approches (Figure 2 (Annexes I)).

L'analyse des fonctions décrites ou potentielles de ces 186 partenaires potentiels a montré une large diversité des processus biologiques concernés (FIGURE 3 (Annexes I)). On retrouve une certaine partie des protéines jouant un rôle dans la maintenance de l'ADN, transcription et traduction..., des fonctions déjà décrites pour la PP1c. Ces données tendent à valider les partenaires de la PfPP1c identifiées. Plusieurs réseaux ont été construits à partir de ces interactions et de celles précédemment détectées chez le parasite (FIGURE 4 et S4 (Annexes I)) (LaCount *et al.* 2005). Cependant, une vaste majorité (58%) des protéines sont hypothétiques et leur(s) fonction(s) chez le parasite reste(nt) à déterminer. Celles-ci sont donc particulièrement intéressantes dans le but de caractériser des régulateurs de la PfPP1c, spécifiques de *Plasmodium*.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont été publiés dans BMC Genomics (2016, 17:246) et sont présentés en Annexes I ainsi que les données supplémentaires.

B Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de Gametocyte EXported Protein 15

L'étude de l'interactome de la PfPP1c par trois approches complémentaires a permis d'identifier 186 partenaires potentiels de la phosphatase (Hollin *et al.* 2016). Parmi ceux-ci, se trouve GEXP15 identifiée lors du criblage par double hybride chez la levure. La partie N-terminale de GEXP15 a été détectée trois fois sur le milieu le plus sélectif suggérant que cette région est importante pour l'interaction avec la phosphatase. PfGEXP15 a également été sélectionnée par le criblage *in silico*, basé sur la recherche de motif d'interaction de type RVxF. En effet, la séquence 'KKKKKVQF' de PfGEXP15 suit le motif consensus stringent utilisé et aussi la séquence consensus décrite chez *P. falciparum* (Hollin *et al.* 2016). L'ensemble de ces données ont fait de GEXP15 l'un des meilleurs candidats partenaires de la PfPP1c, ce qui a été confirmé par la formation du complexe lors d'un test d'interaction de type ELISA (FIGURE 2 (Annexes I)). De plus, GEXP15 est une protéine spécifique du parasite et a été décrite comme étant gamétocytaire et potentiellement exportée. GEXP15 a donc été l'objet d'étude de cette thèse et sa caractérisation moléculaire et fonctionnelle est détaillée ci-dessous.

I Gametocyte EXported Protein 15, analyse *in silico* et expression

1 GEXP15 : Analyse *in silico*

Durant l'établissement de l'interactome de la PfPP1c, une portion de 175 acides aminés de Gametocyte EXported Protein 15 (PfGEXP15 $_{8-182}$) a été identifiée comme un partenaire potentiel de la PfPP1c (Hollin *et al.* 2016). Le gène complet (numéro d'accession PF3D7_1031600) code une protéine de 904 acides aminés (PlasmoDB 2017) qui est conservée uniquement chez l'ensemble des *Plasmodium* (blastP). Une analyse transcriptomique a confirmé l'Open Reading Frame (ORF) putatif de GEXP15 (PlasmoDB 2017).

Étant donné que beaucoup de régulateurs de la PP1c sont décrits comme des protéines désorganisées, nous avons examiné la structure de PfGEXP15. La prédiction de la structure secondaire de PfGEXP15 (PSIPRED v3.3) montre que la protéine posséderait plusieurs

hélices α mais assez peu de feuillets β (FIGURE 26). En revanche, IUPred, site de prédiction des Intrinsically Unstructured Proteins, présage que la structure tertiaire de PfGEXP15 est très peu organisée hormis entre les acides aminés 300-450 et 650-800, qui correspondraient à des hélices α. PfGEXP15 semblerait donc être globalement une protéine non structurée et le potentiel motif RVxF, détecté précédemment, se situerait en dehors d'une conformation tridimensionnelle particulière. De plus, aucun domaine transmembranaire n'a été prédit sur PfGEXP15 (TMHMM v2.0).

FIGURE 26 – Prédiction de la structure secondaire de PfGEXP15 par PSIPRED.

L'alignement global entre PfGEXP15 et son homologue de *P. berghei*, PbGEXP15 (PBANKA_0515400) révèle 41% d'identité (FIGURE 27). Lorsque l'on retire manuellement les séquences riches en acides aminés acides ou en asparagines, qui sont plus spécifiques de *P. falciparum*, l'identité est supérieure à 50%. PbGEXP15 possède des régions hautement conservées comme le potentiel motif d'interaction RVxF, ^{35}KKKKKVQF^{42}, détecté lors du criblage *in silico* (FIGURE 28) et qui est présent chez *Plasmodium* spp.. Il est à noter qu'un second motif potentiel d'interaction RVxF, ^{688}KNVYF^{692}, est présent et est conservé.

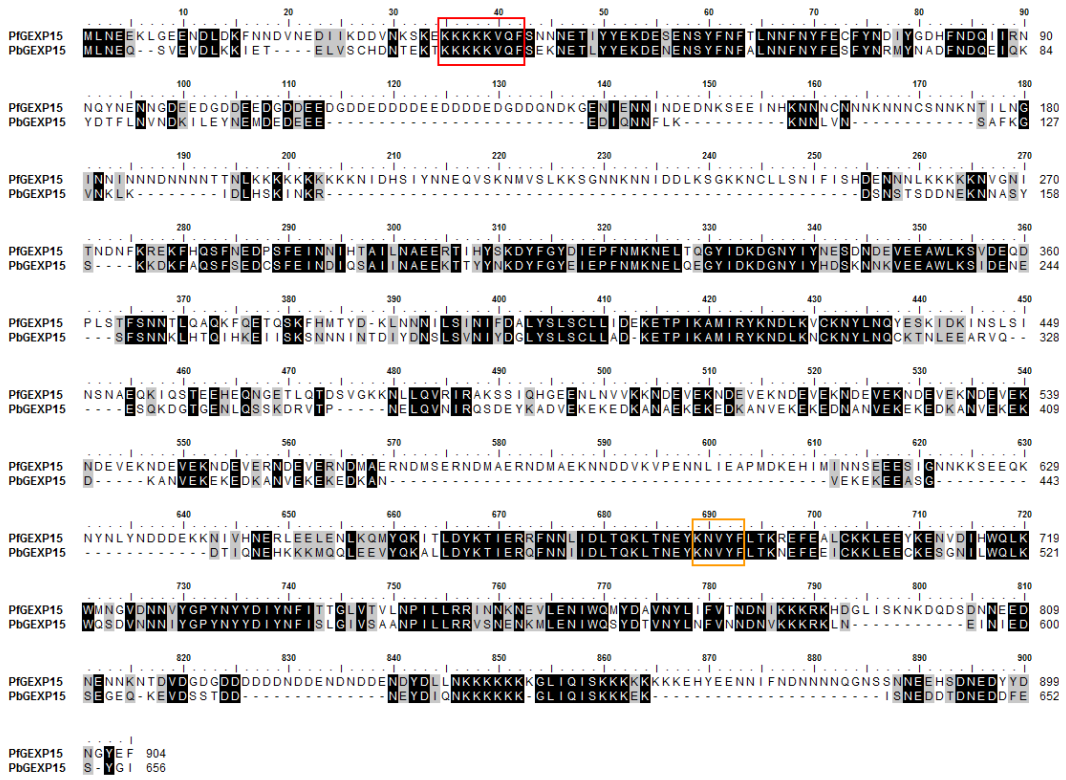

Figure 27 – Alignement global entre les protéines PfGEXP15 et PbGEXP15. L'alignement protéique entre PfGEXP15 (PF3D7_1031600) et PbGEXP15 (PBANKA_0515400) a été réalisé par BioEdit et ClustalW. Les séquences suivant le motif consensus stringent ou basique du RVxF sont encadrées en rouge et orange respectivement.

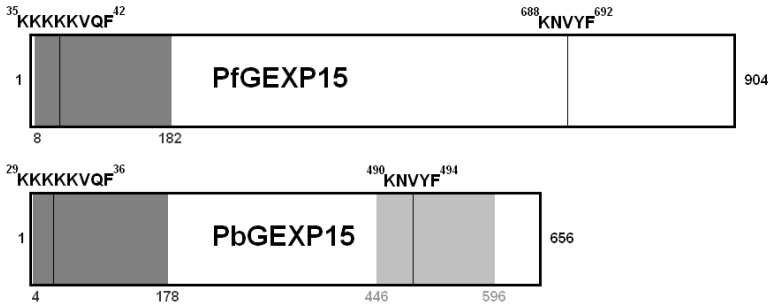

Figure 28 – Motifs potentiels d'interaction de type RVxF et portions protéiques de PfGEXP15 et PbGEXP15 utilisées. Les portions étudiées pour PfGEXP15 $_{8-182}$ (gris), PbGEXP15 $_{4-178}$ (gris) et PbGEXP15 $_{446-596}$ (gris clair) sont représentées schématiquement ainsi que leur position. Les positions et les séquences KKKKKVQF ou KNVYF ont été indiquées et sont conservées chez *P. falciparum* et *P. berghei*. Ces motifs suivent, respectivement, la séquence consensus stringente et basique du motif d'interaction RVxF.

2 GEXP15 est surexprimée dans les jeunes gamétocytes

Afin de confirmer l'expression de GEXP15 chez *Plasmodium*, un antisérum dirigé contre la partie N-terminale de la protéine recombinante de PbGEXP15 a été produit et utilisé en western-blot. Les expériences ont été réalisées avec un extrait total d'une culture de *P. falciparum* et ont révélé la présence d'une double bande spécifique autour de 130kDa au lieu des 107kDa théoriques (Figure 29A). Une expérience similaire a été menée sur les stades sanguins de *P. berghei* et PbGEXP15 a été identifiée à 100kDa environ alors que la taille attendue est de 77kDa (Figure 29B). Tout comme PfGEXP15, un doublet est observé ainsi qu'une différence entre la taille obtenue et théorique. Un chargement anormal en SDS et une dégradation ou des modifications post-traductionnelles de la protéine pourraient expliquer l'ensemble de ces résultats.

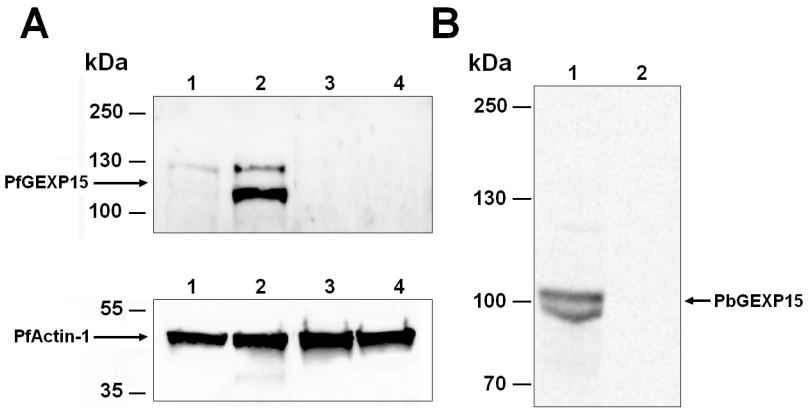

Figure 29 – Expression de PfGEXP15 et PbGEXP15. A.) Analyse par western-blot de l'expression de PfGEXP15 aux stades trophozoïtes/schizontes (pistes **1** et **3**), gamétocytes de stades II (pistes **2** et **4**). 5.10^6 parasites de chaque stade de *P. falciparum* NF54 ont été chargés. Les protéines sont révélées par un sérum anti-GEXP15 (pistes **1** et **2**) ou un sérum pré-immun de souris (pistes **3** et **4**) et des anticorps anti-Actine-1 (toutes les pistes, partie inférieure) comme contrôle de charge. **B.** Détection de PbGEXP15 endogène dans une culture asynchrone de *P. berghei*. Le western-blot a été révélé avec un sérum anti-GEXP15 (piste **1**) ou un sérum pré-immun de souris (piste **2**).

Une comparaison entre les protéomes des trophozoïtes, des gamétocytes jeunes et des gamétocytes âgés, a permis d'identifier PfGEXP15, par spectrométrie de masse, qui serait exprimée uniquement chez les gamétocytes de stades I/II (Silvestrini *et al.* 2010). Nous avons donc réalisé une analyse en western-blot de l'expression de PfGEXP15 aux stades trophozoïte/schizonte ainsi que gamétocyte de stade II chez *P. falciparum*. Les résultats obtenus montrent que PfGEXP15 est faiblement exprimée aux stades asexuels âgés et est plus abondante chez les jeunes gamétocytes (Figure 29A). Cependant, au cours du protéome (Silvestrini *et al.* 2010), seulement deux peptides de PfGEXP15 avaient été détectés (2.6% de recouvrement de la protéine entière) chez les gamétocytes de stades I/II, ce qui peut expliquer qu'aucune détection n'a pu être faite chez les trophozoïtes. Une analyse par western-blot doit être réalisée afin de comparer l'expression de PfGEXP15 à tous les stades sanguins asexuels et sexuels.

II GEXP15 interagit avec la PfPP1c chez le modèle hétérologue de *S. cerevisiae*

Afin d'évaluer plus spécifiquement la capacité de GEXP15 à interagir avec la PfPP1c, une portion de PfGEXP15 (entre les acides aminés 8 et 182) a été testée. PfGEXP15 $_{8-182}$ a été sélectionnée puisqu'elle correspond à la même région détectée trois fois par le criblage en double hybride chez la levure lors de l'établissement de l'interactome de la PfPP1c (Hollin *et al.* 2016). L'interaction entre Gal4-DBD-PfPP1c et Gal4-AD-PfGEXP15 $_{8-182}$ peut être mise en évidence par croissance des diploïdes sur milieu SD dépourvu de Leucine, Tryptophane, Histidine (SD-LWH) et Adénine (SD-LWHA). Gal4-DBD-Laminine et Gal4-DBD sont utilisées comme témoins négatifs. Lorsque les différentes souches croisées ont été étalées sur milieu sélectif stringent, SD-LWH et SD-LWHA, seuls les diploïdes exprimant PfGEXP15 $_{8-182}$ et PfPP1c sont capables de croître indiquant la capacité de ces protéines à interagir spécifiquement l'une avec l'autre (Figure 30A). De façon intéressante, PfGEXP15 $_{8-182}$ interagit fortement avec la PfPP1c, cette interaction étant visualisée par la capacité des diploïdes à se développer sur le milieu le plus sélectif (SD-LWHA), indépendamment des dilutions testées (Figure 30A).

Pour approfondir l'étude de l'interaction et à la vue de la taille et de la complexité de la séquence de PfGEXP15, nous avons analysé la capacité de la copie complète de *P. berghei* GEXP15 à se lier à la PfPP1c. PbGEXP15 est une protéine de 656 acides aminés contre 904 pour PfGEXP15 (Figure 28). Par amplification de l'ADNg de *P. berghei*, nous avons pu obtenir la séquence de PbGEXP15 correspondant aux acides aminés 4 à 629 (PbGEXP15 $_{4-629}$), ce qui représente 95% de la protéine complète. Le croisement entre les levures exprimant Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-629}$ d'une part, et Gal4-DBD-PfPP1c d'autre part, a révélé que ces deux protéines interagissent spécifiquement et fortement comme en témoigne la croissance des diploïdes sur le milieu SD-LWHA (Figure 30B).

Pour évaluer l'implication du potentiel motif d'interaction, deux portions de PbGEXP15 ont été sélectionnées (Figure 28). PbGEXP15 $_{4-178}$, correspondant à la région homologue de PfGEXP15 $_{8-182}$, présente la même séquence suivant un motif d'interaction RVxF stringent, précédemment identifiée par le criblage *in silico* de l'interactome de la PfPP1c (Hollin *et al.* 2016). En parallèle, nous avons testé un second fragment, PbGEXP15 $_{446-596}$, contenant la séquence KNVYF qui suit la séquence consensus basique du RVxF (Wakula *et al.* 2003). Les deux portions ont été clonées et transformées en levure. Les croisement réalisés avec les levures exprimant la PfPP1c montrent que seule PbGEXP15 $_{4-178}$ interagit avec la phosphatase (Figure 30C). Cette interaction est spécifique et forte (croissance sur milieu SD-LWHA) comme celle observée avec PbGEXP15 $_{4-629}$. PbGEXP15 $_{446-596}$ ne montre aucune interaction avec la PfPP1c, dans ce modèle, indiquant que ce n'est pas un motif RVxF. La définition du motif RVxF proposée par Wakula est peu spécifique et peut expliquer que cette séquence de PbGEXP15 est juste aléatoire. De plus, ce résultat indique qu'il n'y a pas d'autres motifs suffisants, sur cette portion, pour interagir seuls avec la phosphatase. Dans le but de valider l'implication du potentiel motif RVxF de la région N-terminale, une mutagenèse dirigée a été réalisée sur la valine 34 et la phénylalanine 36 qui ont été substituées par deux alanines (PbGEXP15 $_{4-178\ \mathrm{KKKKKAQA}}$). Le croisement de ce mutant avec la PfPP1c ne révèle aucune interaction, confirmant que cette séquence est un réel motif d'interaction de type RVxF et qu'il est indispensable à la liaison avec la PfPP1c (Figure 30C).

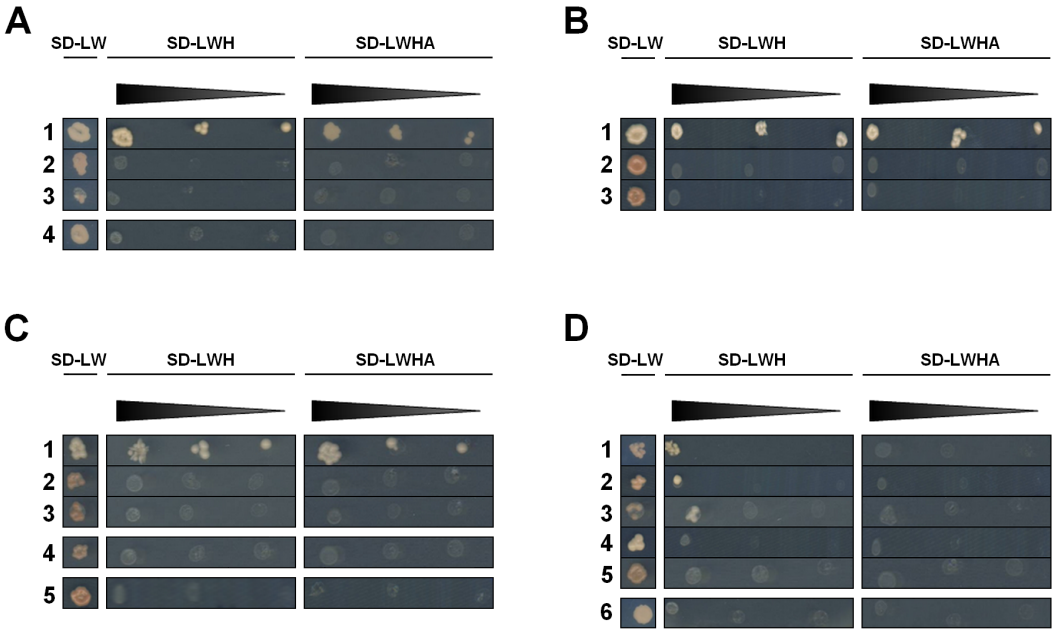

Figure 30 – Interaction de PfGEXP15 et PbGEXP15 avec la PfPP1c chez la levure. Les diploïdes ont été vérifiés sur milieu SD-LW et les interactions ont été identifiées par croissance des cultures non diluées ou diluées (1:25 et 1:50) sur milieux SD-LWH et SD-LWHA. **A.** Gal4-AD-PfGEXP15 $_{8-182}$ a été croisée avec Gal4-DBD-PfPP1c (**1**), Gal4-DBD-Laminine (**2**) ou Gal4-DBD (**3**). Le croisement Gal4-AD et Gal4-DBD-PfPP1c a été utilisé comme contrôle (**4**). **B.** Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-629}$ a été croisée avec Gal4-DBD-PfPP1c (**1**), Gal4-DBD-Laminine (**2**) ou Gal4-DBD (**3**). **C.** Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-178}$ dans le même ordre (**1**, **2** et **3**) et Gal4-AD-PbGEXP15 $_{446-596}$ (**4**), Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-178\ \mathrm{KKKKKAQA}}$ (**5**) ont été croisées avec Gal4-DBD-PfPP1c. **D.** Gal4-AD-PfGEXP15 $_{8-182}$ (**1**), Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-629}$ (**2**), Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-178}$ (**3**), Gal4-AD–PbGEXP15 $_{446-596}$ (**4**) et Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-178\ \mathrm{KKKKKAQA}}$ (**5**) ont été croisées avec Gal4-DBD-PfPP1c F255A F256A. Le croisement Gal4-AD et Gal4-DBD-PfPP1c F255A F256A a été utilisé comme contrôle (**6**).

Afin de confirmer l'implication du motif, nous avons muté le site de liaison du motif RVxF de la PfPP1c. Par mutagenèse dirigée, les phénylalanines 255 et 256 du sillon hydrophobe de la PfPP1c, ont été substituées par deux alanines. Ces résidus de la PP1c sont déjà connus pour diminuer ou inhiber l'interaction avec les partenaires RVxF-dépendants (Hurley *et al.* 2007 ; Meiselbach *et al.* 2006 ; X. Wu et Tatchell 2001). Dans le cas de PfGEXP15 $_{8-182}$, PbGEXP15 $_{4-629}$ et PbGEXP15 $_{4-178}$, nous avons observé l'absence de croissance sur le milieu le plus sélectif (SD-LWHA) et après dilutions sur le milieu SD-LWH (Figure 30D). Ces résultats indiquent un affaiblissement de l'interaction entre GEXP15 et la PfPP1c. Aucune interaction n'a été détectée pour PbGEXP15 $_{4-178\ \mathrm{KKKKKAQA}}$ et PbGEXP15 $_{446-596}$ (Figure 30D).

L'ensemble de ces résultats confirme l'interaction forte et spécifique entre GEXP15 et la PfPP1c. La capacité d'interaction est fortement entravée lorsque le motif RVxF de GEXP15 ou le sillon hydrophobe de la PfPP1c sont mutés indiquant que la liaison entre GEXP15 et la PfPP1c pourrait être directe.

III GEXP15 se lie directement à la PfPP1c via son motif RVxF

Pour montrer que GEXP15 est capable de se lier directement à la PfPP1c, des expériences de GST pull-down ont été utilisées avec différentes protéines recombinantes de GEXP15 de *P. falciparum* et *P. berghei*, tagguées 6-His.

Pour cela, nous avons utilisé la PfPP1c fusionnée à la GST. Le témoin négatif est apporté par la GST seule. Dans un premier temps, la portion N-terminale de PfGEXP15, comprenant le potentiel motif RVxF (PfGEXP15 $_{8-182}$), a été mise en contact des billes de glutathion agarose préalablement incubées avec la GST-PfPP1c ou la GST seule. La révélation du western-blot correspondant, avec un anticorps anti-His, montre que cette portion de PfGEXP15 interagit directement avec la PfPP1c (Figure 31A). On remarque également que PfGEXP15 $_{8-182}$ peut se dimériser et conserver sa capacité à interagir directement et spécifiquement avec la PfPP1c.

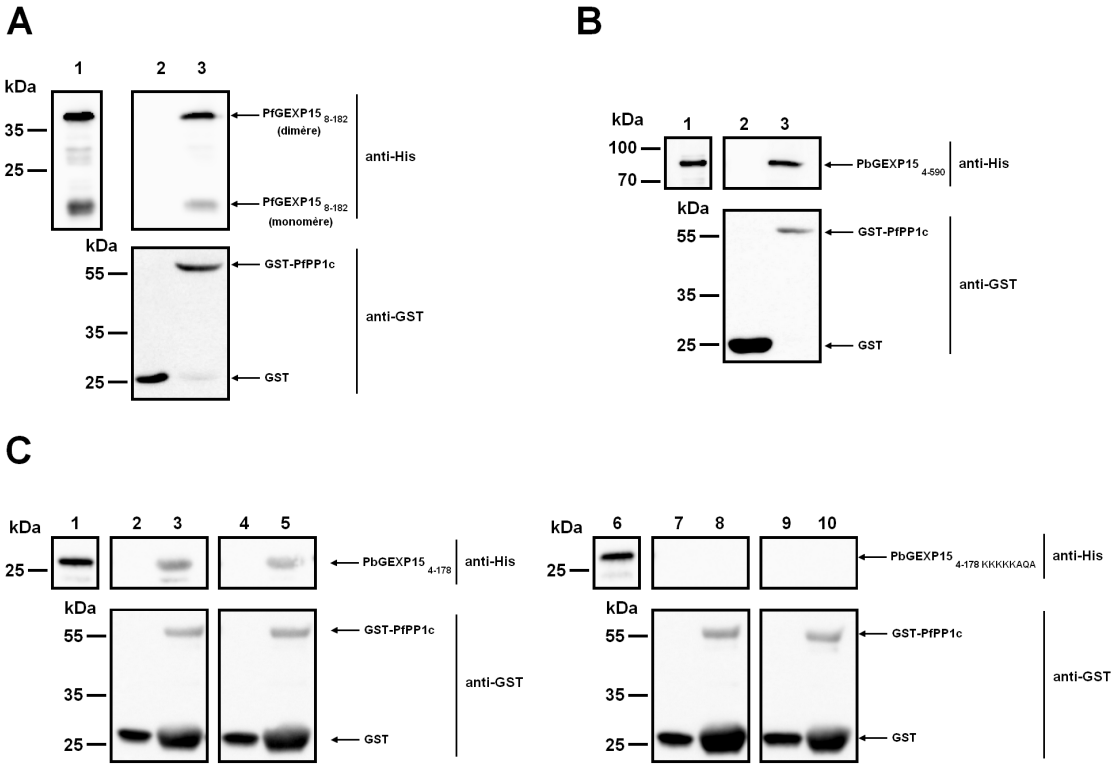

Figure 31 – Interaction directe entre GEXP15 et PfPP1c par GST pull-down. Les western-blots ont été hybridés avec des anticorps anti-His (partie supérieure) ou anti-GST (partie inférieure). 25% des protéines de GEXP15 ont été utilisées comme témoin de charge. **A.** 6-His-PfGEXP15 $_{8-182}$ a été incubée seule (piste **1**), avec la GST seule (piste **2**) ou la GST-PfPP1c (piste **3**). **B.** 6-His-PbGEXP15 $_{4-590}$ a été incubée seule (piste **1**), avec la GST seule (piste **2**) ou la GST-PfPP1c (piste **3**). **C.** 6-His-PbGEXP15 $_{4-178}$ a été incubée seule (piste **1**), avec la GST seule (pistes **2** et **4**) ou la GST-PfPP1c (pistes **3** et **5**) dans 150mM ou 500mM de NaCl respectivement. 6-His PbGEXP15 $_{4-178\ \mathrm{KKKKKAQA}}$ a été incubée dans le même ordre et conditions (pistes **6** à **10**).

Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant son orthologue de *P. berghei*, PbGEXP15 $_{4-590}$ (représentant 89% de la protéine complète) et PbGEXP15 $_{4-178}$ (FIGURE 31B et C). De façon intéressante, sous des conditions stringentes (NaCl 500mM), PbGEXP15 $_{4-178}$ conserve sa capacité à interagir avec la PfPP1c soulignant la robustesse de cette interaction, ce qui avait déjà été observée en double hybride chez la levure (croissance sur milieu SD-LWHA). Afin d'examiner davantage la contribution du motif d'interaction RVxF, une mutagenèse dirigée a été réalisée. Comme décrit dans la FIGURE 31D, PbGEXP15 $_{4-178}$ KKKKKAQA ne montre aucune interaction ni avec la GST-PfPP1c ni avec la GST seule dans les deux conditions de salinité, indiquant que le motif RVxF est impliqué et essentiel dans l'interaction directe GEXP15-PfPP1c.

IV GEXP15 augmente l'activité phosphatase de la PfPP1c

Nous avons montré que GEXP15 interagit directement avec la PfPP1c, *in vitro*, et que cette liaison nécessite un motif RVxF. Puisque ce motif est détecté chez 90% des régulateurs connus de la PP1c (Bollen *et al.* 2010), nous avons supposé que GEXP15 pourrait être impliquée dans la régulation de la PfPP1c. Toutes les protéines recombinantes de GEXP15 ont été testées en présence de la PfPP1c active en utilisant le test du para-nitrophényl phosphate (pNPP). Ce composé incolore est un substrat non spécifique de la phosphatase et son hydrolyse permet la libération d'un produit coloré, le para-nitrophénol. L'incubation de quantités croissantes de GEXP15 avec la PfPP1c montre une augmentation de l'activité phosphatase (FIGURE 32). Celle-ci est doublée en présence de 200pmol de PfGEXP15 $_{8-182}$ ou de 100pmol de PbGEXP15 $_{4-590}$ et PbGEXP15 $_{4-178}$.

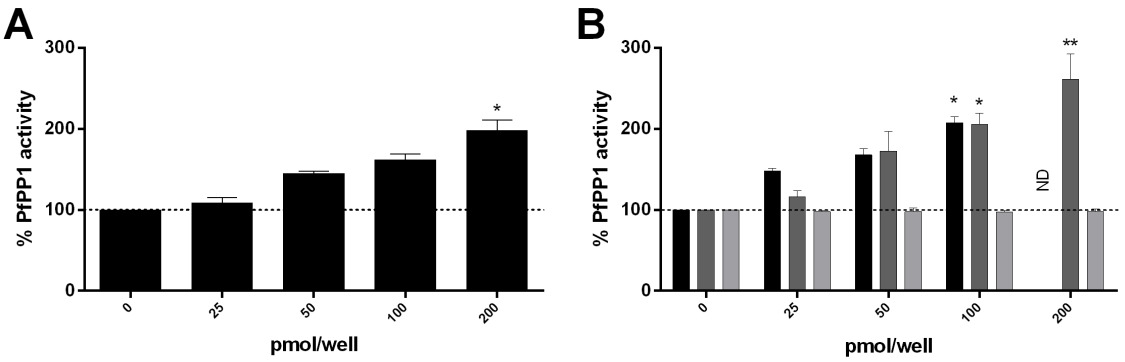

FIGURE 32 – Effet de PfGEXP15 et PbGEXP15 sur l'activité de la PfPP1c. A. PfPP1c a été pré-incubée pendant 30min à 37°C avec différentes concentrations de PfGEXP15 $_{8-182}$ avant l'addition du pNPP. La densité optique a été mesurée après 1h à 37°C. **B.** PfPP1c a été pré-incubée avec différentes concentrations de PbGEXP15 $_{4-590}$ (noir), PbGEXP15 $_{4-178}$ (gris foncé) et PbGEXP15 $_{4-178}$ KKKKKAQA (gris clair). Les résultats, présentés en % d'activité relative, ont été obtenus à partir de deux expériences indépendantes réalisées en duplicate (moyenne ± SD). * $p<0.05$ et ** $p<0.01$ (test de Krustal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple Dunn's comme post hoc), comparé à 100% d'activité phosphatase.

Dans ce test, PbGEXP15 $_{4-178}$ KKKKKAQA n'est pas capable d'interagir ou de réguler l'activité de la PfPP1c. En présence de PbGEXP15 $_{4-178}$, nous n'observons aucune

compétition indiquant que le mutant n'est pas capable de se lier avec la PfPP1c (données non présentées). L'absence de modulation de l'activité de la PfPP1c avec ce mutant, confirme que le motif RVxF est le principal contributeur dans cette interaction. L'ensemble de ces observations suggère que, *in vitro*, GEXP15 est un potentiel activateur de l'activité phosphatase de la PfPP1c.

V GEXP15 co-localise et interagit *in vivo* avec la PP1c chez *P. falciparum* et *P. berghei*

Les expériences *in vitro* ou l'utilisation de modèle hétérologue ont confirmé l'interaction et la présence d'un motif d'interaction de type RVxF permettant la liaison entre GEXP15 et la PfPP1c. Ces résultats nous ont conduits à analyser sa capacité à interagir avec la PP1c chez le parasite.

Tout d'abord, la localisation de GEXP15 chez le parasite a été étudiée. Chez *P. falciparum*, l'antisérum dirigé contre GEXP15 a été utilisé en immunofluorescence avec un anticorps secondaire conjugué FITC (collaboration avec le laboratoire du Dr Alano, Rome). Malgré la difficulté à obtenir un signal, aux stades gamétocytes II et III, PfGEXP15 semblerait être localisé au niveau nucléo-cytoplasmique (Figure 33).

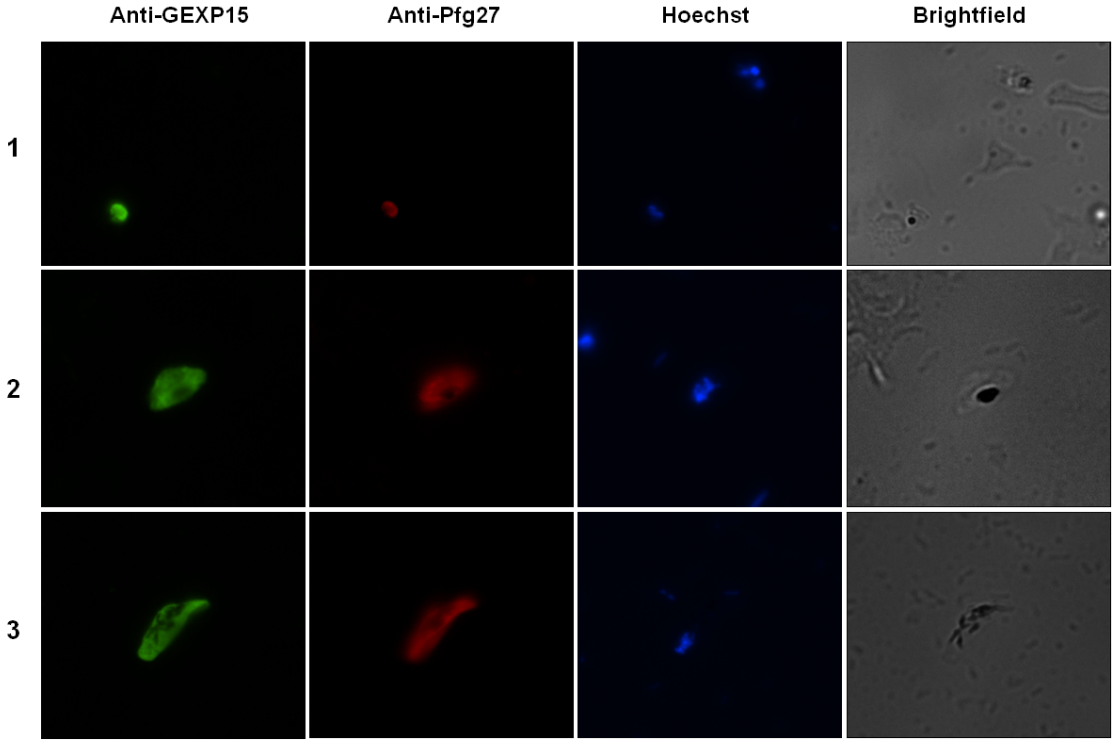

Figure 33 – Localisation de PfGEXP15 chez des gamétocytes jeunes de *P. falciparum*. Par immunofluorescence les protéines PfGEXP15 et Pfg27 ont été marquées à l'aide des antisérums dirigés contre elles-mêmes alors que le noyau est coloré par le Hoechst. Pfg27 est utilisée comme marqueur des gamétocytes de stades I (**1**), II (**2**) et III (**3**). L'expérience a été réalisée au laboratoire du Dr Alano.

Au cours de son identification lors de l'établissement d'un protéome des gamétocytes jeunes (Silvestrini *et al.* 2010), GEXP15 a été classée au sein d'une famille de 22 protéines, les Gametocyte EXported Proteins, décrites comme étant surexprimées ou exprimées uniquement dans les premiers stades de la gamétogenèse et prédites comme étant exportées. Parmi ces 22 membres, seulement 4 protéines, dont GEXP15, ne semblaient pas posséder de motif PEXEL putatif. Ce motif est connu et décrit comme étant impliqué dans l'exportation des protéines de *Plasmodium* (Hiller *et al.* 2004 ; Marti *et al.* 2004) mais d'autres mécanismes alternatifs existent (Heiber *et al.* 2013). Au vu des résultats, PfGEXP15 ne semble pas être exportée dans les premiers stades gamétocytaires.

Par ailleurs, la localisation de PbGEXP15 et PbPP1c endogènes a également été étudiée chez *P. berghei* par double recombinaison homologue avec l'ajout d'un tag HA (Figure 34A) (Pino *et al.* 2012). Dans le cas de PbPP1c, le génotypage a confirmé l'intégration (données non présentées) et la protéine HA-PbPP1c a été détectée par western-blot (Figure 36A). Par immunofluorescence réalisée à l'aide d'un anticorps anti-HA, nous observons que la PbPP1c est localisée au niveau du noyau et du cytoplasme parasitaire (Figure 35A), ce qui est en accord avec les différentes fonctions biologiques de la phosphatase chez les eucaryotes et avec le fractionnement subcellulaire réalisé précédemment chez *P. falciparum* (Daher *et al.* 2006).

Pour HA-PbGEXP15, le génotypage réalisé sur les parasites transfectés montre une intégration de la région promotrice et de la région 5'codante (Figure 34B). Afin de localiser PbGEXP15, une amplification du signal à l'aide du couple anti-HA-biotine et streptavidine-Texas Red a été requise. La protéine semblerait être nucléo-cytoplasmique au stade trophozoïte (Figure 35B). Cependant, HA-PbGEXP15 n'a pu être détectée par western-blot. La faible expression de PbGEXP15 selon les stades et l'absence de clonage des parasites pourraient expliquer cette absence de détection ainsi que de la nécessité d'utiliser un système d'amplification du signal fluorescent. Une immunoprécipitation va être réalisée afin de la concentrer et de la détecter par western-blot. Une RT-PCR est envisageable afin de palier toute absence de détection de la protéine. Une localisation au stade gamétocyte sera réalisée ultérieurement afin de compléter les résultats sur PbGEXP15.

Des modifications par ajout de tag -GFP ou mCherry sur GEXP15 de *P. falciparum* ou *P. berghei* ont également été tentées. Dans le cas de PfGEXP15-GFP et PbGEXP15-GFP (Tableau 5, page 85), malgré la confirmation de l'intégration par génotypage, les deux mutants n'ont ni été détectés par western-blot ni montré de fluorescence (données non présentées). Pour PbGEXP15-mCherry (Tableau 5), une localisation globalement similaire a été observée mais la protéine n'a pas pu être mise en évidence par western-blot (données non présentées).

PbPP1c et PbGEXP15 co-localisent donc à la fois dans le noyau et le cytoplasme, ce qui pourrait laisser présager d'une interaction *in vivo* au vu des résultats précédemment obtenus.

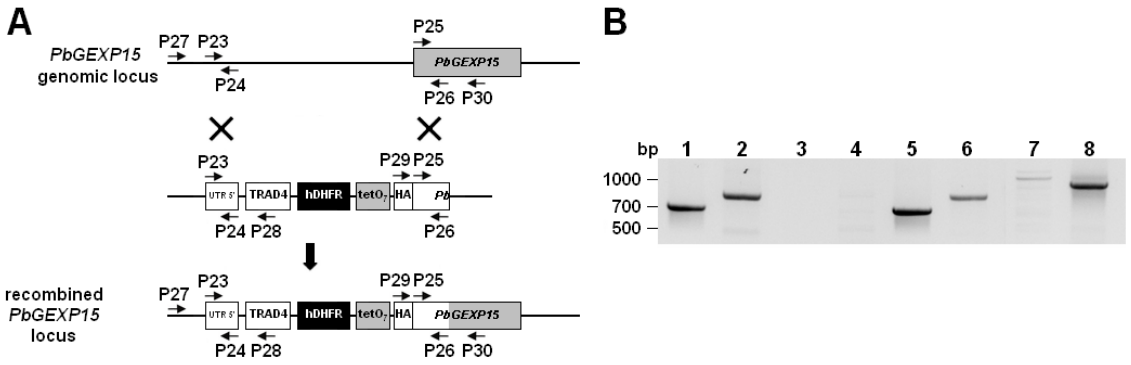

Figure 34 – Knock-in de PbGEXP15 chez *P. berghei*. A. Par double recombinaison homologue, PbGEXP15 est tagguée HA et placé sous le contrôle du promoteur inductible $TetO_7$. **B.** Vérification de l'intégration de HA-PbGEXP15. Les PCR sont réalisées sur de l'ADNg de parasites sauvages (pistes **1** à **4**) ou de parasites transfectés (pistes **5** à **8**) en utilisant les couples d'amorces P23-P24 (pistes **1** et **5**), P25-P26 (pistes **2** et **6**), P27-P28 (pistes **3** et **7**) et P29-P30 (pistes **4** et **8**). L'approche et les vérifications ont été utilisées de la même manière pour PbPP1c.

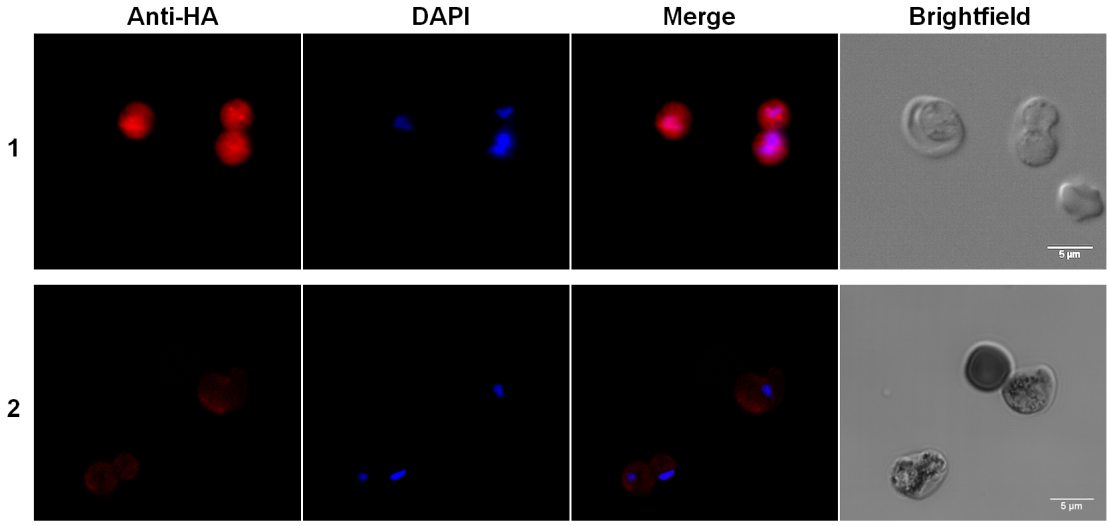

Figure 35 – Localisation de PbPP1c et PbGEXP15 chez des trophozoïtes de *P. berghei*. Par immunofluorescence, la protéine HA-PbPP1c (**1**) a été hybridée par des anticorps anti-HA suivi par une révélation avec des anticorps secondaires couplés à l'Alexa Fluor 594. La protéine HA-PbGEXP15 (**2**) a été détectée grâce à des anticorps anti-HA-biotine suivis par la streptavidine couplée au Texas Red. Le noyau a été coloré par DAPI.

Afin de réaliser une co-immunoprécipitation du complexe, la solubilité des protéines HA-PbPP1c et PbGEXP15 a été vérifiée, à partir d'extraits parasitaires de *P. berghei* (Figure 36A). L'immunoprécipitation de HA-PbPP1c, à l'aide de billes d'agarose couplées à des anticorps anti-HA, a été effectuée et a permis, après western-blot, de détecter PbGEXP15 endogène (Figure 36B). Cette co-immunoprécipitation confirme donc que le complexe PbPP1c-PbGEXP15 existe *in vivo* chez *P. berghei*.

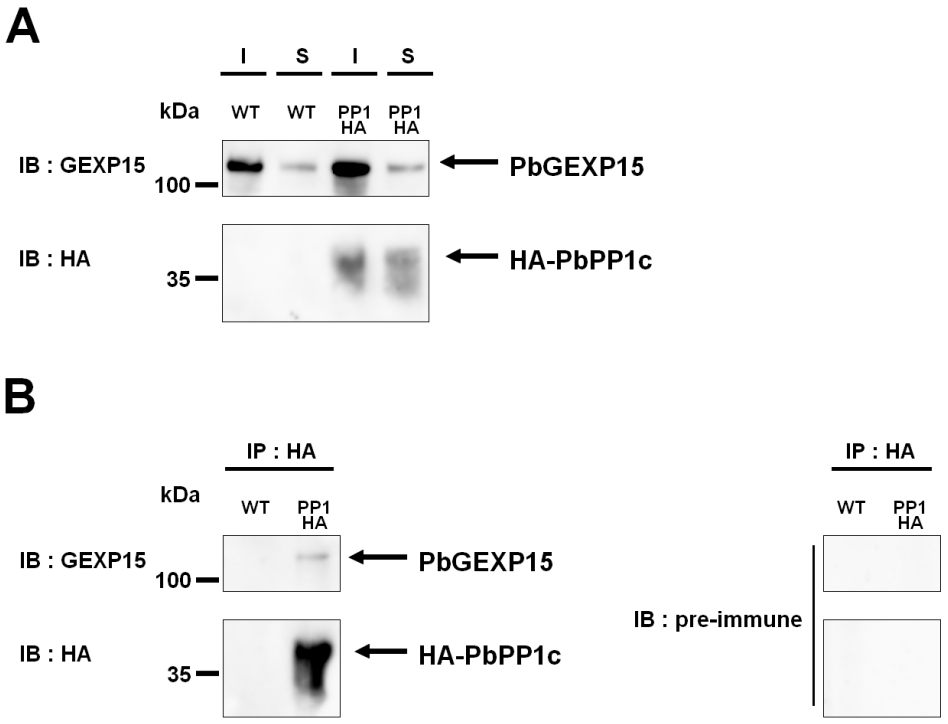

Figure 36 – Immunoprécipitation du complexe PbGEXP15-PbPP1c. A. Détection de PbGEXP15 endogène et HA-PbPP1c dans un extrait soluble (**S**) et insoluble (**I**) de *P. berghei*. **B.** Des billes-HA ont été utilisées sur un extrait de protéines solubles de *P. berghei* sauvage et avec le locus recombinant HA-PbPP1c. Le western-blot a été réalisé avec un sérum anti-GEXP15 (partie supérieure gauche), anti-HA (partie inférieure gauche) ou un sérum pré-immun de souris (partie droite) sur un immunoprécipitat (IP : HA).

VI GEXP15 est une protéine parasitaire essentielle ?

1 Knock-out de GEXP15 chez *P. falciparum* et *P. berghei*

Afin d'évaluer la fonction de GEXP15 et son impact sur la (sur)vie de *Plasmodium*, une délétion du gène a été entreprise.

Chez *P. falciparum*, l'interruption de PfGEXP15 a été réalisée, par simple recombinaison homologue avec le vecteur pCAM (Figure 37A). L'interruption de PfGEXP15 a été démontrée dans la souche 3D7 (Figure 37B), 21 semaines post-transfection. Ces parasites vont être clonés prochainement afin de pouvoir éventuellement observer un phénotype. La présence de parasites mutants laisse sous entendre que la délétion de PfGEXP15 n'est pas délétère aux stades asexuels sanguins chez *P. falciparum*. Cependant, après de multiples essais, notre souche 3D7 s'est montrée incapable de produire des gamétocytes, phénomène largement décrit pour 3D7 (Alano *et al.* 1995). La souche NF54, fournie par le Dr Alano, a alors été mise à profit afin de pouvoir étudier l'impact de GEXP15 dans la gamétogenèse, si des parasites viables étaient obtenus. Deux transfections sont actuellement en cours mais il est encore trop tôt pour pouvoir conclure (Tableau 5).

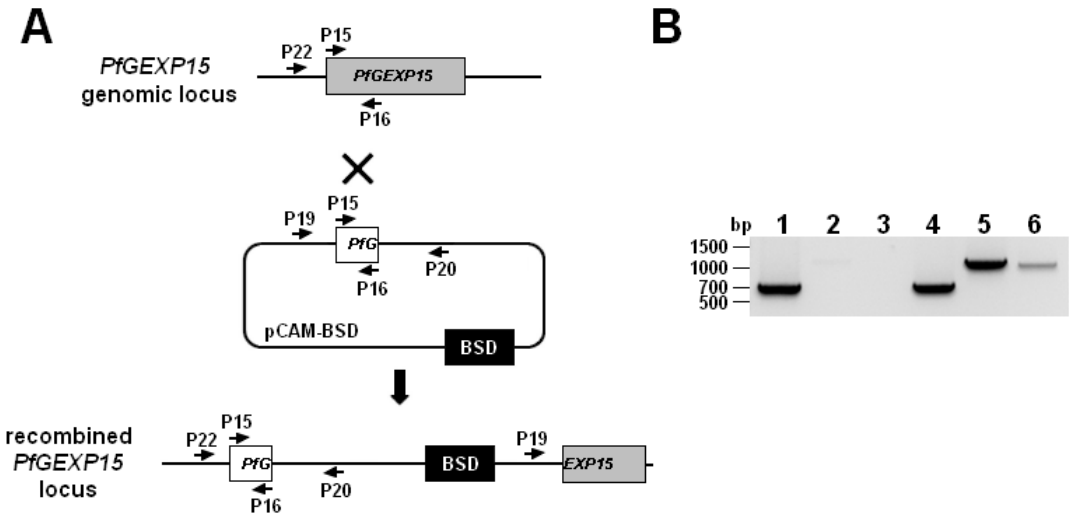

Figure 37 – Knock-out de PfGEXP15 chez *P. falciparum*. A. Par simple recombinaison homologue, PfGEXP15 a été interrompue par le gène conférant la résistance à la blasticidine (BSD). **B.** Vérification du knock-out de PfGEXP15 par PCR à partir de l'ADNg des parasites sauvages de la souche 3D7 de *P. falciparum* (pistes **1** à **3**) et des parasites transfectés de la souche 3D7 de *P. falciparum* (pistes **4** à **6**) en utilisant les couples d'amorces P15-P16 (pistes **1** et **4**), P19-P20 (pistes **2** et **5**) et P22-P20 (pistes **3** et **6**).

Dans le cas de *P. berghei*, une stratégie similaire a été mise en place. Une double recombinaison homologue, via les UTR 5' et 3', permet de remplacer complètement le gène PbGEXP15 par la TgDHFR, gène conférant la résistance à la pyriméthamine (Figure 38A). Après 4 tentatives infructueuses, par absence de parasites viables ou de stabilité de l'intégration (Tableau 5), la cinquième a permis d'obtenir des parasites stables délétés pour PbGEXP15. Cette délétion a été confirmée par génotypage et la présence du gène *pbgexp15* endogène semble même être sous le seuil de détection par PCR (Figure 38B). Afin d'analyser l'impact du knock-out de PbGEXP15, une cinétique a été réalisée sur des souris Balb/cJ infectées par *P. berghei* sauvage ou délété pour PbGEXP15 (Figure 38C). On remarque que jusqu'à 14 jours post-infection, la cinétique de la parasitémie est identique dans les deux groupes de souris. En revanche, à partir de J15, la parasitémie des souris infectées par *P. berghei* knock-out chute fortement et à partir de J17, plus aucun parasite n'est détectable. La délétion de GEXP15 semble donc impacter négativement la multiplication des parasites mutants.

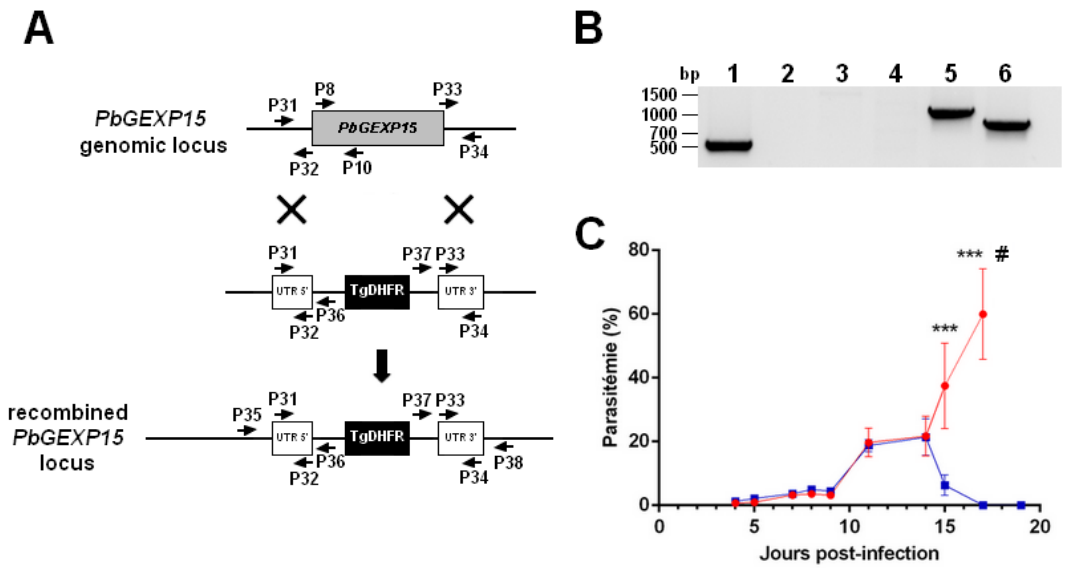

Figure 38 – Knock-out de PbGEXP15 chez *P. berghei*. A. Par double recombinaison homologue au niveau des UTR 5' et 3', PbGEXP15 a été remplacée par le gène TgDHFR conférant la résistance. **B.** Vérification du knock-out de PbGEXP15 par PCR à partir de l'ADNg des parasites sauvages (pistes **1** à **3**) et des parasites transfectés (pistes **4** à **6**) en utilisant les couples d'amorces P8-P10 (pistes **1** et **4**), P35-P36 (pistes **2** et **5**) et P37-P38 (pistes **3** et **6**). **C.** Parasitémie des souris infectés à 10^6 par *P. berghei* sauvage (rouge) ou *P. berghei* délété pour PbGEXP15 (bleu). L'expérience a été effectuée une seule fois sur 5 souris par groupe (moyenne ± SEM). # indique que la parasitémie a été calculée sur les 3 souris non-sacrifiées auparavant. *** $p<0.0001$ (Test T multiple avec correction Holm-Sidak).

2 Systèmes inductibles chez *P. berghei*

Afin d'explorer plus finement le rôle de GEXP15, des systèmes inductibles ont été testés.

Tout d'abord, la construction TRAD4-HA-PbGEXP15, qui a été utilisée pour la localisation, est à la base un système permettant un knock-down du gène cible, par une répression de la transcription par le couple AnhydroTétracycline (ATc) et le promoteur inductible $TetO_7$ (Figure 34A). Cependant, ce système a été testé au laboratoire et aucun knock-down n'a été observé pour les différents gènes d'intérêt. Dans le cas de PbGEXP15, la première transfection a abouti à une instabilité de l'intégration entravant toutes expérimentations (Tableau 5). La deuxième tentative, plus récente, semble être stable et à permis de réaliser les expériences d'immunofluorescence. Néanmoins, face aux multiples échecs d'induction, celle-ci n'a pas été retestée pour PbGEXP15.

Un deuxième système inductible, cette fois par dégradation de la protéine, a été utilisé (Philip et Waters 2015). Le gène PbGEXP15 a été fusionné à un domaine de liaison à l'auxine (AID) qui va permettre en présence de celle-ci, la prise en charge de la protéine PbGEXP15 par le protéasome et assurer sa dégradation dans une lignée de *P. berghei*, où le récepteur TIR1 a été rajouté par modification génétique (Figure 39A et B). La trans-

fection de la construction PbGEXP15-AID-HA a été accomplie et l'intégration détectée (FIGURE 39C). Cependant, la protéine PbGEXP15-AID-HA n'a pas encore été détectée par western-blot à l'aide d'anticorps anti-HA mais un clonage par tri cellulaire va être réalisé suivi par des tests d'induction et des analyses phénotypiques.

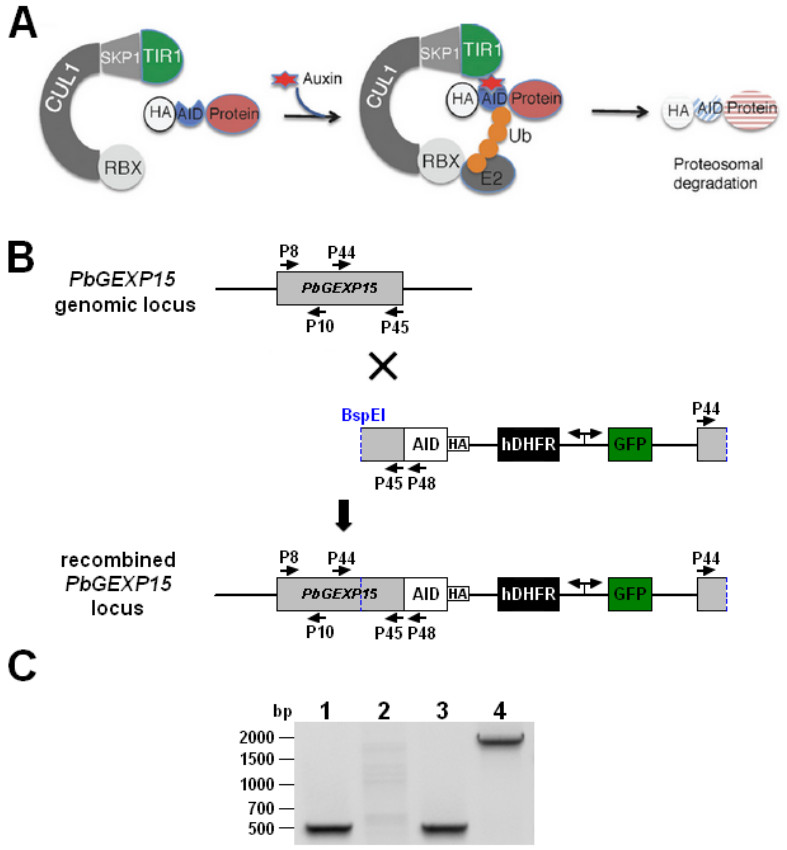

FIGURE 39 – Knock-out inductible de PbGEXP15 chez *P. berghei*. A. Schématisation du système de dégradation protéique. L'auxine promeut l'interaction entre le domaine AID (en bleu) et TIR1 (en vert). Le complexe ubiquitine ligase E3, TIR1-SKP1-CUL1-RBX, par le recrutement de la ligase E2, va favoriser l'ubiquitination et la dégradation de la protéine chimérique (d'après (Philip et Waters 2015)). **B.** Par simple recombinaison homologue, le gène de PbGEXP15 a été fusionné avec le domaine AID et le tag HA. Le gène de la hDHFR confère la résistance à la pyriméthamine. Le site de restriction BspEI a été généré par mutagenèse dirigée afin de linéariser le plasmide avant la transfection. La GFP libre est utilisée pour le clonage des parasites transfectés **C.** Vérification du knock-out inductible de PbGEXP15 par PCR à partir de l'ADNg des parasites sauvages (pistes **1** et **2**) et des parasites transfectés (pistes **3** et **4**) en utilisant les couples d'amorces P8-P10 (pistes **1** et **3**) et P8-P48 (pistes **2** et **4**).

Au vu de la difficulté pour obtenir des parasites knock-out ou knock-down de GEXP15, on peut supposer que la protéine est importante pour la survie du parasite. L'analyse des intégrants chez *P. falciparum* et *P. berghei* et des knock-down inductibles, nous permettra d'élucider le rôle biologique de GEXP15.

Tableau 5 – Récapitulatif de l'ensemble des transfections réalisées pour GEXP15 chez *P. falciparum* et *P. berghei*. Les intégrations ont été vérifiées pour l'ensemble des transfections ainsi que la présence du plasmide pour celles de *P. falciparum*. Des western-blots ont été effectués afin de détecter la protéine tagguée ou chimérique. Les vérifications réussies sont indiquées avec un + alors que les négatives le sont avec un -.

P. falciparum					
Souches	Constructions	Vérification			Remarque
		Plasmide	Intégration	Western-blot	
3D7	pCAM-BSD	+	+		Clonage en cours
NF54	pCAM-BSD				En cours
3D7	pCAM-GFP	+	+	-	Pas de fluorescence
NF54	pCAM-GFP	+	-		En cours

P. berghei				
Souches	Constructions	Vérification		Remarque
		Intégration	Western-blot	
ANKA	Knock-out	+		En cours (n=5)
ANKA	TRAD4	+	+	Instable
ANKA	TRAD4	+	-	En cours
ANKA	GFP	+	-	Pas de fluorescence
ANKA	mCherry	+	-	Fluorescence +
ANKA	AID	+	-	Clonage en cours

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Vecteurs

Les plasmides pGADT7/pGBKT7, pETDuet-1 et pGEX4T3 sont commercialisés par Clontech, Novagen et GE Healthcare Life Sciences. Les différents vecteurs pCAM, pPRF-TRAD4-TetO7, pBS-DHFR, pG362 et pL1886 ont été généreusement fournis par les Drs C. Doerig, D. Soldati-Favre, R. Tewari, N. Philip et B. Franke-Fayard respectivement. Les amorces utilisées sont regroupées en Tableau S7 (Annexes II).

Expérimentation animale

Les infections et la production de l'antisérum ont été réalisées chez des souris mâles CD1 (30g) (Charles River) ou des rats mâles Fisher (4 semaines) pour les transfections (Charles River). Des souris mâles Balb/cJ (10 semaines) (Janvier Labs) ont été utilisées pour le suivi de parasitémie des parasites pG230 sauvages et KO-PbGEXP15. Les différentes expérimentations et protocoles ont été validés par le Comité d'éthique en expérimentation animale 75. Nord Pas de Calais (Référence 00527.04).

Recherche dans les bases de données génomiques et analyse de séquences

Les différentes séquences de GEXP15 ont été recherchées sur la banque de données PlasmoDB. NCBI's conserved domain database, PSIPRED v3.3, IUPred et TMHMM v2.0 sont utilisées pour prédire la structure et les domaines de PfGEXP15. Les sites de phosphorylation sont prédits par NetPhos 3.1. L'alignement entre PfGEXP15 et PbGEXP15 a été effectué par BioEdit et ClustalW.

Tests en double hybride chez la levure

PfGEXP15 $_{8-182}$ clonée dans le vecteur pGADT7, provient de la banque d'ADNc de *P. falciparum* (Dualsystems Biotech) et a été purifiée après le criblage en double hybride chez la levure (Hollin *et al.* 2016). PbGEXP15 $_{4-629}$, PbGEXP15 $_{4-178}$, PbGEXP15 $_{446-596}$ ont été amplifiées par PCR sur l'ADNg de *P. berghei* en utilisant les couples d'amorces P1-P2, P2-P3, P4-P5 (Tableau S7) respectivement et clonées dans le vecteur pGADT7 (Clontech) par le système de In-Fusion HD Cloning (Clontech) selon les instructions du fournisseur. Gal4-DBD-PfPP1c a été clonée précédemment (Fréville *et al.* 2013). PbGEXP15 $_{4-178}$ $_{\text{KKKKKAQA}}$ et PfPP1c F255A/F256A ont été obtenues par mutagenèse dirigée avec l'Isis

DNA polymerase (MP Biomedicals) et pGADT7-PbGEXP15 $_{4-178}$ ou pGBKT7-PfPP1c comme matrices avec les couples d'amorces P11-P12, P13-P14 respectivement (Tableau S7). Les constructions en pGADT7 et pGBKT7 ont été transformées dans les souches de levures Y2H Gold et Y187 (Clontech) respectivement, et étalées sur le milieu Synthetic Defined agar dépourvu de leucine (SD-L) ou le milieu SD agar dépourvu de tryptophane (SD-W) respectivement et incubées à 30°C pendant 3-5 jours. Différents croisements sont réalisés et répandus sur le milieu sélectif SD-LW. Ils sont repiqués sur des milieux SD-LWH et SD-LWHA (L : Leucine, W : Tryptophane, H : Histidine, A : Adénine), plus stringents, à différentes dilutions (1:1, 1:25, 1:50). Les diploïdes sont incubés pendant 4-6 jours à 30°C. Les vecteurs vides pGADT7 ou pGBKT7 et pGBKT7-Laminine sont utilisés comme témoins négatifs.

Expression des protéines recombinantes et production de l'antisérum

Les régions codantes de PfGEXP15 $_{8-182}$, PbGEXP15 $_{4-590}$, PbGEXP15 $_{4-178}$ ont été obtenues par PCR avec les couples d'amorces P6-P7, P8-P9 et P8-P10 respectivement et clonées dans le vecteur pETDuet-1 (Novagen) en utilisant le système In-Fusion HD Cloning (Clontech). Les conditions de PCR consistent à 5min à 95°C suivies par 35 cycles à 95°C (30sec), 58°C (30sec) et 68°C (2min30), suivies par 7min à 68°C. PbGEXP15 $_{4-178}$ $_{\text{KKKKKAQA}}$ a été obtenue par mutagenèse dirigée avec l'Isis DNA polymerase (MP Biomedicals), pETDuet-1-PbGEXP15 $_{4-178}$ comme matrice et les amorces P11-P12 (Tableau S7).

Toutes les expressions des protéines recombinantes de GEXP15 sont réalisées en One Shot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent *E. coli* cells (Life Technologies) en présence de 0.5mM IPTG à 16°C pendant la nuit. Les bactéries sont récupérées dans un tampon non-dénaturant (20mM Tris, 500mM NaCl, 20mM Imidazole et un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche), pH 7.5) puis soumises à sonication et ultracentrifugation. Les culots sont resuspendus dans un tampon dénaturant (20mM Tris, 500mM NaCl, 6M Guanidine, 20mM Imidazole et un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche), pH 7.5) puis centrifugés, après 30min d'incubation. Les billes d'agarose Ni^{2+}-NTA (Macherey Nagel) sont utilisées pour purifier les protéines recombinantes comme précédemment décrit (Hollin *et al.* 2016). La GST-PfPP1c est produite selon le protocole préalablement établi (Tellier *et al.* 2016).

Les différentes protéines recombinantes sont analysées par SDS-PAGE et coloration au bleu de coomassie ou western-blots. Dans ce cas, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose, puis incubées avec des anticorps anti-His (dilution 1:2000) (Qiagen) suivis par des anti-IgG de souris HRP (dilution 1:50000). La détection est effectuée par chimiluminescence avec SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Life Technologies). Les protéines recombinantes sont quantifiées par le test Pierce™ BCA Protein (Life Technologies).

Afin de produire un antisérum, la protéine recombinante PbGEXP15 $_{4-178}$ est mixée avec du Alu-Gel-S (Serva) et administrée à des souris CD1 par voie intrapéritonéale. Les souris sont boostées aux jours 21 et 35. L'antisérum est collecté et testé une semaine après le dernier boost.

Tests d'interaction par GST pull-down

Les billes de sépharose-glutathione (Sigma-Aldrich) couplées avec la GST-PfPP1c sont incubées toute la nuit à 4°C avec 2µg de PfGEXP15 $_{8-182}$, PbGEXP15 $_{4-590}$, PbGEXP15 $_{4-178}$ ou PbGEXP15 $_{4-178\ \text{KKKKKAQA}}$ et 25µg de BSA dans 20mM Tris, 150 ou 500mM NaCl, 0.2mM EDTA, 20mM Hepes, 1 mMDTT, 0.1% Triton X-100, cocktail d'inhibiteurs de protéases et 1mM $MnCl_2$. Après 5 lavages dans le même tampon, les protéines liées aux billes sont analysées par western-blots avec des anticorps anti-His (1:2000) ou anti-GST (1:2000) (Invitrogen) comme décrit ci-dessus.

Effet de GEXP15 sur l'activité de la PfPP1c

Le rôle de GEXP15 sur l'activité de la PfPP1c est étudié en utilisant le test du p-nitrophenyl phosphate (pNPP). Différentes quantités de PfGEXP15 $_{8-182}$, PbGEXP15 $_{4-590}$, PbGEXP15 $_{4-178}$ et PbGEXP15 $_{4-178\ \text{KKKKKAQA}}$ sont incubées avec 40pmol de PfPP1c pendant 30min à 37°C. La réaction enzymatique est initiée par l'ajout du substrat pNPP dans le milieu réactionnel (Sigma-Aldrich) et l'absorbance est mesurée à 405nm (Thermo Scientifc Multiskan FC).

Les deux expériences sont effectuées en duplicate et un test de Krustal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple Dunn's comme post hoc, est réalisé avec GraphPad Prism afin de comparer l'activité phosphatase en présence et en absence de GEXP15.

Génération et analyse des parasites transfectés de *P. falciparum*

Les souches 3D7 et NF54 de *P. falciparum* sont cultivées selon Fréville *et al* (Fréville *et al.* 2012) dans du milieu de culture RPMI1640 avec 0.4% AlbuMAX™ II Lipid-Rich BSA (Life Technologies).

Afin d'interrompre le gène de *pfgexp15*, un produit PCR (666 pb) de la portion 5' a été obtenu en utilisant les amorces P15-P16 (Tableau S7) sur l'ADNg de *P. falciparum* 3D7 et cloné dans le vecteur pCAM-BSD, contenant la cassette conférant la résistance à la blasticidine. L'accessibilité du locus de PfGEXP15 est vérifiée par transfections avec pCAM-PfGEXP15-GFP. Le vecteur a été généré par l'amplification, par PCR, de la portion 3' de PfGEXP15 (588 pb) en utilisant les amorces P17-P18 (Tableau S7) sur l'ADNg de *P. falciparum* 3D7. Les transfections sont réalisées avec 75µg de plasmide et par l'électroporation des stades anneaux ou érythrocytes sains (Hasenkamp *et al.* 2012) suivie par l'ajout des stades trophozoïte/schizonte des souches de 3D7 ou NF54. La pression de sélection à la blasticidine (Invitrogen) est appliquée 24-48h après les transfections à une concentration finale de 2.5µg/ml et renouvelée chaque jour lors de la première semaine puis trois fois par semaine.

L'ADN total est extrait avec le kit KAPA Express Extract (KAPA BioSystems) (instructions du fournisseur) à partir d'érythrocytes infectés préalablement lysés avec de la saponine (Umlas et Fallon 1971).

Les analyses génotypiques des mutants sont effectuées par PCR en utilisant l'Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) et les couples d'amorces P22-P20 et P21-P20 (Tableau S7) pour pCAM-PfGEXP15-BSD et pCAM-PfGEXP15-GFP respectivement. La présence des vecteurs est vérifiée avec les amorces P19-P20.

Détection de GEXP15 dans les stades asexuels et sexuels de *P. falciparum* et *P. berghei*

Pour les western-blots, les gamétocytes jeunes sont obtenus par parasitémie élevée d'une culture de *P. falciparum* NF54 traitée avec du N-acetylglucosamine selon la méthode précédemment décrite (Suárez-Cortés *et al.* 2016). Les gamétocytes et les stades asexuels âgés sont purifiés par Magnetic-activated cell sorting. Les extraits parasitaires, provenant des cultures synchrones de *P. falciparum* NF54, sont hybridés avec un sérum anti-GEXP15 (dilution 1:100) ou un sérum pré-immun de souris, puis avec des anticorps Mouse True-Blot® Ultra : Anti-Mouse Ig HRP (1:2000, eBioscience). Les extraits de *P. berghei* sont obtenus à partir de schizontes matures, enrichis sur un gradient de Nycodenz 50%.

Génération et analyse des parasites transfectés de *P. berghei*

Pour le knock-out du gène de *pbgexp15*, les produits PCR ont été générés à partir des régions UTR 5' et 3' en utilisant les couples d'amorces P31-P32 (847 pb), P33-P34 (695 pb) (Tableau S7) et l'ADNg de *P. berghei* comme matrice. Les inserts ont été clonés dans le vecteur pBS-DHFR (Tewari *et al.* 2010) et la construction a été linéarisée par XbaI-ApaI avant la transfection.

Dans le cas du système knock-down inductible TRAD4-TetO7, l'UTR 5' et la région codante 5' des gènes de *pbgexp15* et *pbpp1c* ont été amplifiés par PCR en utilisant les couples d'amorces P23-P24 (775 pb), P25-P26 (706 pb) et P49-P50 (648 pb), P51-P52 (839 pb) (Tableau S7) respectivement avec comme matrice, l'ADNg de *P. berghei*. Les produits PCR ont été clonés dans le plasmide (Pino *et al.* 2012) et les constructions ont été linéarisées par NheI-BglII avant la transfection.

Afin d'utiliser le système inductible à l'auxine (Philip et Waters 2015), la région 3' codante de PbGEXP15 a aussi été amplifiée avec les amorces P44 et P45 (1332 pb). Les amorces P46 et P47 ont servi à générer une mutation silencieuse par mutagenèse dirigée, afin d'obtenir un site BspEI interne pour la linéarisation du plasmide pG362 avant transfection (Philip et Waters 2015).

Les transfections de *P. berghei* sont effectuées selon Janse *et al* (Janse *et al.* 2006) avec une légère modification du milieu de culture utilisé pour la maturation des schizontes (milieu de culture RPMI1640 avec 0.4% AlbuMAX™ II Lipid-Rich BSA (Life technologies)). Tous les plasmides linéarisés sont transfectés par électroporation dans la lignée pG230 de *P. berghei* ANKA (Philip et Waters 2015). Les parasites transfectés sont positivement sélectionnés par l'ajout de pyriméthamine dans l'eau de biberon, 30h après la transfection.

Les érythrocytes parasités sont lysés avec le Red blood cell Lysing buffer (Sigma-Aldrich), puis l'ADN est extrait à l'aide du kit KAPA Express Extract (KAPA BioSystems) selon les instructions du fournisseur. La délétion du gène est vérifiée par PCR en utilisant les couples d'amorces P35-P36 et P37-P38. P27-P28 et P29-P30 sont utilisées pour le génotypage de TRAD4-TetO7-PbGEXP15 et P53-P28, P29-P54 pour celui de TRAD4-TetO7-PbPP1c (Tableau S7). PbGEXP15-AID-HA est vérifiée avec les amorces P8-P48.

Immunoprécipitation

Les schizontes matures de TRAD4-TetO7-PbPP1c, purifiés par gradient de Nycodenz 50%, sont repris dans 50mM Tris, 0.5% triton X-100 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche), pH 8. Après 10 cycles de congélation-décongélation puis sonication, la fraction soluble est obtenue après des centrifugations répétées à 13000 rpm et à 4°C. Les billes HA Epitope Tag Antibody, Agarose conjugate (Life technologies), sont pré-incubées avec de la BSA, puis mixées avec l'extrait protéique soluble des parasites, pendant la nuit à 4°C dans un tampon : 20mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% triton X-100 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche), pH 7.5. Les billes sont lavées et l'élution est effectuée dans un tampon de charge Laemmli 3min à 100°C. Les western-blots sont réalisés comme décrit ci-dessus et hybridés avec un sérum anti-GEXP15 (1:100) ou un sérum pré-immun de souris, puis par des anticorps Mouse TrueBlot® Ultra : Anti-Mouse Ig HRP (1:2000, eBioscience) ou par des anticorps anti-HA-Tag Rabbit mAb (1:2000, Cell Signaling Technology) puis par des anticorps goat anti-rabbit IgG-HRP (Sigma-Aldrich).

Localisation de GEXP15

Un frottis des gamétocytes jeunes de *P. falciparum* NF54 est réalisé, puis les cellules sont fixées et perméabilisées dans l'acétone. Après plusieurs lavages au PBS et une saturation au PBS 3% BSA, pendant 30min, le sérum de souris anti-GEXP15 (1:100) ou de lapin anti-Pfg27 (1:200) sont appliqués pendant 1h. Après lavages, une incubation est effectuée avec des anticorps secondaires anti-souris ou anti-lapin, couplées FITC ou Texas Red respectivement. Les noyaux sont marqués à l'Hoechst pendant 10min. Les images sont obtenues par le microscope Leica DMR fluorescence et une caméra refroidie CCD (Leica).

Le sang de souris infectées par des parasites transfectés, est fixé avec 4% paraformaldéhyde et 0.075% glutaraldéhyde pendant 24h à 4°C. Après plusieurs lavages au PBS, les cellules sédimentent sur des lamelles recouvertes de Poly-L-lysine, pendant 1h. Les cellules sont perméabilisées et saturées avec du PBS, 0.5% triton X-100 et 1% BSA pendant 30min.

Dans le cas de PbGEXP15, les anticorps anti-HA, conjugués à la biotine (Abcam), sont dilués au 1:200 dans du PBS 1% BSA et appliqués pendant 1h à 37°C. Les lamelles sont lavées au PBS puis incubées avec de la streptavidine-Texas Red au 1:400 (Sigma-Aldrich) dans du PBS 1% BSA, en plus du DAPI, pendant 1h à 37°C. Une imagerie confocale est menée avec le microscope LSM880 (Zeiss).

Pour PbPP1c, la même méthode est réalisée avec des anticorps anti-HA Rabbit mAb (1:200, Cell Signaling Technology) puis Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed, Alexa Fluor 594 (1:1000, Life Technologies) et les images obtenues avec l'AxioImager Z1-Apotome (Zeiss).

L'ensemble des images de *P. falciparum* et *P. berghei* sont traitées avec ImageJ.

Discussion

Discussion

L'étude des phosphatases et notamment de la Ser/Thr protéine phosphatase de type 1 chez *Plasmodium falciparum* (PfPP1c), est l'un des principaux objectifs du laboratoire. Cette phosphatase, conservée chez l'ensemble des eucaryotes, est régulée par une multitude de sous-unités régulatrices. Celles-ci sont particulièrement bien décrites chez l'Homme, au contraire de *P. falciparum* dont seulement 4 régulateurs ont été identifiés par génomique comparative et caractérisés. Afin d'identifier de nouveaux régulateurs, l'établissement d'un interactome de la PfPP1c a été le premier objectif de cette thèse. Dans cette partie les résultats de l'interactome de la PfPP1c seront discutés puis ceux obtenus lors de la caractérisation de GEXP15.

Interactome de la PfPP1c

Le premier interactome de la PfPP1c a été établi par l'utilisation de trois approches.

La colonne d'affinité et l'identification par spectrométrie de masse

Tout d'abord, l'identification par la colonne d'affinité de la PfPP1c a permis de mettre en évidence 6 partenaires potentiels (Table 1 (Annexes I)). Une expérience assez similaire, par immunoprécipitation de la PP1c γ_2 humaine, suivie d'une identification par spectrométrie de masse, avait détecté 7 protéines (Fardilha *et al.* 2011). On peut supposer que le faible nombre de protéines identifiées, dans leur expérience et la notre, peut être dû à une identification par spectrométrie de masse, uniquement sur les bandes discernables après coloration. En effet, avec cette méthode, seuls les partenaires abondants sont détectés. De plus, pour pouvoir interagir avec notre colonne d'affinité, les interactants doivent être libres ou du moins avoir une affinité suffisamment forte dans le cas d'une compétition.

Un test d'interaction de type ELISA a confirmé l'interaction entre 5 candidats et la PfPP1c, et celle-ci est directe *in vitro*. Le dernier partenaire n'a pu être produit et testé sous forme recombinante.

Par ailleurs, notre approche a mis en évidence la chaperonne HSP70 comme éventuel partenaire de la PP1c. La fonction de cette protéine pourrait laisser penser que le complexe se forme uniquement dans le but d'éviter une agrégation ou une mauvaise conformation de la phosphatase. Cependant, la HSP70 a été identifiée comme partenaire potentiel par différentes approches (Fardilha *et al.* 2011 ; Flores-Delgado *et al.* 2007) et la présence de motifs RVxF et Fxx[RK]x[RK] potentiels chez la PfHSP70, suggérerait que la chaperonne

interagit bien avec la PP1c. Ce résultat a d'ailleurs été confirmé par un test d'interaction de type ELISA (Figure 2 (Annexes I)).

Outre les deux protéines chaperonnes HSP, les quatre autres partenaires correspondent à des enzymes. Plusieurs sérines/thréonines ont été décrites sur ces protéines comme étant phosphorylées. Une régulation de leur activité par déphosphorylation de la PfPP1c est donc envisageable.

Le criblage par double hybride chez la levure

La deuxième approche, par le criblage en double hybride chez la levure avec la PfPP1c comme appât, a permis l'identification de 134 protéines. L'analyse des séquences a démontré que 23 de ces gènes étaient en cadre de lecture avec le domaine Gal4-AD et 103 en décalage. Dans le cas de ces derniers, la capacité des levures a exprimer des protéines en décalage de cadre a déjà été démontrée (Fromont-Racine *et al.* 1997) et 8 gènes ont été détectés en cadre et en décalage de lecture, ce qui confirme qu'ils peuvent être considérés comme de réels partenaires. Ce décalage pourrait permettre, dans certains cas, de réduire la toxicité de ces protéines par diminution de leur expression (Chidley *et al.* 2011). En effet, l'une des limites de cette approche est l'expression de protéines potentiellement toxiques pour la levure. Il nous a alors semblé logique de conserver ces protéines comme pouvant être des partenaires de la PfPP1c.

Afin de valider les partenaires obtenus, un test d'interaction de type ELISA a été utilisé. Quinze protéines recombinantes ont été produites sur les 30 sélectionnées (50% de succès) et l'interaction a été confirmée pour 12 d'entre elles. L'une des trois protéines non validées fait partie des partenaires en décalage de cadre. Cependant, les données concernant ces gènes ne sont pas suffisantes pour généraliser sur la validité de celles-ci par rapport à celles en cadre. En effet, hormis la protéine non validée, une seule autre protéine hors cadre a été produite et validée. Le taux de réussite lors de la production des protéines dont le gène est en décalage de cadre, n'atteint que les 25%. On peut donc supposer que ce décalage favorise bien l'expression de protéines toxiques pour les levures ou les bactéries.

Par ailleurs, les histones H2A et H2B ont été également identifiées par double hybride chez la levure en décalage de cadre de lecture pour les deux protéines mais aussi en cadre pour H2B. H2A était déjà décrite pour interagir et être déphosphorylée par la PP1c chez *S. cerevisiae* (Table S2 (Annexes I)) (Costanzo *et al.* 2010). La forte identité entre HsH2A, HsH2B et PfH2A, PfH2B respectivement, nous a permis d'utiliser les protéines humaines commerciales et de valider les interactions par un test de type ELISA. Des résultats préliminaires ont été obtenus avec le test pNPP. HsH2A entraîne une diminution de l'ordre de 30% de l'activité de la PfPP1c en présence de 250pmol de protéine recombinante alors que l'effet de HsH2B n'est pas clairement établi (données non présentées). Cette diminution pourrait s'expliquer par une inhibition de l'activité de la PfPP1c ou tout simplement par une compétition entre HsH2A et le pNPP. En effet, on peut supposer que même si la protéine recombinante HsH2A n'est pas phosphorylée, elle interagit, *in vitro*, avec la PfPP1c qui ne peut alors plus cibler et déphosphoryler le pNPP.

Le criblage *in silico* du motif d'interaction RVxF

La dernière approche a consisté en la recherche d'un motif d'interaction stringent de type RVxF, dans le génome de *P. falciparum*. Elle a permis d'identifier 55 protéines et l'analyse de ces motifs RVxF putatifs (FIGURE 40) a établi une séquence consensus hautement spécifique pour le cas de *P. falciparum* : $[K_{13}L_{12}I_7V_6][K_{18}N_8I_8R_5][K_{52}R_{13}][K_{55}R_{10}][K_{19}N_{15}S_{13}T_5]V[S_{22}H_{11}T_9R_6Q_6N_6][F_{60}W_5]$. Un criblage d'autres motifs connus pour interagir avec la PP1c aurait pu être réalisé mais nous avons fait le choix de nous concentrer sur le motif principal qu'est le RVxF.

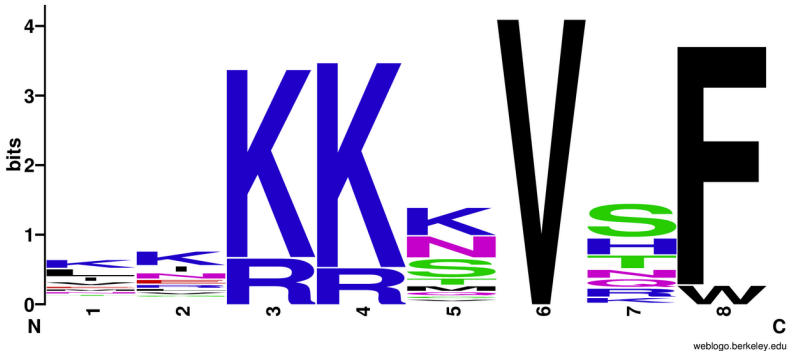

FIGURE 40 – Représentation Weblogo de l'alignement des motifs RVxF putatifs des protéines criblées *in silico*. La hauteur des lettres représente la fréquence de l'acide aminé parmi les 65 séquences testées des 55 protéines.

Lorsque l'on examine les acides aminés fréquents selon la position, on remarque qu'en amont de la valine, la lysine est à chaque fois la plus abondante, ce qui confirmerait qu'un environnement basique en position 1 à 5 du motif accentuerait l'affinité du RVxF avec la PP1c (Bollen *et al.* 2010 ; Meiselbach *et al.* 2006). En position 7, on note un enrichissement en sérines et thréonines suggérant qu'une phosphorylation à cet emplacement est envisageable et influencerait la capacité du motif à interagir avec la PP1c. Ce mécanisme a déjà été décrit chez certains régulateurs (Bollen *et al.* 2010 ; Siddoway *et al.* 2013). La phénylalanine en position 8 est largement prédominante au tryptophane.

Afin de confirmer la pertinence du criblage, nous nous sommes intéressés à la conservation de ces motifs chez les *Plasmodium* et plus particulièrement *P. berghei*. Sur les 55 potentiels partenaires criblés de *P. falciparum*, 50 ont un homologue chez *P. berghei*. Parmi ceux-là, sur les cinq protéines de *P. falciparum* possédant au moins deux RVxF putatifs, trois de leurs homologues conservent au moins l'une de ces séquences. Pour les protéines ayant, au plus, un potentiel RVxF stringent, 18 conservent exactement le même motif ou avec des mutations suffisantes (40%) pour maintenir la séquence consensus de Wakula alors que 27 perdent le motif criblé. La conservation des séquences au cours de l'évolution, peut être un signal encourageant sur la véracité de celles-ci à être un motif RVxF.

De la même manière que précédemment, un test d'interaction de type ELISA a été utilisé dans le but de confirmer la formation des complexes entre les différents candidats et la PfPP1c, *in vitro*. L'interaction a été validée pour 16 des 17 protéines recombinantes produites confirmant que cette approche *in silico* est une méthode complémentaire et valable afin d'identifier des partenaires de la PP1c.

Bilan de l'interactome de la PfPP1c

Au total, 186 partenaires putatifs de la PfPP1c ont été révélés. Le taux de recouvrement entre les différentes approches (Figure 1 (Annexes I)) est assez faible et peut s'expliquer par la complémentarité des méthodes utilisées. Ce fut également le cas lors d'un criblage par double hybride chez la levure et par immunoprécipitation de différentes isoformes de la HsPP1c, où la vaste majorité des protéines détectées étaient de nouveaux partenaires encore inconnus (Fardilha *et al.* 2011).

On peut remarquer que sur les 9 protéines identifiées par deux approches différentes, 7 ont pu être vérifiées par le test d'interaction de type ELISA et 6 d'entre-elles font partie des 13 meilleurs résultats d'interaction (histones exclues). Ces potentiels partenaires sont donc d'excellents candidats pour étudier leur capacité à se lier avec la PfPP1c, voire à la réguler. L'analyse de l'interaction de cinq de ces protéines sont ou ont été approfondis au cours de différentes thèses. Il s'agit des protéines Liver Stage Antigen 3 (LSA3, PF3D7_0220000), PF3D7_0919900, PF3D7_1106800, PF3D7_1202600 et de Gametocyte EXported Protein 15, l'objet de cette thèse. Dans le cas de LSA3 et PF3D7_0919900, elles ont été confirmées pour interagir avec la PfPP1c et la mutation de leur potentiel RVxF stringent, entrave fortement l'interaction (Figure 2D (Annexes I)). La protéine recombinante de LSA3, produite en condition non-dénaturante, ne module pas l'activité phosphatase de la PfPP1c au cours d'un test pNPP (données non présentées). Ce résultat préliminaire indiquerait que LSA3 n'est pas capable de réguler l'activité de la PfPP1c, du moins en test pNPP, *in vitro*.

Hormis la validation par le test de type ELISA, d'autres éléments viennent confirmer la liste établie. Tout d'abord, 139 partenaires putatifs ont été identifiés par colonne d'affinité et double hybride et environ 36% des portions détectées ont, au moins, une séquence suivant un motif RVxF ou Fxx[RK]x[RK] (Table S1 et S3 (Annexes I)). Même si probablement toutes les séquences ne sont pas de réels motifs d'interaction, on peut supposer qu'une bonne partie de ces séquences sont impliquées dans la formation d'un complexe avec la PfPP1c. De plus, d'autres motifs peuvent exister ou existent sur la protéine entière.

Par ailleurs, 8 protéines sont déjà décrites comme interagissant avec la PP1c chez d'autres organismes (Table S2 (Annexes I)). Dans le cas des quatre régulateurs déjà caractérisés chez *P. falciparum*, aucun n'a pu être détecté lors de l'utilisation de ces trois approches. Cela peut s'expliquer par la faible expression de PfI3, ce qui n'est pas propice à une détection par affinité et par double hybride chez la levure (Fréville *et al.* 2012) alors que les gènes sauvages de PfI2 et PfLRR1 ne s'expriment pas chez la levure. L'utilisation d'un gène synthétique, optimisé pour l'expression, a permis la production de PfI2 chez la levure (Fréville *et al.* 2013) mais n'a pas fonctionné pour PfLRR1 (données personnelles). De plus, ces quatre régulateurs ne possèdent pas de motif RVxF stringent, expliquant leur absence lors du criblage *in silico*.

L'ensemble des partenaires identifiés de la PfPP1c a permis d'établir divers réseaux déjà décrits comme impliquant la phosphatase comme dans la maintenance de l'ADN, la transcription ou la traduction (Figure 41). Un réseau basé sur des protéines impliquées dans la pathogénicité suggère que la PfPP1c est impliquée dans cette voie. Ces différents

réseaux confirment les vastes fonctions biologiques de la PP1c chez *P. falciparum* et pourront servir d'ébauche afin d'identifier les fonctions d'une multitude de protéines encore inconnues.

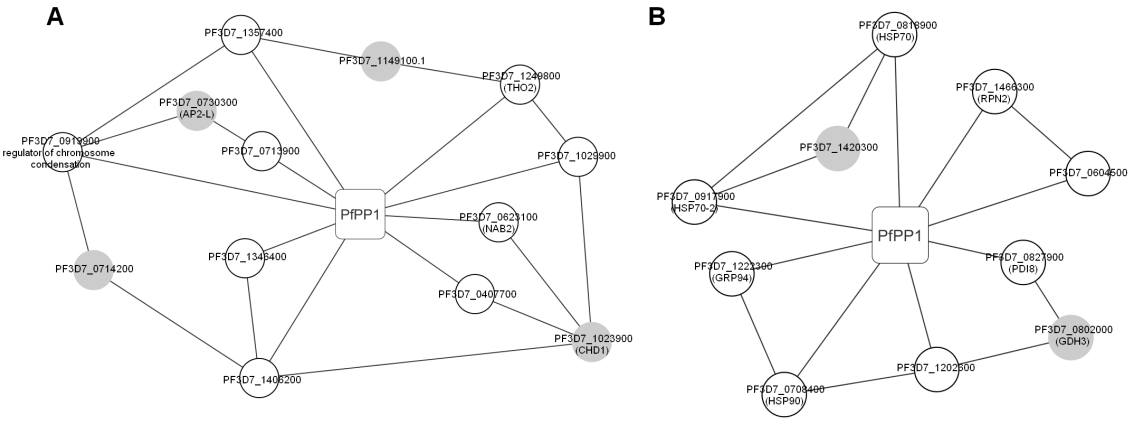

Figure 41 – Réseaux d'interaction de la PfPP1. A. Sous-réseau de la transcription et de la maintenance de l'ADN. **B.** Sous-réseau de la protéolyse et de la conformation protéique. Les graphiques montrent les interactions (lignes) entre les partenaires identifiés lors de l'interactome (cercles blancs) et la PfPP1. Les cercles gris représentent les protéines de connexion basées sur de précédents résultats (LaCount *et al.* 2005). Les noms des gènes disponibles sur PlasmoDB sont indiqués entre parenthèses.

Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de GEXP15

A partir des données obtenues lors de l'établissement de l'interactome de la PfPP1c, Gametocyte EXported Protein 15 (GEXP15), a été classée parmi les meilleurs candidats partenaires de la phosphatase. La caractérisation de la protéine a donc été le second objectif de cette thèse.

Environnement génétique particulier

GEXP15 se situe sur le chromosome 10 chez *P. falciparum*. Il est intéressant de remarquer que le gène situé en aval de GEXP15 (PF3D7_1031600) est l'inhibiteur 3 de la PfPP1c (PF3D7_1031700) et que LRR1 (PF3D7_1032800), lui, se situe à moins de 40kb en aval de GEXP15. De plus, lorsque l'on observe les gènes environnants dans une zone de 120kb, on note, outre GEXP15, I3 et LRR1, la présence de trois autres partenaires putatifs mis en évidence lors de l'interactome de la PfPP1c (Figure 42A). Il s'agit des gènes PF3D7_1029400, PF3D7_1029900 et PF3D7_1032000. Le premier a été identifié par le criblage *in silico* et confirmé en test ELISA alors que les deux derniers sont issus du double hybride chez la levure.

La probabilité que GEXP15 se situe juste à proximité de ces 5 autres régulateurs putatifs ou confirmés, dans cette région de 120kb, n'est que de 0.1% si on émet l'hypothèse que les 5300 gènes de *P. falciparum* sont répartis aléatoirement (loi binomiale). Cependant, il est fort probable que la disposition des gènes n'est pas aléatoire. Dans le génome humain, il apparait que la distance, l'orientation des gènes peut avoir une influence sur leur régulation (Gherman *et al.* 2009).

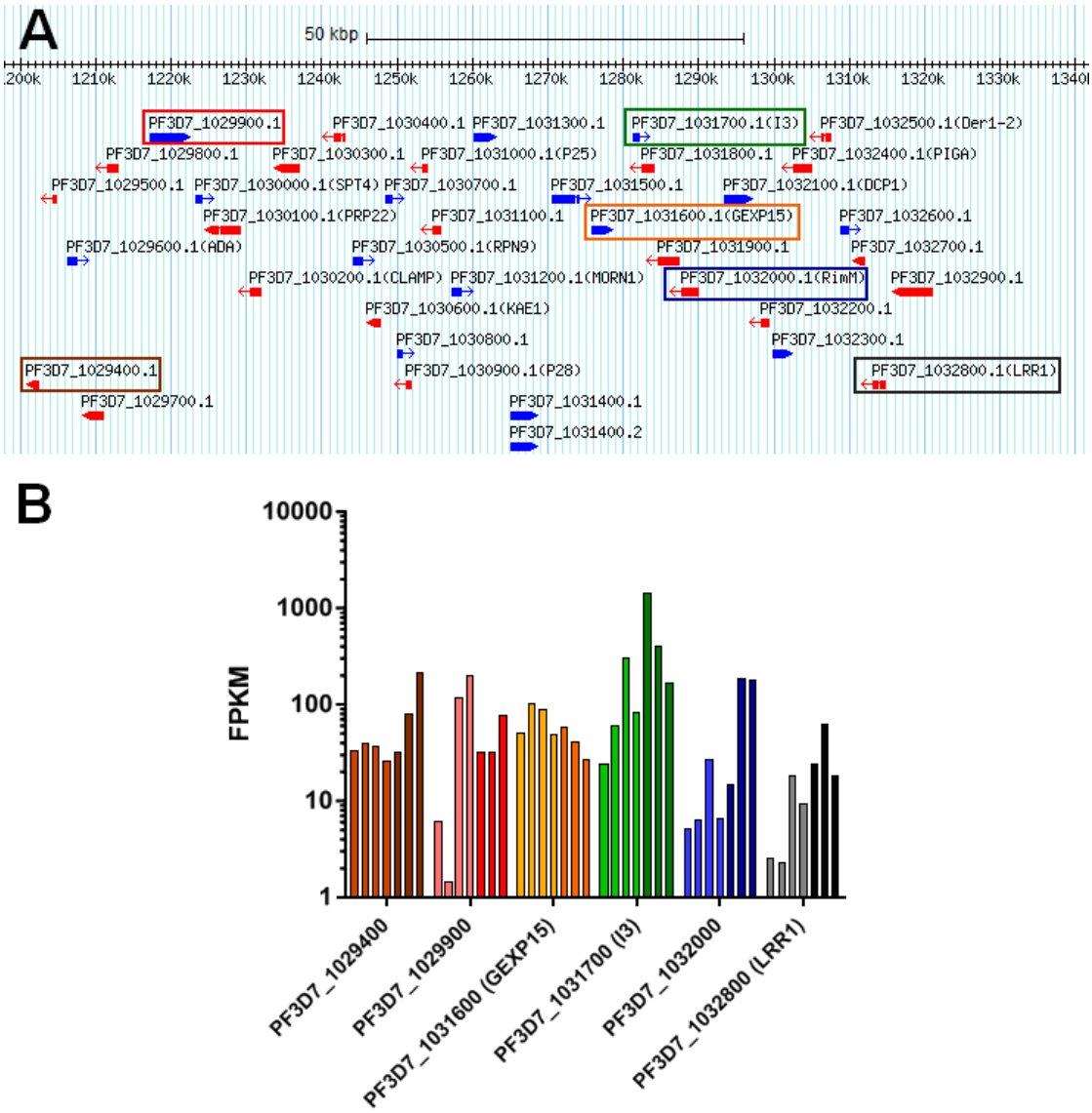

Figure 42 – Environnement génétique de PfGEXP15. A. Représentation du chromosome 10 de *P. falciparum* 120kb autour de PfGEXP15 (en orange). Les régulateurs I3 et LRR1 sont encadrés en vert et en noir respectivement. Les potentiels partenaires de la PfPP1c issus de son interactome, PF3D7_1029400, PF3D7_1029900 et PF3D7_1032000 sont encadrés en marron, rouge et bleu respectivement. **B.** Transcriptomes des 6 gènes d'intérêt au cours de 7 stades de *P. falciparum*. Les différents gènes sont représentés selon la même couleur et le même ordre que ci-dessus. Les couleurs clairs correspondent aux stades asexuels sanguins (anneau, trophozoïte jeune, trophozoïte âgé et schizonte respectivement) et les couleurs foncés représentent les stades gamétocyte II, gamétocyte V et ookinète respectivement. Les données sont issues de (López-Barragán *et al.* 2011).

Il a été estimé qu'une corégulation des gènes voisins est possible à une distance maximale d'environ 100kb pour l'Homme (Gherman *et al.* 2009), la levure et *A. thaliana* (Michalak 2008). Dans le cas de nos 6 gènes d'intérêt, la transcription est accrue principalement

durant la gamétogenèse et le stade ookinète pour 4 de ces 6 gènes (FIGURE 42B) (López-Barragán *et al.* 2011). PF3D7_1029900 semble être transcrit à la fois au cours des stades asexuels âgés et des gamétocytes stade V et ookinète. La transcription de GEXP15 semble être maximale en trophozoïtes mais on sait que la protéine est accumulée majoritairement en gamétocytes jeunes. Le transcriptome de ces potentiels partenaires semble donc indiquer une tendance à une expression majoritaire lors de la gamétogenèse. On peut supposer qu'une co-régulation des partenaires de la PfPP1c a lieu ou que du moins, ceux-ci sont concentrés dans le génome afin de faciliter le contrôle de leur expression. Ce regroupement en cluster a déjà été proposé pour des gènes sur-exprimés dans les cas de malaria cérébrale et se situant sur les chromosomes 7 et 9 (Almelli *et al.* 2014).

GEXP15 au cours de l'évolution

L'un de nos principaux critères de sélection de GEXP15 parmi les partenaires de la PfPP1c identifiés, est que c'est une protéine spécifique de *Plasmodium*. La recherche d'homologue n'a pas permis d'obtenir le moindre résultat satisfaisant même au sein des apicomplexes. La faible complexité de PfGEXP15 pourrait expliquer la difficulté à détecter un homologue. Cependant, PbGEXP15 donne des résultats similaires. On peut donc supposer que GEXP15 est bien une protéine spécifique des *Plasmodium*.

Il est intéressant de noter que PfGEXP15 et PbGEXP15 présente des régions à faible complexité composées de séquences répétées (FIGURE 27). Il est probable que ces motifs ne soient pas indispensables à la fonction de la protéine ou à la survie parasitaire puisqu'au cours des différents clonages de PfGEXP15 et PbGEXP15, il est apparu que ces séquences pouvaient être délétées au sein du génome (FIGURE 43). En effet, lors du clonage de la région 3' de PbGEXP15 afin d'ajouter un tag mCherry, une portion de 38 acides aminés n'a pas pu être amplifiée et ce probablement par délétion au sein du génome de *P. berghei*. Cependant, on ne peut considérer que l'annotation de PlasmoDB est incorrecte puisque cette même région a pu être amplifiée lors du clonage de PbGEXP15 $_{4-590}$ pour la production sous forme de protéine recombinante.

Par ailleurs, il est intéressant de souligner que les différentes constructions des copies complètes de PfGEXP15 et PbGEXP15, pour l'utilisation chez la levure ou la production de protéine recombinante, se sont avérées complexes. En effet, dans le cas de PbGEXP15 $_{4-629}$ et PbGEXP15 $_{4-590}$, l'amorce reverse a été positionnée juste en amont du codon stop. Cependant, aucun des clones obtenus n'a montré au cours du séquençage, une identité de 100% avec la séquence prédite dans PlasmoDB. Le plus souvent un décalage du cadre de lecture était détecté dans des régions riches en adénine, propices à une perte de fidélité de la polymérase.

Expression de GEXP15

GEXP15 a été classée parmi une famille de protéines détectées comme étant surexprimées ou exprimées uniquement dans les gamétocytes jeunes de *P. falciparum*. Notre analyse a démontré que PfGEXP15 n'est pas exprimée qu'aux stades I/II de la gamétogenèse mais qu'elle est plus abondante à ces stades. Différentes analyses protéiques ont détecté PfGEXP15 chez les sporozoïtes présents dans les glandes salivaires du moustique (Lindner *et al.* 2013) et chez les anneaux (Oehring *et al.* 2012). Une expression basale

```
                                10        20        30        40        50        60
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        ------------------------------------------------------------ 1
PbGEXP15 4-590          ---EQSVEVDLKKIETELVSCHDNTEKTKKKKKVQFSEKNETLYYEKDENENSYFNFALN 57
PbGEXP15 copie complète MLNEQSVEVDLKKIETELVSCHDNTEKTKKKKKVQFSEKNETLYYEKDENENSYFNFALN 60

                                70        80        90       100       110       120
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        ------------------------------------------------------------ 1
PbGEXP15 4-590          NFNYFESFYNRMYNADFNDQEIQKYDTFLNVNDKILEYNEMDEDEEEEDIQNNFLKKNNL 117
PbGEXP15 copie complète NFNYFESFYNRMYNADFNDQEIQKYDTFLNVNDKILEYNEMDEDEEEEDIQNNFLKKNNL 120

                               130       140       150       160       170       180
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        ------------------------------------------------------------ 1
PbGEXP15 4-590          VNSAFKGVNKLKIDLHSKINKRDSNSTSDDNEKNNASYSKKDKFAQSFSEDCSFEINDIQ 177
PbGEXP15 copie complète VNSAFKGVNKLKIDLHSKINKRDSNSTSDDNEKNNASYSKKDKFAQSFSEDCSFEINDIQ 180

                               190       200       210       220       230       240
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        --------------------------------EGYIDKDGNYIYHDSKNNKVEEAWLKSI 28
PbGEXP15 4-590          SAIINAEEKTTYYNKDYFGYEIEPFNMKNELQEGYIDKDGNYIYHDSKNNKVEEAWLKSI 237
PbGEXP15 copie complète SAIINAEEKTTYYNKDYFGYEIEPFNMKNELQEGYIDKDGNYIYHDSKNNKVEEAWLKSI 240

                               250       260       270       280       290       300
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        DENESFSNNKLHTQIHKEIISKSNNNINTDIYDNSLSVNIYDGLYSLSCLLADKETPIKA 88
PbGEXP15 4-590          DENESFSNNKLHTQIHKEIISKSNNNINTDIYDNSLSVNIYDGLYSLSCLLADKETPIKA 297
PbGEXP15 copie complète DENESFSNNKLHTQIHKEIISKSNNNINTDIYDNSLSVNIYDGLYSLSCLLADKETPIKA 300

                               310       320       330       340       350       360
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        MIRYKNDLKNCKNYLNQCKTNLEEARVQESQKDGTGENLQSSKDRVTPNELQVNIRQSDE 148
PbGEXP15 4-590          MIRYKNDLKNCKNYLNQCKTNLEEARVQESQKDGTGENLQSSKDRVAPNELQVNIRQSDE 357
PbGEXP15 copie complète MIRYKNDLKNCKNYLNQCKTNLEEARVQESQKDGTGENLQSSKDRVTPNELQVNIRQSDE 360

                               370       380       390       400       410       420
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        YKADVEKEKEDKANAEKEKEDKANVEKEKED------------------------------ 179
PbGEXP15 4-590          YKADVEKEKEDKANAEKEKEDKANVEKEKEDNANVEKEKEDKANVEKEKDKANVEKEKED 417
PbGEXP15 copie complète YKADVEKEKEDKANAEKEKEDKANVEKEKEDNANVEKEKEDKANVEKEKDKANVEKEKED 420

                               430       440       450       460       470       480
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        -----------KANVEKEKEEASGDTIQNEHKKKMQQLEEVYQKALLDYKTIERQFNNIID 229
PbGEXP15 4-590          KANVEKEKEDKANVEKEKEEASGDTIQNEHKKKMQQLEEVYQKALLDYKTIERQFNNIID 477
PbGEXP15 copie complète KANVEKEKEDKANVEKEKEEASGDTIQNEHKKKMQQLEEVYQKALLDYKTIERQFNNIID 480

                               490       500       510       520       530       540
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        LTQKLTNEYKNVYFLTKNEFEEICKKLEECKESGNILWQLKWQSDVNNNIYGPYNYYDIY 289
PbGEXP15 4-590          LTQKLTNEYKNVYFLTKNEFEEICKKLEECKESGNILWQLKWQSDVNNNIYGPYNYYDIY 537
PbGEXP15 copie complète LTQKLTNEYKNVYFLTKNEFEEICKKLEECKESGNILWQLKWQSDVNNNIYGPYNYYDIY 540

                               550       560       570       580       590       600
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PbGEXP15 213-656        NFISLGIVSAANPILLRRVSNENKMLENIWQSYDTVNYLNFVNNDNVKKKRKLNEINIED 349
PbGEXP15 4-590          NFISLGIVSAANPILLRRVSNENKMLENIWQSYDTVNYLNFVNNDNVKKK---------- 587
PbGEXP15 copie complète NFISLGIVSAANPILLRRVSNENKMLENIWQSYDTVNYLNFVNNDNVKKKRKLNEINIED 600

                               610       620       630       640       650
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
PbGEXP15 213-656        SEGEQKEVDSSTDDNEYDIQNKKKKKKGLIQISKKKEKISNEDDTDNEDDFESYGI 405
PbGEXP15 4-590          ------------------------------------------------------- 587
PbGEXP15 copie complète SEGEQKEVDSSTDDNEYDIQNKKKKKKGLIQISKKKEKISNEDDTDNEDDFESYGI 656
```

Figure 43 – Délétion de régions répétées chez GEXP15 de *P. berghei*. Les régions protéiques de PbGEXP15, clonées dans les vecteurs mCherry (PbGEXP15 $_{213-656}$) et pETDuet-1 (PbGEXP15 $_{4-590}$), ont été alignés avec la protéine PbGEXP15 de PlasmoDB. La région répétée et délétée est entourée en orange. L'alignement protéique a été réalisé par BioEdit et ClustalW.

tout au long du cycle parasitaire peut donc être envisagée avec un pic au début de la gamétogenèse.

Cependant, différentes analyses transcriptomiques ont montré que les transcrits de Pf-GEXP15 sont plus abondants au stade trophozoïte (López-Barragán *et al.* 2011 ; Siegel *et al.* 2014). Des phénomènes de régulation (post-)transcriptionnelle et (post-)traductionnelle sont donc envisageables. Tout d'abord, le facteur de transcription AP2-G est décrit comme

indispensable à la formation des gamétocytes (Kafsack *et al.* 2014 ; Sinha *et al.* 2014). Il se fixerait sur l'ADN au niveau d'un double motif GxGTAC et GTACxC (Sinha *et al.* 2014) en moyenne à 2kb du codon start. Pour GEXP15, ce motif est absent chez *P. falciparum* et détectable deux fois chez *P. berghei*. Une régulation par le facteur de transcription maître de la gamétogenèse n'est donc pas totalement à exclure même si des mutants knock-out de AP2-G ne montrent aucune modulation significative dans le nombre de transcrits de GEXP15 (Sinha *et al.* 2014). Par ailleurs, l'absence de transcription antisens indiquerait que des ARN antisens non codants ne sont pas impliqués dans la régulation de l'expression de PfGEXP15 aux stades asexuels sanguins (Siegel *et al.* 2014).

La faible expression de GEXP15 détectable au stade schizonte de *P. falciparum* et *P. berghei*, a été un frein dans l'analyse et la validation des différents mutants obtenus par génétique inverse. De plus, PfGEXP15 et PbGEXP15 montrent une migration anormale par SDS-PAGE et cela malgré un point isoélectrique autour de 4.5. Ce différentiel ne peut être imputable à la détection d'une autre protéine parasitaire par l'antisérum. En effet, la protéine recombinante utilisée, PbGEXP15 $_{4-178}$, ne présente pas une homologie suffisante avec une autre protéine de *P. falciparum* ou *P. berghei*, pour engendrer une cross-réactivité de l'antisérum. La migration anormale pourrait être due à la présence des sites de phosphorylation détectés sur PfGEXP15, sur six sérines et une tyrosine au stade schizonte (PlasmoDB 2017). Cependant, même si on peut imaginer que d'autres sites de phosphorylation existent sur la protéine au même stade ou à d'autres, ils ne peuvent pas complètement expliquer la différence de taille observée. D'autres modifications post-traductionnelles pourraient s'ajouter et créer ce différentiel. Néanmoins, l'hypothèse la plus probable, mais qui n'exclut pas la précédente, est la fixation du SDS qui peut fortement fluctuer selon la structure protéique et faire varier la migration de GEXP15 (Rath *et al.* 2009). En revanche, l'éventualité que l'ORF soit mal annoté est peu probable puisqu'il a été confirmé par différentes analyses transcriptomiques (PlasmoDB 2017) et que des codons stop apparaissent fréquemment, quel que soit le cadre de lecture, en amont et en aval de l'ORF prédit.

Complexe GEXP15-PfPP1c dans le modèle de la levure

L'interaction GEXP15-PfPP1c, préalablement détectée au cours de l'identification des partenaires de la phosphatase, a été confirmée par la suite en double hybride chez la levure. Les portions N-terminales PfGEXP15 $_{8-182}$ et PbGEXP15 $_{4-178}$ se lient à la PfPP1c tout comme la protéine complète PbGEXP15 $_{4-629}$. L'amplification du gène complet de PfGEXP15 a été tentée mais les nombreuses régions répétées en adénine ont été problématiques lors de la vérification du cadre de lecture.

L'utilisation de deux mutants, PbGEXP15 $_{4-178\ \mathrm{KKKKKAQA}}$ et PfPP1c F255A F256A, a permis de mettre en évidence l'implication du motif RVxF dans la formation du complexe. La conservation d'une faible interaction entre les différentes GEXP15 et PfPP1c F255A F256A démontre que la mutation des deux phénylalanines entrave fortement l'interaction. L'analyse de différents mutants pour d'autres acides aminés à la place ou en supplément, aurait pu permettre d'affiner le mécanisme d'interaction du RVxF de GEXP15 avec le sillon hydrophobe de la PfPP1c.

Par ailleurs, l'expression des différentes protéines de GEXP15, produites chez la levure, a été vérifiée par western-blot. Cependant, seules PfGEXP15 $_{8-182}$ et PbGEXP15 $_{4-178}$ ont

pu être détectées après plusieurs essais. Deux raisons peuvent être avancées pour expliquer ces résultats, la difficulté à extraire et vérifier l'expression des protéines de *Plasmodium* ainsi que la faible expression des différentes constructions de GEXP15, qui est observable quel que soit le modèle ou l'approche utilisés. Une expérience d'immunoprécipitation des protéines est envisageable ainsi que la détection des transcrits par RT-PCR.

Production des protéines recombinantes et GST pull-down

Dans le but de vérifier si l'interaction entre GEXP15 et la PfPP1c est directe, *in vitro*, différentes protéines recombinantes ont été produites en bactéries. Lors de l'optimisation de la production et purification de la protéine recombinante PfGEXP15 $_{8-182}$, différentes méthodes ont été testées. La purification en conditions dénaturantes a montré le meilleur rendement, ce qui est probablement dû à l'agrégation de la protéine recombinante et à la formation de corps d'inclusion dans les bactéries. En plus de sa faible expression, il s'est avéré que PfGEXP15 $_{8-182}$ est détectable à la fois sous forme monomérique et dimérique (Figure 31A). Une production en présence de 12mM de DTT a été testée et a montré une légère hausse de la concentration du monomère. Cependant, la faible variation est telle que par la suite la production a été réalisée sans DTT. Afin de palier à ses différents problèmes, un gène synthétique de PfGEXP15 $_{8-182}$, optimisé pour la production en *E. coli*, a été utilisé. Celui-ci n'a montré aucune amélioration dans la concentration protéique ou la formation de dimère. Ce résultat montre que la complexité du gène de PfGEXP15 n'est pas le seul paramètre engendrant cette faible expression protéique. Une toxicité de la protéine est envisageable, ce qui est en adéquation avec la difficulté à détecter la protéine chez la levure.

Dans le cas des différentes protéines recombinantes de PbGEXP15, les mêmes conditions de production et purification ont été utilisées. Les concentrations protéiques sont semblables à celle de la PfGEXP15 $_{8-182}$, de l'ordre de 100 à 200 ng µL^{-1}, mais n'engendrent pas de dimérisation. Afin d'améliorer la concentration protéique, le tag 6-Histidines a été placé en C-terminal au lieu du N-terminal, mais cela n'a pas eu d'effet notable tout comme l'utilisation d'un tag GST.

L'ensemble de ces protéines recombinantes a été utilisé par GST pull-down et a permis de démontrer que l'interaction entre GEXP15 et la PfPP1c est une interaction directe *in vitro*. La détection des dimères de PfGEXP15 $_{8-182}$ après le pull-down suggère que la formation d'un homodimère n'entrave pas la liaison avec la phosphatase.

Implication du motif RVxF de GEXP15

L'interaction entre GEXP15 et la PfPP1c a été démontrée comme étant RVxF-dépendante dans le modèle de la levure et par GST pull-down. En effet, la mutation de la séquence KKKKKVQF de GEXP15 a été confirmée comme étant un motif RVxF stringent dont la mutation entrave totalement la formation du complexe. Il aurait été intéressant d'obtenir par mutagenèse dirigée, différents mutants du motif et d'analyser l'importance de chaque lysine en amont sur l'affinité entre GEXP15 et la PfPP1c, et également sur la régulation de l'activité phosphatase. L'expérience similaire aurait pu être entreprise sur la glutamine située entre la valine et la phénylalanine. Le remplacement de cet acide aminé par un l'un des résidus majoritaires de la séquence consensus du motif RVxF de *P. falciparum*, telles que la sérine ou la thréonine, aurait pu montrer un impact sur l'interaction et/ou la régulation de la PfPP1c (Figure 40).

La phosphorylation sur le motif RVxF ou autour, est décrite comme pouvant moduler l'interaction entre la PP1c et son partenaire (Bollen *et al.* 2010 ; Siddoway *et al.* 2013). Dans le cas de PfGEXP15, la prédiction des sites de phosphorylation (NetPhos 3.1) indique que la sérine, qui se situe juste en aval de la phénylalanine du motif RVxF, n'est potentiellement pas un site phosphorylable puisqu'elle obtient un score de 0.499. Cependant, l'outil de prédiction considère un résidu comme phosphorylable à partir d'un score de 0.5. Au vu du faible écart dans la prédiction, l'exploration de la phosphorylation de cette sérine pourrait peut être permettre de mettre en évidence un phénomène de régulation. En effet, étant donné que la protéine recombinante se lie et active la PfPP1c, il est envisageable qu'une phosphorylation ou un phosphomime inhibe la liaison et/ou l'activation de l'activité phosphatase. Même si les résultats de NetPhos 3.1 ne sont que des prédictions et nécessitent une confirmation *in vivo*, sur les 7 sites de phosphorylation déjà identifiés chez PfGEXP15, 1 seul n'est pas prédit par l'outil.

Enfin, l'analyse *in silico* de la structure de GEXP15 a prédit que la protéine était globalement désordonnée (IUPred) comme une grande partie des régulateurs de la PP1c (Bollen *et al.* 2010). En effet, la protéine est composée à 54% d'asparagines, de lysines, d'acides aspartiques et glutamiques, des acides aminées défavorisant, ou du moins ne favorisant pas, la formation d'une structure tertiaire stable (Y. Zhang *et al.* 2007). Cette désorganisation facilite l'interaction avec la PP1c mais aussi avec d'autres partenaires, notamment si l'environnement autour du motif d'interaction n'est pas organisé, comme c'est le cas avec le motif RVxF de PfGEXP15. En revanche, PbGEXP15 est prédite comme étant plus structurée, ce qui est probablement dû à la plus grande complexité de la protéine. La réalisation d'un cristal permettrait de mieux comprendre la structure 3D de GEXP15 et d'apporter des éclaircissements sur son interaction avec la PfPP1c dans le cas d'un cristal de l'hétérodimère.

Régulation de l'activité de la PfPP1c par GEXP15

L'implication d'un motif RVxF dans l'interaction avec la PP1c suggère que GEXP15 pourrait réguler l'activité de la phosphatase. Ceci-ci a été confirmé, *in vitro*, par l'utilisation du test pNPP, qui a montré une augmentation de l'activité de la PfPP1c en présence des différentes protéines recombinantes de GEXP15. On peut noter que le fragment PbGEXP15 $_{4-178}$ mime parfaitement l'action de la protéine presque complète, PbGEXP15 $_{4-590}$, indiquant que la portion N-terminale est prépondérante dans cette régulation. Cependant, une validation de cette régulation chez le parasite n'est pas d'actualité par manque d'outils. De plus, le complexe GEXP15-PP1c joue probablement un rôle dans la déphosphorylation de certains substrats spécifiques. Une identification de ces substrats serait déjà une avancée dans le but de confirmer le rôle d'activateur de GEXP15. Dans l'éventualité que les parasites knock-out de PbGEXP15 soient viables, la comparaison entre le phosphoprotéome des parasites sauvages et des mutants, pourrait permettre d'identifier ces substrats.

Co-localisation et interaction de PbGEXP15 avec la PbPP1c chez le parasite

PfGEXP15 a été prédite comme étant une protéine exportée (Silvestrini *et al.* 2010). Nos résultats sur la localisation de PfGEXP15 et PbGEXP15 indiquent que la protéine est nucléo-cytoplasmique. Ces observations confirment les données précédemment obtenues sur

des extraits nucléaires de stades anneaux et cytoplasmiques de schizontes, où PfGEXP15 a pu être détectée (Oehring *et al.* 2012). Dans le cas de PbPP1c, sa localisation nucléo-cytoplasmique, valide le précédent fractionnement subcellulaire réalisé chez *P. falciparum* et qui a permis de détecter PfPP1c à la fois dans le noyau et le cytoplasme (Daher *et al.* 2006).

La co-localisation entre les deux protéines d'intérêt, nous a permis de réaliser une expérience d'immunoprécipitation qui a confirmé la présence du complexe PbGEXP15-PbPP1c chez le parasite. Cette interaction a été également validée par analyse en spectrométrie de masse après l'immunoprécipitation de HA-PbPP1c (données non présentées).

Rôle de GEXP15

Avant cette thèse, GEXP15 était une protéine parasitaire dont la fonction chez le parasite restait encore inconnue. Ce travail a permis de démontrer que la protéine interagit avec la PP1c de *Plasmodium* et pourrait réguler positivement son activité phosphatase. Afin d'identifier les cibles du complexe et les éventuels partenaires de GEXP15, une immunoprécipitation de HA-PbGEXP15 doit être effectuée, suivie d'une identification par spectrométrie de masse. Elle permettra ainsi de conjecturer sur la ou les fonctions biologiques de GEXP15 en fonction des partenaires détectées. De plus, une étude sur l'interactome global de *P. falciparum* a été réalisée en double hybride chez la levure, avec une banque d'ADNc de *P. falciparum* criblée sur une banque similaire (LaCount *et al.* 2005). Un partenaire potentiel de PfGEXP15 a été identifié comme étant PF3D7_1214500, une protéine gamétocytaire dont la fonction est inconnue. L'analyse de l'interactome de cette dernière, montre qu'elle pourrait se lier à 3 autres protéines en dehors de GEXP15, dont l'une d'entre elles (PF3D7_1227700) a été détectée au cours du double hybride chez la levure lors de l'interactome de la PfPP1c (Hollin *et al.* 2016). Une vérification de l'interaction et de la formation du complexe entre ces différentes protéines permettrait de valider les données observées et de présager sur la fonction de GEXP15 chez le parasite.

Une analyse *in silico* des potentiels domaines de GEXP15 a été réalisée et a mis en évidence deux types de domaines. Tout d'abord, d'après PlasmoDB, PfGEXP15 pourrait posséder un domaine GYF (IPR003169). Cependant la séquence consensus n'est pas identifiable chez PfGEXP15. De plus, ce domaine semble être davantage impliqué dans la structure protéique plutôt que dans une fonction précise (Interpro). Le second domaine, identifié par NCBI's conserved domain database, se situerait entre les acides aminés 450 et 650 de PfGEXP15. Il s'agirait d'un domaine MAEBL (PTZ00121) qui tire son nom de la protéine éponyme, qui interagirait avec l'érythrocyte (Kappe *et al.* 1998) ou les cellules des glandes salivaires du moustique (Matuschewski 2006). Cette protéine est décrite comme étant présente dans les micronèmes, ce qui est en adéquation avec sa fonction. Dans le cas de GEXP15, sa localisation nucléo-cytoplasmique et son absence de domaine transmembranaire ne suggéreraient pas une implication dans l'interaction avec des cellules de l'hôte. Cependant, l'utilisation de sérums de rats infectés par *P. berghei* montre une reconnaissance des protéines recombinantes de PfGEXP15 (Figure 44A) et PbGEXP15 (Figure 44B). On peut alors supposer que le système immunitaire de ces rats, a produit des anticorps dirigés contre PbGEXP15. Les antisérums sont alors capables de reconnaître la protéine recombinante mais aussi celle de son orthologue de *P. falciparum*, qui présente une certaine homologie. Deux hypothèses peuvent être émises sur la détection de GEXP15.

Soit la protéine est exportée ou accessible, ce qui est contradictoire aux expériences de localisation, soit la libération du contenu parasitaire, permettrait une reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte.

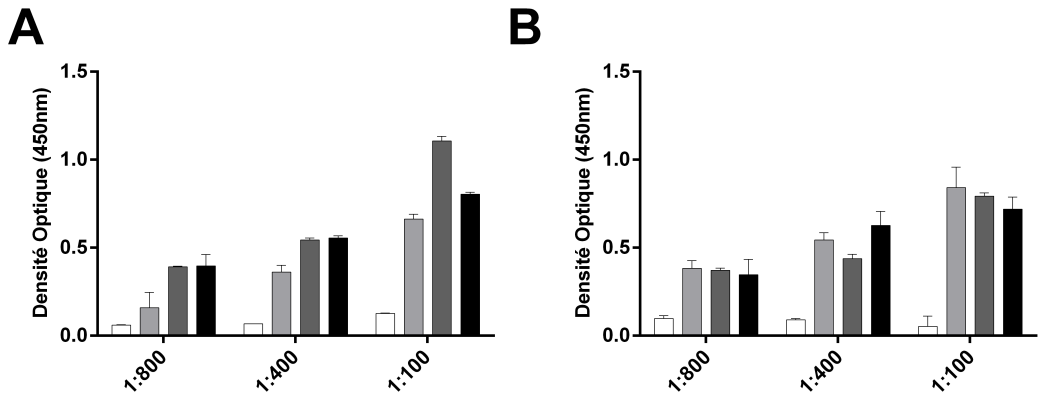

Figure 44 – Reconnaissance des protéines recombinantes de GEXP15 par des sérums de rats infectés par *P. berghei*. A. PfGEXP15 $_{8-182}$ a été mise en présence d'un pool de sérums de trois rats sains (blanc) et de trois sérums de rats infectés par *P. berghei* (gris clair, gris sombre et noir) à différentes dilutions (1:800, 1:400 et 1:100). **B.** PbGEXP15 $_{4-178}$ a été utilisée avec les mêmes sérums et dilutions. Les sérums des rats ont été collectés 5 semaines post-infection. Ces résultats préliminaires sont issus d'une expérience réalisée en duplicate (moyenne ± SD).

L'analyse des partenaires, des domaines et de la localisation de GEXP15 n'a pas permis de prédire sur son rôle biologique. Des expériences de knock-out et knock-down conditionnel ont donc été réalisées afin de vérifier l'essentialité et la fonction de GEXP15 chez le parasite.

Dans le cas de PbGEXP15, la délétion du gène a entrainé une chute de la parasitémie, chez des souris infectées par les mutants de *P. berghei*, à partir de 15 jours post-infection. On peut estimer que PbGEXP15 est essentielle à un moment donné, une fois que le cycle parasitaire a débuté. Par exemple, il est envisageable que la délétion de PbGEXP15 favorise une réponse immunitaire de l'hôte. Le délai avant la chute de la parasitémie correspondrait au temps de mise en place de la réponse immune. L'analyse de la gamétocytémie tend à montrer, avant la chute de la parasitémie, une diminution du nombre de gamétocytes par rapport à la souche non modifiée (données non présentées). Cependant, un impact unique sur la gamétogenèse ne peut expliquer ce résultat qui influence aussi le cycle asexuel sanguin. Cette expérience nécessite une confirmation sur une souche mutante clonée, ce qui n'était pas le cas lors de cette première expérience même si la détection par PCR du gène endogène de PbGEXP15 est sous le seuil de détection (Figure 38).

La répétition des expériences permettra également de vérifier si la délétion de PbGEXP15 a un impact sur la différenciation des sexes des gamétocytes. Toutefois, une analyse transcriptomique a montré qu'aucune différence significative n'était observée dans la transcription de PfGEXP15 entre les gamétocytes mâles et femelles de *P. falciparum* (rapport 1:1.2) (Lasonder *et al.* 2016). On pourrait donc supposer que GEXP15 n'influence pas la différenciation sexuelle des gamétocytes même si une régulation traductionnelle est possible. Parmi les 22 *P. falciparum* Gametocyte EXported Proteins décrites (Silvestrini

et al. 2010), 13 PfGEXPs, en plus de PfGEXP15, ont été détectées. Trois d'entre elles, PfGEXP13, -19 et -22, ne semblent pas être enrichies dans un sexe particulier alors que pour PfGEXP02, -04, -08, -12, -17, -18 et -21, les transcrits sont surexprimés chez le mâle à l'inverse de PfGEXP03, -05 et 10 qui le sont chez la femelle (Lasonder *et al.* 2016). La détection d'une grande majorité des PfGEXPs semble confirmer leur implication dans la gamétogenèse et notamment chez le mâle pour une certaine partie d'entre elles.

Le knock-out chez *P. falciparum* 3D7 pourra également confirmer, après clonage, si la délétion de PfGEXP15 a un impact sur les stades asexuels. L'essentialité de PfGEXP15 sera également observée dans la souche NF54. Cependant, la délétion du gène a été confirmée 21 semaines post-transfection dans le cas de 3D7. Ce délai, s'il est similaire chez NF54, sera un frein dans l'obtention de gamétocytes chez des parasites restés longtemps en culture. L'utilisation du système CRISPR-Cas9 a été envisagée afin d'assurer une délétion efficace et rapide de *pfgexp15* (Ghorbal *et al.* 2014). Toutefois, une optimisation de ce système au sein du laboratoire est nécessaire avant d'entreprendre les expériences sur PfGEXP15.

Le système de knock-down conditionnel TRAD4-TetO$_7$ a été utilisé dans le cas de PbGEXP15. Après une première tentative, confirmée par génotypage et western-blot, la construction s'est montrée instable, ce qui viendrait soutenir l'essentialité observée avec le knock-out de PbGEXP15. Une seconde tentative a été effectuée et est stable pour le moment. Cependant, l'induction par l'ATc ne s'est pas montrée efficace dans différentes constructions testées au laboratoire. Ainsi, des essais sur la répression de la transcription de TRAD4-HA-PbGEXP15 n'ont pas été menés. Néanmoins, une équipe a utilisé ce système afin d'étudier le rôle du complexe *Plasmodium* Translocon of EXported proteins (PTEX) dans l'export des protéines. Les protéines HSP101 (Elsworth *et al.* 2014), PTEX88 (Chisholm *et al.* 2016) et RhopH2 (Counihan *et al.* 2017), trois composantes du PTEX, ont montré une diminution significative de leur expression en présence d'ATc. On peut donc supposer que ce système est gène-dépendant.

L'exploitation d'un deuxième système de knock-down inductible, par dégradation de PbGEXP15 en présence d'auxine, va permettre de compléter les résultats obtenus avec le système TRAD4 et le knock-out.

Ce travail sur GEXP15 a permis de confirmer son interaction avec la PP1c *in vitro* et chez le parasite. La formation de ce complexe est dépendante du motif RVxF de GEXP15 dont l'analyse de différents mutants permettrait d'approfondir la compréhension du mécanisme d'interaction entre le motif et le sillon hydrophobe de la PP1c. Le système CRISPR-Cas9 pourrait être utilisée afin d'éditer le génome de *P. falciparum* et d'obtenir des mutants pour le motif RVxF de PfGEXP15. La survie de ces parasites serait vérifiée et la réalisation d'un phosphoprotéome montrerait d'éventuelles modifications induites par la perte du complexe PfGEXP15-PfPP1c. L'essentialité de GEXP15 pour le cycle de vie du parasite *Plasmodium* sera à démontrer par les différentes expériences de knock-out ou de knock-down inductible en vue d'obtenir une excellente piste pour une cible thérapeutique.

Bibliographie

Bibliographie

Adl, S. M., Leander, B. S., Simpson, A. G. B., Archibald, J. M., Anderson, O. R., Bass, D., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Farmer, M. A., Karpov, S. *et al.* (2007). « Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists ». In : *Systematic Biology* 56.4, p. 684–689. ISSN : 1063-5157. DOI : 10.1080/10635150701494127.

Agnandji, S. T., Fernandes, J. F., Bache, E. B. et Ramharter, M. (2015). « Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine : a systematic review of clinical Phase I-III trials ». In : *Future Microbiology* 10.10, p. 1553–1578. ISSN : 1746-0921. DOI : 10.2217/fmb.15.90.

Alano, P., Roca, L., Smith, D., Read, D., Carter, R. et Day, K. (1995). « Plasmodium falciparum : parasites defective in early stages of gametocytogenesis ». In : *Experimental Parasitology* 81.2, p. 227–235. ISSN : 0014-4894. DOI : 10.1006/expr.1995.1112.

Alano, P. (2007). « Plasmodium falciparum gametocytes : still many secrets of a hidden life ». In : *Molecular Microbiology* 66.2, p. 291–302. ISSN : 0950-382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2007.05904.x.

Allen, P. B., Kwon, Y. G., Nairn, A. C. et Greengard, P. (1998). « Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 273.7, p. 4089–4095. ISSN : 0021-9258.

Almelli, T., Nuel, G., Bischoff, E., Aubouy, A., Elati, M., Wang, C. W., Dillies, M.-A., Coppée, J.-Y., Ayissi, G. N., Basco, L. K. *et al.* (2014). « Differences in gene transcriptomic pattern of Plasmodium falciparum in children with cerebral malaria and asymptomatic carriers ». In : *PloS One* 9.12, e114401. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0114401.

Aly, A. S. I., Vaughan, A. M. et Kappe, S. H. I. (2009). « Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host ». In : *Annual Review of Microbiology* 63, p. 195–221. ISSN : 1545-3251. DOI : 10.1146/annurev.micro.091208.073403.

Amit-Avraham, I., Pozner, G., Eshar, S., Fastman, Y., Kolevzon, N., Yavin, E. et Dzikowski, R. (2015). « Antisense long noncoding RNAs regulate var gene activation in the malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112.9, E982–991. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1420855112.

Anamika, Srinivasan, N. et Krupa, A. (2005). « A genomic perspective of protein kinases in Plasmodium falciparum ». In : *Proteins* 58.1, p. 180–189. ISSN : 1097-0134. DOI : 10.1002/prot.20278.

Antony, H. A. et Parija, S. C. (2016). « Antimalarial drug resistance : An overview ». In : *Tropical Parasitology* 6.1, p. 30–41. ISSN : 2229-5070. DOI : 10.4103/2229-5070.175081.

Aponte, J. J., Schellenberg, D., Egan, A., Breckenridge, A., Carneiro, I., Critchley, J., Danquah, I., Dodoo, A., Kobbe, R., Lell, B. *et al.* (2009). « Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants : a pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials ». In : *Lancet* 374.9700, p. 1533–1542. DOI : 10.1016/S0140-6736(09)61258-7.

Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L. *et al.* (2014). « A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria ». In : *Nature* 505.7481, p. 50–55. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature12876.

Arnot, D. E., Ronander, E. et Bengtsson, D. C. (2011). « The progression of the intra-erythrocytic cell cycle of Plasmodium falciparum and the role of the centriolar plaques in asynchronous mitotic division during schizogony ». In : *International Journal for Parasitology* 41.1, p. 71–80. ISSN : 1879-0135. DOI : 10.1016/j.ijpara.2010.07.012.

Ayala, S. C. et Lee, D. (1970). « Saurian malaria : development of sporozoites in two species of phlebotomine sandflies ». In : *Science* 167.3919, p. 891–892. ISSN : 0036-8075.

Ayllón, V., Cayla, X., García, A., Fleischer, A. et Rebollo, A. (2002). « The anti-apoptotic molecules Bcl-xL and Bcl-w target protein phosphatase 1alpha to Bad ». In : *European Journal of Immunology* 32.7, p. 1847–1855. ISSN : 0014-2980. DOI : 10.1002/1521-4141(200207)32:7<1847::AID-IMMU1847>3.0.CO;2-7.

Ayllón, V., Cayla, X., García, A., Roncal, F., Fernández, R., Albar, J. P., Martínez, C. et Rebollo, A. (2001). « Bcl-2 targets protein phosphatase 1 alpha to Bad ». In : *Journal of Immunology* 166.12, p. 7345–7352. ISSN : 0022-1767.

Baird, J. K. (1998). « Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to Plasmodium falciparum ». In : *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92.4, p. 367–390. ISSN : 0003-4983.

Baker, D. A. (2010). « Malaria gametocytogenesis ». In : *Molecular and Biochemical Parasitology* 172.2, p. 57–65. ISSN : 1872-9428. DOI : 10.1016/j.molbiopara.2010.03.019.

Balaji, S., Babu, M. M., Iyer, L. M. et Aravind, L. (2005). « Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains ». In : *Nucleic Acids Research* 33.13, p. 3994–4006. ISSN : 1362-4962. DOI : 10.1093/nar/gki709.

Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S. et Mitchell, G. H. (2000). « A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages ». In : *Parasitology Today* 16.10, p. 427–433. ISSN : 0169-4758.

Barton, G. J., Cohen, P. T. et Barford, D. (1994). « Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from Escherichia coli suggests homology to the protein phosphatases ». In : *European Journal of Biochemistry* 220.1, p. 225–237. ISSN : 0014-2956.

Batugedara, G., Lu, X. M., Bunnik, E. M. et Le Roch, K. G. (2017). « The Role of Chromatin Structure in Gene Regulation of the Human Malaria Parasite ». In : *Trends in Parasitology.* ISSN : 1471-5007. DOI : 10.1016/j.pt.2016.12.004.

Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P. et Cowman, A. F. (2006). « Regulation of apicomplexan actin-based motility ». In : *Nature Reviews. Microbiology* 4.8, p. 621–628. ISSN : 1740-1526. DOI : 10.1038/nrmicro1465.

Baum, J., Papenfuss, A. T., Mair, G. R., Janse, C. J., Vlachou, D., Waters, A. P., Cowman, A. F., Crabb, B. S. et Koning-Ward, T. F. de (2009). « Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites ». In : *Nucleic Acids Research* 37.11, p. 3788–3798. ISSN : 1362-4962. DOI : 10.1093/nar/gkp239.

Bennink, S., Kiesow, M. J. et Pradel, G. (2016). « The development of malaria parasites in the mosquito midgut ». In : *Cellular Microbiology* 18.7, p. 905–918. ISSN : 1462-5822. DOI : 10.1111/cmi.12604.

Beullens, M. et Bollen, M. (2002). « The protein phosphatase-1 regulator NIPP1 is also a splicing factor involved in a late step of spliceosome assembly ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 277.22, p. 19855–19860. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M200847200.

Bhatt, S., Weiss, D. J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., Battle, K. E., Moyes, C. L., Henry, A., Eckhoff, P. A. *et al.* (2015). « The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015 ». In : *Nature* 526.7572, p. 207–211. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature15535.

Bhattacharyya, M. K., Hong, Z., Kongkasuriyachai, D. et Kumar, N. (2002). « Plasmodium falciparum protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in Saccharomyces cerevisiae ». In : *International Journal for Parasitology* 32.6, p. 739–747. ISSN : 0020-7519.

Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B. et Brinkmann, V. (2004). « Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite ». In : *Cell* 117.4, p. 503–514. ISSN : 0092-8674.

Blackman, M. J. et Bannister, L. H. (2001). « Apical organelles of Apicomplexa : biology and isolation by subcellular fractionation ». In : *Molecular and Biochemical Parasitology* 117.1, p. 11–25. ISSN : 0166-6851.

Blisnick, T., Vincensini, L., Fall, G. et Braun-Breton, C. (2006). « Protein phosphatase 1, a Plasmodium falciparum essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites ». In : *Cellular Microbiology* 8.4, p. 591–601. ISSN : 1462-5814. DOI : 10.1111/j.1462-5822.2005.00650.x.

Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M. J. et Beullens, M. (2010). « The extended PP1 toolkit : designed to create specificity ». In : *Trends in Biochemical Sciences* 35.8, p. 450–458. ISSN : 0968-0004. DOI : 10.1016/j.tibs.2010.03.002.

Boudrez, A., Beullens, M., Groenen, P., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Jagiello, I., Murray, M., Krainer, A. R., Stalmans, W. et Bollen, M. (2000). « NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 275.33, p. 25411–25417. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M001676200.

Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J. et DeRisi, J. L. (2003). « The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum ». In : *PLoS biology* 1.1, E5. ISSN : 1545-7885. DOI : 10.1371/journal.pbio.0000005.

Brooke, B. D., Kloke, G., Hunt, R. H., Koekemoer, L. L., Temu, E. A., Taylor, M. E., Small, G., Hemingway, J. et Coetzee, M. (2001). « Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African Anopheles funestus (Diptera : Culicidae) ». In : *Bulletin of Entomological Research* 91.4, p. 265–272. ISSN : 0007-4853.

Brüchert, N., Mavila, N., Boknik, P., Baba, H. A., Fabritz, L., Gergs, U., Kirchhefer, U., Kirchhof, P., Matus, M., Schmitz, W. *et al.* (2008). « Inhibitor-2 prevents protein phosphatase 1-induced cardiac hypertrophy and mortality ». In : *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 295.4, H1539–1546. ISSN : 0363-6135. DOI : 10.1152/ajpheart.00515.2008.

Cannon, J. F., Pringle, J. R., Fiechter, A. et Khalil, M. (1994). « Characterization of glycogen-deficient glc mutants of Saccharomyces cerevisiae ». In : *Genetics* 136.2, p. 485–503. ISSN : 0016-6731.

Cannon, J. F. (2013). « How phosphorylation activates the protein phosphatase-1 - inhibitor-2 complex ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta* 1834.1, p. 71–86. ISSN : 0006-3002. DOI : 10.1016/j.bbapap.2012.09.003.

Ceulemans, H. et Bollen, M. (2004). « Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button ». In : *Physiological Reviews* 84.1, p. 1–39. ISSN : 0031-9333. DOI : 10.1152/physrev.00013.2003.

Ceulemans, H., Stalmans, W. et Bollen, M. (2002a). « Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution ». In : *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 24.4, p. 371–381. ISSN : 0265-9247. DOI : 10.1002/bies.10069.

Ceulemans, H., Vulsteke, V., De Maeyer, M., Tatchell, K., Stalmans, W. et Bollen, M. (2002b). « Binding of the concave surface of the Sds22 superhelix to the alpha 4/alpha 5/alpha 6-triangle of protein phosphatase-1 ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 277.49, p. 47331–47337. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M206838200.

Chandar, V., Mehta, S. R., Sharma, P. D., Sarkar, P. K. et Sharma, B. R. (1989). « Falciparum malaria ». In : *Indian Journal of Pediatrics* 56.3, p. 365–369. ISSN : 0019-5456.

Cheng, Y.-L. et Chen, R.-H. (2015). « Assembly and quality control of the protein phosphatase 1 holoenzyme involves the Cdc48-Shp1 chaperone ». In : *Journal of Cell Science* 128.6, p. 1180–1192. ISSN : 1477-9137. DOI : 10.1242/jcs.165159.

Chidley, C., Haruki, H., Pedersen, M. G., Muller, E. et Johnsson, K. (2011). « A yeast-based screen reveals that sulfasalazine inhibits tetrahydrobiopterin biosynthesis ». In : *Nature Chemical Biology* 7.6, p. 375–383. ISSN : 1552-4469. DOI : 10.1038/nchembio.557.

Chin, W., Contacos, P. G., Coatney, G. R. et Kimball, H. R. (1965). « A naturally acquited quotidian type malaria in man transferable to monkeys ». In : *Science* 149.3686, p. 865. ISSN : 0036-8075.

Chisholm, S. A., McHugh, E., Lundie, R., Dixon, M. W. A., Ghosh, S., O'Keefe, M., Tilley, L., Kalanon, M. et Koning-Ward, T. F. de (2016). « Contrasting Inducible Knockdown of the Auxiliary PTEX Component PTEX88 in P. falciparum and P. berghei Unmasks

a Role in Parasite Virulence ». In : *PloS One* 11.2, e0149296. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0149296.

Choy, M. S., Hieke, M., Kumar, G. S., Lewis, G. R., Gonzalez-DeWhitt, K. R., Kessler, R. P., Stein, B. J., Hessenberger, M., Nairn, A. C., Peti, W. *et al.* (2014). « Understanding the antagonism of retinoblastoma protein dephosphorylation by PNUTS provides insights into the PP1 regulatory code ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111.11, p. 4097–4102. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1317395111.

Choy, M. S., Page, R. et Peti, W. (2012). « Regulation of protein phosphatase 1 by intrinsically disordered proteins ». In : *Biochemical Society Transactions* 40.5, p. 969–974. ISSN : 1470-8752. DOI : 10.1042/BST20120094.

Cirimotich, C. M., Dong, Y., Clayton, A. M., Sandiford, S. L., Souza-Neto, J. A., Mulenga, M. et Dimopoulos, G. (2011). « Natural microbe-mediated refractoriness to Plasmodium infection in Anopheles gambiae ». In : *Science* 332.6031, p. 855–858. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1201618.

Clyde, D. F., Most, H., McCarthy, V. C. et Vanderberg, J. P. (1973). « Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria ». In : *The American Journal of the Medical Sciences* 266.3, p. 169–177. ISSN : 0002-9629.

Cohen, P. T. W. (2002). « Protein phosphatase 1–targeted in many directions ». In : *Journal of Cell Science* 115 (Pt 2), p. 241–256. ISSN : 0021-9533.

Connor, J. H., Weiser, D. C., Li, S., Hallenbeck, J. M. et Shenolikar, S. (2001). « Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1 ». In : *Molecular and Cellular Biology* 21.20, p. 6841–6850. ISSN : 0270-7306. DOI : 10.1128/MCB.21.20.6841-6850.2001.

Cook, G. C. et Webb, A. J. (2000). « Perceptions of malaria transmission before Ross' discovery in 1897 ». In : *Postgraduate Medical Journal* 76.901, p. 738–740. ISSN : 0032-5473.

Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E. D., Sevier, C. S., Ding, H., Koh, J. L. Y., Toufighi, K., Mostafavi, S. *et al.* (2010). « The genetic landscape of a cell ». In : *Science* 327.5964, p. 425–431. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1180823.

Counihan, N. A., Chisholm, S. A., Bullen, H. E., Srivastava, A., Sanders, P. R., Jonsdottir, T. K., Weiss, G. E., Ghosh, S., Crabb, B. S., Creek, D. J. *et al.* (2017). « Plasmodium falciparum parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate ». In : *eLife* 6. ISSN : 2050-084X. DOI : 10.7554/eLife.23217.

Cox, F. E. (2010). « History of the discovery of the malaria parasites and their vectors ». In : *Parasites & Vectors* 3.1, p. 5. ISSN : 1756-3305. DOI : 10.1186/1756-3305-3-5.

Daher, W., Browaeys, E., Pierrot, C., Jouin, H., Dive, D., Meurice, E., Dissous, C., Capron, M., Tomavo, S., Doerig, C. *et al.* (2006). « Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by PfLRR1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Molecular Microbiology* 60.3, p. 578–590. ISSN : 0950-382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2006.05119.x.

Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E. A., Sinden, R. E. et Leroy, D. (2012). « The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages

of Plasmodium : a comparative study with human and rodent parasites ». In : *PLoS medicine* 9.2, e1001169. ISSN : 1549-1676. DOI : 10.1371/journal.pmed.1001169.

Dixon, M. W. A., Dearnley, M. K., Hanssen, E., Gilberger, T. et Tilley, L. (2012). « Shape-shifting gametocytes : how and why does P. falciparum go banana-shaped ? » In : *Trends in Parasitology* 28.11, p. 471–478. ISSN : 1471-5007. DOI : 10.1016/j.pt.2012.07.007.

Doerig, C., Rayner, J. C., Scherf, A. et Tobin, A. B. (2015). « Post-translational protein modifications in malaria parasites ». In : *Nature Reviews. Microbiology* 13.3, p. 160–172. ISSN : 1740-1534. DOI : 10.1038/nrmicro3402.

Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J. *et al.* (2009). « Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria ». In : *The New England Journal of Medicine* 361.5, p. 455–467. ISSN : 1533-4406. DOI : 10.1056/NEJMoa0808859.

Duan, H., Wang, C., Wang, M., Gao, X., Yan, M., Akram, S., Peng, W., Zou, H., Wang, D., Zhou, J. *et al.* (2016). « Phosphorylation of PP1 regulator Sds22 by PLK1 ensures accurate chromosome segregation ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 291.50, p. 26239. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.A116.745372.

Duraisingh, M. T. et Cowman, A. F. (2005). « Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance ». In : *Acta Tropica* 94.3, p. 181–190. ISSN : 0001-706X. DOI : 10.1016/j.actatropica.2005.04.008.

Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P. et Barford, D. (1997). « Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1 ». In : *The EMBO journal* 16.8, p. 1876–1887. ISSN : 0261-4189. DOI : 10.1093/emboj/16.8.1876.

Eiteneuer, A., Seiler, J., Weith, M., Beullens, M., Lesage, B., Krenn, V., Musacchio, A., Bollen, M. et Meyer, H. (2014). « Inhibitor-3 ensures bipolar mitotic spindle attachment by limiting association of SDS22 with kinetochore-bound protein phosphatase-1 ». In : *The EMBO journal* 33.22, p. 2704–2720. ISSN : 1460-2075. DOI : 10.15252/embj.201489054.

Elsworth, B., Matthews, K., Nie, C. Q., Kalanon, M., Charnaud, S. C., Sanders, P. R., Chisholm, S. A., Counihan, N. A., Shaw, P. J., Pino, P. *et al.* (2014). « PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites ». In : *Nature* 511.7511, p. 587–591. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature13555.

Eto, M., Elliott, E., Prickett, T. D. et Brautigan, D. L. (2002). « Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with NimA-related kinase to induce centrosome separation ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 277.46, p. 44013–44020. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M208035200.

Fardilha, M., Esteves, S. L. C., Korrodi-Gregório, L., Vintém, A. P., Domingues, S. C., Rebelo, S., Morrice, N., Cohen, P. T. W., Cruz e Silva, O. A. B. da et Cruz e Silva, E. F. da (2011). « Identification of the human testis protein phosphatase 1 interactome ». In : *Biochemical Pharmacology* 82.10, p. 1403–1415. ISSN : 1873-2968. DOI : 10.1016/j.bcp.2011.02.018.

Fidock, D. A., Rosenthal, P. J., Croft, S. L., Brun, R. et Nwaka, S. (2004). « Antimalarial drug discovery : efficacy models for compound screening ». In : *Nature Reviews. Drug Discovery* 3.6, p. 509–520. ISSN : 1474-1776. DOI : 10.1038/nrd1416.

Fisher, L. A., Wang, L., Wu, L. et Peng, A. (2014). « Phosphatase 1 nuclear targeting subunit is an essential regulator of M-phase entry, maintenance, and exit ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 289.34, p. 23745–23752. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.M114.572149.

Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacci, J. B., Tabb, D. L. *et al.* (2002). « A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle ». In : *Nature* 419.6906, p. 520–526. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/nature01107.

Flores-Delgado, G., Liu, C. W. Y., Sposto, R. et Berndt, N. (2007). « A limited screen for protein interactions reveals new roles for protein phosphatase 1 in cell cycle control and apoptosis ». In : *Journal of Proteome Research* 6.3, p. 1165–1175. ISSN : 1535-3893. DOI : 10.1021/pr060504h.

Flueck, C., Bartfai, R., Volz, J., Niederwieser, I., Salcedo-Amaya, A. M., Alako, B. T. F., Ehlgen, F., Ralph, S. A., Cowman, A. F., Bozdech, Z. *et al.* (2009). « Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 marks genomic loci linked to phenotypic variation of exported virulence factors ». In : *PLoS pathogens* 5.9, e1000569. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1000569.

Forrest, A. R. R., Ravasi, T., Taylor, D., Huber, T., Hume, D. A., Grimmond, S., RIKEN GER Group et GSL Members (2003). « Phosphoregulators : protein kinases and protein phosphatases of mouse ». In : *Genome Research* 13.6, p. 1443–1454. ISSN : 1088-9051. DOI : 10.1101/gr.954803.

Frevert, U., Usynin, I., Baer, K. et Klotz, C. (2006). « Nomadic or sessile : can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver ? » In : *Cellular Microbiology* 8.10, p. 1537–1546. ISSN : 1462-5814. DOI : 10.1111/j.1462-5822.2006.00777.x.

Fréville, A., Cailliau-Maggio, K., Pierrot, C., Tellier, G., Kalamou, H., Lafitte, S., Martoriati, A., Pierce, R. J., Bodart, J.-F. et Khalife, J. (2013). « Plasmodium falciparum encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1 : perspectives for novel anti-plasmodial therapy ». In : *BMC biology* 11, p. 80. ISSN : 1741-7007. DOI : 10.1186/1741-7007-11-80.

Fréville, A., Landrieu, I., García-Gimeno, M. A., Vicogne, J., Montbarbon, M., Bertin, B., Verger, A., Kalamou, H., Sanz, P., Werkmeister, E. *et al.* (2012). « Plasmodium falciparum inhibitor-3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 287.2, p. 1306–1321. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.M111.276865.

Fréville, A., Tellier, G., Vandomme, A., Pierrot, C., Vicogne, J., Cantrelle, F.-X., Martoriati, A., Cailliau-Maggio, K., Khalife, J. et Landrieu, I. (2014). « Identification of a Plasmodium falciparum inhibitor-2 motif involved in the binding and regulation activity of protein phosphatase type 1 ». In : *The FEBS journal* 281.19, p. 4519–4534. ISSN : 1742-4658. DOI : 10.1111/febs.12960.

Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J.-C., Shorte, S. L. et Ménard, R. (2004). « Imaging movement of malaria parasites during transmission by Anopheles mosquitoes ». In : *Cellular Microbiology* 6.7, p. 687–694. ISSN : 1462-5814. DOI : 10.1111/j.1462-5822.2004.00395.x.

Fromont-Racine, M., Rain, J. C. et Legrain, P. (1997). « Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens ». In : *Nature Genetics* 16.3, p. 277–282. ISSN : 1061-4036. DOI : 10.1038/ng0797-277.

Garcia, J. E., Puentes, A. et Patarroyo, M. E. (2006). « Developmental biology of sporozoite-host interactions in Plasmodium falciparum malaria : implications for vaccine design ». In : *Clinical Microbiology Reviews* 19.4, p. 686–707. ISSN : 0893-8512. DOI : 10.1128/CMR.00063-05.

Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S. *et al.* (2002). « Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Nature* 419.6906, p. 498–511. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/nature01097.

Gerald, N., Mahajan, B. et Kumar, S. (2011). « Mitosis in the human malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Eukaryotic Cell* 10.4, p. 474–482. ISSN : 1535-9786. DOI : 10.1128/EC.00314-10.

Gherman, A., Wang, R. et Avramopoulos, D. (2009). « Orientation, distance, regulation and function of neighbouring genes ». In : *Human Genomics* 3.2, p. 143–156. ISSN : 1479-7364.

Ghorbal, M., Gorman, M., Macpherson, C. R., Martins, R. M., Scherf, A. et Lopez-Rubio, J.-J. (2014). « Genome editing in the human malaria parasite Plasmodium falciparum using the CRISPR-Cas9 system ». In : *Nature Biotechnology* 32.8, p. 819–821. ISSN : 1546-1696. DOI : 10.1038/nbt.2925.

Gibbons, J. A., Kozubowski, L., Tatchell, K. et Shenolikar, S. (2007). « Expression of human protein phosphatase-1 in Saccharomyces cerevisiae highlights the role of phosphatase isoforms in regulating eukaryotic functions ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 282.30, p. 21838–21847. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M701272200.

Gisselberg, J. E., Zhang, L., Elias, J. E. et Yeh, E. (2017). « The Prenylated Proteome of Plasmodium falciparum Reveals Pathogen-specific Prenylation Activity and Drug Mechanism-of-action ». In : *Molecular & cellular proteomics : MCP* 16.4, S54–S64. ISSN : 1535-9484. DOI : 10.1074/mcp.M116.064550.

Goldberg, J., Huang, H. B., Kwon, Y. G., Greengard, P., Nairn, A. C. et Kuriyan, J. (1995). « Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase 1 ». In : *Nature* 376.6543, p. 745–753. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/376745a0.

Goodman, C. D., Siregar, J. E., Mollard, V., Vega-Rodríguez, J., Syafruddin, D., Matsuoka, H., Matsuzaki, M., Toyama, T., Sturm, A., Cozijnsen, A. *et al.* (2016). « Parasites resistant to the antimalarial atovaquone fail to transmit by mosquitoes ». In : *Science* 352.6283, p. 349–353. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.aad9279.

Grassi, B. (1901). *Studi di uno zoologo sulla malaria.* 2nd ed. Roma : R. Accademia dei lincei, 354 p.

Griffith, K. S., Lewis, L. S., Mali, S. et Parise, M. E. (2007). « Treatment of malaria in the United States : a systematic review ». In : *JAMA* 297.20, p. 2264–2277. ISSN : 1538-3598. DOI : 10.1001/jama.297.20.2264.

Gupta, A., Singh, A. K. et Qayum, A. (2014). « Evaluating Ancient Indian History and Culture towards Malaria Control Measures Based on Traditional Knowledge System. »

In : *International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies* 1.8, p. 181–190. ISSN : 2348–0343.

Guttery, D. S., Poulin, B., Ramaprasad, A., Wall, R. J., Ferguson, D. J. P., Brady, D., Patzewitz, E.-M., Whipple, S., Straschil, U., Wright, M. H. *et al.* (2014). « Genome-wide functional analysis of Plasmodium protein phosphatases reveals key regulators of parasite development and differentiation ». In : *Cell Host & Microbe* 16.1, p. 128–140. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2014.05.020.

Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., Gribble, M., Baker, D., Marois, E., Russell, S. *et al.* (2016). « A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector Anopheles gambiae ». In : *Nature Biotechnology* 34.1, p. 78–83. ISSN : 1546-1696. DOI : 10.1038/nbt.3439.

Harding, C. R. et Meissner, M. (2014). « The inner membrane complex through development of Toxoplasma gondii and Plasmodium ». In : *Cellular Microbiology* 16.5, p. 632–641. ISSN : 1462-5822. DOI : 10.1111/cmi.12285.

Harding, H. P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.-J., Kaufman, R. J. et Ron, D. (2009). « Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.6, p. 1832–1837. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.0809632106.

Harvey, K. L., Yap, A., Gilson, P. R., Cowman, A. F. et Crabb, B. S. (2014). « Insights and controversies into the role of the key apicomplexan invasion ligand, Apical Membrane Antigen 1 ». In : *International Journal for Parasitology* 44.12, p. 853–857. ISSN : 1879-0135. DOI : 10.1016/j.ijpara.2014.08.001.

Hasenkamp, S., Russell, K. T. et Horrocks, P. (2012). « Comparison of the absolute and relative efficiencies of electroporation-based transfection protocols for Plasmodium falciparum ». In : *Malaria Journal* 11, p. 210. ISSN : 1475-2875. DOI : 10.1186/1475-2875-11-210.

Hawass, Z., Gad, Y. Z., Ismail, S., Khairat, R., Fathalla, D., Hasan, N., Ahmed, A., Elleithy, H., Ball, M., Gaballah, F. *et al.* (2010). « Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family ». In : *JAMA* 303.7, p. 638–647. ISSN : 1538-3598. DOI : 10.1001/jama.2010.121.

Hayakawa, T., Culleton, R., Otani, H., Horii, T. et Tanabe, K. (2008). « Big bang in the evolution of extant malaria parasites ». In : *Molecular Biology and Evolution* 25.10, p. 2233–2239. ISSN : 1537-1719. DOI : 10.1093/molbev/msn171.

Heiber, A., Kruse, F., Pick, C., Grüring, C., Flemming, S., Oberli, A., Schoeler, H., Retzlaff, S., Mesén-Ramírez, P., Hiss, J. A. *et al.* (2013). « Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in Plasmodium falciparum protein export ». In : *PLoS pathogens* 9.8, e1003546. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1003546.

Heroes, E., Lesage, B., Görnemann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L. et Bollen, M. (2013). « The PP1 binding code : a molecular-lego strategy that governs specificity ». In : *The FEBS journal* 280.2, p. 584–595. ISSN : 1742-4658. DOI : 10.1111/j.1742-4658.2012.08547.x.

Heroes, E., Rip, J., Beullens, M., Van Meervelt, L., De Gendt, S. et Bollen, M. (2015). « Metals in the active site of native protein phosphatase-1 ». In : *Journal of Inorganic Biochemistry* 149, p. 1–5. ISSN : 1873-3344. DOI : 10.1016/j.jinorgbio.2015.03.012.

Hiller, N. L., Bhattacharjee, S., Ooij, C. van, Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estraño, C. et Haldar, K. (2004). « A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection ». In : *Science* 306.5703, p. 1934–1937. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1102737.

Holder, A. A., Mohd Ridzuan, M. A. et Green, J. L. (2012). « Calcium dependent protein kinase 1 and calcium fluxes in the malaria parasite ». In : *Microbes and Infection* 14.10, p. 825–830. ISSN : 1769-714X. DOI : 10.1016/j.micinf.2012.04.006.

Hollin, T., De Witte, C., Lenne, A., Pierrot, C. et Khalife, J. (2016). « Analysis of the interactome of the Ser/Thr Protein Phosphatase type 1 in Plasmodium falciparum ». In : *BMC genomics* 17, p. 246. ISSN : 1471-2164. DOI : 10.1186/s12864-016-2571-z.

Huang, H.-S., Pozarowski, P., Gao, Y., Darzynkiewicz, Z. et Lee, E. Y. C. (2005). « Protein phosphatase-1 inhibitor-3 is co-localized to the nucleoli and centrosomes with PP1gamma1 and PP1alpha, respectively ». In : *Archives of Biochemistry and Biophysics* 443.1, p. 33–44. ISSN : 0003-9861. DOI : 10.1016/j.abb.2005.08.021.

Hughes, K. R., Philip, N., Starnes, G. L., Taylor, S. et Waters, A. P. (2010). « From cradle to grave : RNA biology in malaria parasites ». In : *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 1.2, p. 287–303. ISSN : 1757-7012. DOI : 10.1002/wrna.30.

Hurley, T. D., Yang, J., Zhang, L., Goodwin, K. D., Zou, Q., Cortese, M., Dunker, A. K. et DePaoli-Roach, A. A. (2007). « Structural basis for regulation of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 282.39, p. 28874–28883. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M703472200.

IR Mapper (2017). In : URL : http://www.irmapper.com/.

Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y. et Yuda, M. (2004). « Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer ». In : *PLoS biology* 2.1, E4. ISSN : 1545-7885. DOI : 10.1371/journal.pbio.0020004.

Jackson, K. E., Klonis, N., Ferguson, D. J. P., Adisa, A., Dogovski, C. et Tilley, L. (2004). « Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, Plasmodium falciparum ». In : *Molecular Microbiology* 54.1, p. 109–122. ISSN : 0950-382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2004.04284.x.

Janse, C. J., Ramesar, J. et Waters, A. P. (2006). « High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei ». In : *Nature Protocols* 1.1, p. 346–356. ISSN : 1750-2799. DOI : 10.1038/nprot.2006.53.

Joice, R., Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K. B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K. C. *et al.* (2014). « Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow ». In : *Science Translational Medicine* 6.244, 244re5. ISSN : 1946-6242. DOI : 10.1126/scitranslmed.3008882.

Jones, M. L., Collins, M. O., Goulding, D., Choudhary, J. S. et Rayner, J. C. (2012). « Analysis of protein palmitoylation reveals a pervasive role in Plasmodium development and pathogenesis ». In : *Cell Host & Microbe* 12.2, p. 246–258. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2012.06.005.

Joy, D. A., Feng, X., Mu, J., Furuya, T., Chotivanich, K., Krettli, A. U., Ho, M., Wang, A., White, N. J., Suh, E. *et al.* (2003). « Early origin and recent expansion of Plasmodium falciparum ». In : *Science* 300.5617, p. 318–321. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1081449.

Kafsack, B. F. C., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., Williams, A. E., Drought, L. G., Kwiatkowski, D. P., Baker, D. A. *et al.* (2014). « A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites ». In : *Nature* 507.7491, p. 248–252. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature12920.

Kaneko, I., Iwanaga, S., Kato, T., Kobayashi, I. et Yuda, M. (2015). « Genome-Wide Identification of the Target Genes of AP2-O, a Plasmodium AP2-Family Transcription Factor ». In : *PLoS pathogens* 11.5, e1004905. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1004905.

Kapoor, R., Arora, S., Ponia, S. S., Kumar, B., Maddika, S. et Banerjea, A. C. (2015). « The miRNA miR-34a enhances HIV-1 replication by targeting PNUTS/PPP1R10, which negatively regulates HIV-1 transcriptional complex formation ». In : *The Biochemical Journal* 470.3, p. 293–302. ISSN : 1470-8728. DOI : 10.1042/BJ20150700.

Kappe, S. H., Noe, A. R., Fraser, T. S., Blair, P. L. et Adams, J. H. (1998). « A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.3, p. 1230–1235. ISSN : 0027-8424.

Karmodiya, K., Pradhan, S. J., Joshi, B., Jangid, R., Reddy, P. C. et Galande, S. (2015). « A comprehensive epigenome map of Plasmodium falciparum reveals unique mechanisms of transcriptional regulation and identifies H3K36me2 as a global mark of gene suppression ». In : *Epigenetics & Chromatin* 8, p. 32. DOI : 10.1186/s13072-015-0029-1.

Khan, S. M., Franke-Fayard, B., Mair, G. R., Lasonder, E., Janse, C. J., Mann, M. et Waters, A. P. (2005). « Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific Plasmodium biology ». In : *Cell* 121.5, p. 675–687. ISSN : 0092-8674. DOI : 10.1016/j.cell.2005.03.027.

Kim, Y.-M., Watanabe, T., Allen, P. B., Kim, Y.-M., Lee, S.-J., Greengard, P., Nairn, A. C. et Kwon, Y.-G. (2003). « PNUTS, a protein phosphatase 1 (PP1) nuclear targeting subunit. Characterization of its PP1- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 278.16, p. 13819–13828. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M209621200.

Kirchhefer, U., Baba, H. A., Bokník, P., Breeden, K. M., Mavila, N., Brüchert, N., Justus, I., Matus, M., Schmitz, W., Depaoli-Roach, A. A. *et al.* (2005). « Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2 ». In : *Cardiovascular Research* 68.1, p. 98–108. ISSN : 0008-6363. DOI : 10.1016/j.cardiores.2005.05.019.

Kitron, U. et Spielman, A. (1989). « Suppression of transmission of malaria through source reduction : antianopheline measures applied in Israel, the United States, and Italy ». In : *Reviews of Infectious Diseases* 11.3, p. 391–406. ISSN : 0162-0886.

Knowles, R. M., Das, B. et Knowles, R. (1932). « A study of monkey-malaria and its experimental transmission to man ». In : *Indian Medical Gazette* 67.6, p. 301–320.

Korrodi-Gregório, L., Abrantes, J., Muller, T., Melo-Ferreira, J., Marcus, K., Cruz e Silva, O. A. B. da, Fardilha, M. et Esteves, P. J. (2013a). « Not so pseudo : the evolutionary history of protein phosphatase 1 regulatory subunit 2 and related pseudogenes ». In : *BMC evolutionary biology* 13, p. 242. ISSN : 1471-2148. DOI : 10.1186/1471-2148-13-242.

Korrodi-Gregório, L., Esteves, S. L. C. et Fardilha, M. (2014). « Protein phosphatase 1 catalytic isoforms : specificity toward interacting proteins ». In : *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 164.5, p. 366–391. ISSN : 1878-1810. DOI : 10.1016/j.trsl.2014.07.001.

Korrodi-Gregório, L., Ferreira, M., Vintém, A. P., Wu, W., Muller, T., Marcus, K., Vijayaraghavan, S., Brautigan, D. L., Cruz E Silva, O. A. B. da, Fardilha, M. *et al.* (2013b). « Identification and characterization of two distinct PPP1R2 isoforms in human spermatozoa ». In : *BMC cell biology* 14, p. 15. ISSN : 1471-2121. DOI : 10.1186/1471-2121-14-15.

Kublin, J. G., Mikolajczak, S. A., Sack, B. K., Fishbaugher, M. E., Seilie, A., Shelton, L., VonGoedert, T., Firat, M., Magee, S., Fritzen, E. *et al.* (2017). « Complete attenuation of genetically engineered Plasmodium falciparum sporozoites in human subjects ». In : *Science Translational Medicine* 9.371. ISSN : 1946-6242. DOI : 10.1126/scitranslmed.aad9099.

Kumar, R., Adams, B., Oldenburg, A., Musiyenko, A. et Barik, S. (2002). « Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, Plasmodium falciparum : demonstration of its essential role using RNA interference ». In : *Malaria Journal* 1, p. 5. ISSN : 1475-2875.

LaCount, D. J., Vignali, M., Chettier, R., Phansalkar, A., Bell, R., Hesselberth, J. R., Schoenfeld, L. W., Ota, I., Sahasrabudhe, S., Kurschner, C. *et al.* (2005). « A protein interaction network of the malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Nature* 438.7064, p. 103–107. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature04104.

Lad, C., Williams, N. H. et Wolfenden, R. (2003). « The rate of hydrolysis of phosphomonoester dianions and the exceptional catalytic proficiencies of protein and inositol phosphatases ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.10, p. 5607–5610. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.0631607100.

Lajarín-Cuesta, R., Arribas, R. L. et De Los Ríos, C. (2016). « Ligands for Ser/Thr phosphoprotein phosphatases : a patent review (2005-2015) ». In : *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26.3, p. 389–407. ISSN : 1744-7674. DOI : 10.1517/13543776.2016.1135903.

Landsverk, H. B., Kirkhus, M., Bollen, M., Küntziger, T. et Collas, P. (2005). « PNUTS enhances in vitro chromosome decondensation in a PP1-dependent manner ». In : *The Biochemical Journal* 390 (Pt 3), p. 709–717. ISSN : 1470-8728. DOI : 10.1042/BJ20050678.

Landsverk, H. B., Mora-Bermúdez, F., Landsverk, O. J. B., Hasvold, G., Naderi, S., Bakke, O., Ellenberg, J., Collas, P., Syljuåsen, R. G. et Küntziger, T. (2010). « The protein phosphatase 1 regulator PNUTS is a new component of the DNA damage response ». In : *EMBO reports* 11.11, p. 868–875. ISSN : 1469-3178. DOI : 10.1038/embor.2010.134.

Lasonder, E., Green, J. L., Camarda, G., Talabani, H., Holder, A. A., Langsley, G. et Alano, P. (2012). « The Plasmodium falciparum schizont phosphoproteome reveals extensive

phosphatidylinositol and cAMP-protein kinase A signaling ». In : *Journal of Proteome Research* 11.11, p. 5323–5337. ISSN : 1535-3907. DOI : 10.1021/pr300557m.

Lasonder, E., Rijpma, S. R., Schaijk, B. C. L. van, Hoeijmakers, W. A. M., Kensche, P. R., Gresnigt, M. S., Italiaander, A., Vos, M. W., Woestenenk, R., Bousema, T. *et al.* (2016). « Integrated transcriptomic and proteomic analyses of P. falciparum gametocytes : molecular insight into sex-specific processes and translational repression ». In : *Nucleic Acids Research* 44.13, p. 6087–6101. ISSN : 1362-4962. DOI : 10.1093/nar/gkw536.

Le Roch, K. G., Johnson, J. R., Florens, L., Zhou, Y., Santrosyan, A., Grainger, M., Yan, S. F., Williamson, K. C., Holder, A. A., Carucci, D. J. *et al.* (2004). « Global analysis of transcript and protein levels across the Plasmodium falciparum life cycle ». In : *Genome Research* 14.11, p. 2308–2318. ISSN : 1088-9051. DOI : 10.1101/gr.2523904.

Leach, C., Shenolikar, S. et Brautigan, D. L. (2003). « Phosphorylation of phosphatase inhibitor-2 at centrosomes during mitosis ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 278.28, p. 26015–26020. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M300782200.

Lee, J.-H., You, J., Dobrota, E. et Skalnik, D. G. (2010). « Identification and characterization of a novel human PP1 phosphatase complex ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 285.32, p. 24466–24476. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.M110.109801.

Lesage, B., Beullens, M., Pedelini, L., Garcia-Gimeno, M. A., Waelkens, E., Sanz, P. et Bollen, M. (2007). « A complex of catalytically inactive protein phosphatase-1 sandwiched between Sds22 and inhibitor-3 ». In : *Biochemistry* 46.31, p. 8909–8919. ISSN : 0006-2960. DOI : 10.1021/bi7003119.

Levine, N. (1970). « Taxonomy of the Sporozoa ». In : *J Parasitol* 56, p. 208–209.

Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D. *et al.* (1980). « A newly revised classification of the protozoa ». In : *The Journal of Protozoology* 27.1, p. 37–58. ISSN : 0022-3921.

Li, M., Stefansson, B., Wang, W., Schaefer, E. M. et Brautigan, D. L. (2006). « Phosphorylation of the Pro-X-Thr-Pro site in phosphatase inhibitor-2 by cyclin-dependent protein kinase during M-phase of the cell cycle ». In : *Cellular Signalling* 18.8, p. 1318–1326. ISSN : 0898-6568. DOI : 10.1016/j.cellsig.2005.10.020.

Lim, L. et McFadden, G. I. (2010). « The evolution, metabolism and functions of the apicoplast ». In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365.1541, p. 749–763. ISSN : 1471-2970. DOI : 10.1098/rstb.2009.0273.

Lin, T.-H., Chen, Y.-C., Chyan, C.-l., Tsay, L.-h., Tang, T. C., Jeng, H.-H., Lin, F.-M. et Huang, H.-b. (2003). « Phosphorylation by glycogen synthase kinase of inhibitor-2 does not change its structure in free state ». In : *FEBS letters* 554.3, p. 253–256. ISSN : 0014-5793.

Lindner, S. E., Swearingen, K. E., Harupa, A., Vaughan, A. M., Sinnis, P., Moritz, R. L. et Kappe, S. H. I. (2013). « Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites ». In : *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12.5, p. 1127–1143. ISSN : 1535-9484. DOI : 10.1074/mcp.M112.024505.

López-Barragán, M. J., Lemieux, J., Quiñones, M., Williamson, K. C., Molina-Cruz, A., Cui, K., Barillas-Mury, C., Zhao, K. et Su, X.-z. (2011). « Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of Plasmodium falciparum ». In : *BMC genomics* 12, p. 587. ISSN : 1471-2164. DOI : 10.1186/1471-2164-12-587.

Lu, F., Culleton, R., Zhang, M., Ramaprasad, A., Seidlein, L. von, Zhou, H., Zhu, G., Tang, J., Liu, Y., Wang, W. *et al.* (2017). « Emergence of Indigenous Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum in Africa ». In : *The New England Journal of Medicine.* ISSN : 1533-4406. DOI : 10.1056/NEJMc1612765.

MacKelvie, S. H., Andrews, P. D. et Stark, M. J. (1995). « The Saccharomyces cerevisiae gene SDS22 encodes a potential regulator of the mitotic function of yeast type 1 protein phosphatase ». In : *Molecular and Cellular Biology* 15.7, p. 3777–3785. ISSN : 0270-7306.

Maegraith, B. (1948). *Pathological Processes in Malaria and Blackwater Fever.* Blackwell Scientific Publications.

Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F. et Tilley, L. (2009). « Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte ». In : *Nature Reviews. Microbiology* 7.5, p. 341–354. ISSN : 1740-1534. DOI : 10.1038/nrmicro2110.

Marciniak, S., Prowse, T. L., Herring, D. A., Klunk, J., Kuch, M., Duggan, A. T., Bondioli, L., Holmes, E. C. et Poinar, H. N. (2016). « Plasmodium falciparum malaria in 1(st)-2(nd) century CE southern Italy ». In : *Current biology : CB* 26.23, R1220–R1222. ISSN : 1879-0445. DOI : 10.1016/j.cub.2016.10.016.

Marella, A., Tanwar, O. P., Saha, R., Ali, M. R., Srivastava, S., Akhter, M., Shaquiquzzaman, M. et Alam, M. M. (2013). « Quinoline : A versatile heterocyclic ». In : *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* 21.1, p. 1–12. ISSN : 1319-0164. DOI : 10.1016/j.jsps.2012.03.002.

Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E. et Cowman, A. F. (2004). « Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte ». In : *Science* 306.5703, p. 1930–1933. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1102452.

Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Bergé, J. B., Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N. et Pauron, D. (1998). « Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s ». In : *Insect Molecular Biology* 7.2, p. 179–184. ISSN : 0962-1075.

Martins, Y. C. et Daniel-Ribeiro, C. T. (2013). « A new hypothesis on the manifestation of cerebral malaria : the secret is in the liver ». In : *Medical Hypotheses* 81.5, p. 777–783. ISSN : 1532-2777. DOI : 10.1016/j.mehy.2013.08.005.

Martinsen, E. S., Perkins, S. L. et Schall, J. J. (2008). « A three-genome phylogeny of malaria parasites (Plasmodium and closely related genera) : evolution of life-history traits and host switches ». In : *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47.1, p. 261–273. ISSN : 1055-7903. DOI : 10.1016/j.ympev.2007.11.012.

Matuschewski, K. (2006). « Getting infectious : formation and maturation of Plasmodium sporozoites in the Anopheles vector ». In : *Cellular Microbiology* 8.10, p. 1547–1556. ISSN : 1462-5814. DOI : 10.1111/j.1462-5822.2006.00778.x.

Meiselbach, H., Sticht, H. et Enz, R. (2006). « Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif : molecular description of binding specificities identifies interacting proteins ». In : *Chemistry & Biology* 13.1, p. 49–59. ISSN : 1074-5521. DOI : 10.1016/j.chembiol.2005.10.009.

Meremikwu, M. M., Donegan, S., Sinclair, D., Esu, E. et Oringanje, C. (2012). « Intermittent preventive treatment for malaria in children living in areas with seasonal transmission ». In : *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2, p. CD003756. ISSN : 1469-493X. DOI : 10.1002/14651858.CD003756.pub4.

Meshnick, S. R. et Dobson, M. J. (2001). *Antimalarial Chemotherapy. The History of Antimalarial Drugs*. Sous la dir. de P. J. Rosenthal. Humana Press.

Miao, J., Chen, Z., Wang, Z., Shrestha, S., Li, X., Li, R. et Cui, L. (2017). « Sex-Specific Biology of the Human Malaria Parasite Revealed from the Proteomes of Mature Male and Female Gametocytes ». In : *Molecular & cellular proteomics : MCP*. ISSN : 1535-9484. DOI : 10.1074/mcp.M116.061804.

Michalak, P. (2008). « Coexpression, coregulation, and cofunctionality of neighboring genes in eukaryotic genomes ». In : *Genomics* 91.3, p. 243–248. ISSN : 1089-8646. DOI : 10.1016/j.ygeno.2007.11.002.

Milani, K. J., Schneider, T. G. et Taraschi, T. F. (2015). « Defining the morphology and mechanism of the hemoglobin transport pathway in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes ». In : *Eukaryotic Cell* 14.4, p. 415–426. ISSN : 1535-9786. DOI : 10.1128/EC.00267-14.

Minnebo, N., Görnemann, J., O'Connell, N., Van Dessel, N., Derua, R., Vermunt, M. W., Page, R., Beullens, M., Peti, W., Van Eynde, A. *et al.* (2013). « NIPP1 maintains EZH2 phosphorylation and promoter occupancy at proliferation-related target genes ». In : *Nucleic Acids Research* 41.2, p. 842–854. ISSN : 1362-4962. DOI : 10.1093/nar/gks1255.

Mishra, S. K., Mohanty, S., Satpathy, S. K. et Mohapatra, D. N. (2007). « Cerebral malaria in adults – a description of 526 cases admitted to Ispat General Hospital in Rourkela, India ». In : *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 101.3, p. 187–193. ISSN : 0003-4983. DOI : 10.1179/136485907X157004.

Mordmüller, B., Surat, G., Lagler, H., Chakravarty, S., Ishizuka, A. S., Lalremruata, A., Gmeiner, M., Campo, J. J., Esen, M., Ruben, A. J. *et al.* (2017). « Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine ». In : *Nature* 542.7642, p. 445–449. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature21060.

Morrison, D. A. (2009). « Evolution of the Apicomplexa : where are we now ? » In : *Trends in Parasitology* 25.8, p. 375–382. ISSN : 1471-5007. DOI : 10.1016/j.pt.2009.05.010.

Morrissette, N. S. et Sibley, L. D. (2002). « Cytoskeleton of apicomplexan parasites ». In : *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 66.1, p. 21–38. ISSN : 1092-2172.

Mukherjee, A., Bopp, S., Magistrado, P., Wong, W., Daniels, R., Demas, A., Schaffner, S., Amaratunga, C., Lim, P., Dhorda, M. *et al.* (2017). « Artemisinin resistance without pfkelch13 mutations in Plasmodium falciparum isolates from Cambodia ». In : *Malaria Journal* 16.1, p. 195. ISSN : 1475-2875. DOI : 10.1186/s12936-017-1845-5.

Mundwiler-Pachlatko, E. et Beck, H.-P. (2013). « Maurer's clefts, the enigma of Plasmodium falciparum ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.50, p. 19987–19994. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1309247110.

Nerlich, A. G., Schraut, B., Dittrich, S., Jelinek, T. et Zink, A. R. (2008). « Plasmodium falciparum in ancient Egypt ». In : *Emerging Infectious Diseases* 14.8, p. 1317–1319. DOI : 10.3201/eid1408.080235.

Nunes, M. C., Goldring, J. P. D., Doerig, C. et Scherf, A. (2007). « A novel protein kinase family in Plasmodium falciparum is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell ». In : *Molecular Microbiology* 63.2, p. 391–403. ISSN : 0950-382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2006.05521.x.

Nuytten, M., Beke, L., Van Eynde, A., Ceulemans, H., Beullens, M., Van Hummelen, P., Fuks, F. et Bollen, M. (2008). « The transcriptional repressor NIPP1 is an essential player in EZH2-mediated gene silencing ». In : *Oncogene* 27.10, p. 1449–1460. ISSN : 1476-5594. DOI : 10.1038/sj.onc.1210774.

Ockenhouse, C. F., Sun, P. F., Lanar, D. E., Wellde, B. T., Hall, B. T., Kester, K., Stoute, J. A., Magill, A., Krzych, U., Farley, L. *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 ». In : *The Journal of Infectious Diseases* 177.6, p. 1664–1673. ISSN : 0022-1899.

O'Connell, N., Nichols, S. R., Heroes, E., Beullens, M., Bollen, M., Peti, W. et Page, R. (2012). « The molecular basis for substrate specificity of the nuclear NIPP1 :PP1 holoenzyme ». In : *Structure* 20.10, p. 1746–1756. ISSN : 1878-4186. DOI : 10.1016/j.str.2012.08.003.

Oehring, S. C., Woodcroft, B. J., Moes, S., Wetzel, J., Dietz, O., Pulfer, A., Dekiwadia, C., Maeser, P., Flueck, C., Witmer, K. *et al.* (2012). « Organellar proteomics reveals hundreds of novel nuclear proteins in the malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Genome Biology* 13.11, R108. ISSN : 1474-760X. DOI : 10.1186/gb-2012-13-11-r108.

Pandey, R., Mohmmed, A., Pierrot, C., Khalife, J., Malhotra, P. et Gupta, D. (2014). « Genome wide in silico analysis of Plasmodium falciparum phosphatome ». In : *BMC genomics* 15, p. 1024. ISSN : 1471-2164. DOI : 10.1186/1471-2164-15-1024.

Park, I. K. et DePaoli-Roach, A. A. (1994). « Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 269.46, p. 28919–28928. ISSN : 0021-9258.

Pathak, A., Monte, F. del, Zhao, W., Schultz, J.-E., Lorenz, J. N., Bodi, I., Weiser, D., Hahn, H., Carr, A. N., Syed, F. *et al.* (2005). « Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1 ». In : *Circulation Research* 96.7, p. 756–766. ISSN : 1524-4571. DOI : 10.1161/01.RES.0000161256.85833.fa.

Pedelini, L., Marquina, M., Ariño, J., Casamayor, A., Sanz, L., Bollen, M., Sanz, P. et Garcia-Gimeno, M. A. (2007). « YPI1 and SDS22 proteins regulate the nuclear localization and function of yeast type 1 phosphatase Glc7 ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 282.5, p. 3282–3292. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M607171200.

Peggie, M. W., MacKelvie, S. H., Bloecher, A., Knatko, E. V., Tatchell, K. et Stark, M. J. R. (2002). « Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1 ». In : *Journal of Cell Science* 115 (Pt 1), p. 195–206. ISSN : 0021-9533.

Perkins, F., Barta, J., Clopton, R., Peirce, M. et Upton, S. (2000). *"Phylum Apicomplexa". An Illustrated guide to the Protozoa : organisms traditionally referred to as protozoa, or newly discovered groups.* Sous la dir. de J. Lee, G. Leedale et P. Bradbury. Blackwell Publishers.

Peti, W., Nairn, A. C. et Page, R. (2013). « Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity ». In : *The FEBS journal* 280.2, p. 596–611. ISSN : 1742-4658. DOI : 10.1111/j.1742-4658.2012.08509.x.

Philip, N. et Waters, A. P. (2015). « Conditional Degradation of Plasmodium Calcineurin Reveals Functions in Parasite Colonization of both Host and Vector ». In : *Cell Host & Microbe* 18.1, p. 122–131. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2015.05.018.

Pino, P., Sebastian, S., Kim, E. A., Bush, E., Brochet, M., Volkmann, K., Kozlowski, E., Llinás, M., Billker, O. et Soldati-Favre, D. (2012). « A tetracycline-repressible transactivator system to study essential genes in malaria parasites ». In : *Cell Host & Microbe* 12.6, p. 824–834. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2012.10.016.

Pinsky, B. A., Kotwaliwale, C. V., Tatsutani, S. Y., Breed, C. A. et Biggins, S. (2006). « Glc7/protein phosphatase 1 regulatory subunits can oppose the Ipl1/aurora protein kinase by redistributing Glc7 ». In : *Molecular and Cellular Biology* 26.7, p. 2648–2660. ISSN : 0270-7306. DOI : 10.1128/MCB.26.7.2648-2660.2006.

PlasmoDB (2017). « Plasmodium Genomics Resource ». In : URL : http://plasmodb.org/plasmo/ (visité le 18/04/2017).

Posch, M., Khoudoli, G. A., Swift, S., King, E. M., Deluca, J. G. et Swedlow, J. R. (2010). « Sds22 regulates aurora B activity and microtubule-kinetochore interactions at mitosis ». In : *The Journal of Cell Biology* 191.1, p. 61–74. ISSN : 1540-8140. DOI : 10.1083/jcb.200912046.

Pradel, G., Garapaty, S. et Frevert, U. (2004). « Kupffer and stellate cell proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver ». In : *Comparative Hepatology* 3 Suppl 1, S47. DOI : 10.1186/1476-5926-2-S1-S47.

Prudêncio, M., Rodriguez, A. et Mota, M. M. (2006). « The silent path to thousands of merozoites : the Plasmodium liver stage ». In : *Nature Reviews. Microbiology* 4.11, p. 849–856. ISSN : 1740-1534. DOI : 10.1038/nrmicro1529.

Puntoni, F. et Villa-Moruzzi, E. (1995). « Phosphorylation of the inhibitor-2 of protein phosphatase-1 by cdc2-cyclin B and GSK3 ». In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207.2, p. 732–739. ISSN : 0006-291X.

Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J. M., Wang, X., Hemingway, J. et Collins, F. H. (2000). « Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan Anopheles gambiae associated with resistance to DDT and pyrethroids ». In : *Insect Molecular Biology* 9.5, p. 491–497. ISSN : 0962-1075.

Ranson, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z. et Corbel, V. (2011). « Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes : what are the implications for malaria control ? » In : *Trends in Parasitology* 27.2, p. 91–98. ISSN : 1471-5007. DOI : 10.1016/j.pt.2010.08.004.

Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. et Deber, C. M. (2009). « Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.6, p. 1760–1765. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.0813167106.

Rebelo, S., Santos, M., Martins, F., Cruz e Silva, E. F. da et Cruz e Silva, O. A. B. da (2015). « Protein phosphatase 1 is a key player in nuclear events ». In : *Cellular Signalling* 27.12, p. 2589–2598. ISSN : 1873-3913. DOI : 10.1016/j.cellsig.2015.08.007.

Richie, T. L., Charoenvit, Y., Wang, R., Epstein, J. E., Hedstrom, R. C., Kumar, S., Luke, T. C., Freilich, D. A., Aguiar, J. C., Sacci, J. B. *et al.* (2012). « Clinical trial in healthy malaria-naïve adults to evaluate the safety, tolerability, immunogenicity and efficacy of MuStDO5, a five-gene, sporozoite/hepatic stage Plasmodium falciparum

DNA vaccine combined with escalating dose human GM-CSF DNA ». In : *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8.11, p. 1564–1584. ISSN : 2164-554X. DOI : 10.4161/hv.22129.

Risco-Castillo, V., Son, O., Franetich, J.-F., Rubinstein, E., Mazier, D. et Silvie, O. (2013). « Plasmodium sporozoite entry pathways during malaria liver infection ». In : *Biologie Aujourd'hui* 207.4, p. 219–229. ISSN : 2105-0686. DOI : 10.1051/jbio/2013021.

Risco-Castillo, V., Topçu, S., Marinach, C., Manzoni, G., Bigorgne, A. E., Briquet, S., Baudin, X., Lebrun, M., Dubremetz, J.-F. et Silvie, O. (2015). « Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles ». In : *Cell Host & Microbe* 18.5, p. 593–603. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2015.10.006.

Roberts, L. (2016). « Malaria wars ». In : *Science* 352.6284, p. 398–402, 404–405. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.352.6284.398.

Rodrigues, N. T. L., Lekomtsev, S., Jananji, S., Kriston-Vizi, J., Hickson, G. R. X. et Baum, B. (2015). « Kinetochore-localized PP1-Sds22 couples chromosome segregation to polar relaxation ». In : *Nature* 524.7566, p. 489–492. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature14496.

Rosenberg, R., Wirtz, R. A., Schneider, I. et Burge, R. (1990). « An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito ». In : *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84.2, p. 209–212. ISSN : 0035-9203.

Sakashita, G., Shima, H., Komatsu, M., Urano, T., Kikuchi, A. et Kikuchi, K. (2003). « Regulation of type 1 protein phosphatase/inhibitor-2 complex by glycogen synthase kinase-3beta in intact cells ». In : *Journal of Biochemistry* 133.2, p. 165–171. ISSN : 0021-924X.

Sanchez, C. P., Stein, W. D. et Lanzer, M. (2007). « Is PfCRT a channel or a carrier ? Two competing models explaining chloroquine resistance in Plasmodium falciparum ». In : *Trends in Parasitology* 23.7, p. 332–339. ISSN : 1471-4922. DOI : 10.1016/j.pt.2007.04.013.

Santé publique France (2015). In : URL : http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2015/reco/2015_reco_1.html (visité le 01/02/2017).

Sanyal, S., Egée, S., Bouyer, G., Perrot, S., Safeukui, I., Bischoff, E., Buffet, P., Deitsch, K. W., Mercereau-Puijalon, O., David, P. H. *et al.* (2012). « Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties ». In : *Blood* 119.2, e1–8. ISSN : 1528-0020. DOI : 10.1182/blood-2011-08-370734.

Satinover, D. L., Brautigan, D. L. et Stukenberg, P. T. (2006). « Aurora-A kinase and inhibitor-2 regulate the cyclin threshold for mitotic entry in Xenopus early embryonic cell cycles ». In : *Cell Cycle* 5.19, p. 2268–2274. ISSN : 1551-4005. DOI : 10.4161/cc.5.19.3316.

Satinover, D. L., Leach, C. A., Stukenberg, P. T. et Brautigan, D. L. (2004). « Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.23, p. 8625–8630. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.0402966101.

Sebastian, S., Brochet, M., Collins, M. O., Schwach, F., Jones, M. L., Goulding, D., Rayner, J. C., Choudhary, J. S. et Billker, O. (2012). « A Plasmodium calcium-dependent protein kinase controls zygote development and transmission by translationally acti-

vating repressed mRNAs ». In : *Cell Host & Microbe* 12.1, p. 9–19. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2012.05.014.

Shock, J. L., Fischer, K. F. et DeRisi, J. L. (2007). « Whole-genome analysis of mRNA decay in Plasmodium falciparum reveals a global lengthening of mRNA half-life during the intra-erythrocytic development cycle ». In : *Genome Biology* 8.7, R134. ISSN : 1474-760X. DOI : 10.1186/gb-2007-8-7-r134.

Sibley, C. H. (2015). « Infectious diseases. Understanding artemisinin resistance ». In : *Science* 347.6220, p. 373–374. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.aaa4102.

Siddoway, B. A., Altimimi, H. F., Hou, H., Petralia, R. S., Xu, B., Stellwagen, D. et Xia, H. (2013). « An essential role for inhibitor-2 regulation of protein phosphatase-1 in synaptic scaling ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33.27, p. 11206–11211. ISSN : 1529-2401. DOI : 10.1523/JNEUROSCI.5241-12.2013.

Sidhu, A. B. S., Uhlemann, A.-C., Valderramos, S. G., Valderramos, J.-C., Krishna, S. et Fidock, D. A. (2006). « Decreasing pfmdr1 copy number in plasmodium falciparum malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin ». In : *The Journal of Infectious Diseases* 194.4, p. 528–535. ISSN : 0022-1899. DOI : 10.1086/507115.

Sidhu, A. B. S., Verdier-Pinard, D. et Fidock, D. A. (2002). « Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum malaria parasites conferred by pfcrt mutations ». In : *Science* 298.5591, p. 210–213. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1074045.

Siegel, T. N., Hon, C.-C., Zhang, Q., Lopez-Rubio, J.-J., Scheidig-Benatar, C., Martins, R. M., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y. et Scherf, A. (2014). « Strand-specific RNA-Seq reveals widespread and developmentally regulated transcription of natural antisense transcripts in Plasmodium falciparum ». In : *BMC genomics* 15, p. 150. ISSN : 1471-2164. DOI : 10.1186/1471-2164-15-150.

Silvestrini, F., Alano, P. et Williams, J. L. (2000). « Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Parasitology* 121 Pt 5, p. 465–471. ISSN : 0031-1820.

Silvestrini, F., Lasonder, E., Olivieri, A., Camarda, G., Schaijk, B. van, Sanchez, M., Younis Younis, S., Sauerwein, R. et Alano, P. (2010). « Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Molecular & cellular proteomics : MCP* 9.7, p. 1437–1448. ISSN : 1535-9484. DOI : 10.1074/mcp.M900479-MCP200.

Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.-F., Prenant, M., Belnoue, E., Rénia, L., Hannoun, L., Eling, W., Levy, S., Boucheix, C. *et al.* (2003). « Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity ». In : *Nature Medicine* 9.1, p. 93–96. ISSN : 1078-8956. DOI : 10.1038/nm808.

Sinha, A., Hughes, K. R., Modrzynska, K. K., Otto, T. D., Pfander, C., Dickens, N. J., Religa, A. A., Bushell, E., Graham, A. L., Cameron, R. *et al.* (2014). « A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in Plasmodium ». In : *Nature* 507.7491, p. 253–257. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature12970.

Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W. *et al.* (2010). « The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East :

occurrence data, distribution maps and bionomic précis ». In : *Parasites & Vectors* 3, p. 117. ISSN : 1756-3305. DOI : 10.1186/1756-3305-3-117.

Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H. *et al.* (2012). « A global map of dominant malaria vectors ». In : *Parasites & Vectors* 5, p. 69. ISSN : 1756-3305. DOI : 10.1186/1756-3305-5-69.

Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M. M., Semblat, J.-P., Dorin-Semblat, D., Reininger, L., Bottrill, A. R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C. *et al.* (2011). « Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Nature Communications* 2, p. 565. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms1558.

Stephens, J. W. W. (1914). « A New Malaria Parasite of Man ». In : *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 87.596, p. 375–377. ISSN : 0950-1193.

Sturm, A., Amino, R., Sand, C. van de, Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J., Menard, R. et Heussler, V. T. (2006). « Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids ». In : *Science* 313.5791, p. 1287–1290. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1129720.

Suárez-Cortés, P., Sharma, V., Bertuccini, L., Costa, G., Bannerman, N.-L., Sannella, A. R., Williamson, K., Klemba, M., Levashina, E. A., Lasonder, E. *et al.* (2016). « Comparative Proteomics and Functional Analysis Reveal a Role of Plasmodium falciparum Osmiophilic Bodies in Malaria Parasite Transmission ». In : *Molecular & cellular proteomics : MCP* 15.10, p. 3243–3255. ISSN : 1535-9484. DOI : 10.1074/mcp.M116.060681.

Talevich, E., Mirza, A. et Kannan, N. (2011). « Structural and evolutionary divergence of eukaryotic protein kinases in Apicomplexa ». In : *BMC evolutionary biology* 11, p. 321. ISSN : 1471-2148. DOI : 10.1186/1471-2148-11-321.

Talman, A. M., Domarle, O., McKenzie, F. E., Ariey, F. et Robert, V. (2004). « Gametocytogenesis : the puberty of Plasmodium falciparum ». In : *Malaria Journal* 3, p. 24. ISSN : 1475-2875. DOI : 10.1186/1475-2875-3-24.

Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P. et Krudsood, S. (2009). « Malaria diagnosis : a brief review ». In : *The Korean Journal of Parasitology* 47.2, p. 93–102. ISSN : 1738-0006. DOI : 10.3347/kjp.2009.47.2.93.

Tatem, A. J., Jia, P., Ordanovich, D., Falkner, M., Huang, Z., Howes, R., Hay, S. I., Gething, P. W. et Smith, D. L. (2017). « The geography of imported malaria to non-endemic countries : a meta-analysis of nationally reported statistics ». In : *The Lancet. Infectious Diseases* 17.1, p. 98–107. ISSN : 1474-4457. DOI : 10.1016/S1473-3099(16)30326-7.

Tavares, J., Formaglio, P., Thiberge, S., Mordelet, E., Van Rooijen, N., Medvinsky, A., Ménard, R. et Amino, R. (2013). « Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection ». In : *The Journal of Experimental Medicine* 210.5, p. 905–915. ISSN : 1540-9538. DOI : 10.1084/jem.20121130.

Tellier, G., Lenne, A., Cailliau-Maggio, K., Cabezas-Cruz, A., Valdés, J. J., Martoriati, A., Aliouat, E. M., Gosset, P., Delaire, B., Fréville, A. *et al.* (2016). « Identification of Plasmodium falciparum Translation Initiation eIF2B Subunit : Direct Interaction with Protein Phosphatase Type 1 ». In : *Frontiers in Microbiology* 7, p. 777. DOI : 10.3389/fmicb.2016.00777.

Templeton, T. J., Iyer, L. M., Anantharaman, V., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Subramanian, G. M., Hoffman, S. L., Abrahamsen, M. S. et Aravind, L. (2004). « Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes ». In : *Genome Research* 14.9, p. 1686–1695. ISSN : 1088-9051. DOI : 10.1101/gr.2615304.

Tewari, R., Straschil, U., Bateman, A., Böhme, U., Cherevach, I., Gong, P., Pain, A. et Billker, O. (2010). « The systematic functional analysis of Plasmodium protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission ». In : *Cell Host & Microbe* 8.4, p. 377–387. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2010.09.006.

Tham, W.-H., Healer, J. et Cowman, A. F. (2012). « Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of Plasmodium falciparum ». In : *Trends in Parasitology* 28.1, p. 23–30. ISSN : 1471-5007. DOI : 10.1016/j.pt.2011.10.002.

Tibúrcio, M., Dixon, M. W. A., Looker, O., Younis, S. Y., Tilley, L. et Alano, P. (2015a). « Specific expression and export of the Plasmodium falciparum Gametocyte EXported Protein-5 marks the gametocyte ring stage ». In : *Malaria Journal* 14, p. 334. ISSN : 1475-2875. DOI : 10.1186/s12936-015-0853-6.

Tibúrcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P. A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P. H. *et al.* (2012). « A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages ». In : *Blood* 119.24, e172–180. ISSN : 1528-0020. DOI : 10.1182/blood-2012-03-414557.

Tibúrcio, M., Sauerwein, R., Lavazec, C. et Alano, P. (2015b). « Erythrocyte remodeling by Plasmodium falciparum gametocytes in the human host interplay ». In : *Trends in Parasitology* 31.6, p. 270–278. ISSN : 1471-5007. DOI : 10.1016/j.pt.2015.02.006.

Tirados, I., Costantini, C., Gibson, G. et Torr, S. J. (2006). « Blood-feeding behaviour of the malarial mosquito Anopheles arabiensis : implications for vector control ». In : *Medical and Veterinary Entomology* 20.4, p. 425–437. ISSN : 0269-283X. DOI : 10.1111/j.1365-2915.2006.652.x.

Travassos, M. et Laufer, M. K. (2011). *Antimalarial drugs : An overview.* URL : http://cursoenarm.net/UPTODATE/contents/mobipreview.htm?0/27/433?source=HISTORY#H14 (visité le 31/01/2017).

Treeck, M., Sanders, J. L., Elias, J. E. et Boothroyd, J. C. (2011). « The phosphoproteomes of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries ». In : *Cell Host & Microbe* 10.4, p. 410–419. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2011.09.004.

Tuteja, R. (2007). « Malaria - an overview ». In : *The FEBS journal* 274.18, p. 4670–4679. ISSN : 1742-464X. DOI : 10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x.

Ukegbu, C. V., Cho, J.-S., Christophides, G. K. et Vlachou, D. (2015). « Transcriptional silencing and activation of paternal DNA during Plasmodium berghei zygotic development and transformation to oocyst ». In : *Cellular Microbiology* 17.8, p. 1230–1240. ISSN : 1462-5822. DOI : 10.1111/cmi.12433.

Umlas, J. et Fallon, J. N. (1971). « New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis ». In : *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20.4, p. 527–529. ISSN : 0002-9637.

Vaidya, A. B. et Mather, M. W. (2009). « Mitochondrial evolution and functions in malaria parasites ». In : *Annual Review of Microbiology* 63, p. 249–267. ISSN : 1545-3251. DOI : 10.1146/annurev.micro.091208.073424.

Van Dessel, N., Beke, L., Görnemann, J., Minnebo, N., Beullens, M., Tanuma, N., Shima, H., Van Eynde, A. et Bollen, M. (2010). « The phosphatase interactor NIPP1 regulates the occupancy of the histone methyltransferase EZH2 at Polycomb targets ». In : *Nucleic Acids Research* 38.21, p. 7500–7512. ISSN : 1362-4962. DOI : 10.1093/nar/gkq643.

Vaughan, A. M., Mikolajczak, S. A., Wilson, E. M., Grompe, M., Kaushansky, A., Camargo, N., Bial, J., Ploss, A. et Kappe, S. H. I. (2012). « Complete Plasmodium falciparum liver-stage development in liver-chimeric mice ». In : *The Journal of Clinical Investigation* 122.10, p. 3618–3628. ISSN : 1558-8238. DOI : 10.1172/JCI62684.

Vembar, S. S., Droll, D. et Scherf, A. (2016). « Translational regulation in blood stages of the malaria parasite Plasmodium spp. : systems-wide studies pave the way ». In : *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 7.6, p. 772–792. ISSN : 1757-7012. DOI : 10.1002/wrna.1365.

Verbinnen, I., Ferreira, M. et Bollen, M. (2017). « Biogenesis and activity regulation of protein phosphatase 1 ». In : *Biochemical Society Transactions* 45.1, p. 89–99. ISSN : 1470-8752. DOI : 10.1042/BST20160154.

Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W.-H., Wilson, D. *et al.* (2016). « Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes ». In : *Cell Host & Microbe* 20.1, p. 60–71. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2016.06.004.

Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W. et Bollen, M. (2003). « Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1 ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 278.21, p. 18817–18823. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M300175200.

Wakula, P., Beullens, M., Eynde, A. van, Ceulemans, H., Stalmans, W. et Bollen, M. (2006). « The translation initiation factor eIF2beta is an interactor of protein phosphatase-1 ». In : *The Biochemical Journal* 400.2, p. 377–383. ISSN : 1470-8728. DOI : 10.1042/BJ20060758.

Waller, R. F., Reed, M. B., Cowman, A. F. et McFadden, G. I. (2000). « Protein trafficking to the plastid of Plasmodium falciparum is via the secretory pathway ». In : *The EMBO journal* 19.8, p. 1794–1802. ISSN : 0261-4189. DOI : 10.1093/emboj/19.8.1794.

Wang, Q. M., Guan, K. L., Roach, P. J. et DePaoli-Roach, A. A. (1995). « Phosphorylation and activation of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase by the mitogen-activated protein kinase ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 270.31, p. 18352–18358. ISSN : 0021-9258.

Wang, W., Cronmiller, C. et Brautigan, D. L. (2008a). « Maternal phosphatase inhibitor-2 is required for proper chromosome segregation and mitotic synchrony during Drosophila embryogenesis ». In : *Genetics* 179.4, p. 1823–1833. ISSN : 0016-6731. DOI : 10.1534/genetics.108.091959.

Wang, W., Stukenberg, P. T. et Brautigan, D. L. (2008b). « Phosphatase inhibitor-2 balances protein phosphatase 1 and aurora B kinase for chromosome segregation and

cytokinesis in human retinal epithelial cells ». In : *Molecular Biology of the Cell* 19.11, p. 4852–4862. ISSN : 1939-4586. DOI : 10.1091/mbc.E08-05-0460.

Ward, P., Equinet, L., Packer, J. et Doerig, C. (2004). « Protein kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum : the kinome of a divergent eukaryote ». In : *BMC genomics* 5, p. 79. ISSN : 1471-2164. DOI : 10.1186/1471-2164-5-79.

Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W.-H., Jong, N. W. M. de, Harvey, K. L., Fowkes, F. J. I., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J. *et al.* (2015). « Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes ». In : *PLoS pathogens* 11.2, e1004670. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1004670.

White, N. J., Turner, G. D. H., Day, N. P. J. et Dondorp, A. M. (2013). « Lethal malaria : Marchiafava and Bignami were right ». In : *The Journal of Infectious Diseases* 208.2, p. 192–198. ISSN : 1537-6613. DOI : 10.1093/infdis/jit116.

WHO (2015a). « Guidelines for the treatment of malaria. Third edition ». WHO. In : URL : http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/ (visité le 01/02/2017).

WHO (2015b). « Malaria rapid diagnostic test performance : results of WHO product testing of malaria RDTs : round 6 (2014-2015) ». WHO. In : URL : http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241510035/en/ (visité le 28/01/2017).

WHO (2016). « World Malaria Report ». WHO. In : URL : http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/ (visité le 28/01/2017).

WHO (2017). *Tables of malaria vaccine projects globally.* URL : http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/ (visité le 28/01/2017).

Wilkes, J. M. et Doerig, C. (2008). « The protein-phosphatome of the human malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *BMC genomics* 9, p. 412. ISSN : 1471-2164. DOI : 10.1186/1471-2164-9-412.

Wilson, R. J., Denny, P. W., Preiser, P. R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D. J., Moore, P. W. *et al.* (1996). « Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite Plasmodium falciparum ». In : *Journal of Molecular Biology* 261.2, p. 155–172. ISSN : 0022-2836.

Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A. et Wernsdorfer, W. H. (2007). « A review of malaria diagnostic tools : microscopy and rapid diagnostic test (RDT) ». In : *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77.6, p. 119–127. ISSN : 0002-9637.

Wu, J. Q., Guo, J. Y., Tang, W., Yang, C.-S., Freel, C. D., Chen, C., Nairn, A. C. et Kornbluth, S. (2009). « PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation ». In : *Nature Cell Biology* 11.5, p. 644–651. ISSN : 1476-4679. DOI : 10.1038/ncb1871.

Wu, X. et Tatchell, K. (2001). « Mutations in yeast protein phosphatase type 1 that affect targeting subunit binding ». In : *Biochemistry* 40.25, p. 7410–7420. ISSN : 0006-2960.

Wurzenberger, C., Held, M., Lampson, M. A., Poser, I., Hyman, A. A. et Gerlich, D. W. (2012). « Sds22 and Repo-Man stabilize chromosome segregation by counteracting Aurora B on anaphase kinetochores ». In : *The Journal of Cell Biology* 198.2, p. 173–183. ISSN : 1540-8140. DOI : 10.1083/jcb.201112112.

Yalcindag, E., Elguero, E., Arnathau, C., Durand, P., Akiana, J., Anderson, T. J., Aubouy, A., Balloux, F., Besnard, P., Bogreau, H. *et al.* (2012). « Multiple independent introductions of Plasmodium falciparum in South America ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.2, p. 511–516. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1119058109.

Yang, A. S. P. et Boddey, J. A. (2017). « Molecular mechanisms of host cell traversal by malaria sporozoites ». In : *International Journal for Parasitology* 47.2, p. 129–136. ISSN : 1879-0135. DOI : 10.1016/j.ijpara.2016.09.002.

Yang, H., Hou, H., Pahng, A., Gu, H., Nairn, A. C., Tang, Y.-P., Colombo, P. J. et Xia, H. (2015). « Protein Phosphatase-1 Inhibitor-2 Is a Novel Memory Suppressor ». In : *The Journal of Neuroscience* 35.45, p. 15082–15087. ISSN : 1529-2401. DOI : 10.1523/JNEUROSCI.1865-15.2015.

Yao, G., Wan, J., Mu, C., Liu, Q., Wang, Y. et Sang, J. (2016). « Sds22 participates in Glc7 mediated Rad53 dephosphorylation in MMS-induced DNA damage in Candida albicans ». In : *Fungal genetics and biology : FG & B* 93, p. 50–61. ISSN : 1096-0937. DOI : 10.1016/j.fgb.2016.06.003.

Yap, A., Azevedo, M. F., Gilson, P. R., Weiss, G. E., O'Neill, M. T., Wilson, D. W., Crabb, B. S. et Cowman, A. F. (2014). « Conditional expression of apical membrane antigen 1 in Plasmodium falciparum shows it is required for erythrocyte invasion by merozoites ». In : *Cellular Microbiology* 16.5, p. 642–656. ISSN : 1462-5822. DOI : 10.1111/cmi.12287.

Yokoyama, D., Saito-Ito, A., Asao, N., Tanabe, K., Yamamoto, M. et Matsumura, T. (1998). « Modulation of the growth of Plasmodium falciparum in vitro by protein serine/threonine phosphatase inhibitors ». In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247.1, p. 18–23. ISSN : 0006-291X. DOI : 10.1006/bbrc.1998.8730.

Zacharchenko, T., Barsukov, I., Rigden, D. J., Bennett, D. et Mayans, O. (2016). « Biophysical Analysis of the N-Terminal Domain from the Human Protein Phosphatase 1 Nuclear Targeting Subunit PNUTS Suggests an Extended Transcription Factor TFIIS-Like Fold ». In : *The Protein Journal* 35.5, p. 340–345. ISSN : 1875-8355. DOI : 10.1007/s10930-016-9677-7.

Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S. et Lee, E. Y. (1998). « Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1 ». In : *Biochemistry* 37.47, p. 16728–16734. ISSN : 0006-2960. DOI : 10.1021/bi981169g.

Zhang, L., Qi, Z., Gao, Y. et Lee, E. Y. C. (2008). « Identification of the interaction sites of Inhibitor-3 for protein phosphatase-1 ». In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377.2, p. 710–713. ISSN : 1090-2104. DOI : 10.1016/j.bbrc.2008.10.062.

Zhang, M., Mishra, S., Sakthivel, R., Fontoura, B. M. A. et Nussenzweig, V. (2016). « UIS2 : A Unique Phosphatase Required for the Development of Plasmodium Liver Stages ». In : *PLoS pathogens* 12.1, e1005370. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1005370.

Zhang, Y., Stec, B. et Godzik, A. (2007). « Between order and disorder in protein structures : analysis of "dual personality" fragments in proteins ». In : *Structure (London, England : 1993)* 15.9, p. 1141–1147. ISSN : 0969-2126. DOI : 10.1016/j.str.2007.07.012.

Annexes I

Hollin et al. BMC Genomics (2016) 17:246
DOI 10.1186/s12864-016-2571-z

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

Analysis of the interactome of the Ser/Thr Protein Phosphatase type 1 in Plasmodium falciparum

Thomas Hollin[†], Caroline De Witte[†], Astrid Lenne[†], Christine Pierrot and Jamal Khalife[*]

Abstract

Background: Protein Phosphatase 1 (PP1) is an enzyme essential to cell viability in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* (Pf). The activity of PP1 is regulated by the binding of regulatory subunits, of which there are up to 200 in humans, but only 3 have been so far reported for the parasite. To better understand the *P. falciparum* PP1 (PfPP1) regulatory network, we here report the use of three strategies to characterize the PfPP1 interactome: co-affinity purified proteins identified by mass spectrometry, yeast two-hybrid (Y2H) screening and *in silico* analysis of the *P. falciparum* predicted proteome.

Results: Co-affinity purification followed by MS analysis identified 6 PfPP1 interacting proteins (Pips) of which 3 contained the RVxF consensus binding, 2 with a Fxx[RK]x[RK] motif, also shown to be a PP1 binding motif and one with both binding motifs. The Y2H screens identified 134 proteins of which 30 present the RVxF binding motif and 20 have the Fxx[RK]x[RK] binding motif. The *in silico* screen of the Pf predicted proteome using a consensus RVxF motif as template revealed the presence of 55 potential Pips. As further demonstration, 35 candidate proteins were validated as PfPP1 interacting proteins in an ELISA-based assay.

Conclusions: To the best of our knowledge, this is the first study on PfPP1 interactome. The data reports several conserved PP1 interacting proteins as well as a high number of specific interactors to PfPP1. Their analysis indicates a high diversity of biological functions for PP1 in *Plasmodium*. Based on the present data and on an earlier study of the Pf interactome, a potential implication of Pips in protein folding/proteolysis, transcription and pathogenicity networks is proposed. The present work provides a starting point for further studies on the structural basis of these interactions and their functions in *P. falciparum*.

Keywords: *Plasmodium*, PP1, Interactome, RVxF motif

Background

Malaria continues to be a major health problem and a leading cause of child mortality of the inter-tropical regions despite extensive research efforts. The present situation is also increasingly complicated by the emergence of parasite resistance to multiple drugs much more rapidly than the development of novel anti-malarials. A major obstacle in devising new control tools is our limited knowledge of basic parasite biology and the paucity of identified potential intervention targets. *Plasmodium* species are obligate intracellular protozoan parasites that undergo a number of developmental stages in the vertebrate host and the invertebrate vector. During the last decade, several studies strongly indicated that protein phosphorylation and dephosphorylation processes, governed by kinases and phosphatases respectively, play a central and essential role in *Plasmodium* cell cycle and developmental regulation [1, 2].

In *Plasmodium falciparum* (Pf), the most deadly apicomplexan parasite, efforts have begun for an examination of the biological roles of protein kinases and phosphatases and their potential as drug targets. In this context, biochemical and cloning studies have reported enzymatic activities and the genes of catalytic subunits related to plasmodial phosphatases. These include PfPP1c, PfPP2A,

* Correspondence: jamal.khalife@pasteur-lille.fr
[†]Equal contributors
Center for Infection and Immunity of Lille, Inserm U1019-CNRS UMR 8204, University of Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, Lille, France

© 2016 Hollin et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

PfPP2B and PfPP2C, which have been shown to be highly conserved during evolution, suggesting an essential role for these enzymes [3–5]. With respect to the Pf Protein Phosphatase type 1 catalytic subunit or PfPP1c, it cannot be considered *per se* as a suitable drug target (> 80 % identity with human and yeast PP1 or GLC7). Indeed, complementation studies showed that PfPP1 was able to rescue yeast mutated in PP1 [6]. In *P. falciparum* functional studies suggested that its activity predominates over the other phosphatases in blood parasites [7]. Finally, phenotypic PfPP1 gene knockdown and the use of phosphatase inhibitors indicated that it seems to be essential for parasite asexual development in erythrocytes [2, 4]. At this stage, it is important to note that free PP1c seems to be toxic for the cell [8] but a considerable number of proteins interacting with PP1c have been reported that direct the localization, specificity and the level of its activity in yeast and higher eukaryotic cells [9]. Indeed, about 200 proteins have been shown to physiologically interact with PP1c, constituting a 'PP1c platform' that provides a framework offering diverse functions to this enzyme in cell division, transcription and apoptosis for instance [10]. Structural and functional studies revealed that the interaction of regulators with PP1 involved several binding sites, including mainly the so-called RVxF and SILK motifs [8, 11]. The most studied binding motif is the RVxF for which it has been established a first short consensus sequence as [RK]$x_{0\text{-}1}$[VI]{P}[FW] where x could be any amino acid and {P} any amino acid except P [12].

The importance of these proteins in the regulation of PP1 activity in vitro and in vivo prompted us to identify the regulators of PfPP1c and to address their functions. Our initial focus based on the completion of the Pf genome and the delineation of known PP1 regulators has revealed the existence of four conserved regulators. So far, three gene products, Pf Leucine Rich Repeat 1 (PfLRR1), Pf Inhibitor 2 (PfI2) and Pf Inhibitor 3 (PfI3) have been thoroughly explored to define their functions in this parasite. Biochemical and structure-activity relationship studies demonstrated that these regulators indeed bind to PfPP1. In these studies, we showed that *P. falciparum* PP1 is submitted to a control of its activity by PfLRR1 (a homolog of yeast SDS22), Inhibitor-2 (PfI2) and -3 (PfI3) with substantial differences compared to the human orthologs for Inhibitor 2 and 3 [13–18]. PfI2 exhibits an inhibitory role on PfPP1 activity, the short RVxF binding motif, not present in human I2, a secondary Fxx[RK]x[RK] binding motif and a peptide sequence 30 % shorter than its human homolog. PfI3, although it contains the RVxF consensus motif, does not seem to be an inhibitor but rather an activator of PfPP1 in vitro and is unable to complement I3 deficient yeast, suggesting a specific role for PfI3 on PfPP1. In *P. falciparum*, our reverse genetic analyses suggest that PfI2 as well as PfI3 are essential for parasite growth. Further, NMR analysis showed that the main domain of PfI3 binding to PfPP1 is within residues P^{39}-W^{45}. The mutation of the RVxF motifs in both proteins significantly affects the binding to PP1. Finally, peptides derived from these binding motifs have been shown to inhibit *P. falciparum* growth in vitro [17, 18].

These observations underscore the importance of PP1 regulators and promote an increased interest to identify *P. falciparum* PP1 interacting proteins (Pips). In the present work, biochemical approaches, yeast two-hybrid screens and *in silico* analysis were used to define the Pips that are the starting point to elucidate PP1 interaction networks in *P. falciparum* and to provide new pathways for further studies to reveal potential targets for specific pharmacological intervention.

Results and discussion

Identification of Pips by affinity/Mass Spectrometry

In order to identify Pips expressed by *P. falciparum*, affinity purification on PfPP1 followed by mass spectrometry was carried out. In this approach, soluble extracts from blood stage parasites cleared as described in Materials and Methods were incubated with PfPP1 covalently bound to sepharose beads. The eluate was separated by SDS-PAGE and the proteins detected by coomassie blue staining were identified by MS-MS. As shown in Table 1, only 6 *P. falciparum* proteins were clearly identified based on the number of peptides analysed and the corresponding mascot scores for each protein (Additional file 1: Table S1). The identified proteins, Ornithine aminotransferase, GAPDH and Phosphoethanolamine N-methyltransferase contained the motifs KTVKF, KLVSW and RIIF respectively, which comply with the RVxF consensus sequence, while PfHSP90 and Pf disulfide isomerase have only one putative Fxx[RK]x[RK] motif (FENRKK and FNKKNK respectively). Sequence analyses of PfHSP70 showed 2 potential binding motifs RLVNF and FKRKNR which correspond to RVxF and Fxx[RK]x[RK] motifs respectively, supporting a direct interaction. However, it could not be excluded that this interaction may be related to the chaperone functions of HSPs. Hence, it would be necessary to further dissect the role of HSPs on the function of PP1. Previous studies reported that PP1 interacts with murine and human HSP70 [19, 20] which are in agreement with the above data. Further, amino acid sequence analysis of PfHSP70 showed 70 % identity with mouse and human HSP70 and 2 potential binding motifs, however only the binding motif Fxx[RK]x[RK] is present in the latter (Additional file 2: Table S2). Overall, the above approach led to the detection of a low number of direct or indirect Pips when compared to the high number of reported regulators/substrates of PP1c in other

Table 1 Pips identified by affinity chromatography/mass spectrometry

Band[a]	PlasmoDB Accession number[b]	Name[c]	Motifs (Position a.a.)[d]
1	PF3D7_0708400	heat shock protein 90 (HSP90)	FENRKK (371–376)
2	PF3D7_0818900	heat shock protein 70 (HSP70)	RLVNF (248–252)
			FKRKNR (257–262)
3	PF3D7_0827900	protein disulfide isomerase (PDI8)	FNKKNK (112–117)
4	PF3D7_0608800	ornithine aminotransferase (OAT)	KTVKF (405–409)
5	PF3D7_1462800	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	KLVSW (312–316)
6	PF3D7_1343000	phosphoethanolamine N-methyltransferase (PMT)	KIIF (103–106)

[a]Number of stained bands on SDS-PAGE
[b]Annotations available on PlasmoDB database (v24)
[c]The identified proteins were detected in 2 independent proteins extracts
[d]Sequences complying with consensus of RVxF and Fxx[RK]x[RK] were indicated

species. The low recovery by the affinity/mass spectrometry analysis could be attributed to several factors including the presence of very few free Pips in parasite extracts, their low solubility in buffers suitable for affinity column and/or the competition between Pips.

Yeast two hybrid screening of a Pf cDNA library

To further detect additional Pips in *P. falciparum*, a cDNA library was screened in a yeast two hybrid (Y2H) system using full-length PfPP1c as bait and clones growing on high stringency selection media to reduce the number of false positive clones. Five independent screens yielded 189 clones from a total of 3.3×10^6 clones screened. After sequencing, all clones showed open reading frames encoding Pf genes with 53 clones in frame with GAL4AD and 136 clones out of frame. Amino acid sequence comparison revealed that 8 proteins in frame with GAL4AD were also found among the out-of-frame clones. These data are in agreement with an earlier observation indicating that out-of-frame proteins could be considered as valid interactors in Y2H screening [21] and with recent results suggesting that translational frameshift could be means for yeast to reduce the level of expression of exogenous proteins in order to grow on selective media. Indeed, this was observed with DHFR where most of isolated clones were not in frame with GAL4AD. In addition, this work showed that a reduction of growth rate of yeast was observed when the screening was carried out with DHFR fused in frame with GAL4AD [22]. Consequently, the GAL4AD in frame and out-of-frame clones were included in our analysis. In total, sequences identified from 189 clones represented 134 different proteins (Table 2) of which 27 were obtained more than once with 10 clones for PF3D7_1202600 and 9 clones for PF3D7_0919900 (Additional file 3: Table S3). Analysis of the sequences revealed that HSP70 (PF3D7_0818900) was isolated by Y2H screens, reinforcing the idea of its interaction with PfPP1 that we observed using parasite extracts and a PfPP1 affinity column. This supports the interaction of HSP70 with PP1 and suggests that besides its chaperone function it may control PP1 activity and/or regulate its binding with other partners. The Y2H screens also identified the gene PF3D7_1020900 as a Pip. Its gene product shares 72 % identity with a yeast ADP Ribosylation Factor (ARF1) which has been shown to interact with yeast PP1 [23] (Additional file 2: Table S2). Analysis of the Pf isolated fragment did not show the presence of known binding motifs to PP1. However the analysis of the full length sequence revealed the presence of 1 RVxF motif, suggesting the presence of at least 2 PfPP1 potential binding motifs in this protein. Further, PF3D7_1103100 and PF3D7_1460700 showed 31 and 39 % of identity with yeast RPP1B and RPL27A respectively (Additional file 2: Table S2), identified by different approaches as interactors of yeast PP1 [24, 25].

When the identified sequences were analyzed for the presence of known binding motifs to PP1, 30 proteins share the RVxF binding motif and 20 contain the Fxx[RK]x[RK] motif, supporting the idea of their role as potential regulators of PP1. Indeed, it was reported that 70 % of PP1 interacting proteins containing the RVxF motif are regulators of PP1 activity [26].

Further examination of Y2H screening revealed that some identified clones correspond to different portions of the same protein (16 clones representing 7 proteins). For instance, PF3D7_1303800 interacts with PfPP1 through the protein portions 4987–5278, 6176–6407 (containing the Fxx[RK]x[RK] motif) and 9165–9271 while PF3D7_0419900 binds PfPP1 via the portions 1857–1998 and 4414–4679 (Additional file 3: Table S3). For these proteins it seems that their binding to PfPP1 could take place through at least 2 to 3 regions, potentially involving novel binding motifs.

Among the isolated clones, 8 cDNAs representing 6 known kinases were identified as potential interacting

Table 2 Pips identified by Yeast two-hybrid screening

	PlasmoDB Accession number[a]	Name[a]	Growth on selective plates (number of isolated clones)[b]	RVxF motifs[c]
In frame genes	PF3D7_0107600	serine/threonine protein kinase, putative	TDO/A (1)	
	PF3D7_0220000	liver stage antigen 3 (LSA3)	QDO/A (2)	KKVRF
	PF3D7_0418300	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	
	PF3D7_0520800	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
	PF3D7_0520900	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHH)	TDO/A (1)	
	PF3D7_0610100	Pre-mRNA-splicing factor SLU7, putative (SLU7)	TDO/A (1)	
	PF3D7_0611800	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
	PF3D7_0613800	transcription factor with AP2 domain(s) (ApiAP2)	QDO/A (1)	RGVYF
			TDO/A (1)	
	PF3D7_0623100	nuclear polyadenylated RNA-binding protein NAB2, putative	TDO/A (2)	
	PF3D7_0718100	exported serine/threonine protein kinase (EST)	TDO/A (1)	
	PF3D7_0720700	phosphoinositide-binding protein, putative	TDO/A (1)	KIKF
	PF3D7_0724600	protein kinase, putative	TDO/A (1)	
	PF3D7_0803400	DNA repair protein rad54, putative	QDO/A (1)	
	PF3D7_0816600	ClpB protein, putative (ClpB1)	TDO/A (1)	
	PF3D7_0917900	heat shock protein 70 (HSP70-2)	TDO/A (1)	
	PF3D7_0919900	regulator of chromosome condensation, putative	QDO/A (8)	KSVSF
	PF3D7_1008000	histone deacetylase 2 (HDA2)	TDO/A (1)	
	PF3D7_1008100	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	KSVSF
	PF3D7_1020900	ADP-ribosylation factor (ARF1)	TDO/A (1)	
	PF3D7_1031600	conserved Plasmodium protein, unknown function (GEXP15)	QDO/A (3)	KKVQF
	PF3D7_1105100	histone H2B (H2B)	TDO/A (1)	
	PF3D7_1130700	structural maintenance of chromosome protein, putative	TDO/A (2)	
	PF3D7_1202600	conserved protein, unknown function	QDO/A (10)	KNVTF/KCVSF/ KQVTF/RTVSF/ KKVTF/ KSVSF/KKVTF
	PF3D7_1205500	zinc finger protein, putative	TDO/A (1)	
	PF3D7_1228600	merozoite surface protein 9 (MSP9)	TDO/A (1)	
	PF3D7_1229600	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
	PF3D7_1303800	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
	PF3D7_1317600	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	KYIYF
	PF3D7_1325800	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
	PF3D7_1346100	protein transport protein SEC61 subunit alpha (SEC61)	TDO/A (1)	KGIEF
	PF3D7_1358200	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
Out of frame genes	mal_mito_2	cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	TDO/A (2)	
	PF3D7_0110200	FAD-linked sulfhydryl oxidase ERV1, putative (ERV1)	TDO/A (1)	KINF
	PF3D7_0202400	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
	PF3D7_0205700.1	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
	PF3D7_0207100	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
	PF3D7_0207500	serine repeat antigen 6 (SERA6)	TDO/A (1)	
	PF3D7_0307700	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
	PF3D7_0310400	parasite-infected erythrocyte surface protein (PIESP1)	TDO/A (1)	
	PF3D7_0312800	60S ribosomal protein L26, putative	TDO/A (1)	

Table 2 Pips identified by Yeast two-hybrid screening *(Continued)*

PF3D7_0317300	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0319500	RNA binding protein, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_0407700	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	RDIIF
PF3D7_0417400	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0418000	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (2)	
PF3D7_0418300	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (2)	
PF3D7_0419900	phosphatidylinositol 4-kinase, putative	QDO/A (2)	
		TDO/A (1)	
PF3D7_0420000	zinc finger protein, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_0509200	leucine-rich repeat protein (LRR2)	QDO/A (1)	
PF3D7_0516600	translation initiation factor IF-2	TDO/A (1)	
PF3D7_0516900	60S ribosomal protein L2 (RPL2)	TDO/A (1)	KVIF
PF3D7_0520800	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	
PF3D7_0520900	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHH)	TDO/A (1)	
PF3D7_0525200	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (2)	KIEF/KDVLF
PF3D7_0530000	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0532100	early transcribed membrane protein 5 (ETRAMP5)	TDO/A (2)	
PF3D7_0602000	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0604500	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0611700	60S ribosomal protein L39 (RPL39)	TDO/A (2)	
PF3D7_0613800	transcription factor with AP2 domain(s) (ApiAP2)	TDO/A (1)	
PF3D7_0617200	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	KQIGF
PF3D7_0617800	histone H2A (H2A)	QDO/A (2)	
		TDO/A (6)	
PF3D7_0625300	DNA polymerase 1, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_0709300	Cg2 protein (CG2)	TDO/A (1)	KVNF
PF3D7_0719900	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0721100	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	
		TDO/A (1)	
PF3D7_0725300	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0806900	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	KNIGF/KIRW
PF3D7_0809400	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0811400	conserved protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0813200	CS domain protein, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_0813300	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0814000	60S ribosomal protein L13-2, putative	QDO/A (2)	RVNF
PF3D7_0815800	vacuolar sorting protein VPS9, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_0818000	conserved protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_0818900[d]	heat shock protein 70 (HSP70)	TDO/A (1)	
PF3D7_0831700	heat shock protein 70, putative (HSP70-x)	QDO/A (1)	
PF3D7_0904000	GTPase-activating protein, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_0919900	regulator of chromosome condensation, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_0921700	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	
PF3D7_0924100	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	

Table 2 Pips identified by Yeast two-hybrid screening *(Continued)*

PF3D7_0932100	protein MAM3, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_0933300	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1020200	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	KNVFF
PF3D7_1023400	HORMA domain protein, putative	QDO/A (1)	
PF3D7_1029900	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1032000	ribosome maturation factor RimM, putative (RimM)	TDO/A (1)	
PF3D7_1103100	60S acidic ribosomal protein P1, putative (RPP1)	TDO/A (1)	
PF3D7_1105100	histone H2B (H2B)	TDO/A (2)	
PF3D7_1107300	polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative (PAIP1)	TDO/A (1)	
PF3D7_1108600	endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein (ERC)	TDO/A (1)	KVYF
PF3D7_1116200.1	pyridoxine biosynthesis protein PDX2 (PDX2)	QDO/A (1)	
PF3D7_1117700	GTP-binding nuclear protein ran/tc4 (RAN)	QDO/A (1)	RQIQF
PF3D7_1121600	circumsporozoite-related antigen,exported protein 1 (EXP1)	TDO/A (1)	
PF3D7_1127900	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1141400	phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit H, putative (PIGH)	TDO/A (1)	
PF3D7_1149000	antigen 332, DBL-like protein (Pf332)	TDO/A (1)	KIIW
PF3D7_1206800	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	
PF3D7_1210600	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	
PF3D7_1211200	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	KVKF/KRINF/KYIEF
PF3D7_1214100	GPI ethanolamine phosphate transferase 3, putative (PIGO)	TDO/A (1)	
PF3D7_1222300	endoplasmin, putative (GRP94)	TDO/A (1)	
PF3D7_1224000	GTP cyclohydrolase I (GCH1)	TDO/A (1)	
PF3D7_1227000	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (2)	
PF3D7_1227700	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1228600	merozoite surface protein 9 (MSP9)	QDO/A (1)	
		TDO/A (1)	
PF3D7_1229400	macrophage migration inhibitory factor (MIF)	QDO/A (1)	
		TDO/A (1)	
PF3D7_1231600	pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP2, putative (PRP2)	TDO/A (1)	
PF3D7_1234600	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1234900	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1240600	erythrocyte membrane protein 1, PfEMP1 (VAR)	TDO/A (1)	
PF3D7_1249800	THO complex subunit 2, putative (THO2)	TDO/A (1)	
PF3D7_1303800	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (2)	
PF3D7_1306400	26S protease regulatory subunit 10B, putative (RPT4)	TDO/A (1)	
PF3D7_1308400	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	RRVLF
PF3D7_1308800	tyrosine recombinase (INT)	QDO/A (1)	KYIKF
		TDO/A (1)	
PF3D7_1316100	inositol polyphosphate kinase, putative (IPK2)	TDO/A (1)	
PF3D7_1324800	dihydrofolate synthase/folylpolyglutamate synthase (DHFS-FPGS)	QDO/A (1)	
PF3D7_1326600	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (2)	

Table 2 Pips identified by Yeast two-hybrid screening *(Continued)*

PF3D7_1336600	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1342300	tetratricopeptide repeat family protein, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_1342900	transcription factor with AP2 domain(s) (ApiAP2)	TDO/A (1)	
PF3D7_1346400	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1348400	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1351200	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	KYVNW
PF3D7_1356900	protein kinase 5 (PK5)	TDO/A (1)	
PF3D7_1357400	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (1)	KSIRF
PF3D7_1360700	E3 SUMO-protein ligase PIAS, putative (PIAS)	QDO/A (1)	KKVLW
PF3D7_1361200	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1366400	rhoptry protein (Rhop148)	TDO/A (1)	KILF
PF3D7_1417600	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1423700	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1444300	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative (LPAAT)	TDO/A (1)	
PF3D7_1456500	conserved Plasmodium protein, unknown function	QDO/A (2)	
PF3D7_1457000	signal peptide peptidase (SPP)	QDO/A (1)	
PF3D7_1460500	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	KVDF/KTVSF
PF3D7_1460700	60S ribosomal protein L27 (RPL27)	TDO/A (1)	
PF3D7_1464500	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1465900	40S ribosomal protein S3, putative	TDO/A (1)	
PF3D7_1466300	26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative (RPN2)	TDO/A (1)	
PF3D7_1470800	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	
PF3D7_1471900	conserved Plasmodium protein, unknown function	TDO/A (1)	KIIEF

[a]Annotations available on PlasmoDB database (v24)
[b]Selection medium used for the growth of isolated yeast clones were indicated. Numbers indicate the count of isolated clones. *TDO/A* Triple dropout supplemented with Aureobasidin A, *QDO/A* Quadruple dropout supplemented with Aureobasidin A
[c]The presence and the sequence of RVxF binding motifs were indicated
[d]Shared proteins isolated by affinity purification and Y2H screening

proteins for PP1 but none of the fragments contains any known binding motifs. This supports the idea that these kinases encompass new PP1-binding region/motifs. Examination of the full length proteins of these 6 kinases showed the presence of at least one binding motif (Additional file 3: Table S3). It would be important to check whether these motifs are also involved in interaction with PP1. Taken together, it could be speculated that these kinases could be direct substrates and/or regulators of PfPP1 and vice versa.

In addition to the interaction of PfPP1 and kinases, PfH2A, PfH2B and Pf Histone deacetylase 2 (PfHDA2) have been identified as Pips. All of these proteins are associated with nucleosome modifications and could direct the control of gene expression. Previous studies showed that the phosphorylation marks of H2A and H2B are detected along with lysine acetylation [27, 28]. The interaction of H2A and PP1 has also been reported in yeast [24, 29] (Additional file 2: Table S2). Taken together, these observations suggest a potential role and/or a control of the PP1 network in the marks of histones to govern diverse nuclear actions in *P. falciparum*.

Identification of Pips by *in silico* screening of the Pf genome

PP1 partners have been identified by biochemical and Y2H approaches, both of which can have their limitations: the quality and quantity of protein preparations, or the incapacity of yeast to produce Pf proteins (or proteins toxic for the growth of yeast). In order to further examine the presence of Pips genes in Pf, we used an extended RVxF consensus sequence mentioned in Materials and Methods. The choice of this extended consensus sequence, referred thereafter as $RVxF^{ext}$, was based on previous studies indicating its high specificity [30, 31]. The first consensus sequence defined by

Wakula et al. [12] was not used in this study because it is less restrictive and it occurs randomly in ~25 % of all proteins [30]. The bioinformatics analysis was performed with ORFs present in PlasmoDB (v24). This screening showed the presence of 55 RVxF^{ext} motif containing proteins in *P. falciparum* of which 5 proteins contain at least 2 motifs (Table 3). Two RVxF^{ext} containing proteins were excluded as one corresponds to a pseudogene and the second is annotated twice in PlasmoDB. Interestingly, among the 55 *in silico* Pips, 42 exhibit at least one additional binding motif to PP1 (SILK and/or Fxx[RK]x[RK]) (Additional file 4: Table S4). In addition, 8 proteins identified *in silico* were also isolated by Y2H screening while 1 protein was common between the affinity/MS-MS approach and Y2H screening (Fig. 1). Among the 8 shared proteins, 6 clones identified by Y2H screening followed the RVxF^{ext} consensus sequence. Further, homologs to 2 potential *in silico* PfPips (PF3D7_1107700, PF3D7_1220100) have been shown to interact with PP1 in *S. cerevisiae* (Additional file 2: Table S2) [23, 32, 33]. The *in silico* screening applied in this work cannot include PfLRR1 and Pf Inhibitors 2 and 3, known to bind and to regulate PfPP1 activity. Indeed, PfLRR1 binds PP1 through LRR motifs, however PfI2 and PfI3 encompass the short RVxF motif.

Validation of interaction of Pips identified

All interactors identified by the above approaches could be capable of binding directly to PfPP1. To explore this further, we decided to investigate the physical interaction of PfPP1 with some of PfPips produced as recombinant proteins. To this end, a binding assay with purified His-tagged fusion Pips in *E. coli* and biotin labeled PfPP1 was used. This approach has already been used and validated using recombinant proteins of known partners of PfPP1 or derived peptides from binding motifs [17]. PfI2 and PfI3, previously described to interact with PfPP1, were used as positive controls. A total of 37 PfPips were successfully produced as recombinant proteins in *E. coli* and purified out of 68 candidates tested and corresponding to 66 different Pips.

In the case of the Pips identified by PfPP1 affinity column, 5 proteins were produced out of 6. Binding data presented in Fig. 2a showed that biotin-PfPP1 binds to the 5 proteins tested. These data likely suggests that the identified Pips are direct interactors of PfPP1.

Next, we searched to check the direct interactions of Pips identified by Y2H screening and PfPP1. Fifteen recombinant PfPips were produced out of 30 cloned cDNAs tested (Additional file 5: Figure S1, Additional file 6: Table S5). The failure for the production of some proteins could be due to the lack of expression and/or to the toxicity for bacteria. For the binding with H2A and H2B, commercially available human recombinant proteins were used as they showed 67 and 63 % identity with PfH2A and PfH2B respectively (Additional file 7: Figure S2). As depicted in Fig. 2b, biotin-PfPP1 was able to bind to 14 recombinant proteins out of 17 tested. These data confirmed a direct interaction between PfPP1 and these Pips. Moreover, this binding assay showed that Pips with or without the RVxF motif can bind PfPP1 and confirmed that proteins which are out of frame of GAL4AD could be true Pips. However, under the same conditions, 3 proteins did not show significant binding when compared to BSA. The lack of binding is unlikely to be due to an absence of coating of purified protein to wells as the quality of coating was checked using an anti-His antibody (data not shown). It could be argued that these proteins are not direct partners of PfPP1 or their interaction may require additional partner(s) expressed by the yeast.

Finally, in order to examine the binding capacity of several *in silico* Pips identified by genome analysis, 32 fragments which correspond to 30 potential candidates were tested for protein production. The fragments were about 190 residues long with the RVxF^{ext} motif in the middle of the recombinant proteins (Additional file 5: Figure S1, Additional file 6: Table S5). The expression and purification were successful for only 17 proteins. Their ability to bind PP1 was then examined as described above. Significant interactions for 16 out of 17 proteins tested were observed (Fig. 2c). The lack of interaction of PfPP1 with PF3D7_0305500 could be attributed to the fact that its RVxF is not a valid binding motif. However, it is important to point out that 6 Pips identified by Y2H and *in silico* screens (PF3D7_0220000, PF3D7_0610100, PF3D7_0919900, PF3D7_1008100, PF3D7_1031600 and PF3D7_1202600) were confirmed to interact with PfPP1 by ELISA (Fig. 2b and c), highlighting the accuracy of the RVxF consensus sequence used throughout this study.

To further explore the implication of the RVxF motifs in PfPP1 binding, 2 Pips identified by Y2H screening and *in silico* analysis were mutated in their RVxF motifs and the corresponding recombinant proteins were produced. Results presented in Fig. 2d showed a significant decrease of the binding with PfPP1 (about 86 % for PF3D7_0220000 and 70 % for PF3D7_0919900). This confirms that the RVxF motifs of these 2 Pips are the main contributors for binding to PfPP1. However, it could not be excluded that these interactions could involve secondary structures of the protein to stabilize and to lead to a functional complex. This could be attributed to the fact that the RVxF binding motif, in most regulators, is often present in intrinsically disordered regions and the protein could adopt a structure upon binding [16, 17].

The newly RVxF-containing PfPips were then used to reexamine the features of the RVxF motif and the nature

Table 3 Pips identified by genome *in silico* analysis

PlasmoDB Accession number[a]	Name[a]	RVxF[ext] motifs[b]
PF3D7_0204600	conserved Plasmodium protein, unknown function	RKSVRW
PF3D7_0214400	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVTF
PF3D7_0220000[c]	liver stage antigen 3 (LSA3)	KKKVRF
PF3D7_0304300	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVTF
PF3D7_0305500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRNVSF/KRSVHF
PF3D7_0323300	conserved protein, unknown function	KKSVSF
PF3D7_0404700	dipeptidyl aminopeptidase 3 (DPAP3)	RKNVTF
PF3D7_0407300	transcription factor, putative	KKKVHF
PF3D7_0407700[c]	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVSW
PF3D7_0416900	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRNVHF
PF3D7_0503000	50S ribosomal protein L28, apicoplast, putative	RKNVRF
PF3D7_0513600	deoxyribodipyrimidine photo-lyase, putative	KKQVSF
PF3D7_0526500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKCVHF
PF3D7_0526600	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVTF
PF3D7_0610100[c]	pre-mRNA-splicing factor SLU7, putative (SLU7)	KKKVNF
PF3D7_0628100	HECT-domain (ubiquitin-transferase), putative	RKSVKF/KKSVTF
PF3D7_0713900	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVNF
PF3D7_0717800	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRSVSW
PF3D7_0723800	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKSVQF
PF3D7_0727500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKCVSF
PF3D7_0804500	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	KKNVHF
PF3D7_0913600	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKMVHF
PF3D7_0917500	conserved Plasmodium protein, unknown function	RKAVQF
PF3D7_0919900[c]	regulator of chromosome condensation, putative	KKSVSF
PF3D7_0922800	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVCF
PF3D7_0930100	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKTVHF
PF3D7_1002900	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRNVNF
PF3D7_1003700	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRKVKF
PF3D7_1008100[c]	conserved Plasmodium protein, unknown function	RKSVSF
PF3D7_1020600	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	KKKVNW
PF3D7_1022200	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	KKVVRF
PF3D7_1029400	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVSF
PF3D7_1031600[c]	conserved Plasmodium protein, unknown function (GEXP15)	KKKVQF
PF3D7_1107700	pescadillo-like protein (PES)	KKKVTW
PF3D7_1106800	protein kinase, putative	KKKVSF
PF3D7_1109100	conserved Plasmodium protein, unknown function	RRKVSF
PF3D7_1113700	glyoxalase I (Glol)	KKNVKF
PF3D7_1128000.1	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVTF
PF3D7_1139700	adrenodoxin reductase, putative	RKKVHF
PF3D7_1200100	erythrocyte membrane protein 1, PfEMP1 (VAR)	RKTVRF
PF3D7_1202600[c]	conserved protein, unknown function	KKNVTF/KKQVTF/ KRTVSF/KKSVSF/ KKTVSF/KKSVSF/KKNVSF
PF3D7_1220100	pre-mRNA splicing factor, putative	KKMVNF
PF3D7_1234700	CPW-WPC family protein	KKSVSF

Table 3 Pips identified by genome *in silico* analysis *(Continued)*

PF3D7_1238500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVHF
PF3D7_1244200	transcription factor Tfb2, putative	RKSVHF
PF3D7_1244500	conserved Plasmodium protein, unknown function	RRKVNF
PF3D7_1322100	variant-silencing SET protein (SETvs)	KRNVSF
PF3D7_1364300	pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (PRP16)	RKMVQF
PF3D7_1366300	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKVVKF/KKKVQF
PF3D7_1367500	NADH-cytochrome b5 reductase, putative	KKHVHF
PF3D7_1406200	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKMVSF
PF3D7_1411500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKQVSF/KKKVSF
PF3D7_1413000	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVQF
PF3D7_1417300	cysteine protease ATG4, putative (ATG4)	KKKVRF
PF3D7_1460500[c]	conserved Plasmodium protein, unknown function	RKTVSF

[a]Annotations from PlasmoDB database (v24)
[b]The RVxF[ext] binding motifs corresponding to the [KR][KR][ACHKMNQRSTV]V[CHKNQRST][FW] consensus sequence were indicated
[c]Shared proteins isolated by Y2H and *in silico* screenings

of the flanking amino acids in *P. falciparum*. The accepted motif exhibits the sequence $[K_{52}R_{13}][K_{55}R_{10}][K_{19}N_{15}S_{13}T_5]V[S_{22}H_{11}T_9R_6Q_6N_6][F_{60}W_5]$ (Additional file 8: Figure S3). Interestingly, the amino acids between V and F/W are enriched by S and H (~50 %). At the N-terminal positions of the RVxF (−1, and −2), the most conserved amino acid is the K residue. We have also found a high frequency of L residue at −2. Based on these data, the RVxF consensus sequence for PfPips could be extended and refined as $[K_{13}L_{12}I_7V_6][K_{18}N_8I_8R_5][K_{52}R_{13}][K_{55}R_{10}][K_{19}N_{15}S_{13}T_5]V[S_{22}H_{11}T_9R_6Q_6N_6][F_{60}W_5]$.

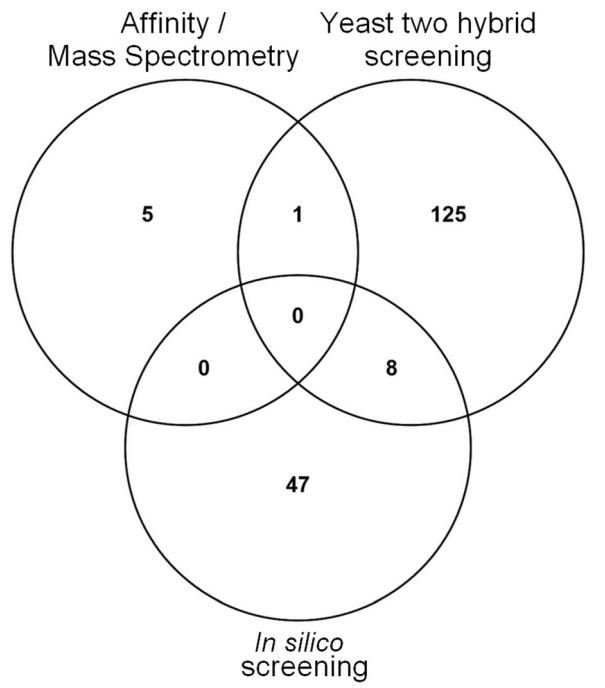

Fig. 1 Venn diagram. Graphic shows the distribution of identified Pips by the three approaches

PfPP1 interaction networks

The identification in this study of 186 new Pips provides new insights on the functional diversity of PfPP1 functions. Among the 186 identified proteins, 108 (58 %) have unknown function. For the 78 remaining proteins, the most abundant proteins correspond to metabolism, DNA maintenance, translation and phosphorylation processes (Fig. 3).

Based on an earlier published *P. falciparum* interactome [34] and on the identified PP1 interacting proteins reported in this work, we were able to establish three networks where several Pips could be involved. The transcription and DNA maintenance network illustrated in Figure S4A (Additional file 9) contained 9 direct Pips (white circles) detected by the different approaches described above and 4 connecting proteins (gray circles). The folding/proteolysis network involved 8 direct Pips and 2 connecting proteins (Additional file 9: Figure S4B). The pathogenicity network comprised 18 direct Pips and 16 connecting proteins (Fig. 4). In the latter network, 2 homologs of direct Pips in *P. berghei* (PBANKA_0408500 homolog to PF3D7_0310400 and PBANKA_0926700 homolog to PF3D7_1121600) have been shown to be essential for parasite survival as no viable KO parasites can be obtained [35, 36]. It is worthy of note that PF3D7_1023900, a connecting protein, contains a region of about 700 amino acids with 40 % identity with a yeast protein (YER164W) which has been shown to interact with yeast PP1 [23]. Its homolog in *P. berghei* (PBANKA_050810) has been shown to be essential for parasite survival [35]. The network analysis raises the possibility that new Pips

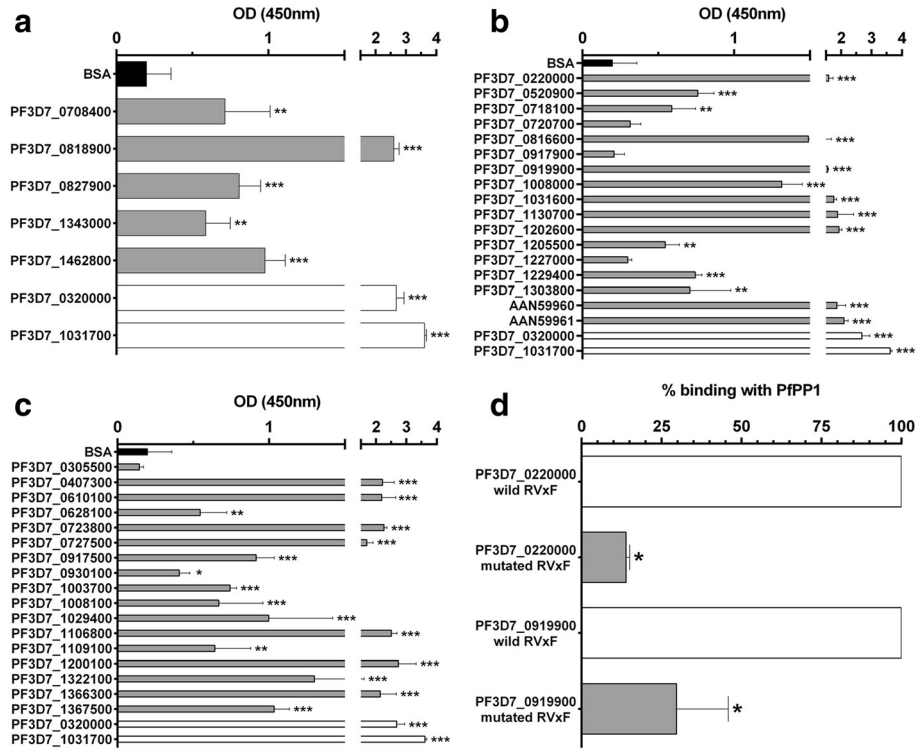

Fig. 2 Direct interaction of Pips to PfPP1. The binding capacity of recombinant Pips (25pmol/well) to biotin-PfPP1 (4pmol/well) was measured using an ELISA-based assay. **a** represents the binding of recombinant Pips identified by PP1-affinity column (*gray bars*). Pfl2 (PF3D7_0320000) and Pfl3 (PF3D7_1031700) were used as positive controls (*white bars*) and BSA was used as negative control (*black bars*). **b** represents the binding of Pips identified by Y2H screening (*gray bars*). AAN59960 and AAN59961 are human H2A and H2B proteins respectively which present high identity with PfH2A (PF3D7_0617800) and PfH2B (PF3D7_1105100). **c** represents the Pips identified by genome *in silico* analysis (*gray bars*). **d** contribution of the RVxF motifs to the binding of PF3D7_0220000 and PF3D7_0919900 to PfPP1 (*gray bars*). The interaction of PfPP1 to wild proteins was considered at 100 % binding. Results are presented as mean ± SD of 2 independent experiments preformed in duplicate. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$ (Mann–Whitney *U* test), compared to the negative control

could play a role in pathogenicity, at least in part, through their interaction with and regulation of PfPP1. However, it cannot be excluded that these proteins could be also substrates of PfPP1.

Conclusion

The diversity of proteins identified by three different and complementary approaches suggests that PP1c has a wide interaction network which controls several aspects of parasite physiology. A total of 186 proteins were identified by these approaches. One protein was common to both Y2H screening and PfPP1-affinity column approach and 8 proteins to Y2H and *in silico* screenings. This provides experimental support to determine the contribution of the RVxF motif to PfPP1 binding when present in Pips, to identify new binding regions/motifs specific of *Plasmodium* and to explore the role of Pips as regulators, substrates or both. Further experiments need to be done to determine PfPP1 substrates, for instance by identifying the phosphoproteomes of Pf in vitro in the absence and presence of recombinant active PfPP1, and to evaluate whether the new Pips could be able to regulate PfPP1 activity. These future studies will help to better elucidate PP1 signaling in *Plasmodium* and to increase and improve the choice of parasite targets for drug design.

Methods

Affinity purification of Pips

For affinity purification, 10 mg of PfPP1 recombinant protein (produced as previously described [17]) were covalently coupled to 0.5 ml of CNBr-activated Sepharose 4B according to the supplier's instructions (Sigma). The coupling efficiency was > 90 %. Before use, PP1 beads were submitted to 3 wash cycles with 3 M NaSCN and PBS. Ten mg of total soluble parasite extract (prepared as previously described [17]) were precleared on 2 ml of activated sepharose beads blocked with ethanolamine. The precleared extract recovered by centrifugation was filtered, divided in 2 equal volumes and incubated with

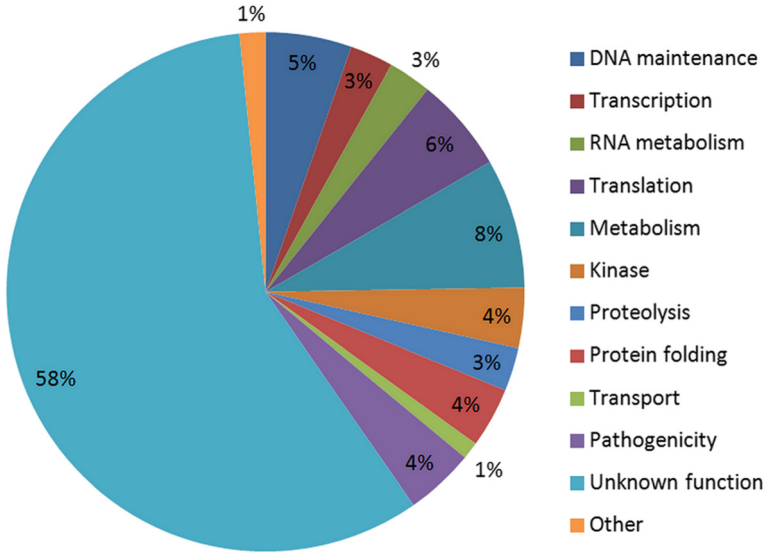

Fig. 3 Pie chart of biological functions of Pips. A total of 186 proteins are classified in 12 different biological functions based on confirmed or putative functions indicated in PlasmoDB and shown in our pie chart

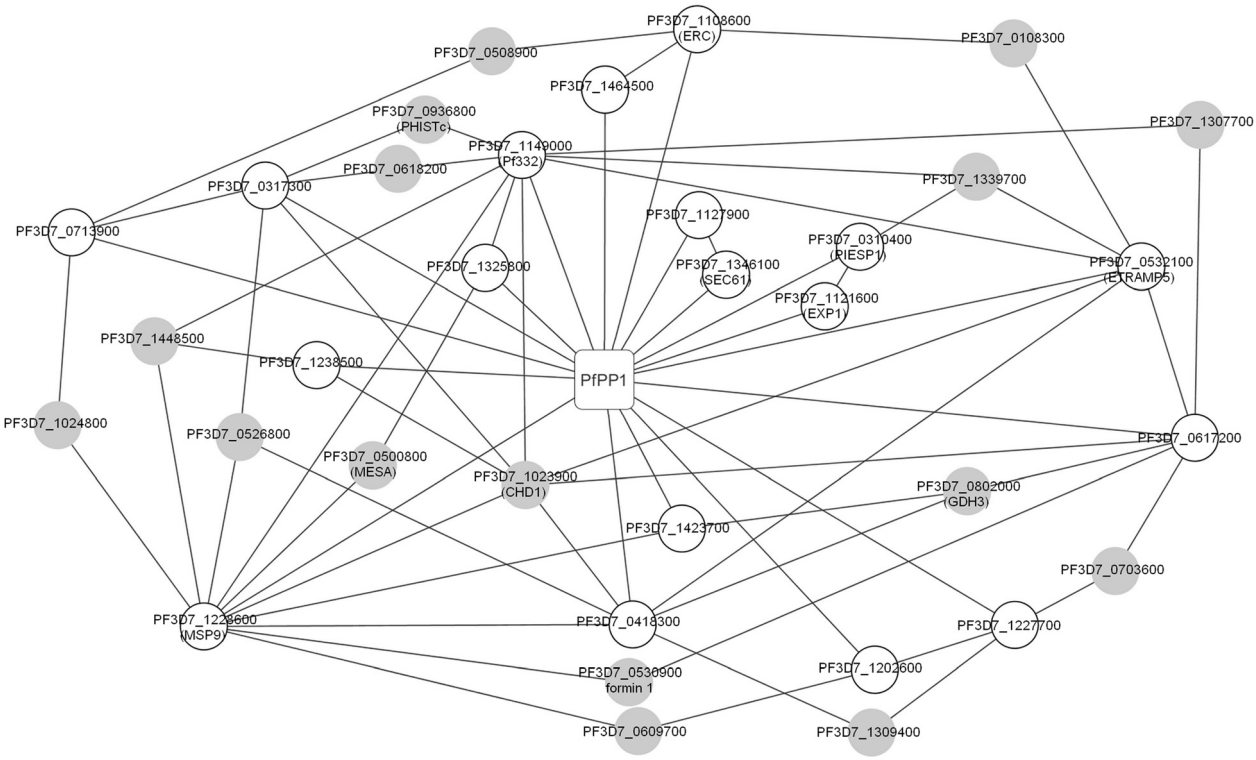

Fig. 4 PfPP1 Pathogenicity network. The graph shows interactions (*lines*) between Pips identified by our different approaches (*white circles*) and PfPP1 (*square box*). The gray circles represent connecting proteins based on the results of Lacount et al. [34]. When available, gene names given in PlasmoDB are shown in brackets

BSA-sepharose beads or PP1-beads overnight at 4 °C. After 5 washings with 50 mM Tris, 0.3 M NaCl, proteins were eluted with 2 × 0.5 ml of 3 M NaSCN. The proteins were then precipitated with acetone and separated on SDS-PAGE. No stained bands were observed for eluates of BSA-sepharose beads. Stained bands observed for eluates of PP1 column affinity were cut for MS/MS identification as previously described [37].

Plasmid and yeast strain

The cDNA library of *Plasmodium falciparum*, cloned in pGAD-HA vector, was purchased from Dualsystems Biotech. In this plasmid, the expressed parasite proteins are fused to the GAL4 activation domain. Yeast Y2HGold strain (Clontech) was transformed with the pGAD-cDNA library according to the method for high-efficiency library scale transformation of Dualsystems Biotech, and allowed to form colonies on 150 mm plates with SD agar medium lacking leucine (SD/-Leu) at 30 °C (3-4 days). Y2HGold contains four integrated reporter genes (AUR1-C, HIS3, ADE2 and MEL1) under the control of three distinct GAL4 responsive promoters used to detect two-hybrid interaction and in order to reduce false positives. All clones were scraped, harvested with a freezing medium (YPDA medium with 25 % glycerol) and stored in 1 ml aliquots at −80 °C for further experiments. This library-transformed yeast strain is referred below as the prey strain.

The cDNA encoding for *P. falciparum* protein phosphatase type-1 (PfPP1, PlasmoDB accession number: PF3D7_1414400) was cloned in the pGBKT7 vector (Clontech) to generate a PfPP1-pGBKT7 plasmid allowing the production of PfPP1 fused with the GAL4 DNA binding domain. Y187 yeast competent cells (Clontech) were then transformed with this construct according to the manual of Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Clontech). The expression of PfPP1 was checked by immunoblot using anti-GAL4BD antibody. This strain was used as a bait to screen protein interactions with the *P. falciparum* cDNA library by mating.

Yeast two-hybrid assay

All reagents and methods for yeast-two hybrid assays were from the Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech).

One fresh and large colony of bait yeast strain (pGBKT7-PfPP1 in Y187) was inoculated into 50 ml of SD/-Trp/Kan (Kanamycin) liquid medium agitated at 250 rpm, 30 °C until the OD600 reached 0.8. The supernatant was discarded after centrifugation for 5 min at 1,000 g. The pellet was suspended in 5 ml of SD/-Trp/Kan liquid medium ([cells] $>1 \times 10^8$/ml). 1 ml of library prey strain (after rechecking the titer) and 5 ml of bait strain Y187 were combined with 45 ml of 2xYPDA liquid medium and incubated for 20–24 h at 30 °C at 40 rpm. The culture was centrifuged for 10 min at 1,000 g, then 50 ml of 0.5xYPDA liquid medium (with 50 μg/ml Kan) was added to resuspend the pellet. After a centrifugation for 10 min, cells were suspended in 10 ml of 0.5xYPDA liquid medium (with 50 μg/ml Kan) and the total volume was measured. To calculate the number of screened clones and the mating efficiency, 100 μl of the fusion culture (diluted by 10^1 gradient) were plated on the selective medium SD/-Trp, SD/-Leu, and SD/-Trp/-Leu (Double dropout medium, DDO) and incubated for 3–5 days at 30 °C. More than 1 million diploids were screened to maximize chances of detecting genuine interactions on Aureobasidin A (AbA) plates. The remaining fusion culture was spread onto selective medium SD/-Trp/-Leu/Kan supplemented with 125 ng/ml AbA (DDO/A), 200 μl per 150 mm plates and incubated for 3–7 days at 30 °C. Colonies obtained were re-streaked onto higher stringency SD/-Trp/-Leu/-His/AbA/Kan (TDO/A, Triple dropout supplemented with AbA) and SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/AbA/Kan (QDO/A, Quadruple dropout supplemented with AbA) agar plates. This screening was carried out five times independently.

Identification of potential Pips

The prey plasmids from positive yeast clones were isolated using the Plasmid DNA Purification kit (Macherey-Nagel). To facilitate yeast lysis, the equivalent of 100 μl of glass beads (Sigma) was added in the resuspension buffer. To amplify the plasmid obtained, it was transformed to *E. coli* DH5α cells (Life Technologies) followed by selection on LB/Ampicillin and LB/Kanamycin plates. Plasmids were isolated once again using the Plasmid DNA Purification kit and then to estimate the sizes of the specific inserts on positive prey plasmids, plasmids were digested using the *Sfi*I restriction enzyme.

The positive prey plasmids were characterized by sequencing and BLAST searches to identify the corresponding *P. falciparum* genes in the PlasmoDB database (v24).

In silico screening

The consensus sequence used to identify potential interactors of PfPP1, was [KR][KR][ACHKMNQRSTV]V [CHKNQRST][FW]. It was based on the crystal of PP1 with a RRVSFA peptide [38] and on consensus sequences defined by different publications [12, 30, 31]. After identification of the putative partners, the positions −10 to +10 of RVxF motifs were aligned by BioEdit software (v7.2.5) to establish a new consensus sequence.

Recombinant proteins expression and purification

In order to verify the interaction between PfPP1 and its new interactors, His-tagged recombinant proteins were

produced. Concerning Pips from Y2H screening, the recombinant proteins correspond to the fragment identified during the screening (Additional file 6: Table S5). For Pips from *in silico* screening, the A/T rich regions or acidic amino acids were eliminatory to avoid a lack of expression in *E.coli*. The different RVxF motifs were placed in the middle of recombinant proteins. The chosen coding regions for Pips were obtained by PCR with the primers mentioned in Additional file 10: Table S6 using the Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech). The PCR conditions consisted of 10 min at 94 °C followed by 35 cycles at 94 °C (45 s), 56 °C or 58 °C (1 min) and 68 °C (1 min 30), finished by 7 min at 68 °C. To examine the role of RVxF binding motif, mutated constructs (KSVSF to KSASA for PF3D7_0919900, and the introduction of a stop in the second position of the KKVRF motif for PF3D7_0220000) were obtained by a PCR-based site-directed mutagenesis approach using the wild pQE30-PF3D7_0919900 and pETDuet-PF3D7_0220000 constructions as templates, the primers mentioned in Additional file 10: Table S6 and Isis DNA polymerase (MP Biomedicals). The mutations were checked by sequencing.

For the expression of Pips, the pETDuet-1 (Novagen) or pQE30 (Qiagen) expression system and the In-Fusion HD Cloning system (Clontech) were used according to the supplier's instructions. The plasmids and restriction sites are mentioned in Additional file 10: Table S6. The constructions obtained were checked by sequencing and transformed in One Shot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent *E. coli* cells (Life Technologies) for expression.

The expression of His6-Pips was carried out in the presence of 0.5 mM IPTG at 37 °C for 2 h. Cells were harvested in sonication buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 6 M Guanidine, 20 mM Imidazole and protease inhibitor cocktail (Roche), pH 7.5). Recombinant proteins were purified according to manufacturer's instructions by Ni^{2+}-NTA agarose beads (Macherey Nagel). Washing steps were performed with a buffer containing 20 mM Tris, 500 mM NaCl and 20 mM imidazole, pH 7.5. Elution was done with a buffer containing 20 mM Tris, 500 mM NaCl and 600 mM imidazole, pH 7.5. The eluted proteins were dialyzed against 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5.

PfPP1 was produced as described above [16] with a dialysis buffer containing 20 mM Tris, 500 mM Nacl and 1 mM $MnCl_2$, pH 7.5.

The produced proteins were quantified with the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Life Technologies) and checked by western blot. Soluble proteins were separated on a 4–20 % SDS-PAGE and subsequently blotted onto nitrocellulose. The blots were probed with anti-His antibody (1:2000 dilution) (Qiagen). As secondary antibody, a horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG (1:20000 dilution) was used, followed by chemiluminescence detection with SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Life Technologies).

Measurement of Pips binding

Binding of Pips to PfPP1 was assessed by an ELISA-based assay as previously described [17]. The plates were coated with 25pmol of each Pips in PBS overnight at 4 °C. In these experiments, recombinant PfI2 and PfI3 [16, 17] and BSA were used as positive and negative controls respectively. The statistical significance was calculated with the Mann-Whitney U test for non-parametric data and $p < 0.05$ was considered significant.

Bioinformatic analysis

The different binding motifs were identified using the tool "Protein Motif Pattern" available on PlasmoDB website. For biological functions of Pips, only the putative or characterized functions were taken into account. The GO annotation of unknown proteins was not retained. For functional analysis, the different protein subnetworks were based on the results from LaCount [34] and our interactions with PfPP1. After manual correction, they were visualized on Cytoscape (v3.2.1). The Venn diagram was established from Venny [39].

Availability of data and materials

All genome and protein sequence files are available through PlasmoDB (http://plasmodb.org/plasmo/) and GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/) and the data are included in the manuscript and in Additional file 1: Table S1, Additional file 2: Table S2, Additional file 3: Table S3, Additional file 4: Table S4, Additional file 6: Table S5, Additional file 7: Figure S2, Additional file 8: Figure S3, and Additional file 9: Figure S4.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Pips identified by affinity chromatography/mass spectrometry. (XLSX 10 kb)

Additional file 2: Table S2. Common Pips between *P. falciparum* and other species. (XLSX 13 kb)

Additional file 3: Table S3. Pips identified by Yeast two-hybrid screening. (XLSX 24 kb)

Additional file 4: Table S4. Pips identified by genome *in silico* analysis. (XLSX 13 kb)

Additional file 5: Figure S1. Production of Pips in *E. coli*. Immunoblot assay of recombinant Pips. (PDF 143 kb)

Additional file 6: Table S5. Recombinant proteins produced. (XLSX 15 kb)

Additional file 7: Figure S2. Conservation of human and Pf H2A and H2B. Global alignments using BioEdit software. (DOCX 58 kb)

Additional file 8: Figure S3. Global alignment between *in silico* Pips. The different protein sequences flanking the RVXF motifs were aligned using BioEdit software. (DOCX 463 kb)

Additional file 9: Figure S4. PfPP1 interaction networks. Transcription/DNA maintenance and Folding/Proteolysis subnetworks are shown. (PNG 141 kb)

Additional file 10: Table S6. List of primers for recombinant proteins expression. (DOCX 30 kb)

Abbreviations
AbA: Aureobasidin A; DDO: Double dropout medium; GAL4AD: GAL4 activation domain; HSP: Heat shock protein; I2: Inhibitor 2; I3: Inhibitor 3; Kan: Kanamycin; KO: Knock out; LRR1: Leucine Rich Repeat 1; Pf: *Plasmodium falciparum*; Pips: PP1 interacting proteins; PP1: Protein Phosphatase 1; TDO: Triple dropout medium; Y2H: Yeast two-hybrid.

Competing interests
There are no competing interests by any of the contributing authors.

Authors' contributions
JK designed the study. TH, CDW and AL, performed experiments. TH, CDW, AL, CP, and JK analyzed data. TH, CDW, CP and JK wrote the paper. All authors read, contributed feedback to, and approved the final manuscript.

Acknowledgments
We thank Hervé Drobecq for his technical assistance and Dr Raymond J Pierce for his critical reading of the manuscript. This work is supported by CNRS, Inserm, and Université Lille Nord de France.

Received: 7 October 2015 Accepted: 7 March 2016
Published online: 17 March 2016

References
1. Doerig C, Rayner JC, Scherf A, Tobin AB. Post-translational protein modifications in malaria parasites. Nat Rev Microbiol. 2015;13(3):160–72.
2. Guttery DS, Poulin B, Ramaprasad A, Wall RJ, Ferguson DJ, Brady D, Patzewitz EM, Whipple S, Straschil U, Wright MH, et al. Genome-wide functional analysis of Plasmodium protein phosphatases reveals key regulators of parasite development and differentiation. Cell Host Microbe. 2014;16(1):128–40.
3. Dobson S, May T, Berriman M, Del Vecchio C, Fairlamb AH, Chakrabarti D, Barik S. Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, Plasmodium falciparum: inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin-cyclosporin complex. Mol Biochem Parasitol. 1999;99(2):167–81.
4. Kumar R, Adams B, Oldenburg A, Musiyenko A, Barik S. Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite. Plasmodium falciparum. 2002;1:5.
5. Mamoun CB, Sullivan Jr DJ, Banerjee R, Goldberg DE. Identification and characterization of an unusual double serine/threonine protein phosphatase 2C in the malaria parasite Plasmodium falciparum. J Biol Chem. 1998; 273(18):11241–7.
6. Bhattacharyya MK, Hong Z, Kongkasuriyachai D, Kumar N. Plasmodium falciparum protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in Saccharomyces cerevisiae. Int J Parasitol. 2002;32(6):739–47.
7. Yokoyama D, Saito-Ito A, Asao N, Tanabe K, Yamamoto M, Matsumura T. Modulation of the growth of Plasmodium falciparum in vitro by protein serine/threonine phosphatase inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 1998;247(1):18–23.
8. Gallego M, Virshup DM. Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. Curr Opin Cell Biol. 2005;17(2):197–202.
9. Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-Gregorio L, da Cruz e Silva OA, da Cruz e Silva FF. The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interacting proteins to health and disease. Curr Med Chem. 2010;17(33):3996–4017.
10. Bollen M, Peti W, Ragusa MJ, Beullens M. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. Trends Biochem Sci. 2010;35(8):450–8.
11. Huang HB, Horiuchi A, Watanabe T, Shih SR, Tsay HJ, Li HC, Greengard P, Nairn AC. Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. J Biol Chem. 1999;274(12):7870–8.
12. Wakula P, Beullens M, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. J Biol Chem. 2003;278(21):18817–23.
13. Daher W, Browaeys E, Pierrot C, Jouin H, Dive D, Meurice E, Dissous C, Capron M, Tomavo S, Doerig C, et al. Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by PfLRR1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Mol Microbiol. 2006;60(3):578–90.
14. Daher W, Pierce R, Khalife J. Census, molecular characterization and developmental expression of Leucine-Rich-Repeat proteins in Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol. 2007;155(2):161–6.
15. Daher W, Oria G, Fauquenoy S, Cailliau K, Browaeys E, Tomavo S, Khalife J. A Toxoplasma gondii leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity. Eukaryot Cell. 2007;6(9):1606–17.
16. Freville A, Landrieu I, Garcia-Gimeno MA, Vicogne J, Montbarbon M, Bertin B, Verger A, Kalamou H, Sanz P, Werkmeister E, et al. Plasmodium falciparum inhibitor-3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival. J Biol Chem. 2012;287(2):1306–21.
17. Freville A, Cailliau-Maggio K, Pierrot C, Tellier G, Kalamou H, Lafitte S, Martoriati A, Pierce RJ, Bodart JF, Khalife J. Plasmodium falciparum encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1: perspectives for novel anti-plasmodial therapy. BMC Biol. 2013;11:80.
18. Freville A, Tellier G, Vandomme A, Pierrot C, Vicogne J, Cantrelle FX, Martoriati A, Cailliau-Maggio K, Khalife J, Landrieu I. Identification of a Plasmodium falciparum inhibitor-2 motif involved in the binding and regulation activity of protein phosphatase type 1. FEBS J. 2014;281(19):4519–34.
19. Flores-Delgado G, Liu CW, Sposto R, Berndt N. A limited screen for protein interactions reveals new roles for protein phosphatase 1 in cell cycle control and apoptosis. J Proteome Res. 2007;6(3):1165–75.
20. Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-Gregorio L, Vintem AP, Domingues SC, Rebelo S, Morrice N, Cohen PT, da Cruz e Silva QA, da Cruz e Silva EF, et al. Identification of the human testis protein phosphatase 1 interactome. Biochem Pharmacol. 2011;82(10):1403–15.
21. Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. Nat Genet. 1997; 16(3):277–82.
22. Chidley C, Haruki H, Pedersen MG, Muller E, Johnsson K. A yeast-based screen reveals that sulfasalazine inhibits tetrahydrobiopterin biosynthesis. Nat Chem Biol. 2011;7(6):375–83.
23. Logan MR, Nguyen T, Szapiel N, Knockleby J, Por H, Zadworny M, Neszt M, Harrison P, Bussey H, Mandato CA, et al. Genetic interaction network of the Saccharomyces cerevisiae type 1 phosphatase Glc7. BMC Genomics. 2008;9:336.
24. Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S et al. The genetic landscape of a cell. Science. 2010;327(5964):425–31.
25. Walsh EP, Lamont DJ, Beattie KA, Stark MJ. Novel interactions of Saccharomyces cerevisiae type 1 protein phosphatase identified by single-step affinity purification and mass spectrometry. Biochemistry. 2002;41(7):2409–20.
26. Peti W, Page R. Strategies to make protein serine/threonine (PP1, calcineurin) and tyrosine phosphatases (PTP1B) druggable: achieving specificity by targeting substrate and regulatory protein interaction sites. Bioorg Med Chem. 2015;23(12):2781–5.
27. Plasmodium Genomics Resource. http://plasmodb.org/plasmo/. Accessed 28 Sep 2015.
28. Dastidar EG, Dzeyk K, Krijgsveld J, Malmquist NA, Doerig C, Scherf A, Lopez-Rubio JJ. Comprehensive histone phosphorylation analysis and identification of Pf14-3-3 protein as a histone H3 phosphorylation reader in malaria parasites. PLoS One. 2013;8(1):e53179.
29. Bazzi M, Mantiero D, Trovesi C, Lucchini G, Longhese MP. Dephosphorylation of gamma H2A by Glc7/protein phosphatase 1 promotes recovery from inhibition of DNA replication. Mol Cell Biol. 2010;30(1):131–45.
30. Hendrickx A, Beullens M, Ceulemans H, Den Abt T, Van Eynde A, Nicolaescu E, Lesage B, Bollen M. Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. Chem Biol. 2009;16(4):365–71.
31. Meiselbach H, Sticht H, Enz R. Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif: molecular description of binding specificities identifies interacting proteins. Chem Biol. 2006;13(1):49–59.
32. Breitkreutz A, Choi H, Sharom JR, Boucher L, Neduva V, Larsen B, Lin ZY, Breitkreutz BJ, Stark C, Liu G, et al. A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. Science. 2010;328(5981):1043–6.
33. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K et al. Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry. Nature. 2002;415(6868):180–3.
34. LaCount DJ, Vignali M, Chettier R, Phansalkar A, Bell R, Hesselberth JR, Schoenfeld LW, Ota I, Sahasrabudhe S, Kurschner C, et al. A protein

interaction network of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature. 2005;438(7064):103–7.
35. Rodent Malaria genetically modified Parasites. http://www.pberghei.eu/. Accessed 28 Sep 2015.
36. van Ooij C, Tamez P, Bhattacharjee S, Hiller NL, Harrison T, Liolios K, Kooij T, Ramesar J, Balu B, Adams J, et al. The malaria secretome: from algorithms to essential function in blood stage infection. PLoS Pathog. 2008;4(6):e1000084.
37. Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Wattez A, David JP, Vanmechelen E, Sergheraert C, et al. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. J Neurochem. 2003;85(6):1581–91.
38. Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P, Barford D. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. EMBO J. 1997;16(8):1876–87.
39. Oliveros JC. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html (2007–2015). Accessed 28 Sep 2015.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

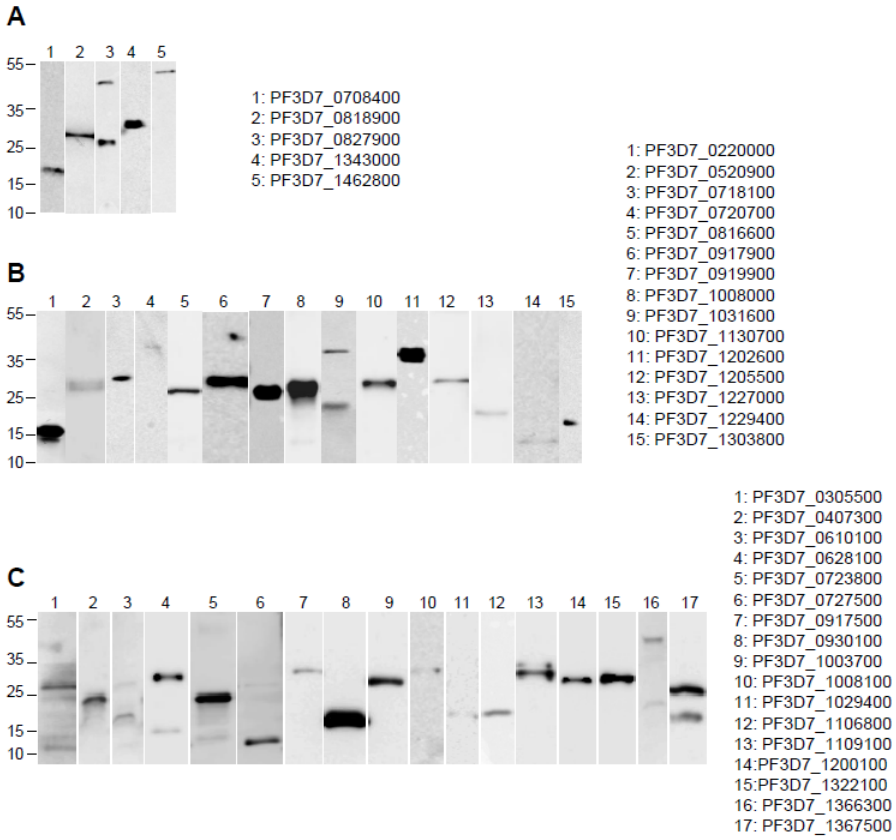

Figure S1. Production of Pips in *E. coli*. Purified recombinant proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblot assays were performed using an anti-histidine mAb at 1:2000. **A**, **B** and **C**, represent Pips identified by affinity purification, Y2H screening and *in silico* analysis respectively.

Figure S2. Conservation of human and Pf H2A and H2B. Global alignments of human H2A (AAN59960) with PfH2A (PF3D7_0617800) (**A**) and human H2B (AAN59961) with PfH2B (PF3D7_1105100) (**B**) showed 67% and 63% of identity respectively.

A

```
                    10        20        30        40
human H2A   - S G R G K Q G G K A R A K A K S R S S R A G L Q F P V G R V H R L L R K G N Y
PfH2A       M S A K G K T G R K K A S K G T S N S A K A G L Q F P V G R I G R Y L K K G K Y

                    50        60        70        80
human H2A   S E R V G A G A P V Y L A A V L E Y L T A E I L E L A G N A A R D N K K T R I I
PfH2A       A K R V G A G A P V Y L A A V L E Y L C A E I L E L A G N A A R D N K K S R I T

                    90       100       110       120
human H2A   P R H L Q L A I R N D E E L N K L L G R V T I A Q G G V L P N I Q A V L L P K K
PfH2A       P R H I Q L A V R N D E E L N K F L A G V T F A S G G V L P N I H N V L L P K K

                   130
human H2A   T E S H H K A K G K - -
PfH2A       S Q L K A G T A N Q D Y
```

B

```
                    10        20        30        40
human H2B   P E P A K S A P A P K K G S K K A V T K A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S I Y
PfH2B       M V S K K P A K A K K T G - - - - - T G P D G K - - K K R K K S R Y D S Y G L Y

                    50        60        70        80
human H2B   V Y K V L K Q V H P D T G I S S K A M G I M N S F V N D I F E R I A G E A S R L
PfH2B       I F K V L K Q V H P D T G I S R K S M N I M N S F L V D T F E K I A T E A S R L

                    90       100       110       120
human H2B   A H Y N K R S T I T S R E I Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K
PfH2B       C K Y T R R D T L S S R E I Q T A I R L V L P G E L A K H A V S E G T K A V T K

human H2B   Y T S S K
PfH2B       F T S K -
```

Figure S3. Global alignment between *in silico* Pips. The different protein sequences flanking the RVxF^{ext} motifs (black) were aligned using BioEdit software. The PlasmoDB accession numbers are indicated.

```
                                  ''''|''''|''''|''''|''''|''
                                           10        20
PF3D7 0204600                     KTKVLKGVFKRKSVRWQYH
PF3D7 0214400                     ........MNKKKVTFKNDVTYENAD
PF3D7 0220000                     VKEEPKKKITKKKVRFDIKDKEPKDE
PF3D7 0304300                     KDNPINVNKKKKKVTFHDIYGEVINI
PF3D7 0305500  a                  TLLIIINILIKRNVSFINFYSWIFFK
PF3D7 0305500                     SVKIIDVDERKRSVHFYPQHLDGNTL
PF3D7 0323300                     DVLNMENKINKKSVSFIKNEYINSNI
PF3D7 0404700                     SNNISHIYMIRKNVTFFGLRNNKIKK
PF3D7 0407300                     SQELENINKEKKKVHFEEDEITSEEL
PF3D7 0407700                     SEEGNKNIYKKKKVSWGKRENVLDND
PF3D7 0416900                     KFLMNKIKVVKRNVHFFGKDMNNKKK
PF3D7 0503000                     PNYFYVISLYRKNVRFKNNNVLNKSV
PF3D7 0513600                     ISCTFTDSNKKKQVSFFSQVDKNIMQ
PF3D7 0526500                     EDGIHNHSLEKKCVHFSDVSPSDFPQ
PF3D7 0526600                     SHKKSSNNIIKKKVTFCPKIKRCSHS
PF3D7 0610100                     KEKDCLERTRKKKVNFMKNDNEDFIC
PF3D7 0628100  a                  SKFYFSNKILRKSVKFYASWLLKKYI
PF3D7 0628100                     SKEKMYFYTSKKSVTFEKLEENEKMD
PF3D7 0713900                     GVNRKVGPGRKKNVNFKMEENADTNV
PF3D7 0717800                     CNINNMSKKKKRSVSWESTRSSSHEG
PF3D7 0723800                     KDMNDIMSARKKSVQFSHRSIAVFDD
PF3D7 0727500                     YYYNTYNCLNKKCVSFISCYKRDFCY
PF3D7 0804500                     TTQIYMTSAGKKNVHFIVISFMLMDQ
PF3D7 0913600                     TSEFLINELIKKMVHFIILNFTKTFL
PF3D7 0917500                     MELTKKLDDKRKAVQFIIDRYNEYTW
PF3D7 0919900                     LKKSSSSDGIKKSVSFSKYVYDLAKN
PF3D7 0922800                     NYVFLLNIQKKKNVCFWINIKHIHKN
PF3D7 0930100                     YINEKCDNVVKKTVHFKSLNSLIHLF
PF3D7 1002900                     SSDKSDQSLRKRNVNFICDRIVIDEH
PF3D7 1003700                     VSIKLNPFFYKRKVKFFDYGYYINNI
PF3D7 1008100                     NTEHTDHEKDRKSVSFEQEKSELISN
PF3D7 1020600                     NIVEYINQEEKKKVNWTENLRYETQK
PF3D7 1022200                     LNNEEKKKQVKKVVRFKEDSIIKTQK
PF3D7 1029400                     YDRNKSRIKNKKNVSFEEKLYSDIEK
PF3D7 1031600                     DDVNKSKEKKKKKVQFSNNNETIYYE
PF3D7 1106800                     NDSEIKKIMNKKKVSFEYDNNEEKKK
PF3D7 1107700                     KGYYLQAEILKKKVTWIIPHIFTPYL
PF3D7 1109100                     NNLKNEEKLERRKVSFASTKELCLLN
PF3D7 1113700                     DVIEQCDNLFKKNVKFHKLPHETKMK
PF3D7 1128000.1                   TTSSHNNKKKKKNVTFSDDNMYNISY
PF3D7 1139700                     YENDITELLKRKKVHFVSMDQWNYIQ
PF3D7 1200100                     GEDKEYPCLGRKTVRFSDKEGAECYK
PF3D7 1202600  a                  DTNKGNKKLKKKNVTFLCDDDEDKRD
PF3D7 1202600                     ETKDVNDDEKKKQVTFKRKNIDSDVV
PF3D7 1202600                     KRKNIDSDVVKRTVSFSSEEEHICIE
PF3D7 1202600                     FESYKNNDVIKKSVSFSSEEEFIPVD
PF3D7 1202600                     HNNIRSNDVIKKTVSFSSEEEYIPVY
PF3D7 1202600                     FNDKVGELMNKKSVSFSSEEEHIPVE
PF3D7 1202600                     MKRNKENDTLKKNVSFEYNENENKNE
PF3D7 1220100                     SNGGLFIWNWKKMVNFKNIKAHKNVC
PF3D7 1234700                     VYSSYLKDDKKKSVSFENTPNEEEEK
PF3D7 1238500                     KFNYKYTDYWKKKVHFKCCKLQRAYN
PF3D7 1244200                     KKEDDNKTEQRKSVHFNSDIYEKAYN
PF3D7 1244500                     GNNMEEMNKLRRKVNFAPRDIYTVNN
PF3D7 1322100                     KSYYVNISKKKRNVSFNYKEEFMKGD
PF3D7 1364300                     NNEGNLTDIGRKMVQFPLDPPLSKIV
PF3D7 1366300  a                  ITTDYCNVVNKKVVKFLEDFKKDFLN
PF3D7 1366300                     KDIEENQKLEKKKVQFSNLKNINTKA
PF3D7 1367500                     SYTPVYIDKKKKHVHFIIRVYYPDDE
PF3D7 1406200                     YPSRKKRKNKKKMVSFFDDINESMKR
PF3D7 1411500  a                  KRKNSFLKKEKKQVSFSNNDQIIINK
PF3D7 1411500                     NPIVEIKQKKKKKVSFNYENDIKKME
PF3D7 1413000                     FIGSQTNENIKKNVQFVKEEDILKIK
PF3D7 1417300                     SAIIISNLINKKKVRFVKKNKMKNNF
PF3D7_1460500                     NINNNILSKKRKTVSFSNMNIDTNNQ
```

a, proteins containing at least 2 RVxF^{ext} motifs.

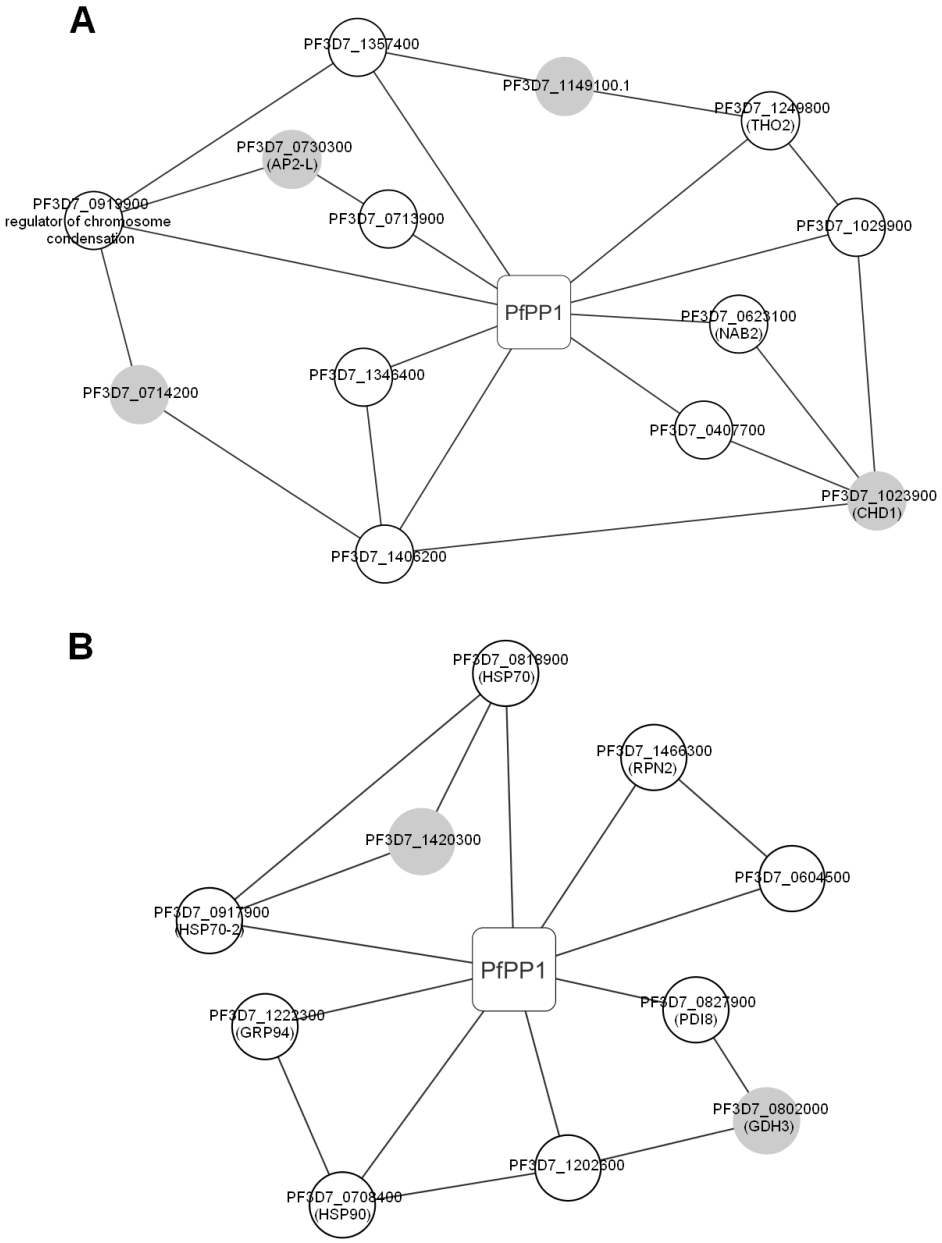

Figure S4. PfPP1 interaction networks.

A, Transcription and DNA maintenance subnetwork. **B**, Folding/proteolysis subnetwork.
The graph shows interactions (lines) between Pips identified by our different approaches (white circles) and PfPP1.
The gray circles represent connecting proteins based on the results of Lacount et al. [34]
When available, gene names given in PlasmoDB are shown in brackets.

Table S1. Pips identified by column affinity/mass spectrometry.

Band[a]	PlasmoDB Accession number[b]	Name[b]	Motifs (Position a.a.)[c]	Number of peptides used	Protein sequence coverage	Mascot score	Biological function[d]
1	PF3D7_0708400	heat shock protein 90 (HSP90)	FENRKK (371-376)	16	19%	92	Protein folding
2	PF3D7_0818900	heat shock protein 70 (HSP70)	RLVNF (248-252) FKRKNR (257-262)	22	34%	203	Protein folding
3	PF3D7_0827900	protein disulfide isomerase (PDI8)	FNKKNK (112-117)	15	27%	108	Protein folding
4	PF3D7_0608800	ornithine aminotransferase (OAT)	KTVKF (405-409)	15	35%	131	Metabolism
5	PF3D7_1462800	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	KLVSW (312-316)	14	44%	106	Metabolism
6	PF3D7_1343000	phosphoethanolamine N-methyltransferase (PMT)	KIIF (103-106)	8	32%	100	Metabolism

[a] Number of stained bands on SDS-PAGE.

[b] Annotations available on PlasmoDB database (v24).

[c] 3 different binding motifs with PP1 were scanned :

RVxF=[RK]x_{0-1}[VI]{P}[FW]

Fxx[RK]x[RK]

SILK=[GS]IL[RK]

[d] Biological functions were based on confirmed or putative functions indicated on PlasmoDB.

Table S2. Common Pips between *P. falciparum* and other species.

Pips identified in *Plasmodium falciparum*	Pips previously described in other species			
Name[a] (accession number)	Organism	Name[b] (accession number)	% of identity[c]	Reference
histone H2A (H2A) (PF3D7_0617800)	*S. cerevisiae*	HTA1 (YDR225W)	67%	Costanzo M, *et al.* [24]
heat shock protein 70 (HSP70) (PF3D7_0818900)	*H. sapiens*	HSP-71 (P11142.1)	69%	Fardilha M, *et al.* [20]
	M. musculus	HSP70-1B (P17879.3)	69%	Flores Delgado G, *et al.* [19]
ADP-ribosylation factor (ARF1) (PF3D7_1020900)	*S.cerevisiae*	ARF1 (YDL192W)	72%	Logan MR, *et al.* [23]
60S acidic ribosomal protein P1, putative (RPP1) (PF3D7_1103100)	*S.cerevisiae*	RPP1B (YDL130W)	31%	Costanzo M, *et al.* [24]
pescadillo homolog (PES) (PF3D7_1107700)	*S.cerevisiae*	NOP7 (YGR103W)	28%	Breitkreutz A, *et al.* [32] Ho Y, *et al.* [33]
pre-mRNA splicing factor, putative (PF3D7_1220100)	*S.cerevisiae*	CDC40 (YDR364C)	26%	Logan MR, *et al* . [23]
60S ribosomal protein L27 (RPL27) (PF3D7_1460700)	*S.cerevisiae*	RPL27A (YHR010W)	39%	Walsh EP, *et al.* [25]
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (PF3D7_1462800)	*S.cerevisiae*	THD3 (YGR192C)	58%	Logan MR, *et al.* [23]

[a] Annotations from PlasmoDB database (v24).

[b] Gene annotations as indicated in NCBI.

[c] Identity obtained by global alignments between Pf protein and its homolog on BioEdit software (v7.2.5).

Table S3. Pips identified by Yeast two-hybrid screening.

	PlasmoDB Accession number[a]	Name[a]	In frame with GAL4AD	Growth on selective plates (number of isolated clones)[b]	Detected fragment (a.a.)	Motifs and positions on detected fragments (Position a.a.)[c]	Additional Motifs on full length[d]	Biological function[e]
In frame and out of frame genes	PF3D7_0418300	conserved Plasmodium protein, unknown function	Yes	QDO/A	73-202	/	/	Unknown function
			No	TDO/A (2)	553-707			
	PF3D7_0520800	conserved Plasmodium protein, unknown function	Yes	TDO/A	885-1121	/	2 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
			No	QDO/A	1117-1193			
	PF3D7_0520900	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHH)	Yes	TDO/A	236-479	/	1 SILK	Metabolism
			No	TDO/A	2-299	SILK (179-182)	/	
	PF3D7_0613800	transcription factor with AP2 domain(s) (ApiAP2)	Yes	QDO/A	3014-3150	RGVYF (3087-3091) FENKTK (3134-3139)	2 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	Transcription
			Yes	TDO/A	2742-2977	/	3 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK]	
			No	TDO/A	3398-3720	/		
	PF3D7_0919900	regulator of chromosome condensation, putative	Yes	QDO/A (8)	801-1107	KSVSF (980-984)	3 RVxF	DNA maintenance
			No	TDO/A	1549-1733	/	4 RVxF	
	PF3D7_1105100	histone H2B (H2B)	Yes	TDO/A	1-117	/	/	DNA maintenance
			No	TDO/A (2)	1-117			
	PF3D7_1228600	merozoite surface protein 9 (MSP9)	Yes	TDO/A	124-447	/	1 RVxF	Pathogenicity
			No	QDO/A TDO/A	82-391			
	PF3D7_1303800	conserved Plasmodium protein, unknown function	Yes	TDO/A	9165-9271	/	19 RVxF 9 Fxx[RK]x[RK] 2 SILK	Unknown function
			No	TDO/A	4987-5278			
			No	TDO/A	6176-6407	FIYKRK (6305-6310)	19 RVxF 8 Fxx[RK]x[RK] 2 SILK	
In frame genes	PF3D7_0107600	serine/threonine protein kinase, putative	Yes	TDO/A	1139-1404	/	6 RVxF 4 Fxx[RK]x[RK]	Kinase
	PF3D7_0220000	liver stage antigen 3 (LSA3)	Yes	QDO/A (2)	1149-1295	KKVRF (1283-1287) FDIKDK (1287-1292)	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
	PF3D7_0610100	Pre-mRNA-splicing factor SLU7, putative (SLU7)	Yes	TDO/A	131-443	/	1 RVxF	RNA metabolism
	PF3D7_0611800	conserved Plasmodium protein, unknown function	Yes	TDO/A	2447-2721	/	/	Unknown function
	PF3D7_0623100	nuclear polyadenylated RNA-binding protein NAB2, putative	Yes	TDO/A (2)	42-262	FRLRDK (206-211)	1 Fxx[RK]x[RK]	RNA metabolism
	PF3D7_0718100	exported serine/threonine protein kinase (EST)	Yes	TDO/A	1205-1431	/	2 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK]	Kinase
	PF3D7_0720700	phosphoinositide-binding protein, putative	Yes	TDO/A	565-968	FVRRIR (887-892) KIKF (921-924)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
	PF3D7_0724600	protein kinase, putative	Yes	TDO/A	1-118	/	1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Kinase
	PF3D7_0803400	DNA repair protein rad54, putative	Yes	QDO/A	861-1080	/	1 Fxx[RK]x[RK]	DNA maintenance
	PF3D7_0816600	ClpB protein, putative (ClpB1)	Yes	TDO/A	875-1070	/	1 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK] 2 SILK	Protein folding
	PF3D7_0917900	heat shock protein 70 (HSP70-2)	Yes	TDO/A	354-582	/	/	Protein folding
	PF3D7_1008000	histone deacetylase 2 (HDA2)	Yes	TDO/A	835-1055	/	3 RVxF 4 Fxx[RK]x[RK]	DNA maintenance
	PF3D7_1008100	conserved Plasmodium protein, unknown function	Yes	TDO/A	809-1064	KSVSF (837-841)	4 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
	PF3D7_1020900	ADP-ribosylation factor (ARF1)	Yes	TDO/A	71-181	/	1 RVxF	Other
	PF3D7_1031600	conserved Plasmodium protein, unknown function (GEXP15)	Yes	QDO/A (3)	8-256	KKVQF (38-42)	1 RVxF	Unknown function
	PF3D7_1130700	structural maintenance of chromosome protein, putative	Yes	TDO/A	281-481	FLRKNR (410-415)	1 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	DNA maintenance
				TDO/A	811-984	/	1 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	
	PF3D7_1202600	conserved protein, unknown function	Yes	QDO/A (10)	1261-1735	KNVTF (1275-1279) KCVSF (1338-1342) KQVTF (1400-1404) RTVSF (1416-1420) KKVTF (1492-1496) KSVSF (1507-1511) KKVTF (1569-1573) EGDKGK (1487-1492)	10 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
	PF3D7_1205500	zinc finger protein, putative	Yes	TDO/A	712-936	/	/	Unknown function
	PF3D7_1229600	conserved Plasmodium protein, unknown function	Yes	TDO/A	1-269	FNKKRK (83-88)	1 RVxF	Unknown function
	PF3D7_1317600	conserved Plasmodium protein, unknown function	Yes	TDO/A	291-421	KYIYF (348-352)	1 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
	PF3D7_1325800	conserved Plasmodium protein, unknown function	Yes	TDO/A	820-1100	/	1 RVxF 1 SILK	Unknown function
	PF3D7_1346100	protein transport protein SEC61 subunit alpha (SEC61)	Yes	TDO/A	204-463	KGIEF (205-209)	1 RVxF	Transport
	PF3D7_1358200	conserved Plasmodium protein, unknown function	Yes	TDO/A	852-1060	/	2 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
	mal_mito_2	cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	No	TDO/A	63-308	/	/	Metabolism
				TDO/A	260-478			
	PF3D7_0110200	FAD-linked sulfhydryl oxidase ERV1, putative (ERV1)	No	TDO/A	1-143	KINF (104-107)	/	Metabolism
	PF3D7_0202400	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	426-518	/	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
	PF3D7_0205700.1	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1-137	/	/	Unknown function
	PF3D7_0207100	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1109-1253	FLIKKK (1186-1191)	2 RVxF	Unknown function
	PF3D7_0207500	serine repeat antigen 6 (SERA6)	No	TDO/A	1-183	/	1 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	Pathogenicity
	PF3D7_0307700	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1669-1826	/	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
	PF3D7_0310400	parasite-infected erythrocyte surface protein (PIESP1)	No	TDO/A	118-382	/	/	Pathogenicity

PF3D7_0312800	60S ribosomal protein L26, putative	No	TDO/A	1-61	/	/	Translation
PF3D7_0317300	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	2018-2197	/	2 RVxF 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0319500	RNA binding protein, putative	No	TDO/A	1-224	/	/	Unknown function
PF3D7_0407700	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	967-1161	RDIIF (1075-1079)	1 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0417400	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	5966-6242	/	14 RVxF 7 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0418000	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A (2)	2271-2481	/	4 RVxF 8 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0419900	phosphatidylinositol 4-kinase, putative	No	QDO/A QDO/A TDO/A	1857-1998 4414-4679	/ /	8 RVxF 4 Fxx[RK]x[RK]	Kinase
PF3D7_0420000	zinc finger protein, putative	No	TDO/A	2238-2459	/	/	Unknown function
PF3D7_0509200	leucine-rich repeat protein (LRR2)	No	QDO/A	1-266	FIKKIK (245-250)	/	Unknown function
PF3D7_0516600	translation initiation factor IF-2	No	TDO/A	937-1245	/	1 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	Translation
PF3D7_0516900	60S ribosomal protein L2 (RPL2)	No	TDO/A	1-260	KVIF (60-63)	/	Translation
PF3D7_0525200	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A TDO/A	954-1172 1599-1849	KDVLF (1092-1096) KIEF (1732-1735)	2 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0530000	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1-69	/	/	Unknown function
PF3D7_0532100	early transcribed membrane protein 5 (ETRAMP5)	No	TDO/A (2)	1-107	/	/	Unknown function
PF3D7_0602000	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1215-1437	/	3 RVxF 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0604500	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	983-1074	/	1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0611700	60S ribosomal protein L39 (RPL39)	No	TDO/A (2)	1-31	FRLKQR (7-12)	/	Translation
PF3D7_0617200	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A	103-206	KQIGF (103-107)	/	Unknown function
PF3D7_0617800	histone H2A (H2A)	No	QDO/A (2) TDO/A (6)	1-132	/	/	DNA maintenance
PF3D7_0625300	DNA polymerase 1, putative	No	TDO/A	1-267	/	1 RVxF	DNA maintenance
PF3D7_0709300	Cg2 protein (CG2)	No	TDO/A	1094-1340	KVNF (1109-1112)	2 RVxF 6 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0719900	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	No	TDO/A	732-1028	/	4 RVxF 4 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0721100	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A TDO/A	1-104	/	1 RVxF	Unknown function
PF3D7_0725300	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	22-173	/	/	Unknown function
PF3D7_0806900	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A	13-163	KNIGF (60-64) KIRW (74-77)	/	Unknown function
PF3D7_0809400	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	2-241	/	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0811400	conserved protein, unknown function	No	TDO/A	413-608	/	/	Unknown function
PF3D7_0813200	CS domain protein, putative	No	TDO/A	15-148	/	/	Unknown function
PF3D7_0813300	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1-135	/	/	Unknown function
PF3D7_0814000	60S ribosomal protein L13-2, putative	No	QDO/A (2)	1-195	RVNF (22-25)	1 RVxF	Translation
PF3D7_0815800	vacuolar sorting protein VPS9, putative	No	TDO/A	847-1120	/	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0818000	conserved protein, unknown function	No	TDO/A	128-209	/	/	Unknown function
PF3D7_0818900[f]	heat shock protein 70 (HSP70)	No	TDO/A	389-585	/	1 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	Protein folding
PF3D7_0831700	heat shock protein 70, putative (HSP70-x)	No	QDO/A	307-455	/	1 RVxF	Protein folding
PF3D7_0904000	GTPase-activating protein, putative	No	TDO/A	10-300	/	/	Unknown function
PF3D7_0921700	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A	132-269	FDDKEK (133-138)	1 RVxF	Unknown function
PF3D7_0924100	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	2-162	/	/	Unknown function
PF3D7_0932100	protein MAM3, putative	No	TDO/A	762-955	/	5 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0933300	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	652-771	/	2 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_1020200	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	125-406	KNVFF (164-168)	/	Unknown function
PF3D7_1023400	HORMA domain protein, putative	No	QDO/A	8-195	FEKKRK (28-33)	/	Unknown function
PF3D7_1029900	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1362-1675	/	4 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1032000	ribosome maturation factor RimM, putative (RimM)	No	TDO/A	151-192	/	2 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	Translation
PF3D7_1103100	60S acidic ribosomal protein P1, putative (RPP1)	No	TDO/A	1-118	/	/	Translation
PF3D7_1107300	polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative (PAIP1)	No	TDO/A	1188-1324	/	3 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_1108600	endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein (ERC)	No	TDO/A	66-295	KVYF (237-240)	/	Unknown function
PF3D7_1116200.1	pyridoxine biosynthesis protein PDX2 (PDX2)	No	QDO/A	61-179	/	1 Fxx[RK]x[RK]	Metabolism
PF3D7_1117700	GTP-binding nuclear protein ran/tc4 (RAN)	No	QDO/A	1-214	RQIQF (133-137)	/	Transport
PF3D7_1121600	circumsporozoite-related antigen,exported protein 1 (EXP1)	No	TDO/A	1-162	/	/	Pathogenicity
PF3D7_1127900	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	43-128	/	1 RVxF	Unknown function
PF3D7_1141400	phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit H, putative (PIGH)	No	TDO/A	1-182	/	1 RVxF	Metabolism
PF3D7_1149000	antigen 332, DBL-like protein (Pf332)	No	TDO/A	5670-5836	KIIW (5710-5713)		Pathogenicity
PF3D7_1206800	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A	570-725	/	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function

Out of frame genes

PF3D7_1210600	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A	572-675	/	1 RVxF	Unknown function
PF3D7_1211200	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	941-1062	KVKF (1015-1018) KRINF (1023-1027) KYIEF (1041-1045)	1 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1214100	GPI ethanolamine phosphate transferase 3, putative (PIGO)	No	TDO/A	74-320	/	2 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK]	Metabolism
PF3D7_1222300	endoplasmin, putative (GRP94)	No	TDO/A	384-485	/	1 RVxF	Protein folding
PF3D7_1224000	GTP cyclohydrolase I (GCH1)	No	TDO/A	31-165	/	/	Metabolism
PF3D7_1227000	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A (2)	1-163	/	/	Unknown function
PF3D7_1227700	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	190-453	/	/	Unknown function
PF3D7_1229400	macrophage migration inhibitory factor (MIF)	No	QDO/A TDO/A	1-116	/	/	Pathogenicity
PF3D7_1231600	pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP2, putative (PRP2)	No	TDO/A	394-643	/	1 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	RNA metabolism
PF3D7_1234600	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1-197	/	1 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1234900	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1-151	/	/	Unknown function
PF3D7_1240600	erythrocyte membrane protein 1, PfEMP1 (VAR)	No	TDO/A	876-1191	/	2 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK]	Pathogenicity
PF3D7_1249800	THO complex subunit 2, putative (THO2)	No	TDO/A	1829-2039	/	2 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	Transcription
PF3D7_1306400	26S protease regulatory subunit 10B, putative (RPT4)	No	TDO/A	237-382	/	/	Proteolysis
PF3D7_1308400	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A	1800-1941	RRVLF (1906-1910)	10 RVxF 6 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1308800	tyrosine recombinase (INT)	No	QDO/A TDO/A	1-158	KYIKF (42-46)	2 RVxF	DNA maintenance
PF3D7_1316100	inositol polyphosphate kinase, putative (IPK2)	No	TDO/A	693-835	/	2 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	Kinase
PF3D7_1324800	dihydrofolate synthase/folylpolyglutamate synthase (DHFS-FPGS)	No	QDO/A	1-80	/	1 Fxx[RK]x[RK]	Metabolism
PF3D7_1326600	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A (2)	3322-3615	/	4 RVxF 8 Fxx[RK]x[RK] 2 SILK	Unknown function
PF3D7_1336600	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1-91	/	/	Unknown function
PF3D7_1342300	tetratricopeptide repeat family protein, putative	No	TDO/A	26-262	/	/	Unknown function
PF3D7_1342900	transcription factor with AP2 domain(s) (ApiAP2)	No	TDO/A	577-714	/	4 RVxF 3 Fxx[RK]x[RK]	Transcription
PF3D7_1346400	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1918-2270	FIGKIK (1982-1987)	4 RVxF 5 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1348400	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	No	TDO/A	1514-1777	FINKEK (1597-1602)	5 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1351200	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1342-1597	KYVNW (1469-1473)	2 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_1356900	protein kinase 5 (PK5)	No	TDO/A	1-33	/	1 SILK	Kinase
PF3D7_1357400	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A	281-513	FYEKRK (359-364) KSIRF (444-448)	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1360700	E3 SUMO-protein ligase PIAS, putative (PIAS)	No	QDO/A	1-234	KKVLW (209-213)	3 Fxx[RK]x[RK]	Other
PF3D7_1361200	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	712-870	/	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1366400	rhoptry protein (Rhop148)	No	TDO/A	73-295	KILF (149-152) FDKKKK (189-194)	/	Unknown function
PF3D7_1417600	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	2128-2373	/	2 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1423700	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	1038-1147	/	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1444300	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative (LPAAT)	No	TDO/A	1-258	/	/	Metabolism
PF3D7_1456500	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	QDO/A (2)	1740-2056	FLNKIK (1759-1764) FHNKLK (1919-1924)	1 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1457000	signal peptide peptidase (SPP)	No	QDO/A	323-412	/	/	Other
PF3D7_1460500	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	294-590	KVDF (313-316) KTVSF (380-384)	1 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1460700	60S ribosomal protein L27 (RPL27)	No	TDO/A	1-61	/	1 RVxF	Translation
PF3D7_1464500	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	No	TDO/A	2493-2706	SILK (2508-2511)	7 RVxF 6 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1465900	40S ribosomal protein S3, putative	No	TDO/A	75-221	/	/	Translation
PF3D7_1466300	26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative (RPN2)	No	TDO/A	775-979	FLSKEK (972-977)	2 RVxF 2 Fxx[RK]x[RK]	Proteolysis
PF3D7_1470800	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	44-186	FRSKSK (53-58)	1 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1471900	conserved Plasmodium protein, unknown function	No	TDO/A	3-217	KIIEF (10-14)	5 RVxF 1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function

[a] Annotations available on PlasmoDB database (v24).

[b] Selection medium used for the growth of isolated yeast clones were indicated. Numbers indicate the count of isolated clones.
TDO/A=Triple dropout supplemented with Aureobasidin A. QDO/A=Quadruple dropout supplemented with Aureobasidin A.

[c] Sequence of binding motifs in the detected fragment were indicated. Motifs were examined as shown below [d].

[d] 3 different binding motifs with PP1 were scanned :
RVxF=[RK]x_{0-1}[VI]{P}[FW]
Fxx[RK]x[RK]
SILK=[GS]IL[RK]

[e] Biological functions were based on confirmed or putative functions indicated on PlasmoDB.

[f] Shared proteins isolated by affinity purification and Y2H screening.

Table S4. Pips identified by genome *in silico* analysis.

PlasmoDB Accession number[a]	Name[a]	RVxF[ext] motifs (Position a.a.)[b]	Additional Motifs on full length[c]	Biological function[d]
PF3D7_0204600	conserved Plasmodium protein, unknown function	RKSVRW (1180-1185)	/	Unknown function
PF3D7_0214400	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVTF (3-8)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0220000[e]	liver stage antigen 3 (LSA3)	KKKVRF (1282-1287)	3 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0304300	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVTF (372-377)	3 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0305500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRNVSF (3283-3288) KRSVHF (3700-3705)	2 Fxx[RK]x[RK] 2 SILK	Unknown function
PF3D7_0323300	conserved protein, unknown function	KKSVSF (139-144)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0404700	dipeptidyl aminopeptidase 3 (DPAP3)	RKNVTF (261-266)	3 Fxx[RK]x[RK]	Proteolysis
PF3D7_0407300	transcription factor, putative	KKKVHF (97-102)	1 Fxx[RK]x[RK]	Transcription
PF3D7_0407700[e]	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVSW (465-470)	1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0416900	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRNVHF (1889-1894)	2 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0503000	50S ribosomal protein L28, apicoplast, putative	RKNVRF (57-62)	/	Translation
PF3D7_0513600	deoxyribodipyrimidine photo-lyase, putative	KKQVSF (199-204)	/	DNA maintenance
PF3D7_0526500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKCVHF (573-578)	3 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0526600	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVTF (4498-4503)	7 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0610100[e]	pre-mRNA-splicing factor SLU7, putative (SLU7)	KKKVNF (110-115)	/	RNA metabolism
PF3D7_0628100	HECT-domain (ubiquitin-transferase), putative	RKSVKF (5331-5336) KKSVTF (9843-9848)	6 Fxx[RK]x[RK] 2 SILK	Proteolysis
PF3D7_0713900	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVNF (959-964)	4 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0717800	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRSVSW (2408-2413)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0723800	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKSVQF (461-466)	4 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0727500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKCVSF (139-144)	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0804500	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	KKNVHF (1741-1746)	7 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0913600	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKMVHF (348-353)	1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_0917500	conserved Plasmodium protein, unknown function	RKAVQF (360-365)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_0919900[e]	regulator of chromosome condensation, putative	KKSVSF (979-984)	/	DNA maintenance
PF3D7_0922800	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVCF (3253-3258)	6 Fxx[RK]x[RK] 2 SILK	Unknown function
PF3D7_0930100	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKTVHF (1051-1056)	/	Unknown function
PF3D7_1002900	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRNVNF (83-88)	/	Unknown function
PF3D7_1003700	conserved Plasmodium protein, unknown function	KRKVKF (593-598)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1008100[e]	conserved Plasmodium protein, unknown function	RKSVSF (836-841)	3 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1020600	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	KKKVNW (76-81)	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1022200	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	KKVVRF (559-564)	/	Unknown function
PF3D7_1029400	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVSF (58-63)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1031600[e]	conserved Plasmodium protein, unknown function (GEXP15)	KKKVQF (37-42)	/	Unknown function
PF3D7_1106800	protein kinase, putative	KKKVSF (481-486)	1 Fxx[RK]x[RK]	Kinase
PF3D7_1107700	pescadillo-like protein (PES)	KKKVTW (201-206)	/	Translation
PF3D7_1109100	conserved Plasmodium protein, unknown function	RRKVSF (550-555)	1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_1113700	glyoxalase I (GloI)	KKNVKF (132-137)	/	Metabolism
PF3D7_1128000.1	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVTF (152-157)	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1139700	adrenodoxin reductase, putative	RKKVHF (457-462)	2 Fxx[RK]x[RK]	Metabolism
PF3D7_1200100	erythrocyte membrane protein 1, PfEMP1 (VAR)	RKTVRF (93-98)	2 Fxx[RK]x[RK]	Pathogenicity
PF3D7_1202600[e]	conserved protein, unknown function	KKNVTF (1274-1279) KKQVTF (1399-1404) KRTVSF (1415-1420) KKSVSF (1506-1511) KKTVSF (1657-1662) KKSVSF (1777-1782) KKNVSF (1917-1922)	4 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	Unknown function
PF3D7_1220100	pre-mRNA splicing factor, putative	KKMVNF (577-582)	/	RNA metabolism
PF3D7_1234700	CPW-WPC family protein	KKSVSF (37-42)	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1238500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKKVHF (1391-1396)	1 SILK	Unknown function
PF3D7_1244200	transcription factor Tfb2, putative	RKSVHF (365-370)	/	Transcription
PF3D7_1244500	conserved Plasmodium protein, unknown function	RRKVNF (347-352)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function

PF3D7_1322100	variant-silencing SET protein (SETvs)	KRNVSF (1517-1522)	3 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	DNA maintenance
PF3D7_1364300	pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (PRP16)	RKMVQF (941-946)	1 Fxx[RK]x[RK] 1 SILK	RNA metabolism
PF3D7_1366300	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKVVKF (3301-3306) KKKVQF (3740-3745)	3 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1367500	NADH-cytochrome b5 reductase, putative	KKHVHF (157-162)	1 SILK	Metabolism
PF3D7_1406200	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKMVSF (552-557)	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1411500	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKQVSF (45-50) KKKVSF (325-330)	2 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1413000	conserved Plasmodium protein, unknown function	KKNVQF (344-349)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function
PF3D7_1417300	cysteine protease ATG4, putative (ATG4)	KKKVRF (861-866)	2 Fxx[RK]x[RK]	Proteolysis
PF3D7_1460500[e]	conserved Plasmodium protein, unknown function	RKTVSF (379-384)	1 Fxx[RK]x[RK]	Unknown function

[a] Annotations available on PlasmoDB database (v24).

[b] The RVxF^{ext} binding motifs corresponding to the [KR][KR][ACHKMNQRSTV]V[CHKNQRST][FW] consensus sequence were indicated.

[c] 2 different binding motifs with PP1 were scanned :

Fxx[RK]x[RK]

SILK=[GS]IL[RK]

[d] Biological functions were based on confirmed or putative functions indicated on PlasmoDB.

[e] Shared proteins isolated by Y2H and *in silico* screenings.

Table S5. Recombinant proteins produced

	PlasmoDB Accession number	Name	Fragment produced (a.a.)	Recombinant proteins purification	In frame with GAL4AD	Motifs RVxF or RVxF^{ext} and Fxx[RK]x[RK] (Position a.a.)
Affinity MS-MS	PF3D7_0608800	ornithine aminotransferase (OAT)	4-403	-		KTVKF (405-409)
	PF3D7_0708400	heat shock protein 90 (HSP90)	301-470	+		FENRKK (371-376)
	PF3D7_0818900	heat shock protein 70 (HSP70)	389-585	+		RLVNF (248-252) FKRKNR (257-262)
	PF3D7_0827900	protein disulfide isomerase (PDI8)	61-478	+		FNKKNK (112-117)
	PF3D7_1343000	phosphoethanolamine N-methyltransferase (PMT)	3-264	+		KIIF (103-106)
	PF3D7_1462800	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	2-337	+		KLVSW (312-316)
Y2H screening	mal_mito_2	cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	63-308	-	No	
	PF3D7_0107600	serine/threonine protein kinase, putative	1107-1401	-	Yes	
	PF3D7_0207500	serine repeat antigen 6 (SERA6)	1-183	-	No	
	PF3D7_0220000	liver stage antigen 3 (LSA3)	1189-1293	+	Yes	KKVRF (1283-1287) FDIKDK (1287-1292)
	PF3D7_0418300	conserved Plasmodium protein, unknown function	72-201	-	Yes	
	PF3D7_0520800	conserved Plasmodium protein, unknown function	885-1121	-	Yes	
	PF3D7_0520900	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHH)	236-479	+	Yes	
	PF3D7_0623100	nuclear polyadenylated RNA-binding protein NAB2, putative	42-262	-	Yes	FRLRDK (206-211)
	PF3D7_0718100	exported serine/threonine protein kinase (EST)	1202-1434	+	Yes	
	PF3D7_0720700	phosphoinositide-binding protein, putative	569-961	+	Yes	FVRRIR (887-892) KIKF (921-924)
	PF3D7_0724600	protein kinase, putative	1-118	-	Yes	
	PF3D7_0814000	60S ribosomal protein L13-2, putative	1-195	-	No	RVNF (22-25)
	PF3D7_0816600	ClpB protein, putative (ClpB1)	875-1070	+	Yes	
	PF3D7_0917900	heat shock protein 70 (HSP70-2)	354-582	+	Yes	
	PF3D7_0919900	regulator of chromosome condensation, putative	920-1108	+	Yes	KSVSF (980-984)
	PF3D7_1008000	histone deacetylase 2 (HDA2)	835-1055	+	Yes	
	PF3D7_1023400	HORMA domain protein, putative	8-195	-	No	FEKKRK (28-33)
	PF3D7_1031600	conserved Plasmodium protein, unknown function (GEXP15)	8-182	+	Yes	KKVQF (38-42)
	PF3D7_1130700	structural maintenance of chromosome protein, putative	281-481	+	Yes	FLRKNR (410-415)
	PF3D7_1202600	conserved protein, unknown function	1395-1708	+	Yes	KQVTF (1400-1404) RTVSF (1416-1420) KKVTF (1492-1496) KSVSF (1507-1511) KKVTF (1569-1573) KTVSF (1658-1662) FGDKGK (1487-1492)
	PF3D7_1205500	zinc finger protein, putative	712-936	+	Yes	
	PF3D7_1227000	conserved Plasmodium protein, unknown function	1-163	+	No	
	PF3D7_1228600	merozoite surface protein 9 (MSP9)	124-434	-	Yes	
	PF3D7_1229400	macrophage migration inhibitory factor (MIF)	1-116	+	No	
	PF3D7_1303800	conserved Plasmodium protein, unknown function	9123-9270	+	Yes	
	PF3D7_1308400	conserved Plasmodium protein, unknown function	1800-1941	-	No	RRVLF (1906-1910)
	PF3D7_1325800	conserved Plasmodium protein, unknown function	818-1070	-	Yes	
	PF3D7_1346100	protein transport protein SEC61 subunit alpha (SEC61)	198-467	-	Yes	KGIEF (205-209)
	PF3D7_1358200	conserved Plasmodium protein, unknown function	856-1057	-	Yes	
	PF3D7_1456500	conserved Plasmodium protein, unknown function	1740-2039	-	No	FLNKIK (1759-1764) FHNKLK (1919-1924)

In silico screning	PF3D7_0304300	conserved Plasmodium protein, unknown function	296-479	-	KKKVTF (372-377)
	PF3D7_0305500	conserved Plasmodium protein, unknown function	3193-3358	-	KRNVSF (3283-3288)
	PF3D7_0305500	conserved Plasmodium protein, unknown function	3601-3784	+	KRSVHF (3700-3705)
	PF3D7_0323300	conserved protein, unknown function	2-184	-	KKSVSF (139-144)
	PF3D7_0404700	dipeptidyl aminopeptidase 3 (DPAP3)	182-356	-	RKNVTF (261-266)
	PF3D7_0407300	transcription factor, putative	13-188	+	KKKVHF (97-102)
	PF3D7_0416900	conserved Plasmodium protein, unknown function	1776-1951	-	KRNVHF (1889-1894)
	PF3D7_0526500	conserved Plasmodium protein, unknown function	462-670	-	KKCVHF (573-578)
	PF3D7_0610100	pre-mRNA-splicing factor SLU7, putative (SLU7)	59-229	+	KKKVNF (110-115)
	PF3D7_0628100	HECT-domain (ubiquitin-transferase), putative	5231-5409	-	RKSVKF (5331-5336)
	PF3D7_0628100	HECT-domain (ubiquitin-transferase), putative	9739-9925	+	KKSVTF (9843-9848)
	PF3D7_0723800	conserved Plasmodium protein, unknown function	362-531	+	KKSVQF (461-466)
	PF3D7_0727500	conserved Plasmodium protein, unknown function	47-191	+	KKCVSF (139-144)
	PF3D7_0804500	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	1647-1837	-	KKNVHF (1741-1746)
	PF3D7_0913600	conserved Plasmodium protein, unknown function	257-418	-	KKMVHF (348-353)
	PF3D7_0917500	conserved Plasmodium protein, unknown function	242-476	+	RKAVQF (360-365)
	PF3D7_0930100	conserved Plasmodium protein, unknown function	935-1150	+	KKTVHF (1051-1056)
	PF3D7_1003700	conserved Plasmodium protein, unknown function	482-694	+	KRKVKF (593-598)
	PF3D7_1008100	conserved Plasmodium protein, unknown function	741-931	+	RKSVSF (836-841)
	PF3D7_1029400	conserved Plasmodium protein, unknown function	3-191	+	KKNVSF (58-63)
	PF3D7_1106800	protein kinase, putative	423-616	+	KKKVSF (481-486)
	PF3D7_1107700	pescadillo-like protein (PES)	121-290	-	KKKVTW (201-206)
	PF3D7_1109100	conserved Plasmodium protein, unknown function	442-646	+	RRKVSF (550-555)
	PF3D7_1113700	glyoxalase I (GloI)	46-239	-	KKNVKF (132-137)
	PF3D7_1200100	erythrocyte membrane protein 1, PfEMP1 (VAR)	7-214	+	RKTVRF (93-98)
	PF3D7_1220100	pre-mRNA splicing factor, putative	424-617	-	KKMVNF (577-582)
	PF3D7_1244200	transcription factor Tfb2, putative	321-495	-	RKSVHF (365-370)
	PF3D7_1322100	variant-silencing SET protein (SETvs)	1445-1639	+	KRNVSF (1517-1522)
	PF3D7_1364300	pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (PRP16)	830-1025	-	RKMVQF (941-946)
	PF3D7_1366300	conserved Plasmodium protein, unknown function	3644-3807	+	KKKVQF (3740-3745)
	PF3D7_1367500	NADH-cytochrome b5 reductase, putative	61-237	+	KKHVHF (157-162)
	PF3D7_1460500	conserved Plasmodium protein, unknown function	266-473	-	RKTVSF (379-384)

RVxF mutagenesis	PF3D7_0220000	liver stage antigen 3 (LSA3)	1189-1284	+
	PF3D7_0919900	regulator of chromosome condensation, putative	920-1108	+

Table S6. List of primers for recombinant proteins expression.

	Accession number	Primer Orientation	Sequence	Plasmid	Restriction enzyme sites
Affinity	PF3D7_0608800	F	CATCACCACAGCCAGGATCCCGTTAAAGAATTAAAAAGTAGTC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCAATAATTTCAGTACATTCATC		
	PF3D7_0708400	F	CATCACCACAGCCAGGATCCCACAGTTGAACATGAATGG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCCTCGTGGATACCCAAC		
	PF3D7_0818900	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCACAAGCAGCCATTTTATCTG	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCTTTCATACATGTTTCAATTTCAG		
	PF3D7_0827900	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGGTCATTGTAAAAGGCTAATC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGCCGTCTTCAAATTCAGG		
	PF3D7_1343000	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGCTTTGATTGAAAACTTAAACTC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGGTGGCCTTAAAATAACC		
	PF3D7_1462800	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGCAGTAACAAAACTTGG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTTGTTAGTAATGTGTAC		
Y2H screening	mal_mito_2	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCACTATATAATATGATATTTACAATT	pETDuet-1	EcoRI-Not
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCAGTATCAACTTCTAAACCAGTA		
	PF3D7_0107600	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGGGTTAATGTATTATTTCAC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTATAATCATATGATGCTAAC		
	PF3D7_0207500	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAATGATATGTCCTATTTTTTTCC	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCCCATTATAATTTTTTAAAAGTCC		
	PF3D7_0220000	F	CATCACCACAGCCAGGATCCAGGTTTGGAAGAAGATGATTTAGAAGAAG	pETDuet-1	BamHI-HindIII
		R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTGGTTCCTTATCCTTAATATCAAACC		
	PF3D7_0418300	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGGATCTGGTGGACCCTG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCCCCTTGTTCATAATCC		
	PF3D7_0520800	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAGAATATGATTTGACATTTGTGC	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCTATGGTTTCACTATCACTATTTC		
	PF3D7_0520900	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAGTGTATGGATGTAGACATTC	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTATCTGTATTCGTTACTC		
	PF3D7_0623100	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAAACGCTAAAAGTAGCAATG	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGCTATCACTAATTCTTTTATATGTT		
	PF3D7_0718100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGAAAATAGGAGAACAAATTGC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTTTCTTTTGTTATCTCTTC		
	PF3D7_0720700	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATGATGAATACGATAATGG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTTAATTATAATGTTACTATCC		
	PF3D7_0724600	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAATGTATGTTTATAACAAACAAAATA	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCTAATATTTTAATATTATTCAAATTATAG		
	PF3D7_0814000	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGAAAAAAAAAAAAAAGAAGATTGTTGA	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCAGCCAATTTAGCTCTACGTAA		
	PF3D7_0816600	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAGATGCAGTACGTAAAAAACCAT	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCACTTTTTGAAAAGTGCAACTTC		
	PF3D7_0917900	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATGAAATTGTTTTAGTAGGAG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGATTTTATCAGCTAATTTATCTTTA		
	PF3D7_0919900	F	ACCATCACCATCACGGATCCACAAATAACGAATATGAAGATGAAGAAAG	pQE30	BamHI-HindIII
		R	AAGCTCAGCTAATTAAGCTTAGTTCTTCCTTTAAAGTGTTATTTTTATTC		
	PF3D7_1008000	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAGATTCTGCTATATCTAATAAATTAAG	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCATCAAATCGATGTATGGAGAAACAA		
	PF3D7_1023400	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCATTTATTGAGGCTTTTACTCATC	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCGTGACATTTTTTGGACTTTC		
	PF3D7_1031600	F	CATCACCACAGCCAGGATCCAGGGGAGGAAAATGACTTGGATAAATTC	pETDuet-1	BamHI-HindIII
		R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTGTTAATTCCATTCAATATGGTATTTTTAT		
	PF3D7_1130700	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAGGTCTTTATAAAGAAAATGATTTG	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCTTTTTTCTTTTCATTTAAATAATTC		
	PF3D7_1202600	F	CATCACCACAGCCAGGATCCAGATCTAGATGATGAAAAGAAGAAACAGGTAAC	pETDuet-1	BamHI-HindIII
		R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTCTCGAGTTCTTGCTCAACCTCCTTTAATAATTTAC		
	PF3D7_1205500	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAGTAGTAGATTGTGGTTCTAC	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTTTGTATTATGCAATGATATGG		
	PF3D7_1227000	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAATGATGGAACTTGAAGAACAAC	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCAACATTGTCGTCTTTTTTTTTTAG		
	PF3D7_1228600	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGCTCATAAGAAATTAATTAAAGC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGATACCCATATCTAGAATAC		
	PF3D7_1229400	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAATGCCTTGCTGTGAAGTAATA	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGCCGAAAAGAGAACCACTG		
	PF3D7_1303800	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGGAATTAACAAATTGATTGAC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCCATGGAAACCATGTTC		
	PF3D7_1308400	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCATTTATTTTGTACAAATATAAATAT	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCTATTATATTATCTATATTATACTTT		
	PF3D7_1325800	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATGTACTTGAAAAAATGC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCAATAGTGTAGACCTC		
	PF3D7_1346100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGGTCCTACAACAATAAATAC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGCTTTTTCTTGTTCTTTTAC		
	PF3D7_1358200	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGTGTATTATATATACATGTGG	pETDuet-1	BamHI-NotI

		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCATATGAATAGGAAACCATAC		
	PF3D7_1456500	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAAGAAAATATACTTTTATATTCTAT	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCTATGTGAGATTGGTTAGCTA		
In silico	PF3D7_0304300	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATGGAATAATAAAAGATAGAC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGAAATTTTCCTTTTGTATGTAAAAG		
	PF3D7_0305500	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGACTTAAAGTTATATAGAGAG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCACGGATATATTATATACAC		
	PF3D7_0305500	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGAAAGAATATACTCACCAAAT	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCATCATATCATTATCATCTG		
	PF3D7_0323300	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCCTGTATGTTTTAGTACC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGAAATTCCCTTCATTTAGC		
	PF3D7_0404700	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCAGAAAGGTGATGTTTCATATAG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCTGAACAGGAATTTTGTTGG		
	PF3D7_0407300	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGTAAATAATGATGAAACGTTC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCATAAATAAATACATATAATCATC		
	PF3D7_0416900	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGAAATTATAACTACCCAATTAATTC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTTATAATTAAGAATATCTTCATTTG		
	PF3D7_0526500	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGCCATACGTATTATGAGAGAAG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTCTCCACATTTATTACCATC		
	PF3D7_0610100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCTGAAACATCAAAGGTATAAG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTTTTGGTTGTTCATAATATC		
	PF3D7_0628100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATGCTGTACAAAATGAATAC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCATTTCTTTTGTATTTGCACTG		
	PF3D7_0628100	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCGGACATAAAAAAGAAACTACAG	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCATATTTTCATTTTCGTGAGG		
	PF3D7_0723800	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATAGTATAAATTATAATGATAAG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCGATTTATCAAGATCTTCC		
	PF3D7_0727500	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGGATGTAAGTCAAAAATATATG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTTTGTTTTTCTAGATACCTTTAG		
	PF3D7_0804500	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCTTGTAAATATTCTTTTATATAATTC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCCTTACATCTTTTAATATCAAC		
	PF3D7_0913600	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCATAAGCATTTAATATATATTAACG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCTGTGTACGTAATTTATTTTG		
	PF3D7_0917500	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATCATAAAAAGAAAGCACATG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCTTTTCATTAGATTCATTTGTTG		
	PF3D7_0930100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGAAGCTCAGTCATTTCTTG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGATATCTATATTTATAGTTTCG		
	PF3D7_1003700	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCATATTAAGGATATTTATGC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCAATTCATATATATCCTTTTC		
	PF3D7_1008100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATAAATATAAAAGAAGCACAAGAAG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCATCTTTTCTATGCTTTTTTTAATTTTC		
	PF3D7_1029400	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATAATAAATGTGAAGAAAATG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCTTCATATCTTTTGGTATATTTA		
	PF3D7_1106800	F	CACAGCCAGGATCCGAATTCAGAAACAAAAAAATTCAACAACATGG	pETDuet-1	EcoRI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCACAAGAGGATGAAATGGGAAAGTTGTC		
	PF3D7_1107700	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCATATAATAAAAGAACGATATCC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGCTTTGTAGTTCTTGATTCATG		
	PF3D7_1109100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATATATGTAACAATGTACATG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGTAACTAATTTTGATAGGTTC		
	PF3D7_1113700	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCATTTTAATGAGTATAACTTTTCTC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCTTATTTGATTGATCTTCTATC		
	PF3D7_1200100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGTGACTGACTATAGTAAAGC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCTTTTCTAATTTATCATTTTCTC		
	PF3D7_1220100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCCAGATGATACAAATACATTC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCCATAATTTAATTGTTCCATCC		
	PF3D7_1244200	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGATAAAGCAAATTCTCATCTAC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCGAAAAAGCTTCTCTACTC		
	PF3D7_1322100	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCTTAATATAAAAGAATGTACTG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCTCTTGTAACGATAATAATC		
	PF3D7_1364300	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGCAAACTATTGGTATGGATGTATTAC	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGCACCAACTATATGAATAATTATG		
	PF3D7_1366300	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGGATATGAATCACATCAACATTTAG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCGATATCTGCTTTGTCCTCAAC		
	PF3D7_1367500	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGAAGAATTAGACACAAAAGAAAAAAG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCAAACGAAAGAAAGGAGTCATTC		
	PF3D7_1460500	F	CATCACCACAGCCAGGATCCGGGTGGTATATATGATCATAATAATG	pETDuet-1	BamHI-NotI
		R	ACTTAAGCATTATGCGGCCGCCGGATTCACTGCAACTTTACTC		
RVxF mutagenesis	PF3D7_0220000	F	CATCACCACAGCCAGGATCCAGGTTTGGAAGAAGATGATTTAGAAGAAG	pETDuet-1	BamHI-HindIII
		R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTATCCTTAATATCAAACCTTACTTACTT		

PF3D7_0919900	F	GTATAAAAAAAAGTGCGTCCGCTTTTAAG	pQE30	BamHI-HindIII
	R	CTTAAAAGCGGACGCACTTTTTTTTATAC		

Annexes II

Tableau S7. Liste des amorces pour la caractérisation de GEXP15

Nom	Amorce 5′ - 3′	Orientation	Protéine tagguée/Région amplifiée	Vecteur	Utilisation
P1	GGAGGCCAGTGAATTCGAACAAAGTGTTGAAG	F	Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-629}$	pGADT7	Double hybride chez la levure
P2	CGAGCTCGATGGATCCGGCCATAACTTTCAAAATC	R			
P3	CGAGCTCGATGGATCCGATCATTAATTTCAAAAGAAC	R	Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-178}$	pGADT7	Double hybride chez la levure
P4	GGAGGCCAGTGAATTCCAGCAATTAGAGGAAG	F	Gal4-AD-PbGEXP15 $_{446-596}$	pGADT7	Double hybride chez la levure
P5	CGAGCTCGATGGATCCGGTTAAGATAATTCACTGTATCG	R			
P6	CATCACCACAGCCAGGATCCAGGGGAGGAAAATGACTTGGATAAATTC	F	6His-PfGEXP15 $_{8-182}$	pETDuet-1	Protéine recombinante
P7	CATTATGCGGCCGCAAGCTTGTTAATTCCATTCAATATGGTATTTTTAT	R			
P8	ACCACAGCCAGGATCCGGAACAAAGTGTTGAAG	F	6His-PbGEXP15 $_{4-590}$	pETDuet-1	Protéine recombinante
P9	ATGCGGCCGCAAGCTTGCCATAACTTTCAAAATC	R			
P10	ATGCGGCCGCAAGCTTATCATTAATTTCAAAAGAAC	R	6His-PbGEXP15 $_{4-178}$	pETDuet-1	Protéine recombinante
P11	CGAAAAAAAAAAAAAAAGGCTCAAGCTTCCGAAAAAAATGAAACG	F	Gal4-AD-PbGEXP15 $_{4-178\ KKKKKAQA}$	pGADT7	Mutagenèse dirigée
P12	CGTTTCATTTTTTTCGGAAGCTTGAGCCTTTTTTTTTTTTTTCG	R	6His-PbGEXP15 $_{4-178\ KKKKKAQA}$	pETDuet-1	
P13	GTGGAGGATGGATATGAAGCTGCTGCAAAGCGCCAATTA	F	Gal4-DBD-PfPP1c F255A/F256A	pGBKT7	Mutagenèse dirigée
P14	TAATTGGCGCTTTGCAGCAGCTTCATATCCATCCTCCAC	R			
P. falciparum					
P15	CATATTTATTAAACTGCAGCATATATACATAAAAAAATGCTGAATG	F	PfGEXP15	pCAM-KO	Knock-out
P16	GCTCTAGAACTAGTGGATCCGTTCGTTATTATATATAGAATGGTC	R			
P17	CATATTTATTAAACTGCAGGTACATAATGAGAGGTTAGAAG	F		pCAM-GFP	Knock-in
P18	CTTCTCCTTTACTGGATCCATTCTCGTCATCGTTATCATTCTC	R			
P19	GTAATTTATGGGATAGCGATTTTTTTTACTGTCTG	F		pCAM-KO	Génotypage
P20	CCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAG	R		pCAM-GFP	
P21	CATCACCACAGCCAGGATCCGGAGCAGAAGAATTACAATC	F			
P22	CTTTTCTCCATAGGGAAAAGAAG	F			
P. berghei					
P23	CAAAAAAAGCGCAGATCTGGAGCTTATTAATATGCACGC	F	UTR 5′ PbGEXP15	pPRFp-TRAD4	Knock-down conditionnel
P24	CATTTTAAGCTTCCGCGGCGTACATAGCTATATATATACGC	R			
P25	CGTGCCCGATTATGCCGGCGAATGAACAAAGTGTTGAAGTCG	F	PbGEXP15		
P26	CAAAATTTTAACGCTAGCCTTCCACTTTGTTATTTTTAGAATC	R			
P27	GCATTATTATGTGTGTAATTTCTCTCG	F	5′ UTR PbGEXP15		Génotypage
P28	CTTTGCTCTTGTCCAGGCGCGAC	R			
P29	CTGCAGCAAAATGTCAGGTTACCCCTATGACGTGC	F	PbGEXP15		
P30	GAGATTCTTGTACTCTTGCTTCCTC	R			
P31	AAAGCTGGGTACCGGGCCCGCCGATTAAACCATATTATTATAC	F	5′ UTR PbGEXP15	pBS-DHFR	Knock-out
P32	CCTGCAGGCATGCAAGCTTGACTTCAACACTTTGTTCATTC	R			
P33	CAATTTCGATATCGAATTCGAAGATGATTTTGAAAGTTATG	F	3′ UTR PbGEXP15		
P34	CGGTGGCGGCCGCTCTAGACAGAAAGATATGTCTTGTTC	R			
P35	GCAATTCAACCTTTGGGTTATTC	F	5′ UTR PbGEXP15	pBS-DHFR	Génotypage
P36	GATGTGTTATGTGATTAATTCATACAC	R			
P37	CAATGATTCATAAATAGTTGGACTTG	F	3′ UTR PbGEXP15		
P38	GTAACAACTAATTCAAATGGATAGTAAG	R			
P39	CTCCACCGCGGTGGCGGCCGCGAAGGATATATAGATAAAGATGGG	F	PbGEXP15-mCHERRY	pL1886	Knock-in
P40	TTCCACCTCCACCGGATCCAATGCCATAACTTTCAAAATCATCTTC	R			
P41	GAAAAGGAAAAAGAAGATAAGGCGAATGCGGAAAAGGAAAAAG	F			Mutagenèse dirigée
P42	CTTTTTCCTTTTCCGCATTCGCCTTATCTTCTTTTTCCTTTTC	R			
P43	CTCGCCCTCGATCTCGAACTC	R			Génotypage
P44	GAATTGGAGCTCCACCGCGGGAAGGATATATAGATAAAGATGGG	F	PbGEXP15-AID-HA	pG362	Knock-down conditionnel
P45	CCATCATTCTAGTCTCGAGAATGCCATAACTTTCAAAATCATCTTC	R			
P46	GAAAAGGAAAAAGAAGAAGCTTCCGGAGATACGATTCAGAATG	F			Mutagenèse dirigée
P47	CATTCTGAATCGTATCTCCGGAAGCTTCTTCTTTTTCCTTTTC	R			
P48	CCGTCTCTGAGAACCCTCTC	R			Génotypage
P49	ACAAAAAAAGCGCAGATCTGTCAATTGGGATATATCATATTGAC	F	5′ UTR PbPP1	pPRFp-TRAD4	Immunoprécipitation
P50	ACATTTTAAGCTTCCGCGGGAAAAGGGTAATGAGTTATGAACATA	R			
P51	CGTGCCCGATTATGCCGGCATGGCATTAGAAATAGATATAGATAATG	F	PbPP1		
P52	CCAAAATTTTAACGCTAGCATTTTCCCCCCATCCATTTATTTCCTTTTC	R			
P53	GATGTTCTTTTTTTTGACACATGC	F	5′ UTR PbPP1		Génotypage
P54	CCATCCTCAACAACTTGGTG	R	PbPP1		

Table des matières

Résumé **v**

Sommaire **xi**

Liste des figures **xiii**

Liste des tableaux **xv**

Abréviations **xvii**

Introduction **3**

A Le paludisme . . . 3
- I Le paludisme : de Toutânkhamon à Ronald Ross . . . 3
- II *Plasmodium* : un parasite apicomplexe . . . 4
  - 1 Généralités des *Apicomplexa* . . . 5
  - 2 Phylogénie de *Plasmodium* . . . 7
- III Le paludisme : un enjeu majeur de santé publique . . . 8
  - 1 Des chiffres élevés mais des chiffres en baisse . . . 8
  - 2 Impact financier . . . 9
  - 3 Les objectifs 2030 . . . 9
- IV Une once de prévention vaut une livre de guérison . . . 10
  - 1 Éviter la piqûre . . . 10
  - 2 Chimioprophylaxie . . . 11
  - 3 Vaccins . . . 12
- V Symptômes . . . 13
  - 1 Accès palustres simples . . . 13
  - 2 Accès palustres graves . . . 14
- VI Diagnostic . . . 14
  - 1 Par microscopie . . . 14
  - 2 Par réaction en chaîne par polymérase (PCR) . . . 15
  - 3 Par tests de diagnostic rapide . . . 15
- VII Traitements et résistances . . . 15
  - 1 Historique des antipaludiques naturels . . . 15

2 Molécules antipaludiques actuelles 16
3 Traitements actuels 18
4 Résistance aux antipaludiques 18
B *Plasmodium falciparum* 21
I Génome et protéome de *P. falciparum* 21
1 Génome 21
2 Protéome 22
II Description générale du cycle de vie de *P. falciparum* 22
III De l'anophèle à l'Homme 23
1 Les anophèles 23
2 L'infection 25
IV Phase hépatique 26
1 Accès aux hépatocytes 26
2 Infection non productive et productive 26
V Cycle érythrocytaire 29
1 L'invasion des érythrocytes 29
2 Les stades précoces érythrocytaires 30
3 Schizogonie 32
VI Gamétogenèse 33
VII De l'Homme à l'anophèle 35
VIII Régulation du cycle de vie de *Plasmodium falciparum* 36
1 Régulation transcriptionnelle 36
2 Régulation post-transcriptionnelle 37
3 Régulation post-traductionnelle 38
C PP1c et ses régulateurs 40
I Le kinome et le phosphatome de *P. falciparum* 40
1 Le kinome 40
2 Le phosphatome 42
II La Protéine Phosphatase de Type I : sous-unité catalytique ou PP1c 44
1 La PP1c chez les eucaryotes 44
2 La PP1c et sa structure 46
III La Protéine Phosphatase de Type I : plateforme d'interaction 48
1 Les divers motifs d'interaction 48
2 Le motif principal d'interaction : RVxF 48
3 Des régulateurs désorganisés 49
IV La Protéine Phosphatase de Type I : régulateurs et rôles biologiques 50
1 Une diversité de régulateurs et de mécanismes 50
2 Les régulateurs dans la biogenèse de la PP1c 50
3 L'inhibiteur 2 52
4 L'inhibiteur 3 et SDS22 54
5 Les autres régulateurs du cycle cellulaire 56
6 Les régulateurs de la synthèse protéique 57
7 Les régulateurs dans d'autres fonctions biologiques 59
8 Les régulateurs chez *Plasmodium* 60

Cadre et objectifs **65**

Résultats **69**
A Interactome de la PfPP1c 69
B Caractérisation de GEXP15 70
I Gametocyte EXported Protein 15, analyse *in silico* et expression . . 70
1 GEXP15 : Analyse *in silico* 70
2 GEXP15 est surexprimée dans les jeunes gamétocytes . . . 73
II GEXP15 interagit avec la PfPP1c chez le modèle hétérologue de *S. cerevisiae* 74
III GEXP15 se lie directement à la PfPP1c via son motif RVxF 76
IV GEXP15 augmente l'activité phosphatase de la PfPP1c 77
V GEXP15 co-localise et interagit *in vivo* avec la PP1c chez *P. falciparum* et *P. berghei* 78
VI GEXP15 est une protéine parasitaire essentielle ? 81
1 Knock-out de GEXP15 chez *P. falciparum* et *P. berghei* . . 81
2 Systèmes inductibles chez *P. berghei* 83

Matériel et méthodes **89**

Discussion **97**
Interactome de la PfPP1c 97
Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de GEXP15 101

Bibliographie **111**

Annexes I **139**

Annexes II **173**

Table des matières **175**

Résumé

L'un des obstacles majeurs au développement de nouveaux antipaludiques est notre connaissance limitée de la biologie parasitaire et la rareté des cibles thérapeutiques potentielles identifiées. Les interactions protéines-protéines sont impliquées et essentielles dans divers processus biologiques incluant les modifications post-traductionnelles. Les interactions substrats-kinases ou phosphatases sont considérées comme une liaison transitoire et jouent un rôle central et essentiel dans le cycle cellulaire de *Plasmodium*. La Ser/Thr Protéine Phosphatase de Type 1 (PP1), l'une des phosphatases majeurs des eucaryotes, est essentielle à la survie du parasite *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme. Elle est régulée par diverses sous-unités régulatrices dont plus de 200 ont été identifiées chez l'Homme, mais seulement 4 chez *Plasmodium*.

Afin d'explorer le réseau de régulation de la *P. falciparum* PP1 (PfPP1), nous avons utilisé trois approches complémentaires pour caractériser l'interactome de la PfPP1. La purification par co-affinité suivie d'une analyse par spectrométrie de masse a identifié 6 protéines interagissant avec la PfPP1 dont 3 contenaient le motif consensus d'interaction RVxF, 2 autres le motif Fxx[RK]x[RK], également connu pour interagir avec la phosphatase et une protéine avec les deux motifs de liaison. Le criblage par double hybride chez la levure a identifié 134 protéines dont 30 présentent le motif RVxF et 20 ont le motif de liaison Fxx[RK]x[RK]. Le criblage *in silico* du génome de *P. falciparum* en utilisant une séquence consensus du motif RVxF a révélé 55 partenaires potentiels de la PfPP1. Afin de confirmer l'interaction de certaines protéines, 35 partenaires candidats ont été validés par un test d'interaction de type ELISA. Les résultats ont permis de détecter aussi bien des partenaires conservés de la PP1 qu'un nombre élevé d'interacteurs spécifiques à la PP1 du parasite et montrent une grande diversité dans les fonctions biologiques impliquant la PP1 chez *Plasmodium*.

Parmi ces candidats, un partenaire appelé Gametocyte EXported Protein 15 (GEXP15) a été sélectionné et caractérisé. Cette protéine est surexprimée chez les gamétocytes, stade responsable de la transmission du parasite chez le moustique et son interaction avec la PP1 a été confirmée par double hybride chez la levure et GST pull-down. L'utilisation d'un mutant a démontré que la formation du complexe était RVxF-dépendante. Le rôle de GEXP15, comme activateur de l'activité phosphatase de la PfPP1, a été montré *in vitro*. L'étude chez *P. berghei*, a permis de mettre en évidence la co-localisation des deux protéines et la présence du complexe chez le parasite. L'exploration de la fonction biologique de GEXP15 chez *P. falciparum* et *P. berghei* est en cours. Les résultats préliminaires, obtenus à partir de parasites mutants délétés pour GEXP15, indiqueraient que la protéine a une influence sur le cycle sanguin de *P. berghei*.

Plasmodium, PP1, interactome, GEXP15, motif RVxF