



HAL
open science

Etude du mode d'action de composés antipaludiques qui ciblent la fonction mitochondriale, en utilisant la levure comme modèle

Pierre Mounkoro

► To cite this version:

Pierre Mounkoro. Etude du mode d'action de composés antipaludiques qui ciblent la fonction mitochondriale, en utilisant la levure comme modèle. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL008 . tel-03410514

HAL Id: tel-03410514

<https://theses.hal.science/tel-03410514>

Submitted on 1 Nov 2021

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.

Etude du mode d'action de composés antipaludiques qui ciblent la fonction mitochondriale, en utilisant la levure comme modèle

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell
(I2BC) 91198, Gif-sur-Yvette, France.
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 30.10.2020, par

Pierre MOUNKORO

Composition du Jury

Georges SNOUNOU

DR, Université Paris-Saclay

Président

Claire REMACLE

PR, Université de Liège

Rapporteuse & Examinatrice

Gilles TRUAN

DR (HDR), Université de Toulouse

Rapporteur & Examineur

Marc BLONDEL

PR, Université de Brest

Examineur

Laurence VERNIS

CR, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Brigitte MEUNIER

CR, I2BC-CNRS

Directrice de thèse

Remerciements

A Dr. Brigitte MEUNIER,

Chargée de recherche à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC)

Merci

de m'avoir accepté au sein de l'équipe

de ton aide inconditionnelle

du sens de la rigueur professionnelle enseignée

de l'expérience scientifique et humaine partagées.

Merci, pour avoir été tout simplement toi-même !

A Mr. Thomas Michel

Assistant ingénieur à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC)

pour le travail collectif et ta contribution remarquable,

pour ton sens d'humanité et ta présence inconditionnelle,

merci pour tes valeurs amicales !

Aux membres du jury,

Mm Claire REMACLE

Professeure à l'Université de Liège, Belgique

Mr Gilles TRUAN

Directeur de recherche à Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering, France

Mr Marc BLONDEL

Professeur à l'Université de Brest, France

Mr Georges SNOUNOU

Directeur de recherche du Laboratory of Malaria Biology, France

Mme Laurence VERNIS

Chargée de recherche à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, France

merci pour l'honneur que vous me faites en évaluant ma thèse !

Aux membres du comité de thèse,

Mr. Jérôme CLAIN,

pour ta participation, ton soutien et les connaissances partagées

Mme. Marie-Pierre GOLINELLI,

pour le soutien technique et scientifique

merci pour le suivi de la thèse !

A toutes les personnes qui ont participé à ce projet de recherche,

Dr. Elisabeth DAVIOUD-CHARVET, pour votre compétence technique et scientifique

Dr. Stephanie BLANDIN, pour votre contribution scientifique

A tous les membres du consortium *Plasmoprim*,

merci pour tout !

A mes collègues du laboratoire,

Geneviève DUJARDIN, pour tes conseils pertinents, ton sens d'écoute et ta présence,

Natalie BONNEFOY, pour ton soutien et ta présence,

Alexa BOURAND-PLANTEFOL, pour ta gentillesse et ton humour,

Sylvie MARIOTTE-LABARRE, pour ta gentillesse et ton humour,

Cristina PANOZZO, pour ton aide et ton humour,

Christopher HERBERT, pour les conseils pertinents,

Anita PREVOT, pour ton soutien technique, tes encouragements et ton humour,

Anne-Marie PONTILLON, pour ton soutien technique,

Fanny CULOT, pour ton soutien technique et ta gentillesse,

Anais LALEVE, pour ton soutien et tes conseils pertinents,

valentine LUCAS, pour le moment passé au laboratoire,

merci, le travail collectif dans un environnement "familial" prend tout son sens avec vous !

A toute ma famille au Mali et en France,

à ma mère et à mon père,

pour l'éducation dont j'ai bénéficié, pour le courage et la persévérance dont vous m'avez inculqués, pour m'avoir appris la patience et le sens de la retenue,

à mon grand-père Pierre MOUNKORO ,

pour ton éternel soutien et ton amour, pour tes conseils et ta rigueur,

pour la confiance que tu m'as apportée, pour nos longues discussions,

pour le sens des mots "*conformité – rigueur – discipline*"

à mes frères et sœurs, tantes, oncles, cousine et grands-mères,

pour votre amour, pour votre soutien, pour votre présence, pour les valeurs familiales,

une pensée particulière à **Blaise Mounkoro** et **Marie-Noelle Mounkoro**,

merci pour votre soutien inconditionnel,

merci pour tout. Nul ne se suffit de lui-même !

A mes amis,

à **Ibe**, pour ton amitié fraternelle et indéfectible, ton soutien, ton hospitalité, tes conseils,

à **Paul**, pour tes conseils, ton aide, ton soutien

à **Baldé, Fred, Bintou, Hamadoun, Moh, Salimata, Selly, Diak, Bamba, Solange, Fatim, Awa, Yagame et Dicko**, pour vos accompagnements personnels et votre amitié,

à mes amis de Garnelles, plus particulièrement **Hubert, les abbés Vaillot et Pallais**,

pour votre accompagnement amical, spirituel et humain, pour le moment passé ensemble,

à tous mes autres amis, que je ne peux pas tout citer ici, pour tous les moments inoubliables, pour votre passion, pour votre appréciation et pour votre fidélité,

merci, je n'y arriverais jamais sans votre soutien.

Au comité d'attribution des contrats doctoraux de l'Université Paris-Sud (Paris-Saclay) et à l'Ecole doctorale SDSV, pour m'avoir accepté comme doctorant et pour le suivi durant la thèse.

A Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), pour m'avoir accueilli au sein de l'unité, pour l'accès aux différentes plateformes techniques, pour cet environnement exceptionnel de travail scientifique.

A mes collègues de l'association YOUR I2BC, Laura MONIOT-PERRON, Diletta CIARDO, Frédéric RIVIERE, Manon CHEVALIER,
merci pour le moment passé ensemble !

A la France, pour m'avoir accueilli pendant mes études, pour m'avoir permis de découvrir des personnes extraordinaires, pour ma formation scientifique et professionnelle, pour m'avoir fait découvrir un autre mode de vie, pour m'avoir appris des notions importantes sur la valeur de l'Humanité. Merci !

Au Mali, pour m'avoir préparé à la découverte et à la compréhension du monde, pour m'avoir inculqué la curiosité scientifique, pour la motivation qu'elle m'a apportée dans la réalisation de ce projet, pour m'avoir appris la valeur des choses simples, pour le sens d'honneur et la valeur humaine. Merci !

'Une vie sans avenir est souvent une vie sans souvenir.'

Hervé Bazin , *Le Bureau des mariages*, 1972.

Table des matières

Liste des figures	12
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	14
Introduction générale	15
A- Fonction mitochondriale de la levure et du parasite	16
A-1-La chaîne de phosphorylation oxydative	17
A-1-1- La chaîne respiratoire mitochondriale	17
A-1-2- F ₀ -F ₁ ATP synthase ou complexe V et le potentiel membranaire	21
A-2- Biosynthèse mitochondriale	26
A-2-1- Le cycle de Krebs	26
A-2-2- La biogenèse des centres Fe-S	28
A-2-3- La biosynthèse de l'hème	32
A-2-4- La biosynthèse des phospholipides et des acides aminés chez la levure.....	33
A-2-5-La biosynthèse de l'ubiquinone (ou coenzyme Q).....	34
B- Introduction à la problématique de la thèse	37
Chapitre I : Etude du mécanisme d'action de la plasmodione en utilisant la levure comme organisme modèle	40
Introduction du chapitre.....	41
Chapitre I-1 : Etude du mécanisme d'action de la plasmodione étudié chez la levure : approche 'enzymes candidates'	43
Introduction.....	44
Article publié	46
Chapitre I-2 : Sélection des mutants résistantes à la plasmodione et identification du mécanisme de résistance	74
Introduction.....	75
Article en préparation.....	76

Chapitre I-3 : Recherche de partenaires de la plasmodione en utilisant le modèle levure	
.....	94
Introduction et méthodes.....	95
Résultats et discussion	97
Discussion du chapitre et Perspectives.....	109
Chapitre II : Etude du mode d'action du proguanil	113
Introduction du chapitre.....	114
Article en préparation	117
Discussion du chapitre et questions ouvertes	138
Conclusion générale et perspective	140
Bibliographie	144

Liste des figures

Figure i : Structure de la chaine respiratoire mitochondriale	21
Figure ii : Modèle structural de la F ₀ -F ₁ ATP sythase de la levure et du parasite <i>Plasmodium</i>	22
Figure iii : Représentation schématique du cycle de krebs et du complexe α -kétoglutarate déshydrogénase.	27
Figure iv : Biogenèse des centres Fe-S chez la levure.	30
Figure v : Biosynthèse de l'hème chez la levure et le parasite.....	33
Figure vi : Etapes de la biosynthèse de l'ubiquinone chez la levure.....	35
Figure vii : Cycle de vie du parasite <i>P. falciparum</i> et molécules antipaludiques..	42
Figure viii : Mode d'action de la plasmodione, modèle simplifié.....	44
Figure ix : Schéma du mode d'action de la plasmodione.....	109
Figure x : Modèle du mécanisme de la synergie entre l'atovaquone et le proguanil.	116

Liste des tableaux

Tableau i : Gènes codant pour les composants de la chaîne de la phosphorylation oxydative chez la levure et le parasite.....	25
Tableau ii : Gènes codant pour les principaux acteurs de la biosynthèse des centres Fe-S chez la levure et le parasite.....	31
Tableau iii : Flavoenzymes impliquées dans l'activité de la plasmodione, identifiées chez la levure et leurs équivalents chez le parasite.	110
Tableau iv : Flavoenzymes mitochondriales de la levure	111

Liste des abréviations

ATP/ADP : Adénosine TriPhosphate/DiPhosphate

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

CCCP : Carbonyle Cyanide 3-ChloroPhenylhydrazone

CoQ : Coenzyme Q ou ubiquinol/ubiquinone

ELQ : Endochin-Like Quinolone (en français : Endochin qui ressemble à la quinolone)

FAD/H₂ : Flavine Adénine Dinucléotide/réduite

FMN : Flavine Mononucleotide

IC₅₀ : Concentration nécessaire d'un Inhibiteur pour inhiber 50% d'activité

NAD⁺/H: Nicotinamide Adénine Dinucléotide/réduit

NADP⁺/H: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate/réduit

OD: Optical Density (en français : Densité Optique)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymérase Chain Reaction (en français : Réaction en chaîne par polymérase)

PD : Plasmodione

PD-bzol : benzhydrol

PDB: Protein Data Bank (en français : Banque de données des protéines)

PDO : 3-benzoylmenadione

ROS : Reactive Oxygen Species (en français : Espèce réactive d'oxygène)

SOD : SuperOxide Dismutase

WT: wild-type (en français : la souche sauvage)

Introduction générale

A- Fonction mitochondriale de la levure et du parasite

La mitochondrie est un organite dynamique et multifonctionnel spécifique des cellules eucaryotes. Composée d'une double membrane, elle serait d'origine procaryote selon la théorie de l'endosymbiose. Selon cette théorie, les mitochondries seraient nées il y a environ deux milliards d'années de la fusion d'une α -protéobactérie avec le précurseur des cellules eucaryotes modernes (Zimorski *et al.* 2014). Bien que les mitochondries aient conservé la double membrane de leurs ancêtres et la machinerie de production d'ATP, leur forme et leur composition générale ont été largement modifiées. Elles ont acquis une multitude de fonctions supplémentaires au cours de l'évolution. La plus grande partie du matériel génomique du progéniteur α -protéobactérie a été rapidement perdue ou transférée dans le génome nucléaire (Jonathan R. F. and Jodi N. 2008). Dans certains cas, la mitochondrie perd complètement son génome et l'ensemble des protéines mitochondriales est codé par le génome nucléaire (Henriquez *et al.* 2005).

La taille ainsi que la composition du génome mitochondrial varient largement selon les espèces. Le plus grand génome mitochondrial connu à ce jour est celui de la plante *Silene conica* (11.3 Mb) alors que le plus petit génome mitochondrial reste celui du parasite *Plasmodium falciparum* (6 Kb) (Gray *et al.* 2008 ; Sloan *et al.* 2012). Chez ce dernier, seulement trois protéines sont codées par le génome mitochondrial (les gènes *COX1*, *COX3*, *CYTB*). (Vaidya and Mather 2009). Le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* fait 75 Kb pour 35 gènes, dont 8 codent pour des protéines, principalement pour des protéines de la chaîne de phosphorylation oxydative. Un gène code pour le cœur catalytique (*CYTB*) du complexe *bc₁* ; trois gènes codent pour des sous-unités du complexe IV (*COX1*, *COX2*, *COX3*) ; trois gènes codent pour des sous-unités de l'ATP synthase ou complexe V (*ATP6*, *ATP8*, *ATP9*) et finalement un gène pour une protéine de la petite sous-unité ribosomale (*VARI*).

Cependant, dans ces organismes la contribution du génome mitochondrial dans le protéome global de la mitochondrie est très faible (moins de 1%). La majeure partie du protéome mitochondrial est codé par des gènes nucléaires. Leur traduction est réalisée dans le cytoplasme. Les protéines sont ensuite transportées vers la mitochondrie pour assurer leurs rôles fonctionnels ou structurales. Le transport, régulé, de ces protéines est essentiel pour un bon fonctionnement de la mitochondrie. (Malina *et al.* 2018 ; Bender *et al.* 2003)

De nombreuses fonctions sont associées à la mitochondrie. On peut citer la phosphorylation oxydative, le maintien du potentiel membranaire, la biogenèse des centres Fer-Soufre (Fe-S) ainsi que la biosynthèse des acides aminés et des phospholipides. Le maintien du potentiel

membranaire et la biogenèse des centres Fe-S sont particulièrement importantes pour la viabilité des cellules.

A-1-La chaîne de phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative (OXPHOS) est un processus métabolique qui couple l'oxydation de donneurs d'électrons (NADH, succinate) et la réduction de l'oxygène à la synthèse d'ATP. Ce processus est assuré par deux machineries de la cellule : la chaîne de transfert d'électrons ou chaîne respiratoire et la F₀-F₁ ATP synthase. La chaîne de transfert d'électrons crée un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. La F₀-F₁ ATP synthase utilise alors ce gradient pour synthétiser de l'ATP. Bien que le mécanisme moléculaire de ce processus soit commun à tous les organismes, les acteurs intervenant peuvent diverger d'un organisme à l'autre.

A-1-1- La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale est une succession de complexes enzymatiques localisés dans la membrane interne de la mitochondrie (**Fig.i**). Classiquement, elle est constituée de quatre complexes transmembranaires : le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase), le complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase), le complexe III (ubiquinone-cytochrome *c* oxydoréductase ou complexe *bc*₁) et le complexe IV (cytochrome *c* oxydase). Le processus de transfert d'électrons commence lorsque les électrons provenant du NADH ou du succinate sont transférés à l'ubiquinone *via* respectivement le complexe I ou le complexe II. L'ubiquinol ainsi produit transfère ses électrons au cytochrome *c* *via* le complexe *bc*₁. Le cytochrome *c* réduit cède alors les électrons, *via* le complexe IV, à l'accepteur final (l'oxygène) conduisant à la formation de molécules d'H₂O. (Rich and Maréchal 2010)

Au cours de ce transfert d'électrons, trois complexes (complexe I, complexe *bc*₁, complexe IV) couplent le transfert d'électrons avec la translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire.

- *Le complexe I et les NADH déshydrogénases alternatives (NDHs)*

Chez de nombreux organismes, l'oxydation du NADH est assurée par le complexe I. Composé de 45 sous-unités chez l'homme et de 14 à 17 sous-unités chez les protéobactéries, le complexe I constitue le plus gros complexe enzymatique de la chaîne respiratoire. Il s'agit d'un complexe transmembranaire dont le rôle est d'assurer le transfert d'électrons du NADH de la matrice mitochondriale vers l'ubiquinone. Ce transfert est assuré grâce à son cofacteur FMN et ses huit centres Fe-S qui reçoivent les électrons provenant du NADH pour réduire l'ubiquinone.

L'oxydation du NADH et la réduction de l'ubiquinone est couplée à la translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. (Cardol 2011 ; Rich and Maréchal 2010 ; Larosa and Remacle 2018)

Chez la levure *S.cerevisiae*, tout comme chez le parasite *Plasmodium*, il n'existe pas de complexe I mais des NADH déshydrogénases alternatives (NDH-2) non transmembranaires. Ce sont des protéines homodimériques qui, tout comme le complexe I, assurent l'oxydation du NADH couplée à la réduction de l'ubiquinone. Cette activité est assurée grâce à leur cofacteur FAD sans faire intervenir de centre Fe-S. Il y a trois NDH-2s homologues chez la levure, deux de ces NDHs (Nde1 et Nde2) sont orientées vers l'espace intermembranaire et assurent l'oxydation du NADH d'origine cytosolique alors que la troisième (Ndi1) est orientée vers la matrice mitochondriale et assure exclusivement l'oxydation du NADH de la matrice mitochondriale, donc venant du cycle de Krebs. Les Ndes sont redondantes et la délétion de l'une ou l'autre n'a pas d'effet délétère sur la croissance. Quant à Ndi1, elle est essentielle pour l'utilisation du NADH provenant du cycle de Krebs, la rendant ainsi indispensable pour la croissance respiratoire. (Vries and Marres 1988 ; Luttkik *et al.* 1998 ; Theos *et al.* 2005). Le parasite *Plasmodium* a une seule NDH-2 orientée vers la matrice mitochondriale. Tout comme Ndi1 de la levure, elle assure l'oxydation du NADH de la matrice mitochondriale.

Si Ndi1 de la levure est essentielle pour la croissance respiratoire de la levure, l'importance de la NDH-2 du parasite diffère selon les stades de son cycle de vie. En effet, l'absence de la NDH du parasite n'affecte pas le stade érythrocytaire alors que la protéine est essentielle pour la maturation des oocytes et donc pour la transmission du parasite à l'homme. (Ke *et al.* 2019)

- *Le complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase)*

Le complexe II est le second point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire commun à tous les organismes eucaryotes. Le complexe est ancré dans la membrane interne mitochondriale. Il fait partie à la fois de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. Il assure le transfert d'électrons du succinate à l'ubiquinone, grâce à son cofacteur FAD et à ses trois centres Fe-S. Le complexe est constitué de quatre sous-unités (A, B, C et D ou 1, 2, 3 et 4 chez la levure) réparties en deux domaines (hydrophobe et hydrophile). Le domaine hydrophile, constitué des sous-unités A et B, est orienté vers la matrice mitochondriale. La sous-unité A contient le cofacteur FAD (lié de manière covalente) et le site de liaison du succinate. La sous-unités B contient trois centres Fe-S. Le domaine hydrophobe est formé par les sous-unités C et D qui forment le site de réduction de l'ubiquinone et attachent un hème *b*. C'est le seul

complexe de la chaîne respiratoire possédant à la fois un cofacteur flavinylique et un cofacteur hémique. (Rich and Maréchal 2010 ; Cecchini 2003)

La réaction commence par la liaison du succinate dans la sous-unité A. Les électrons du succinate passent au FAD, ensuite aux centres Fe-S pour finalement réduire l'ubiquinone. La proximité du site de liaison de l'ubiquinone avec le dernier centre Fe-S favorise ainsi la réduction de l'ubiquinone. Le rôle de l'hème dans l'activité du complexe n'est pas encore clair. Son rôle pourrait être différent selon les organismes. L'hème pourrait jouer un rôle structural en stabilisant les deux sous-unités. Il pourrait également prévenir la production de ROS par le complexe II. (Elena and Gary 2010 ; Hyung *et al.* 2012 ; Yankovskaya *et al.* 2003)

Chez la levure, la présence de l'hème *b* n'est pas essentielle pour l'activité du complexe, ni pour son assemblage ou sa stabilisation. Son rôle dans la prévention de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau du complexe n'est pas exclu. (Oyedotun, Sit and Lemire 2007)

Si l'activité du complexe II dans le processus de transfert d'électrons de la chaîne respiratoire est l'oxydation du succinate en fumarate et la réduction de l'ubiquinone, chez certains organismes tel que le parasite *Plasmodium*, il peut également réaliser la réaction inverse. Chez *Plasmodium*, la réaction de réduction du fumarate semble prédominer suggérant un rôle mineur du complexe II dans l'activité de la chaîne respiratoire. Par ailleurs, ce complexe ne semble pas essentiel au développement du parasite au stade érythrocytaire quoique son absence ait un impact sur la capacité de prolifération. Cependant il serait essentiel, tout comme NDH-2, à la maturation des oocytes. (Hino *et al.* 2012)

- *Le complexe III (ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase ou complexe bc₁)*

Le complexe III ou complexe *bc₁* est le complexe en aval du complexe I/NDH-2 et du complexe II dans la chaîne respiratoire. Il est sous forme dimérique et transmembranaire. Chaque monomère est formé de dix à onze sous-unités selon les organismes. Trois de ces sous-unités (cytochrome *b*, cytochrome *c₁* et la protéine à centre Fe-S ou protéine de Rieske) interviennent dans l'activité catalytique alors que les autres sous-unités ont un rôle structural. Le complexe *bc₁* catalyse le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome *c*. Le cytochrome *b* forme les deux sites de liaisons de l'ubiquinol : le site Q_i (entièrement formé par le cytochrome *b*) et le site Q_o (formé par le cytochrome *b* et la protéine de Rieske). Les électrons sont transférés au cytochrome *c₁* en passant par la protéine de Rieske. Le cytochrome *c₁* donne alors les électrons au cytochrome *c*. Ce transfert d'électrons est couplé à la translocation de protons vers l'espace

intermembranaire. Le mécanisme catalytique complexe de cette enzyme est appelé cycle Q. (Rich and Maréchal 2010)

Des mutations dans le complexe bc_1 sont associées à des pathologies humaines. La levure a été utilisée comme modèle pour étudier l'effet de ces mutations sur l'activité du complexe (Meunier *et al.* 2013). La levure a également été utilisée pour étudier le mode d'action d'inhibiteurs du complexe, inhibiteurs à action antimicrobienne, fongicide et antipaludique, par exemple (Vallières *et al.* 2013 ; Zehua *et al.* 2018 ; Mounkoro *et al.* 2018).

Un intérêt particulier est porté sur les antipaludiques ciblant le complexe bc_1 en raison du rôle que joue ce complexe chez le parasite. Dans la voie de biosynthèse des pyrimidines, une enzyme mitochondriale (dihydroorotate déshydrogénase ou DHODH) utilise l'ubiquinone comme receveur d'électrons. La réoxydation de l'ubiquinol par le complexe bc_1 est essentielle pour l'activité de la DHODH. Ceci rend le complexe bc_1 indispensable pour le parasite et une excellente cible pour le développement des antipaludiques. L'atovaquone est le seul inhibiteur du complexe bc_1 actuellement sur le marché mais d'autres sont en cours de développement. La levure a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'atovaquone et la structure atomique de l'enzyme de levure avec l'atovaquone est disponible (Birth *et al.* 2014). L'atovaquone est utilisé en combinaison avec le proguanil, avec lequel il agit synergiquement. Le mécanisme exact de cette synergie n'est pas encore bien compris.

L'atovaquone est un puissant inhibiteur de l'enzyme du parasite. Malheureusement, de nombreux cas de résistance ont été reportés après traitement (Fivelman *et al.* 2002). Dans la majorité des cas, la résistance est causée par une mutation dans le site Q_o du complexe bc_1 , le site de liaison de l'atovaquone. Les mutations les plus fréquentes chez *P.falciparum* sont Y268S/C dans le cytochrome *b*. Leurs équivalents chez la levure confèrent le même haut niveau de résistance que celui observé chez le parasite. (Srivastava *et al.* 1999 ; Song *et al.* 2015)

Il est donc urgent de trouver de nouvelles molécules se liant différemment au complexe, des molécules qui ciblent soit le site Q_i , soit les deux sites de liaison à la fois seraient particulièrement intéressantes (McConnell *et al.* 2018).

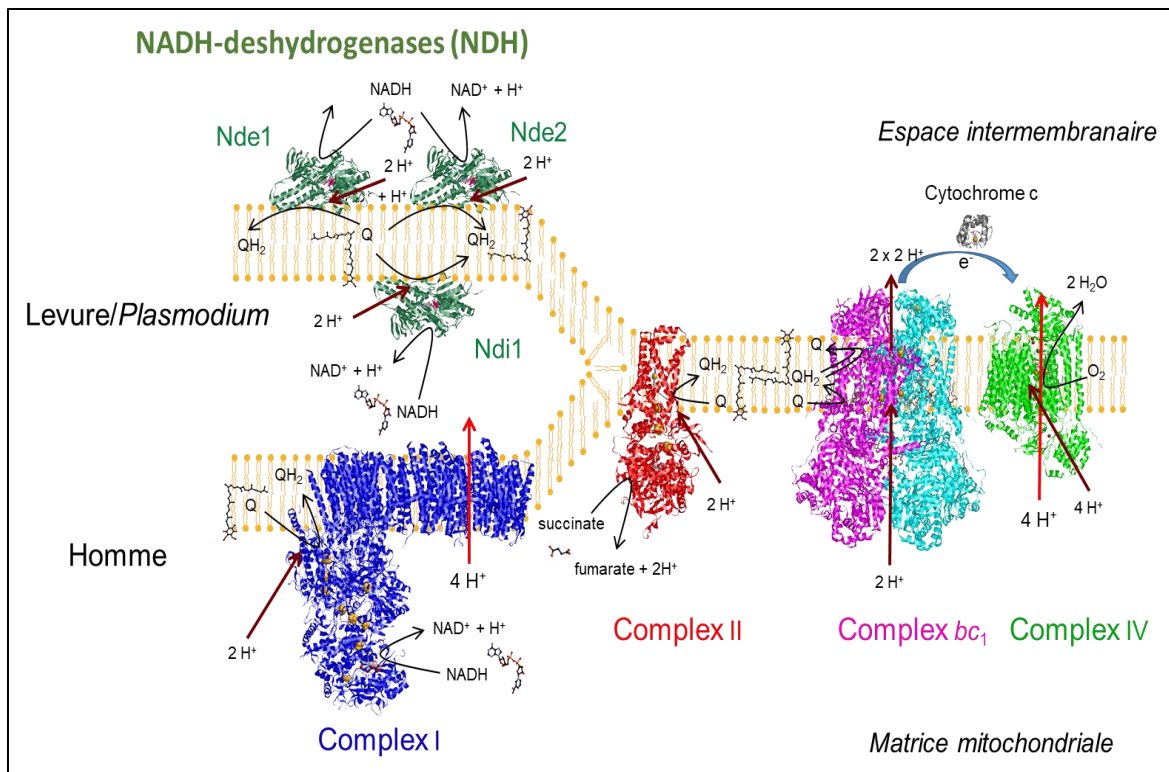


Figure i : *Structure de la chaîne respiratoire mitochondriale*, adapté selon Meunier *et al.* 2013

- *Le complexe IV (Cytochrome c oxydase)*

La cytochrome *c* oxydase ou complexe IV est le dernier complexe de la chaîne respiratoire. Ce complexe transmembranaire est constitué de 13 sous-unités et lie deux hèmes (*a* et *a*₃) et des cuivres. Il est le seul composant de la chaîne respiratoire ne possédant ni cofacteur FAD ni centre Fe-S. Il réalise le transfert d'électrons du cytochrome *c* à l'oxygène couplé à la translocation de protons vers l'espace intermembranaire. Son activité aboutit à la production de molécules d'H₂O. (Rich and Maréchal 2010)

Chez le parasite *Plasmodium*, la présence des sous-unités du complexe IV n'est pas encore bien claire. Cependant l'activité de ce complexe a été décrite et cette activité est, comme dans toutes cellules, sensible au cyanure (Vaidya and Mather 2009). Ce complexe ne présente pas d'intérêt pour le développement de molécules antipaludiques car les inhibiteurs de complexes IV sont de petites molécules comme le cyanure et l'azide extrêmement toxiques et sans spécificité.

A-1-2- *F₀-F₁ ATP synthase ou complexe V et le potentiel membranaire*

Le potentiel de membrane généré par l'activité de la chaîne respiratoire (transfert d'électrons et translocation vectorielle de protons) est utilisé par la F₀-F₁ ATP synthase pour synthétiser de l'ATP. Cette production d'ATP est vitale pour certains organismes et dans certaines conditions de croissance. Chez la levure, elle n'est indispensable que lorsque la croissance dépend de la

fonction respiratoire. En effet la levure peut croître par fermentation en puisant l'énergie nécessaire à sa croissance de la glycolyse et la fermentation éthylique. La chaîne respiratoire et l'ATP synthase ne sont alors pas nécessaires.

Sous forme de dimère, la F₀-F₁ ATP synthase est constituée de deux secteurs multiprotéiques (F₀ et F₁). Cette structure est cruciale pour son mécanisme catalytique (**Fig.ii**). (Bornhövd *et al.* 2006 ; Boyer 1997)

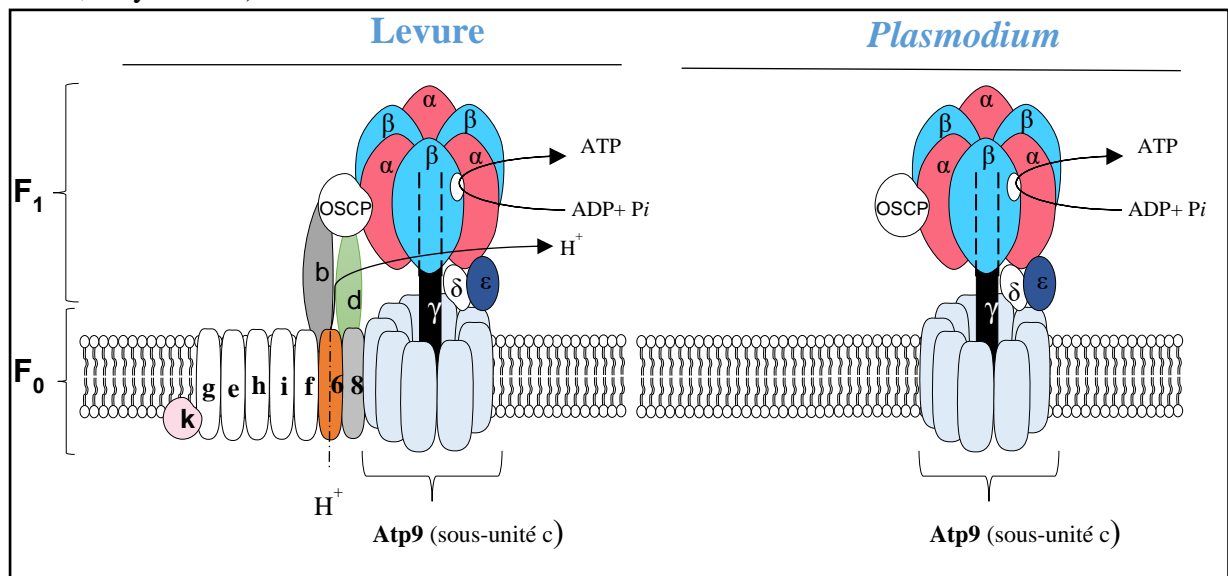


Figure ii : *Modèle structural de la F₀-F₁ ATP synthase de la levure et du parasite Plasmodium.* Cette structure est basée sur les protéines identifiées chez ces deux organismes.

Le secteur F₀ constitue le domaine transmembranaire du complexe. Chez *S. cerevisiae*, le secteur F₀ est constitué de douze sous-unités dont neuf (sous-unités b, OSCP, d, e, f, g, h, i, k) sont codées par le génome nucléaire et trois (sous-unités 6, 8, 9) codées par le génome mitochondrial. Les sous-unités peuvent être classées en différents groupes en fonction du rôle qu'elles jouent dans le fonctionnement du complexe. Les sous-unités b et d forment une tige périphérique qui jaillit de la membrane pour se lier à la sous-unité OSCP formant ainsi le premier groupe. Le second groupe (sous-unités 6, 8, 9) forment le canal de passage des protons essentiel au fonctionnement du secteur F₀. Ces sous-unités étant codées par le génome mitochondrial, le secteur F₀ est donc absent dans un mutant rho^o dépourvu d'ADN mitochondrial. Le troisième groupe (sous-unités h, f, i) jouerait un rôle dans la stabilité du complexe. Le dernier groupe (sous-unités e, g, k) est associé à l'assemblage du dimère et n'a aucun impact sur le fonctionnement d'un monomère (Devenish *et al.* 2000).

La structure du secteur F₀ du parasite *Plasmodium* paraît différente de celui de la levure. Par des approches bio-informatiques, seules la sous-unité c (Atp9 chez la levure) et la sous-unité

OSCP du secteur F_0 ont été identifiées chez le parasite. L'absence des sous-unités a (Atp6 chez la levure) et b qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement du secteur F_0 laisse croire que le complexe n'a pas d'activité de synthèse d'ATP chez le parasite. Toutefois, il n'est pas à exclure que les protéines jouant ce rôle chez le parasite pourraient être phylogénétiquement très éloignées de celles observées chez la plupart des eucaryotes. En effet, l'absence de ces deux sous-unités a été observée chez l'espèce *Tetrahymena thermophila* (très proche phylogénétiquement du parasite) alors que celle-ci présente une activité ATP synthase très élevée. Chez cet organisme, des protéines candidates ont été proposées comme étant des potentielles sous-unités a et b. La même observation pourrait donc avoir lieu chez le parasite *Plasmodium*. (Nishi and Scherbaum 1962 ; Nina *et al.* 2010; Nina *et al.* 2011)

Le secteur F_1 est localisé dans la matrice mitochondriale. Chez le parasite, comme chez *S. cerevisiae*, il est constitué de 5 sous-unités (α , β , γ , δ et ϵ) et l'ensemble est codé par le génome nucléaire. Dans un monomère, se trouvent trois sous-unités α et β (3α , 3β), une sous-unité γ , une sous-unité δ et une sous-unité ϵ . Les sous-unités γ , δ et ϵ forment la tige principale qui lie le secteur F_1 au secteur F_0 alors que les sous-unités α et β constituent la tête statique (ou stator). L'activité catalytique du complexe est assurée par ces deux sous-unités. (Nakamoto *et al.* 1999)

Le mécanisme catalytique de la F_0 - F_1 ATP synthase a été proposé par *Paul Boyer* et *John Walker*. L'ATP synthase agit comme un moteur moléculaire rotatif. La tête statique du domaine F_1 présente une symétrie de rotation. Chaque sous-unité β contient un site de liaison pour l'ADP et le phosphate inorganique (P_i). Au fur et à mesure que les protons passent de l'espace intermembranaire vers la matrice à travers le domaine F_0 , le rotor tourne à l'intérieur de la tête du stator. Lorsque la tige en rotation passe au niveau des sous-unités β , des changements conformationnels sont induits, ce qui favorise la conversion de l'ADP et P_i en ATP. En moyenne, il faut 3 protons pour la synthèse d'une molécule d'ATP, ce qui donnerait 3 ATP synthétisés par NADH ou 2 ATP par succinate par une chaîne de phosphorylation oxydative classique. (Boyer 1997 ; Nakamoto *et al.* 1999)

La fonction du secteur F_1 du complexe ne se limite pas à la synthèse de l'ATP.

L'activité de la chaîne respiratoire aboutit à une translocation de protons générant ainsi du potentiel membranaire. Le potentiel membranaire est essentiel à la viabilité de toutes cellules eucaryotes. Il fournit en effet la force nécessaire pour le transport de molécules du cytoplasme vers la mitochondrie (et de la mitochondrie vers le cytoplasme). L'ATP synthase joue aussi un

rôle très important dans le maintien du potentiel de membrane. (Gbelská *et al.* 1983 ; D'Alessandro and Melandri 2010)

Lorsque, à cause d'un défaut de la chaîne respiratoire ou de son inhibition, le potentiel membranaire diminue jusqu'à un niveau critique, le secteur F_1 de l'ATP synthase hydrolyse de l'ATP, produit par la glycolyse, conduisant à une translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire *via* le secteur F_0 , ce qui maintient le potentiel de membrane.

Cependant, le maintien du potentiel membranaire par l'ATP synthase ne se fait pas uniquement par translocation de protons. Chez la levure, dans un mutant ρ^0 dépourvu du génome mitochondrial, donc sans secteur F_0 , le potentiel de membrane est maintenu grâce à l'activité du transporteur ADP/ATP (Kunji *et al.* 2016), travaillant en concert avec le secteur F_1 et le transporteur de phosphate.

En effet l'ATP (produit par la glycolyse) est transporté du cytosol vers la matrice mitochondriale contre une molécule d'ADP par le transporteur ADP/ATP. L'ATP y est hydrolysé par le secteur F_1 en ADP et en P_i . Ces deux molécules sont transportées vers l'espace intermembranaire à travers la membrane mitochondriale conduisant à une augmentation de charges négatives. Le P_i est transporté contre une molécule d'hydroxyle OH^- alors que l' ADP^{3+} est échangé contre une molécule d' ATP^{4+} . Le rôle du secteur F_1 de l'ATP synthase est donc indispensable dans cette condition (Gbelská *et al.* 1983 ; Lefebvre-Legendre *et al.* 2003 ; Truscott *et al.* 2003).

Chez le parasite, la perte du génome mitochondrial devrait être impossible. En effet, même en absence de production d'ATP par l'ATP synthase, le complexe bc_1 (dont le cœur catalytique, le cytochrome b , est codé par le génome mitochondrial) reste vital, étant donné son rôle dans l'activité de la DHODH. Le potentiel de membrane est probablement généré par l'activité du secteur F_1 avec les transporteurs ADP/ATP et phosphate lorsque le parasite produit son ATP par la glycolyse, expliquant le rôle essentiel du secteur F_1 (Painter *et al.* 2007 ; Nina *et al.* 2011). Il a été proposé que l'inhibition de ce mécanisme de génération de potentiel de membrane par le proguanil expliquerait la synergie atovaquone-proguanil (Painter *et al.* 2007). Ceci a suscité l'intérêt pour l'étude de l'ATP synthase du parasite. Les gènes codant pour les composants de la chaîne de phosphorylation oxydative identifiés dans la levure et chez *P.falciparum* sont présentés dans le **tableau i**.

Tableau i : *Gènes codant pour les composants de la chaîne de la phosphorylation oxydative chez la levure et le parasite.* Le caractère essentiel est principalement déterminé selon les études de (Zhang et al. 2018)

Complexes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Plasmodium</i>	
	Gènes	Gènes <i>P.falciparum</i>	Essentiel
NADH déshydrogénase	<i>NDE1-YMR145C</i>	Absent	
	<i>NDE2-YDL085W</i>	Absent	
	<i>NDII-YML120C</i>	PF3D7_0915000	NON
Complexe II	<i>SDHA-YKL148C</i>	PF3D7_1034400	NON
	<i>SDHB-YLL041C</i>	PF3D7_1212800	NON
	<i>SDHC-YKL141W</i>	PF3D7_0611100	NON
	<i>SDHD-YDR178W</i>	PF3D7_1010300	OUI
Complexe III ou <i>bc₁</i> (cœur catalytique)	<i>Cytochrome b-Q0105</i>	Pf7G8_000015300	OUI
	<i>Cytochrome c1-YJR048W</i>	PF3D7_1462700	OUI
	<i>Protéine de Rieske, YEL024W</i>	PF3D7_1439400	NON
Complexe IV	<i>COX1-Q0045</i>	mal_mito_2	Pas de données
	<i>COX2-Q0250</i>	PF3D7_1361700 PF3D7_1430900	OUI OUI
	<i>COX3-Q0275</i>	mal_mito_1	Pas de données
	<i>COX4-YGL187C</i>	-----	-----
	<i>COX5A-YNL052W</i>	-----	-----
	<i>COX5B-YIL111W</i>	PF3D7_0927800	NON
	<i>COX6-YHR051W</i>	PF3D7_0928000	OUI
	<i>COX7-YMR256C</i>	-----	-----
	<i>COX8-YLR395C</i>	-----	-----
	<i>COX9-YDL067C</i>	-----	-----
	<i>COX12-YLR038C</i>	-----	-----
	<i>COX13-YGL191W</i>	PF3D7_1022900	-----
F ₀ -F ₁ ATP synthase	<i>ATP1-YBL099W (α)</i>	PF3D7_0217100	OUI
	<i>ATP2-YJR121W (β)</i>	PF3D7_1235700	NON
	<i>ATP3-YBR039W (γ)</i>	PF3D7_1311300	OUI
	<i>ATP4-LPF7 (b)</i>	-----	OUI
	<i>ATP5-YDR298C (OSCP)</i>	PF3D7_1310000	OUI
	<i>ATP6-Q0085 (a)</i>	-----	-----
	<i>ATP7-YKL016C (d)</i>	-----	OUI
	<i>ATP8-Q0080 (8)</i>	-----	-----
	<i>ATP9-Q0130 (c)</i>	PF3D7_0705900	OUI
	<i>ATP14-YLR295C (h)</i>	-----	-----
	<i>ATP15-YPL271W (ε)</i>	PF3D7_0715500	NON
	<i>ATP16-YDL004W (δ)</i>	PF3D7_1439400	NON
	<i>ATP17-YDR377W (f)</i>	-----	-----
	<i>ATP18-YML081C-A (i)</i>	-----	-----
	<i>ATP19-YOL077W-A (k)</i>	-----	-----
<i>ATP20-YPR020W (g)</i>	-----	-----	
<i>ATP21-YDR322C-A (e)</i>	-----	-----	

En résumé, l'ATP synthase, lorsque la cellule utilise la fonction respiratoire, assure la production d'ATP. En absence de chaîne respiratoire fonctionnelle, lorsque la cellule utilise l'ATP produit par la glycolyse, le complexe participe à la génération du potentiel membranaire. Le maintien d'un potentiel de membrane est vital pour la cellule car il permet le transport à travers la membrane mitochondriale, notamment de protéines (*via* les transporteurs TIM, par exemple), et d'ions (fer, calcium,...) (Herrmann 2007). De nombreuses protéines synthétisées dans le cytosol sont en effet adressées à la mitochondrie où elles remplissent diverses fonctions dans des voies de biosynthèse. Certaines de ces fonctions sont essentielles à la survie de la cellule, comme par exemple la biogenèse des centres Fe-S (Lange, Kispal, and Lill 1999). Au point 2 de cette introduction, je décris brièvement, sans vouloir être exhaustif, la biosynthèse des centres fer-souffre, des hèmes, de l'ubiquinone, des phospholipides et des acides aminés dont des étapes importantes ont lieu dans la mitochondrie.

A-2- Biosynthèse mitochondriale

A-2-1- Le cycle de Krebs

Le cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs est un ensemble de réactions biochimiques qui se déroulent dans le cytoplasme des organismes procaryotes ou la matrice mitochondriale des eucaryotes. L'attribution "cycle" de ces réactions vient du fait que le dernier produit de ces réactions participe également à la première réaction.

Chez les eucaryotes, le cycle de Krebs lie le métabolisme cytoplasmique à celui de la mitochondrie. Il produit du NADH utilisé par la chaîne respiratoire et fournit des précurseurs essentiels pour la biosynthèse des acides aminés et des phospholipides. Le catabolisme des composés carbonés dans le cytoplasme aboutit au pyruvate qui est ensuite transporté dans la mitochondrie où il est transformé en acétyl-coenzyme-A (acétyl-CoA) par le complexe pyruvate déshydrogénase.

Le cycle de Krebs est classiquement composé de neuf réactions permettant la production de trois molécules de NADH, d'une molécule d'ATP et d'une molécule de GTP (**Fig.iii**).

Notons que la réaction de transformation de l' α -kéto-glutarate en succinyl-coenzyme A est réalisée par le complexe α -kéto-glutarate déshydrogénase ou complexe α KGD, une association de trois enzymes. L'enzyme I (E1), α -kéto-glutarate déshydrogénase, liant un cofacteur thiamine pyrophosphate (TPP) décarboxyle l' α -kéto-glutarate formant le succinyl. L'enzyme II (E2), dihydrolipoamide succinyltransferase, forme le succinyl-CoA. L'enzyme III (E3), dihydrolipoamide déshydrogénase, utilisant un co-facteur FAD, re-oxyde le cofacteur

lipoamide de E2, réduisant un NAD en NADH. Le succinyl-coA produit par le complexe α KGD sert aussi à la biosynthèse des hèmes.

Les enzymes E2 et E3 sont communes aux complexes α KGD, glycine déshydrogénase et pyruvate déshydrogénase, mentionnée plus haut tandis que E1 diffère entre ces complexes.

L'ensemble des acteurs du cycle de Krebs sont présents chez le parasite et son fonctionnement a été observé à la fois au stade érythrocytaire et sexuel (MacRae *et al.* 2013). Toutefois il ne semble pas indispensable pour le développement érythrocytaire du parasite.

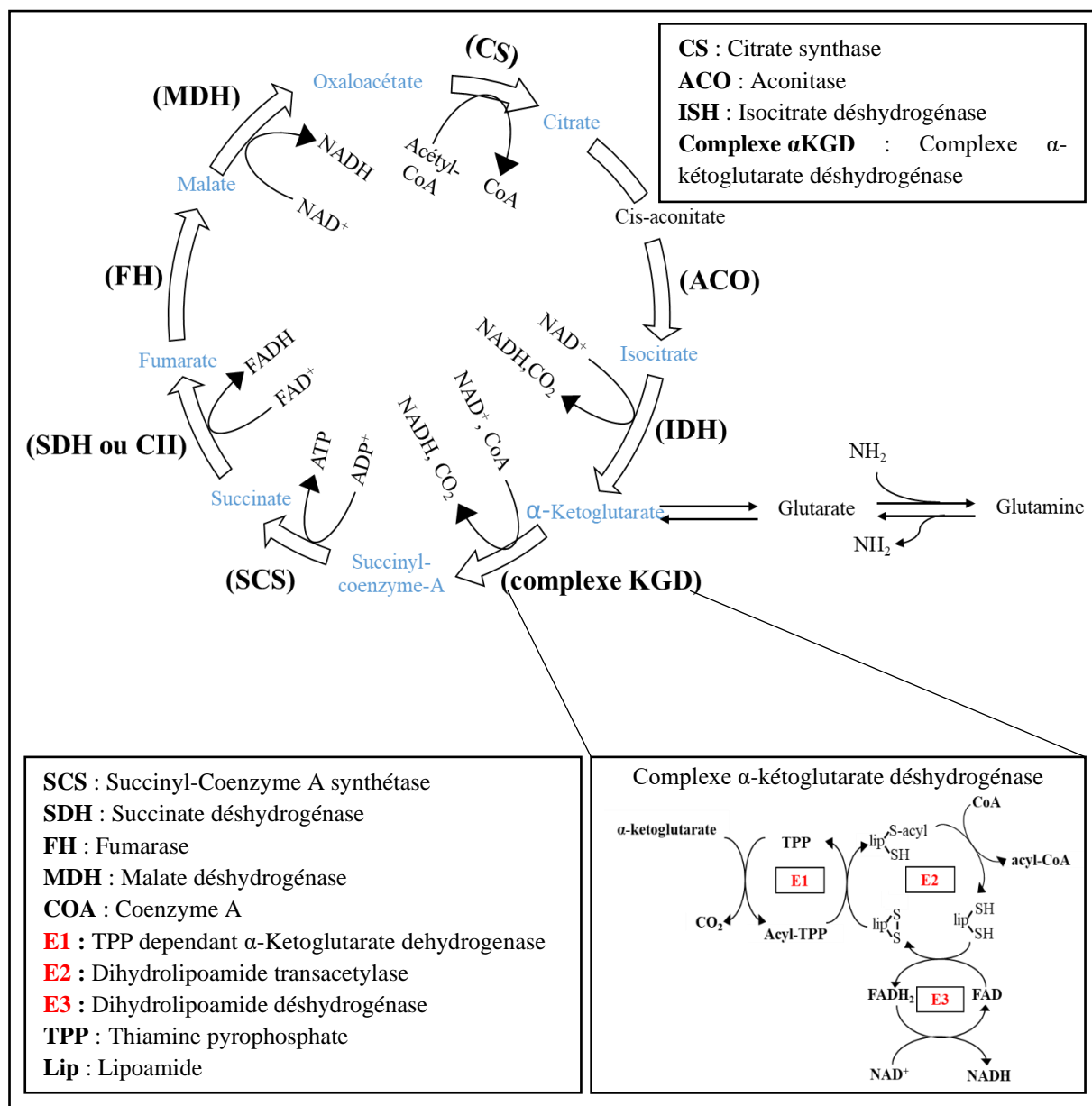


Figure iii : Représentation schématique du cycle de krebs et du complexe α -kétoglutarate déshydrogénase.

Aux stades sexuels par contre, son activité semble nécessaire. En effet, l'aconitase est essentielle pour la maturation des gamétocytes et la présence du complexe α KGD est cruciale pour la formation des oocytes (Ke *et al.* 2015).

Chez *Plasmodium*, le complexe α KGD serait le principal point d'entrée du cycle de Krebs au stade érythrocytaire, la transformation des acides aminés glutamine et glutamate fournissant l' α -kétoglutarate (**Fig.iii**). La glutamine serait la principale source de carbone au cours du développement érythrocytaire alors que c'est le glucose au stade sexuel (MacRae *et al.* 2013). Le mécanisme et les acteurs intervenant dans la production de l'acétyl-CoA, quant à eux, ne sont pas encore bien identifiés chez le parasite.

Il a été montré que les gamétocytes sont particulièrement plus sensibles aux inhibiteurs du cycle de Krebs, ce qui en fait une excellente cible pour le développement de médicaments bloquant la transmission. (MacRae *et al.* 2013).

A-2-2- La biogenèse des centres Fe-S

Les centres Fe-S également appelés "cluster Fe-S" sont des assemblages de fer et de soufre présents dans de nombreuses protéines. Ils ont un rôle de cofacteurs dans la catalyse enzymatique ou un rôle structural.

Les centres Fe-S sont indispensables aux cellules. En effet, ils sont requis pour des enzymes essentielles, par exemple l'ADN hélicase Rad3 de la levure et son homologue FANCI du parasite qui interviennent dans la réparation de l'ADN, Rli1, une protéine essentielle à la biogenèse des ribosomes et Nar1, requis pour la maturation des protéines nucléaires à centre Fe-S. (Imlay 2006 ; Lill and Mühlhoff 2005 ; Rudolf *et al.* 2006).

Trois systèmes de biogenèse des centres Fe-S existent chez les organismes eucaryotes : SUF (Sulfur Formation), CIA (Cytoplasm Iron Assembly) et ISC (Iron Sulfur Cluster). Ils se différencient par leur localisation cellulaire. SUF est caractéristique des chloroplastes des plantes et de l'apicoplaste des parasites apicomplexes dont *Plasmodium*. CIA est localisé dans le cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes. Il est indispensable pour les enzymes à centre Fe-S localisées dans le cytoplasme mais dépend de l'activité du système mitochondrial d'assemblage des centres Fe-S (ISC). ISC est donc localisé dans la mitochondrie et serait la raison majeure du maintien de cet organe chez les organismes eucaryotes (Lill *et al.* 2012). En effet, les organismes possédant les formes les plus réduites de mitochondries gardent uniquement les enzymes et la voie de biogenèse des centres Fe-S. Pour cette raison la mitochondrie reste un organe essentiel pour tous les organismes eucaryotes et fait de la

mitochondrie une excellente cible pour les antimicrobiens (anti-microorganismes eucaryotes). (Dellibovi-Ragheb *et al.* 2013)

Si la biogenèse de centres Fe-S mitochondriale (ISC) est une fonction essentielle pour tous les organismes, ceci n'est pas le cas pour le système SUF chez les organismes qui en possèdent. Chez *Plasmodium* la biosynthèse des Fe-S au niveau de l'apicoplaste n'est pas une fonction essentielle. (Pala *et al.* 2018 ; Yeh and DeRisi 2011 ; Couturier *et al.* 2013)

La biogenèse des centres Fe-S a été fort étudiée chez la levure mais aussi dans les cellules humaines. Plusieurs points restent encore à éclaircir. Je décris ci-dessous les étapes de cette biogenèse mitochondriale chez la levure, avec les acteurs principaux, sans entrer dans les détails ou la discussion (**Fig.iv**).

Dans une première étape, le fer (Fe^{2+}) est transporté du cytosol vers la matrice mitochondriale. Le fer cytosolique est d'abord transporté vers l'espace intermembranaire. Les transporteurs de la membrane interne (Mrs3/4 et Mmt1/2) se chargent alors du transport vers la matrice mitochondriale. Ces transporteurs délivreraient directement le fer à la frataxine dans la matrice mitochondriale. (Malina *et al.* 2018 ; Froschauer *et al.* 2009)

Dans un second temps, le fer lié à la frataxine est apporté à un complexe d'assemblage d'au moins trois protéines : une cystéine désulfurase (Nfs1), une protéine donneuse de cystéine (Isu1/2), et une protéine activatrice de la cystéine désulfurase (Isd11). Ces trois protéines sont essentielles dans le processus de la synthèse car non seulement elles reçoivent le fer apporté par la frataxine mais elles jouent le rôle de donneur de soufre. En effet, au cours du processus, une cystéine de la protéine Isu1/2 est désulfurée en alanine dans le complexe permettant la formation d'une persulfure (-SSH). La désulfuration est assurée par Nfs1 en partenariat avec Isd11. On retrouve également une protéine de soutien du complexe (Acp1) dont le rôle semble secondaire. La ferrédoxine (Yah1) réduite par la ferrédoxine réductase (Arh1) sert ensuite de donneur d'électron au complexe conduisant à la réduction du persulfure en sulfide. L'Arh1 utilise les électrons provenant du NADPH d'où le rôle important de cette molécule dans la biogenèse des centres Fe-S. Le sulfide produit se lie ensuite au fer permettant la formation du centre Fe-S. Le mécanisme n'est pas encore bien connu. Il faut deux molécules de fer et de sulfide pour la formation d'un centre [2Fe-2S]. (Muhlenhoff 2002 ; Gerber, Mühlenhoff, and Lill 2003)

Dans une dernière étape, le centre Fe-S est mûri et assemblé dans les apoprotéines. L'assemblage des centres Fe-S [2Fe-2S] est assez bien connu contrairement à celui des centres [4Fe-4S].

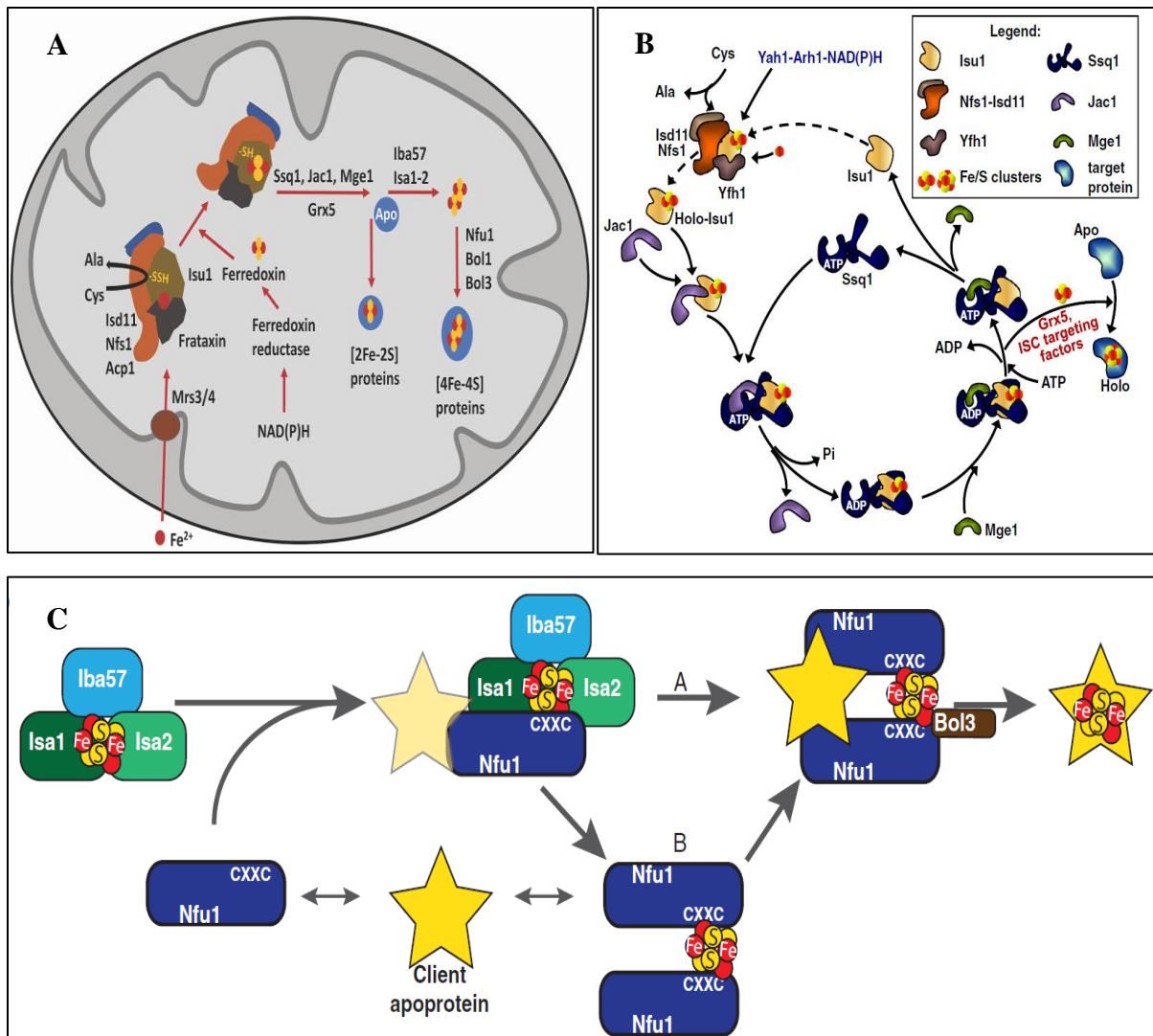


Figure iv : *Biogenèse des centres Fe-S chez la levure* adapté selon (Malina *et al.* 2018 ; Mühlhoff *et al.* 2002 ; Melber *et al.* 2016). *A* : Modèle des grandes étapes de la biogenèse mitochondriale. *B* : Maturation et assemblage des centres Fe-S [2Fe-2S]. *C* : Maturation et assemblage des centres [4Fe-4S].

Pour la maturation et l'assemblage des centres [2Fe-2S], un système de chaperonne constitué de quatre protéines (Ssq1, Jac1, Mge1 et Grx5) est mis en place. La mise en place de ce système commence par la liaison de Jac1 à la protéine Isu1/2 (contenant le centre [2Fe-2S]) pour l'apporter à l'ATPase Ssq1. La liaison de Ssq1 à Jac1 est suivie simultanément par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP entraînant un changement de conformation de la protéine Ssq1. Ce changement de conformation permet ensuite la liaison des protéines Mge1 et Grx5 au système (Jac1+Isu1/2+Ssq1). La Grx5 récupère le centre [2Fe-2S] de l'Isu1/2 alors que Mge1 favorise

le remplacement de l'ADP par de l'ATP dans Ssq1 ce qui entraîne la dissociation du système. La Grx5 peut alors directement incorporer le centre [2Fe-2S] dans les apoprotéines.

La Grx5 joue un rôle majeur dans la maturation des centres [4Fe-4S]. Elle apporte le centre [2Fe-2S] à un complexe protéique constitué de trois chaperones (Iba57, Isa1 et Isa2). Ce système de chaperone transforme deux [2Fe-2S] en un centre [4Fe-4S]. Le transfert et l'incorporation des centres [4Fe-4S] seraient assurés par trois protéines Nfu1, Bol1 et Bol3. Parmi elles, Nfu1 et Bol3 semblent être les facteurs déterminants. L'absence de ces deux facteurs entraîne une forte diminution de l'activité des protéines à centre [4Fe-4S] sans que d'autres protéines à centre Fe-S ne soient affectées. Dans le modèle proposé par *Melber et al.*, Nfu1 interagit avec le complexe Isa1-Isa2-Iba57 sous forme de monomère avant de se mettre en dimère. Sous cette forme, elle se dissocie de ce complexe. La formation de ce dimère permet ainsi de protéger le centre [4Fe-4S] des oxydants notamment les ROS. Le rôle de Bol3 serait alors tardif et interviendrait au niveau de l'incorporation du centre [4Fe-4S]. Le rôle de Bol1 n'est pas encore bien compris même si certaines données suggèrent qu'elle interagirait avec Grx5. (*Malina et al.* 2018 ; *Lill et al.* 2012 ; *Mühlenhoff et al.* 2002 ; *Melber et al.* 2016)

Les gènes codant pour ces protéines et leurs équivalents chez le parasite sont listés dans le **tableau ii** ci-dessous.

Tableau ii : *Gènes codant pour les principaux acteurs de la biosynthèse des centres Fe-S chez la levure et le parasite. Le caractère essentiel est déterminé selon les études de (Zhang et al. 2018)*

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	
Gènes	Gènes	Essentiel
<i>NFS1-YCL017C</i>	<i>NFS-PF3D7_0727200</i>	OUI
<i>ISU1/ISU2-YPL135W/YOR226C</i>	<i>ISU-PF3D7_1454500</i>	OUI
<i>ISD11-YER048W-A</i>	<i>ISD-PF3D7_1311000</i>	OUI
<i>YAH1-YPL252C</i>	<i>Férredoxine-PF3D7_1214600</i>	OUI
<i>ARH1-YDR376W</i>	<i>Férredoxine réductase-PF3D7_1139700</i>	OUI
<i>YFH1-YDL120W</i>	<i>Non identifié</i>	
<i>ISA1/ISA2 YLL027W/YPR067W</i>	<i>ISA-PF3D7_0522700</i>	OUI
<i>NFU1-YKL040C</i>	<i>NFU-PF3D7_0921400</i>	OUI
<i>GRX5-YPL059W</i>	<i>Glutaredoxine-PF3D7_0304500</i>	OUI
<i>SSQ1-YLR369W</i>	<i>Chaperone (HSP70)-PF3D7_1134000</i>	OUI
<i>JAC1-YGL018C</i>	<i>Chaperone (HSP20)-PF3D7_0920100</i>	OUI
<i>MGE1-YOR232W</i>	<i>Facteur d'échange de nucléotide - PF3D7_1124700</i>	OUI

A-2-3- La biosynthèse de l'hème

L'hème est un cofacteur présent chez presque tous les organismes vivants. Il est indispensable pour de nombreuses protéines telles que les hémoglobines et les cytochromes de la chaîne respiratoire. Structuellement, c'est un complexe de molécule de fer (Fe^{2+}) et du composé hétérocyclique porphyrine. La biosynthèse de l'hème consiste en la synthèse de la porphyrine et à l'incorporation du fer dans cette porphyrine. (Franken *et al.* 2011)

Chez la levure *S.cerevisiae*, les étapes de la biosynthèse de l'hème se déroule dans la mitochondrie et dans le cytosol (**Fig.v**). Cette biosynthèse se déroule en huit étapes commençant dans la mitochondrie par la synthèse de l'acide 5-aminolévulinique (ALA) à partir de la glycine et du succinyl-coenzyme A catalysée par Hem1. La 5-aminolévuline est ensuite transportée vers le cytosol où elle est convertie en porphobilinogène par Hem2. Il s'ensuit alors une succession de quatre étapes dans le cytosol permettant de passer de la porphobilinogène à la protoporphyrone IX catalysées respectivement par Hem3, Hem4, Hem12 et Hem13. Les deux dernières étapes de la biosynthèse sont réalisées dans la mitochondrie et sont catalysées par Hem14 et Hem15. Au cours de ces deux étapes, la protoporphyrone IX est d'abord transformée en protoporphyrine puis en hème *b* (Hoffman *et al.* 2003 ; Richardson *et al.* 2010). Deux enzymes de cette voie de biosynthèse sont des oxydases rendant ainsi la biosynthèse dépendante de l'oxygène.

La biosynthèse de l'hème ne semble pas indispensable pour la viabilité de la levure en condition de croissance fermentaire. Mais elle est bien sûr essentielle à la croissance respiratoire car plusieurs complexes de la chaîne respiratoire sont des hémoprotéines. (Hoffman *et al.* 2003 ; Sartori *et al.* 1999)

Chez le parasite *Plasmodium*, l'ensemble des acteurs intervenant dans la biosynthèse des hèmes a été détecté. Cependant des étapes qui, chez la levure sont localisées dans le cytoplasme, sont réalisées dans l'apicoplaste chez le parasite (**Fig.v**). (Ke *et al.* 2014)

La biosynthèse de l'hème ne semble pas être une fonction essentielle pour le stade sanguin du parasite. Il utiliserait plutôt de l'hème provenant de la dégradation de l'hémoglobine de l'hôte. Par contre, cette fonction est essentielle pour le développement des parasites lorsqu'ils se trouvent chez le moustique, ainsi qu'au stade hépatique. De ce fait, la voie de biosynthèse des hèmes pourrait constituer une bonne cible pour le développement des molécules antipaludiques pour le stade hépatique. (Overkamp *et al.* 2000)

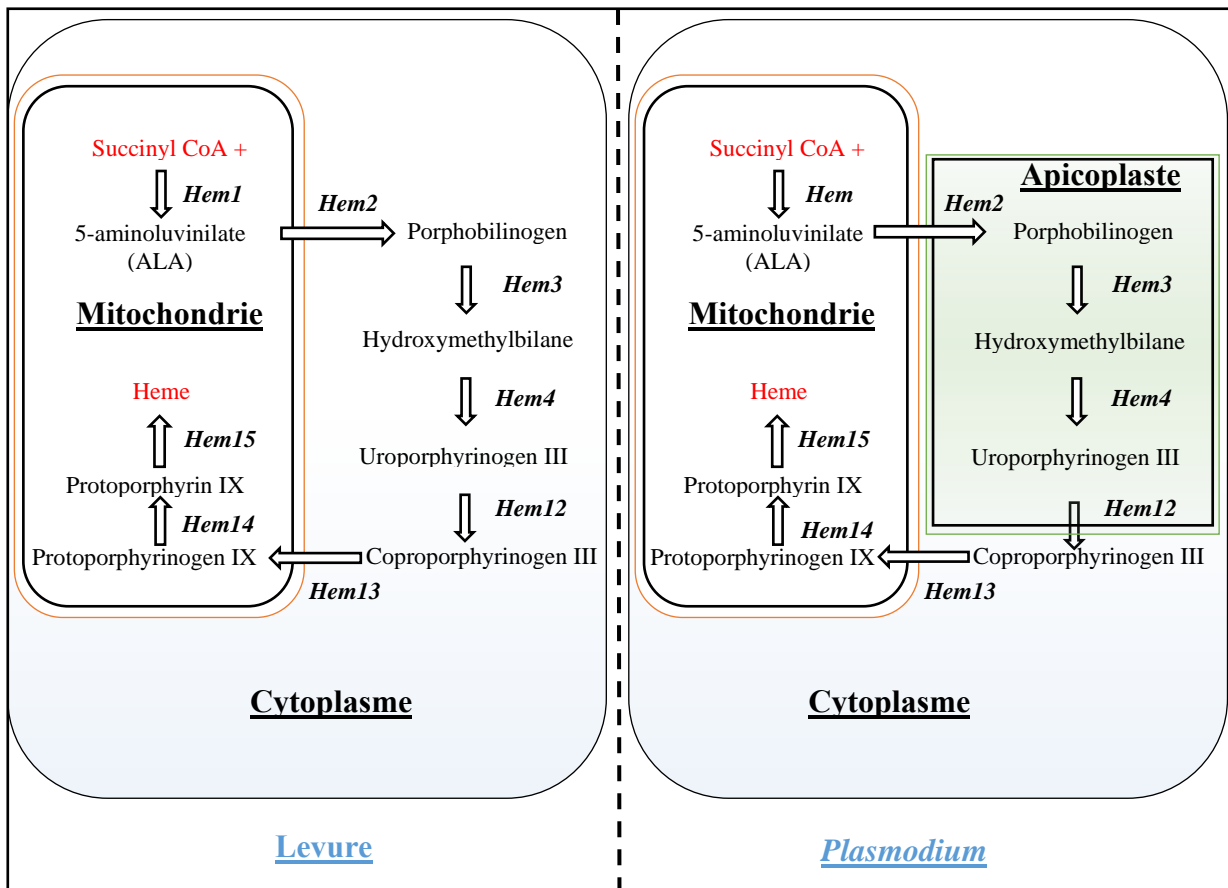


Figure v : Biosynthèse de l'hème chez la levure et le parasite. Hem1 : 5-aminolevulinatase synthase ; Hem2 : Aminolevulinatase déshydratase ; Hem3: Porphobilinogène déaminase ; Hem4: Uroporphyrinogène III synthase ; Hem12: Uroporphyrinogène III décarboxylase ; Hem13: Coproporphyrinogène III oxydase ; Hem14 : Protoporphyrinogène III oxydase ; Hem15 : Ferrochélatase.

A-2-4- La biosynthèse des phospholipides et des acides aminés chez la levure

Chez *S.cerevisiae*, la phosphatidylethanolamine (PE) et la cardiolipine (CL) sont synthétisés dans la membrane interne mitochondriale. La CL est spécifique de la mitochondrie et la PE contribue à hauteur de 40 % de la composition générale des phospholipides de la mitochondrie. Toutefois, la biosynthèse de ces deux phospholipides nécessite des précurseurs externes à la mitochondrie. Le précurseur de la biosynthèse de tous les phospholipides de la cellule est l'acide phosphatidique qui est synthétisé dans la membrane du réticulum endoplasmique. Il est le précurseur direct de la biosynthèse de la CL alors que celui de la PE est la phosphatidylserine (PS). La biosynthèse de ces deux phospholipides (CL et PE) n'est pas une fonction essentielle à la viabilité de la cellule. Cependant l'absence de la CL aurait un impact sur l'assemblage et le fonctionnement des complexes bc_1 et IV de la chaîne respiratoire. (Malina *et al.* 2018 ; Han 2013)

La biosynthèse des acides aminés a lieu principalement dans le cytosol de la cellule. Cependant, certains acides aminés ne sont synthétisés que dans la mitochondrie, par exemple l'isoleucine et la valine. Le précurseur principal de leur biosynthèse est le pyruvate.

La mitochondrie est également le fournisseur de la 2-isopropyl-malate et de l'ornithine qui servent respectivement de précurseurs pour la biosynthèse de leucine et d'arginine. (Malina *et al.* 2018)

A-2-5-La biosynthèse de l'ubiquinone (ou coenzyme Q)

L'ubiquinone ou coenzyme Q (CoQ) est un lipide essentiellement mitochondrial chez les cellules eucaryotes où il est impliqué dans le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire (voir plus haut). Il est constitué d'une partie "redox-active" ou quinone et d'une chaîne d'isoprènes dont la taille n peut différer d'une espèce à autre.

La levure a été un outil crucial pour identifier les différents acteurs de la biosynthèse du CoQ. Comme chez la plupart des eucaryotes, les principales étapes de la biosynthèse du CoQ ont lieu dans la mitochondrie. L'isoprenyl pyrophosphate (IPP) et l'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB) sont les deux précurseurs principaux (**Fig.vi**).

L'IPP (dont la synthèse peut avoir lieu à la fois dans la mitochondrie et le cytoplasme) est obtenu suite à une série de réactions. L'acétyl-CoA en est le précurseur principal (Lv *et al.* 2016). En condition de croissance respiratoire, la source principale de l'IPP est la mitochondrie. Quant au 4-HB, il provient principalement du métabolisme de la tyrosine ou du chorismate (Tran and Clarke 2007). L'IPP et le 4-HB rentrent ensuite dans un complexe de neuf enzymes (Coq1-9). Pour chaque molécule de CoQ synthétisée, une molécule de 4-HB est attachée à $n=6$ unités d'isoprènes chez la levure pour donner de l'acide 4-hydroxy-3-polyprenylbenzoïque ou 4-HHB. Cet intermédiaire rentre ensuite dans une série de réactions composées d'hydroxylation, de carboxylation, d'*O*-méthylation et de *C*-méthylation pour donner le produit final CoQ₆.

Chez le parasite *Plasmodium*, la biosynthèse du CoQ est une fonction essentielle (Bushell *et al.* 2017). L'origine des deux précurseurs de cette biosynthèse constitue actuellement un sujet de discussion.

Le précurseur 4-HB proviendrait principalement du chorismate. En effet, l'inhibition de la voie de biosynthèse du chorismate par du glyphosate entraîne une inhibition de la croissance chez le parasite. Cette inhibition de croissance peut être corrigée par l'ajout de l'acide

hydroxybenzoïque suggérant que cette inhibition de croissance est liée à l'incapacité du parasite à produire du CoQ. Il est difficile d'exclure la tyrosine comme source du 4-HB car, au stade sanguin, le parasite utilise principalement les acides aminés de l'hémoglobine (contenant de la tyrosine) comme source de carbone et d'énergie. Il a été montré, récemment que l'acide hydroxybenzoïque pourrait avoir une origine différente du chorismate et de la tyrosine. Une voie métabolique alternative dans la biosynthèse du précurseur 4-HB n'est donc pas à exclure chez le parasite (Valenciano *et al.* 2019).

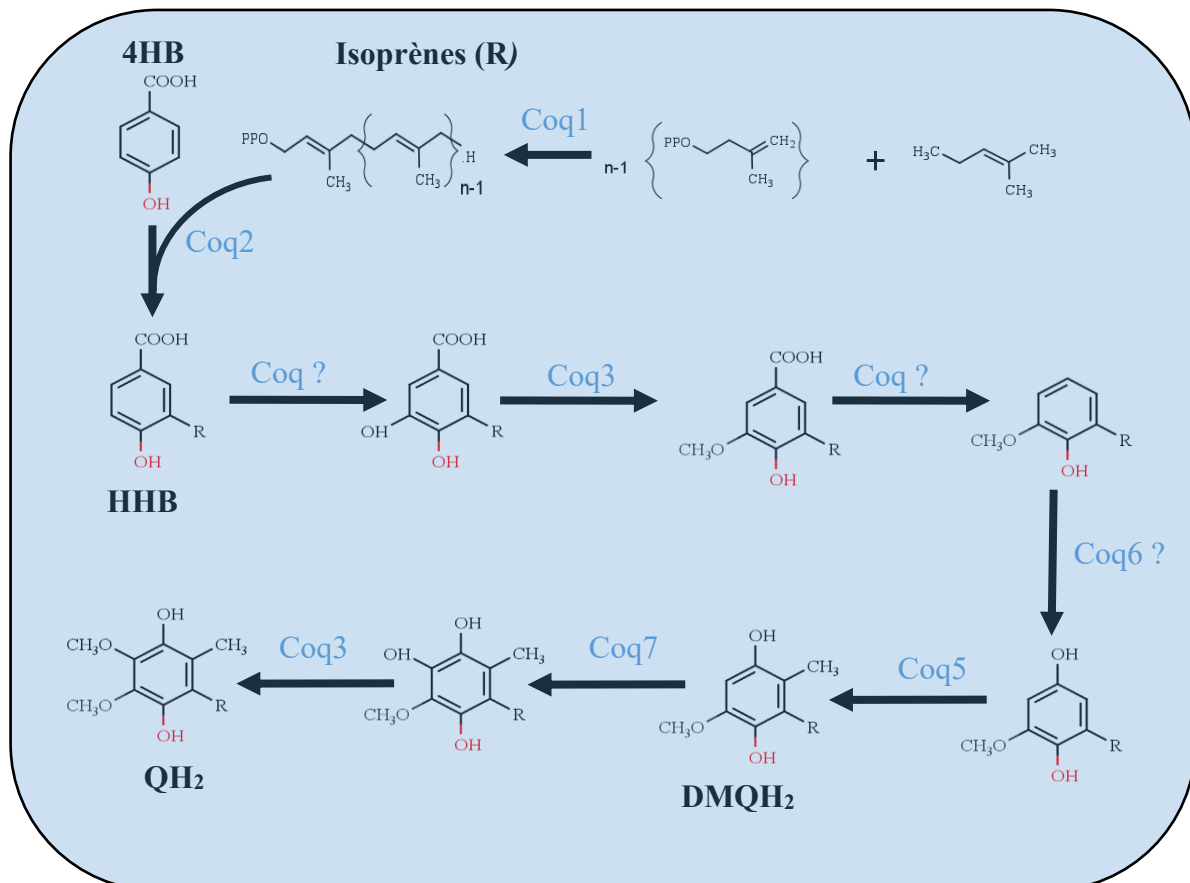


Figure vi : *Etapes de la biosynthèse de l'ubiquinone chez la levure* adapté selon Awad *et al.* 2018.

La biosynthèse de l'IPP est une des fonctions associées au métabolisme de l'apicoplaste (Guggisberg, Amthor, and Odom 2014). Il a été montré que la complémentation du milieu de culture par de l'IPP assure la croissance du parasite sans fonction apicoplastidique indiquant ainsi que la synthèse de l'IPP serait la raison d'existence de l'apicoplaste (Pala *et al.* 2018 ; Yeh and DeRisi 2011). Le mécanisme de transport de l'IPP vers la mitochondrie n'est pas encore bien compris.

Les composantes de la voie de biosynthèse du CoQ (COQ1-9) ont été identifiées et localisées dans la mitochondrie du parasite (Tonhosolo *et al.* 2005 ; Dooren *et al.* 2006). Ces protéines sont essentielles. Les étapes de la biosynthèse sont similaires à celles identifiées chez la levure.

Le parasite produirait un CoQ avec une chaîne constituée de huit et neuf isoprènes et il est incapable d'utiliser celui de l'homme (dix isoprènes). (De Macedo *et al.* 2002)

La biosynthèse du CoQ, particulièrement celle des précurseurs isoprenoides peut être une cible pour le développement des molécules antipaludiques. L'antibiotique fosmidomycine est un excellent inhibiteur de cette voie en ciblant les étapes situées dans l'apicoplaste (Guggisberg, Amthor, and Odom 2014). Pour ce qui concerne les étapes localisées dans la mitochondrie, il faudrait étudier les différences entre les enzymes de l'homme et du parasite pour s'assurer que des inhibiteurs spécifiques pourraient être développés.

B- Introduction à la problématique de la thèse

Le paludisme, ou la malaria, est une maladie infectieuse causant près d'un demi-million de décès par an selon l'OMS. Causée par le protozoaire apicomplexe *Plasmodium*, la maladie est transmise par la piqûre de la femelle du moustique *Anopheles gambiae*. Cinq espèces du genre *Plasmodium* sont responsables de la maladie chez l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale*.

En absence de vaccin, le traitement symptomatique reste la seule stratégie médicale pour faire face à la maladie. Depuis la purification et la caractérisation du premier antipaludique (quinine) en 1820, le nombre de molécules à activité antipaludique ne cesse de croître. Actuellement les molécules antipaludiques sur le marché sont classées en trois groupes : les quinoléines (chloroquine, méfloquine, primaquine..), les antifolates (atovaquone, proguanil...) et les endoperoxydes (artémisinine, artésunate, artemether, ...) (Eyasu 2015). Malheureusement, on assiste à de plus en plus de cas de résistance à ces molécules. Les cas de résistance les plus récents sont ceux observés avec les artémisinines.

Ces observations ont conduit l'OMS à considérer le développement de nouvelles molécules antipaludiques comme une urgence sanitaire, préconisant le développement de molécules qui ont des mécanismes d'action différents de celles sur le marché. Les recommandations de l'OMS priorisent le développement de molécules capables de bloquer la transmission du parasite, ce qui permettrait d'éradiquer la maladie. La primaquine est la seule molécule de ce type sur le marché actuellement. Malheureusement la primaquine provoque des effets secondaires sur des personnes souffrant d'une pathologie hémolytique liée à une déficience de l'activité enzymatique glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Cette pathologie, causée par diverses mutations du gène codant pour la G6PD, est très répandue dans les zones endémiques, contre-indiquant la primaquine dans ces zones (Recht *et al.* 2018).

La plasmodione est une nouvelle molécule antipaludique développée par l'équipe d'Elisabeth Davioud-Charvet (université de Strasbourg). La plasmodione bloque la transmission par son effet sur les gamétocytes, tout en restant non toxique pour l'homme (Tobias *et al.* 2011, Bielitz *et al.* 2015, Ehlrhadt *et al.* 2016) Le mécanisme d'action de la plasmodione n'est pas encore bien compris. Elle agirait par stress oxydant. Les gamétocytes sont particulièrement sensibles au stress oxydant. Ceci serait liée à la présence d'importants réseaux mitochondriaux et d'une fonction mitochondriale très active. La mitochondrie, en effet, est un important acteur dans le stress oxydant.

La mitochondrie est aussi la cible de l'antipaludique atovaquone utilisé en combinaison avec le proguanil et commercialisé sous le nom de Malarone[®]. Très efficace dans la prévention et le traitement du paludisme, le Malarone[®] est principalement utilisé dans les pays développés en raison de son coût élevé. Son efficacité est liée à l'interaction synergique de ses deux composantes (atovaquone et proguanil). Le mécanisme exact de cette synergie n'est pas encore connu. Mais la fonction mitochondriale doit y jouer un rôle clé. Le mode d'action de l'atovaquone est bien connu, comme nous l'avons vu dans l'introduction générale. C'est un inhibiteur spécifique du complexe bc_1 de la chaîne respiratoire. Le mécanisme d'action du proguanil par contre n'est pas encore compris. Tout porte à penser qu'il cible la mitochondrie.

La fonction mitochondriale semble donc être un élément clé dans les modes d'action de la plasmodione et du proguanil que j'ai étudié dans ce travail de thèse.

Pour cette étude, j'ai utilisé la levure comme organisme modèle.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un microorganisme unicellulaire de type ascomycète. Premier eucaryote dont le génome a été complètement séquencé et annoté, elle a permis d'identifier différents acteurs cellulaires chez les autres organismes. De nombreuses techniques biochimiques et génétiques (extraction de mitochondries, préparation de protéines totales cellulaires, hybridation des protéines, modification de l'ADN mitochondrial...) ont été développées avec la levure. L'efficacité de la recombinaison homologue chez la levure permet de réaliser facilement les constructions génétiques.

Cet organisme a permis de faire de grandes avancées dans la compréhension de la fonction respiratoire. En effet, une des particularités de la levure est sa capacité à produire l'énergie nécessaire à sa survie et à sa prolifération par la respiration mais également par la fermentation. De ce fait, elle reste viable sur milieu fermentescible en l'absence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle. L'absence ou l'inhibition d'une ou plusieurs enzymes de cette chaîne n'est donc pas létale pour la levure. Il existe différents types de mutants respiratoires. Les mutations peuvent concerner soit le génome mitochondrial : les mutants mit^- (mutations ponctuelles) et ρ^-/ρ^0 (grandes délétions/perte totale de l'ADN mitochondrial) soit le génome nucléaire les mutants pet^- . De plus les techniques de préparation de mitochondries sont bien rôdées. Par contre, l'obtention de mitochondries de qualité et quantité suffisantes pour des analyses biochimiques n'est pas chose aisée chez *Plasmodium*. De même, les outils génétiques disponibles chez la levure sont bien plus difficiles à utiliser chez le parasite.

Pour toutes ces raisons, la levure est un excellent outil dans l'étude du mécanisme d'action de molécules antimicrobiens ciblant la mitochondrie.

**Chapitre I : Etude du mécanisme d'action de la
plasmodione en utilisant la levure comme organisme
modèle**

Introduction du chapitre

Le cycle de vie du parasite responsable du paludisme est marqué par de nombreuses différenciations aboutissant à différentes formes de cellules (**Fig. vii**). Cette complexité dans la physiologie de ce microorganisme est un problème majeur dans le développement des molécules antipaludiques notamment celles capables de cibler à la fois le stade sanguin (érythrocytaire) et sexuel (gamétocytes). Le développement de ce type de médicament a été présenté comme priorité majeure dans les recommandations de l’OMS sur l’éradication du paludisme.

La plasmodione ou 3-[4- (trifluorométhyl)benzyl]-menadione, est une nouvelle molécule synthétisée par le groupe d’Elisabeth Davioud-Charvet (Université de Strasbourg). C’est un puissant inhibiteur de la prolifération de *P. falciparum* qui cible à la fois le stade érythrocytaire et sexuel du parasite (Ehrhardt *et al.* 2016). Des travaux réalisés *in vitro* ont montré que la plasmodione agirait *via* un stress oxydant (Ehrhardt *et al.* 2013). Cependant les acteurs cellulaires intervenant dans son mécanisme d’action ne sont pas encore identifiés. La compréhension du mode d’action permettrait non seulement d’optimiser son efficacité mais aussi de prévoir des potentiels mécanismes de résistance.

Dans ce travail, j’ai utilisé la levure comme organisme modèle pour identifier des acteurs intervenant dans le mécanisme d’action de la plasmodione.

Dans un premier temps (**chapitre I-1**), j’ai étudié le rôle d’enzymes candidates, choisies principalement sur la base de données publiées. Dans un second temps (**chapitre I-2**), j’ai utilisé une approche sans *a priori* pour identifier d’autres acteurs. J’ai sélectionné des mutants de résistance à la plasmodione et identifié les mutations de résistance.

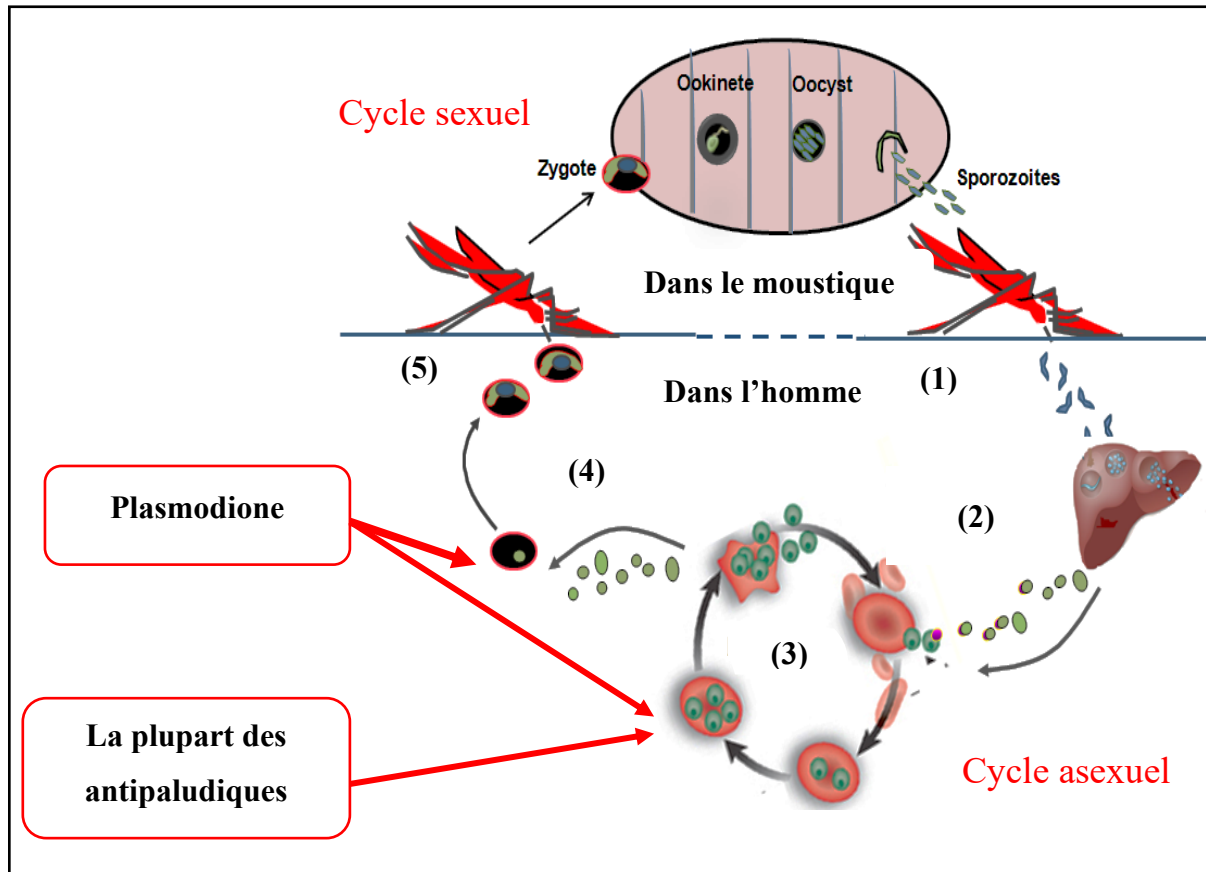


Figure vii : *Cycle de vie du parasite P. falciparum et molécules antipaludiques* adapté selon (Sharma and Awasthi 2015). Lors du repas sanguin de la femelle du moustique *Anopheles gambiae*, les parasites haploïdes ou sporozoïtes sont transmis à l'homme (1). Les sporozoïtes passent ensuite dans le foie. Dans les cellules hépatiques, ils se transforment en shizontes adultes avant de se retrouver dans le sang sous forme de mérozoïtes (2). Dans le sang, le mérozoïte se transforme en trophozoïte et se multiplie intensément. La multiplication des trophozoïtes aboutit à des mérozoïtes qui sont libérés par éclatement des globules rouges. Ces mérozoïtes peuvent ainsi recommencer le cycle. (3). Certains trophozoïtes vont se différencier en cellule sexuelle (mâle et femelle) (4) qui sont transmis au moustique lors de son repas sanguin (5). A l'intérieur du moustique, la fécondation des cellules sexuelles aboutit aux zygotes diploïdes. Les zygotes, en passant par des ookinètes, vont donner des oocystes. Chaque oocyte, par méiose, donne quatre sporozoïtes qui sont retransmis à l'homme et le cycle continue.

**Chapitre I-1 : Etude du mécanisme d'action de la
plasmodione étudié chez la levure : approche
'enzymes candidates'**

Introduction

La plasmodione est une ménadione substituée dont la structure est similaire à celle de l'atovaquone qui cible la fonction mitochondriale en inhibant le complexe bc_1 de la chaîne respiratoire.

En raison de la ressemblance structurale de ces deux molécules, il avait été suggéré que la plasmodione serait aussi un inhibiteur du complexe bc_1 . Cependant les premières études sur le parasite ont montré que la plasmodione avait un mode d'action différent (Ehrhardt *et al.* 2013). Des études *in vitro* ont montré que la glutathion réductase du parasite (GR), une flavoenzyme qui utilise du NADPH pour réduire le disulfure de glutathion, pourrait jouer un rôle crucial dans son mécanisme d'action. Suite à ces travaux, un modèle de mécanisme d'action de la plasmodione ((**Fig. viii**) a été proposé (Tobias *et al.* 2011). Il est repris en détail dans l'article publié présenté dans les pages suivantes.

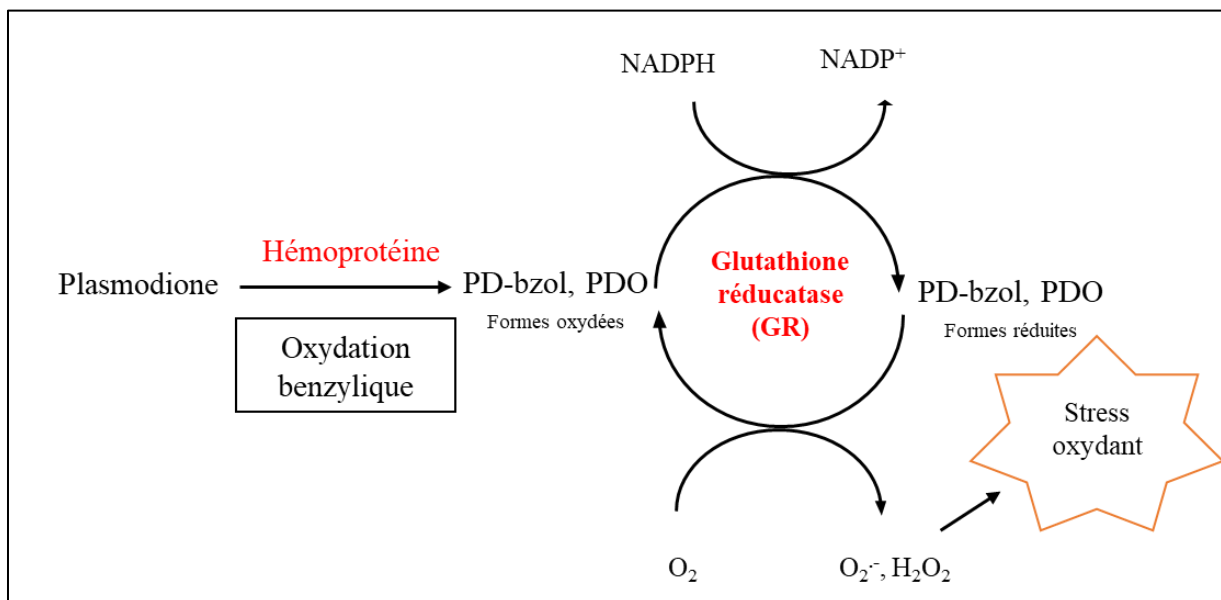


Figure viii : *Mode d'action de la plasmodione, modèle simplifié*. Un modèle détaillé est présenté dans l'article. PD-bzol, benzhydrol; PDO, 3-benzoylmenadione.

Des études *in vivo*, chez le parasite, ont montré que la GR ne serait pas le seul acteur (E.Davioud-Charvet et S. Blandin, communication personnelle). D'autres flavoenzymes pourraient intervenir et jouer le rôle de la GR dans le modèle proposé. Qu'elles sont-elles ? D'autres questions soulevées par le modèle proposé nécessitent aussi des réponses : Quels pourraient être les acteurs de l'oxydation benzylique de la plasmodione ? Quels sont les effets des métabolites potentiels (PDO et PD-bzol) ? Comment pourraient-ils intervenir dans l'activité de la plasmodione ? Ces questions ont fait l'objet d'études chez le parasite (Feng *et al.* 2018). J'ai tenté ici d'apporter des éléments de réponse en utilisant le modèle levure. L'approche

utilisée est principalement génétique. J'ai utilisé différentes souches mutantes : délétion et surexpression de gènes. J'ai testé l'effet de ces mutations sur la sensibilité de la croissance à la plasmodione et à ses métabolites potentiels. J'ai ensuite analysé des activités enzymatiques.

Les résultats obtenus avec la levure ont montré que la plasmodione est un inhibiteur de la croissance respiratoire de la levure et qu'elle agit *via* un stress oxydant. Les flavoenzymes NADH-déshydrogénases (NDHs) jouent un rôle important dans son mécanisme d'action. Ces enzymes utilisent les métabolites potentiels de la plasmodione, PDO et PD-bzol, comme substrat. Leur réduction résulte en la production des ROS, qui vraisemblablement conduit à l'arrêt de croissance. Les tests de croissance ont montré que le niveau des NDHs module la sensibilité des cellules à la plasmodione. Or la plasmodione est un mauvais substrat de ces flavoenzymes. Ceci suggère que la plasmodione serait transformée en métabolites (PDO et/ou PD-bzol) substrats des NDHs qui seraient responsables de l'inhibition de la croissance induite par la plasmodione. Si le rôle de ces métabolites potentiels semble être clair dans le mécanisme d'action de la plasmodione, le mécanisme d'oxydation de la plasmodione en ces métabolites n'est pas encore compris.

Les résultats de cette première étude ont été publiés dans le journal *Free radical Biology and Medicine* (FRBM) et sont détaillés dans le pré-print ci-dessous.

Article publié: *Investigating the mode of action of the redox-active antimalarial drug plasmodione using the yeast model*

Authors : Pierre Mounkoro¹, Thomas Michel¹, Stéphanie Blandin², Marie-Pierre Golinelli-Cohen³, Elisabeth Davioud-Charvet⁴ & Brigitte Meunier¹

Affiliation

¹ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

² Université de Strasbourg, CNRS, Inserm, UPR9022/U1257, Mosquito Immune Responses (MIR), F-67000 Strasbourg, France

³ Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), CNRS, UPR 2301, Univ. Paris-Sud Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

⁴ Université de Strasbourg, Université de Haute-Alsace, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), LIMA-UMR 7042, Team Bioorganic and Medicinal Chemistry, ECPM 25 Rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France.

Corresponding author: Brigitte Meunier, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), avenue de la Terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France; brigitte.meunier@i2bc.paris-saclay.fr

- *Free Radical Biology and Medicine*, DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.026](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.026)

Keywords: antimalarial drug, oxidative stress, mitochondrial respiratory chain, drug mode of action, yeast model

Summary

Malaria is caused by protozoan parasites and remains a major public health issue in subtropical areas. Plasmodione (3-[4-(trifluoromethyl)benzyl]-menadione) is a novel early lead compound displaying fast-acting antimalarial activity. Treatment with this redox active compound disrupts the redox balance of parasite-infected red blood cells. *In vitro*, the benzoyl analogue of plasmodione can act as a subversive substrate of the parasite flavoprotein NADPH-dependent glutathione reductase, initiating a redox cycling process producing ROS. Whether this is also true *in vivo* remains to be investigated. Here, we used the yeast model to investigate the mode of action of plasmodione and uncover enzymes and pathways involved in its activity. We showed that plasmodione is a potent inhibitor of yeast respiratory growth, that in drug-treated cells, the ROS-sensitive aconitase was impaired and that cells with a lower oxidative stress

defence were highly sensitive to the drug, indicating that plasmodione may act *via* an oxidative stress.

We found that the mitochondrial respiratory chain flavoprotein NADH-dehydrogenases play a key role in plasmodione activity. Plasmodione and metabolites act as substrates of these enzymes, the reaction resulting in ROS production. This in turn would damage ROS-sensitive enzymes leading to growth arrest. Our data further suggest that plasmodione is a pro-drug whose activity is mainly mediated by its benzhydrol and benzoyl metabolites. Our results in yeast are coherent with existing data obtained *in vitro* and in *Plasmodium falciparum*, and provide additional hypotheses that should be investigated in parasites.

Introduction

Malaria is a mosquito-borne infectious disease caused by unicellular eukaryotic parasites of the genus *Plasmodium*. Among the five species known to infect humans, *P. falciparum* is responsible for the most severe forms of the disease, and *P. falciparum* and *P. vivax* are the most frequently encountered worldwide. *Plasmodium* parasites have a complex life cycle with different development stages that are adapted to their two hosts. In the human host, parasites mostly undergo asexual multiplication in red blood cells causing typical malaria symptoms, while a fraction of them differentiate in gametocytes that are the only forms able to infect female Anopheles mosquitoes upon a blood meal. Most drugs currently on the market target the symptomatic asexual forms, however an increasing effort is now focused on the transmissible forms aiming at malaria control and elimination. Of note, parasites have developed resistances to virtually all drugs used thus far to treat malaria, including to the most efficient drug artemisinin, underlying the need to find new drugs with different modes of action.

Plasmodione (PD) is a 3-[4-(trifluoromethyl)benzyl]-menadione active against asexual blood stages and early gametocytes [1-2]. PD kills parasites as fast as artemisinin, is effective on a large variety of drug-resistant parasites, and has demonstrated a low potential to generate genetic resistance [2]. Despite chemical similarity to atovaquone, PD does not target the same mitochondrial protein. Indeed transgenic parasites expressing the yeast dihydroorotate dehydrogenase, which uses fumarate instead of ubiquinone as electron acceptor and therefore renders the *bc*₁ complex activity dispensable for parasite proliferation [3], presented unchanged sensitivity to plasmodione whereas they were highly resistant to the *bc*₁ complex inhibitor atovaquone [4].

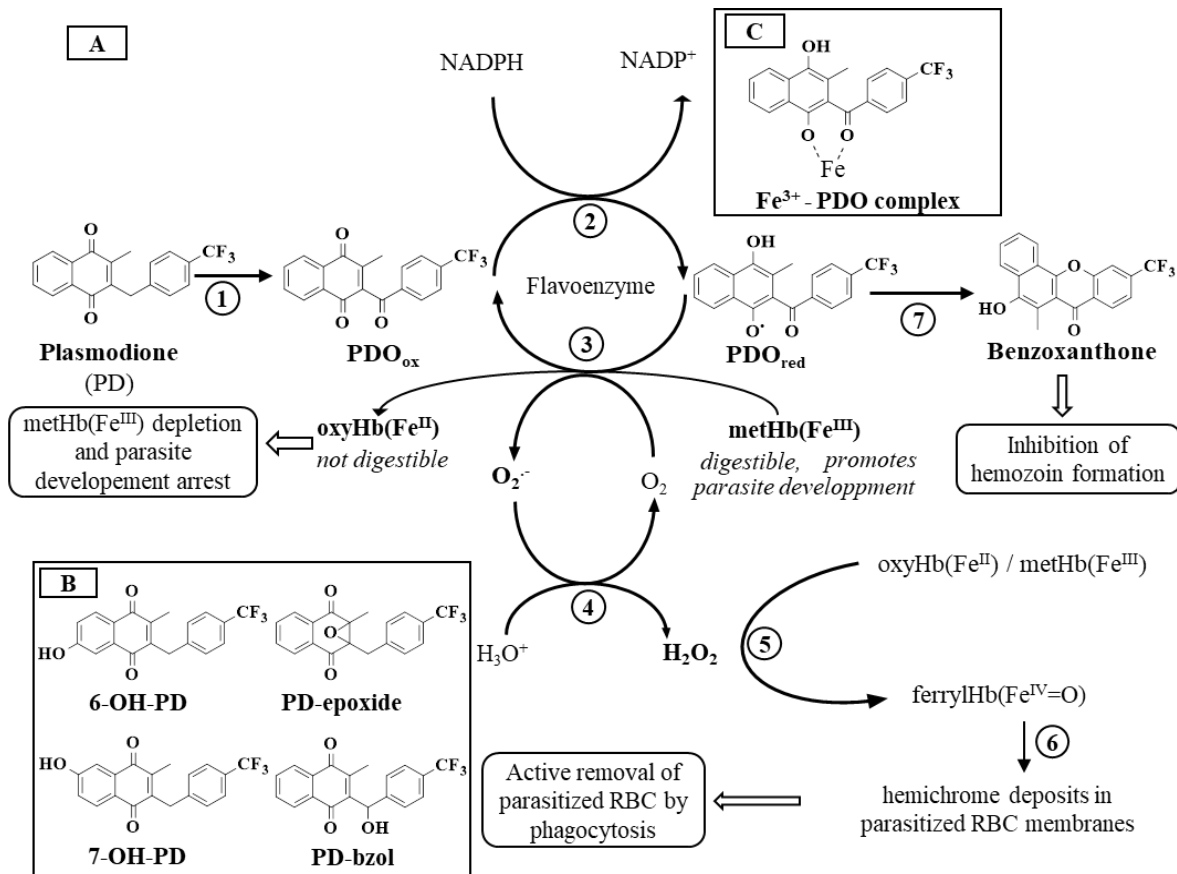


Figure 1: (A) Model for plasmodione mode of action in parasitized red blood cells (adapted from [5]). (Step 1) The benzylic oxidation of plasmodione (PD) generates the 3-benzoylmenadiione metabolite (PDO_{ox}), a reaction likely catalysed by free or protein-bound hemes in the parasite. (Step 2) PDO_{ox} acts as a subversive substrate of a flavoenzyme and is reduced through the consumption of NAD(P)H, generating PDO_{red} . (Step 3) Then, PDO_{red} transfers an electron to methemoglobin ($\text{metHb}(\text{Fe}^{\text{III}})$), the major form of hemoglobin in the parasite acidic vacuole, or to O_2 leading to high rate of production of superoxide radical anions. (Step 4) At acidic pH typically found in the parasite food vacuole (H_3O^+), these radicals dismutate spontaneously to hydrogen peroxide (H_2O_2) [47]. (Step 5) The continuous NAD(P)H consumption in the presence of oxygen in the course of the redox-cycling produces a steady flux of hydrogen peroxide, which reacts with $\text{oxyHb}(\text{Fe}^{\text{II}})$ and $\text{metHb}(\text{Fe}^{\text{III}})$ to generate ferrylHb($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) leading to (Step 6) hemichrome deposits specifically in membranes of ring-infected red blood cells (iRBCs). Elevation of hemichrome, a known marker for RBC aging, increases their removal by macrophage phagocytosis [48]. (Step 7) In the parasite, an oxidative phenolic coupling reaction from PDO_{red} might generate a benzoxanthone derivative that was shown to inhibit hemozoin formation both in a spectrophotometric assay coupled to mass spectrometry and in parasitized RBC [5]. Note that in normal RBCs, where oxyhemoglobin ($\text{oxyHb}(\text{Fe}^{\text{II}})$) is the major protein, autooxidation and superoxide production occur slowly in the 3 months-life time of RBCs. In *Plasmodium*-parasitized RBC, $\text{oxyHb}(\text{Fe}^{\text{II}})$ from the host is uptaken by the parasite and quickly oxidized into $\text{metHb}(\text{Fe}^{\text{III}})$ in the acidic food vacuole. $\text{MetHb}(\text{Fe}^{\text{III}})$ is digested faster than $\text{oxyHb}(\text{Fe}^{\text{II}})$ by the parasite proteases [49] and is thus its main nutrient source. Consequently, the reduction of $\text{metHb}(\text{Fe}^{\text{III}})$ to $\text{oxyHb}(\text{Fe}^{\text{II}})$ by PDO_{red} (Step 3) is expected to slow down the parasite growth rate by food deprivation [1,5], and also to improve O_2 transport by iRBCs. (B) Chemical structures of four others putative plasmodione metabolites. (C) Reduced PDO presenting an iron (III) chelation site.

Plasmodione is a redox-active agent that disturbs the redox balance of the parasitized red blood cells [5]. Its mode of action (Fig.1A) was proposed to start with the benzylic oxidation of PD to form PDO (3-benzoylmenadione) by a mechanism yet to be elucidated. Benzylic oxidation can be catalysed by CYP450s and by free or protein-bound hemes *via* ferryl species (see for instance, [6-9]). Moreover numerous hemoproteins (including hemoglobin) can oxidize drugs [10]. While CYP450s are absent from *Plasmodium* and red blood cells, free heme and hemoproteins are abundant in infected erythrocytes and could mediate benzylic oxidation of PD to PDO. In addition, we previously proposed that in the presence of redox-cyclers, *P. falciparum*-infected erythrocytes could be electrochemically active, generating/transporting oxidized and reduced charged naphthoquinone species in different compartments, the anodic one for oxidation reactions (acidic vesicle/food vacuole network), and the cathodic one for reduction reactions (cytosol), possibly *via* iron complexation [1,11]. This particular situation is comparable to an electrochemical cell where the electrolytic milieu contains Fe^{II} and potentials values at the electrodes are at a scale that could be appropriate for plasmodione bioactivation, metabolite electrosynthesis and/or transport through membranes.

The PD metabolite PDO can act as a subversive substrate of flavoprotein(s), such as the parasite and/or human NADPH-dependent glutathione reductases [1]. *In vitro*, PDO is able to cycle with the parasite NADPH-dependent glutathione reductase and methemoglobin (metHb(Fe^{III})) [1,5]. *In vivo*, this continuous redox-cycle consuming NADPH and preventing the recycling of oxidised glutathione into reduced glutathione, would ultimately disturb the redox homeostasis of the parasitized red blood cells and lead to parasite death. Still, the nature of the *in vivo* target(s) of PD/PDO is not known and it cannot be excluded that other flavoenzymes are involved in this process, depending of the parasite life cycle stage.

The fact that PD has a strong and specific activity on infected erythrocytes, including hemichrome deposition on the surface of infected cells, suggests that its bioactivation and/or its redox cycling selectively occur in *P. falciparum*-parasitized red blood cells and not in normal cells. Several hypotheses could explain the specificity of PD towards infected erythrocytes, for instance: (1) a higher rate of benzylic oxidation in the metHb(Fe^{III})-digesting parasitic stages, (2) large amounts of metHb(Fe^{III}) accepting the electrons from PDO_{red} and contributing to much higher redox-cycling turnover (3) the presence of acidic vesicles and food vacuole in infected cells promoting ferrylhemoglobin formation upon superoxide dismutation.

Saccharomyces cerevisiae provides valuable genetic and biochemical tools and has proven to be instrumental for drug discovery, identification of drug targets or modeling mutations in human diseases (see for instance [12-14]). In this study, we used this yeast model to investigate the mechanism of action of PD and to identify enzymes and pathways that are involved in its redox-based activity.

Materials and Methods

Growth media and yeast strains

The following growth media were used: YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glucose), YPEth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% ethanol), YPGal (1% yeast extract, 2% peptone, 0.2% glucose, 2% galactose), YP10 (1% yeast extract, 2% peptone, 10% glucose), CSM medium (0.7% yeast nitrogen base, 2% glucose, 2% agar and 0.8 g/l of a complete supplement mixture minus uracil) supplied by Bio 101 (San Diego, CA, USA).

Two series of yeast strains were used for the growth assays: 1) BY4742 (α , *his3*, *leu2*, *lys2*, *ura3*) and its derived isogenic deletion strains were from Euroscarf (Frankfurt, Germany); 2) AD1-9 that lacks several membrane transporters (α , *ura3*, *his1*, Δ *yor1*, Δ *snq2*, Δ *pdr5*, Δ *pdr10*, Δ *pdr11*, Δ *ycf1*, Δ *pdr3*, Δ *pdr15*, Δ *pdr1*) was kindly provided by M. Ghislain, UCL, Belgium. From AD1-9, deletion and over-expressing mutants were constructed, respectively, by PCR-based deletion or by transformation with a multi-copy plasmid (yEP352) containing the genes of interest under the control of their own promoter.

Growth assays- drug sensibility test

Drug sensitivity was assessed by monitoring the inhibition of yeast cell proliferation. Yeast were grown in 5 mL culture medium YP10 or YPEth with increasing concentrations of drugs. Cultures were inoculated at an OD_{600nm} of 0.2 and incubated at 28°C with (YPEth) or without (YP10) vigorous shaking for three days. OD_{600 nm} were then measured. Data are presented for each strain and culture condition as the percentage of growth relative to control, *i.e.* untreated by drugs. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. The final OD_{600nm} of the untreated cultures of WT and mutant strains were similar.

Measurement of the components of the respiratory chain in yeast mitochondria.

Mitochondria were prepared as in [15]. Protein concentration was determined by Bradford method. *bc*₁ complex concentration was determined from dithionite-reduced optical spectra, using $\epsilon=28.5 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ at 562 nm minus 575 nm. Activity measurements were performed at

room temperature. The measurements were repeated at least twice and averaged. IC₅₀ values or mid-point inhibitor concentrations (inhibitor concentration required to obtain 50% inhibition of the activity) were determined by inhibitor titration.

O₂ consumption activities (NADH-oxidase) were measured using a Clark-type oxygen electrode. Mitochondria were added at around 18 µg of protein to 1 mL 0.7 M sorbitol, 50 mM potassium phosphate pH 7.5, 0.2 mM EDTA. Oxygen uptake activity was initiated by the addition of 0.8 mM NADH.

NADH dehydrogenase activities were measured by monitoring the rate of oxidation of NADH at 340 nm over a 1 to 5 min time-course. Measurements were performed in 1 mL of 10 mM potassium phosphate pH 7, 0.01% lauryl maltoside, 200 µM NADH and 2 mM KCN. Mitochondria were added at 60 to 240 µg of protein per mL. The reaction was initiated by the addition 25-100 µM quinone or other electron acceptors.

*bc*₁ complex activities were determined by measuring the reduction of cytochrome c (final concentration of 20 µM) at 550-540 nm over 1-min time-course in 1 mL of 10 mM potassium phosphate pH 7, 0.01% (w/v) lauryl-maltoside and 1 mM KCN. Mitochondria were added to obtain a final concentration of around 2 nM *bc*₁ complex. The reaction was initiated by the addition of 20 µM decylubiquinone and initial rates were measured. Activities are presented as the cytochrome c reduction rate per *bc*₁ complex.

Aconitase and fumarase measurement using yeast cell extracts

The aconitase and fumarase activities were determined spectrophotometrically by monitoring the formation of cis-aconitate and fumarate at 240 nm and 25°C as described [16]. Briefly, cell extracts were prepared from 2.10⁸ cells grown on YPGal, by glass bead breakage, aliquoted and frozen immediately in liquid nitrogen. The aconitase activities were measured in 50 mM potassium phosphate pH 7.4, 30 mM sodium isocitrate, 0.6 mM MnCl₂. The fumarase activities were measured in 50 mM potassium phosphate, pH 7.4, 50 mM L-malic acid. Cell extracts were added at 150-250 µg of protein for a final volume of 1 mL. The absorbance changes were measured for 5-10 min, and the activity was calculated from the slope of the linear portion using $\epsilon = 3.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for cis-aconitate and $2.44 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for fumarate.

Aconitase measurement using porcine mitochondrial aconitase

210 mg of mitochondrial aconitase from porcine heart (Sigma) was dissolved in 20 mM HEPES pH 7.4 and loaded on a Hi Screen Capto Q ImpRes column (GE Healthcare). Proteins were

eluted with a linear NaCl gradient (0–1 M). Fractions containing aconitase were pooled and concentrated on a Vivaspin 30K concentrator (Sartorius). Aconitase was reactivated by incubation for 1h at room temperature under anaerobic conditions in a glove box (Jacomex, O₂<9 ppm) with 5X-Mohr's salt and Na₂S and loaded on a NAP-5 gel filtration column (GE Healthcare) equilibrated with 10 mM Hepes pH 7.4, 40 mM KCl and 3 mM MgCl₂. Aconitase activity was measured in degazed 100 mM Tris–HCl pH 7.4, 20 mM cis-aconitate at 37°C. The absorbance changes were measured for 15 min, and the activity was calculated from the slope of the linear portion using $\epsilon_{240} = 3.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The specific activity of purified mitochondrial aconitase was of 2334 U.μg⁻¹.

Results

Effect of PD on yeast growth and respiratory function.

We first tested whether PD, a potent inhibitor of *Plasmodium* proliferation, could inhibit yeast growth in respiratory and fermentative conditions. For this, we used strain AD1-9 that lacks several membrane transporters, which renders the cells more sensitive to compounds as previously shown for atovaquone and other anti-malaria drugs [17,18]. We also compared the inhibitory activity of PD to that of artesunate (ART), currently the most active antimalarial drug. Yeast respiratory growth was inhibited by both PD and ART at low μM concentrations (Fig.2A). However, in contrast to ART, PD had no effect on the fermentative growth up to 80 μM.

We then checked whether the respiratory growth inhibition could be caused by the disruption of the respiratory activity. To that end, we monitored the effect of PD treatment on cell O₂ consumption in the presence or absence of the uncoupling agent carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) at 20 μM. CCCP releases the respiratory chain activity from the control of the mitochondrial membrane potential. Cells, pre-grown in respiratory medium, were incubated for 24h in respiratory medium with a dose of PD that fully abolished growth. The O₂ consumption rate of the PD-treated and untreated cells was then monitored and compared in the presence or absence of CCCP (Fig.2B). As expected, in untreated cells, the addition of CCCP resulted a 2-fold increase of the O₂ consumption rate. PD treatment mildly decreased O₂ consumption rate and did not abolish the 2-fold increase in rate upon CCCP addition. These results indicated that PD treatment did not severely impair the respiratory function, even at a concentration where the respiratory growth was completely blocked. By comparison, treatment with an inhibitory dose of ART resulted in a significant decrease in O₂

consumption and a complete loss of the response to CCCP, suggesting that the mitochondrial membrane was impaired. This is in agreement with previous reports [19,20] and with the severe loss of viability we observed in cell cultures treated with ART (less than 15% viable cells). By contrast, PD-treatment did not impair yeast survival.

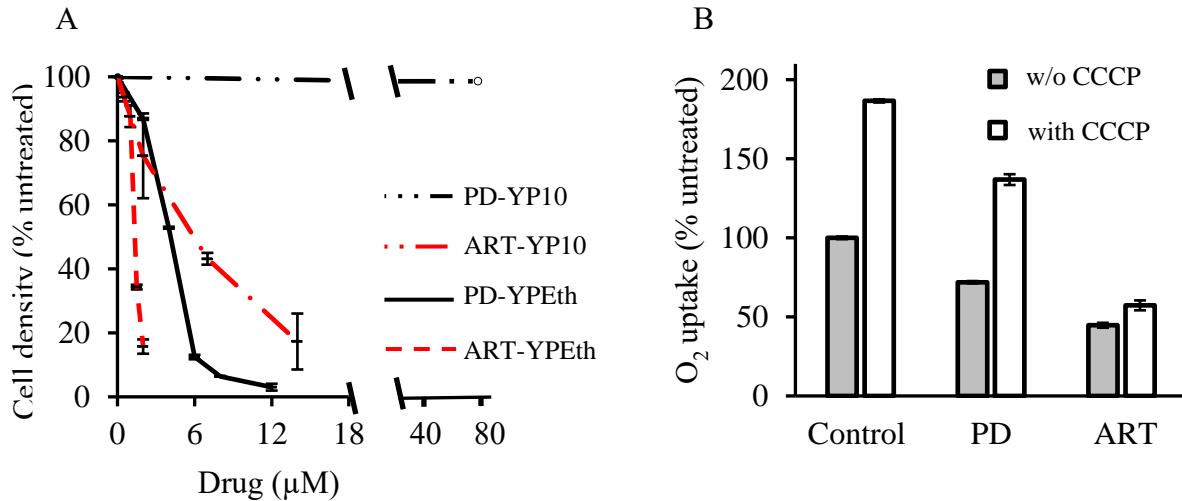


Figure 2: Effect of plasmodione (PD) and artesunate (ART) on yeast growth and respiration. (A) Effect on respiration- and fermentation-supported growth. Yeast AD1-9 cells freshly grown on YPD plates were inoculated in respiratory medium YPEth or in fermentative medium YP10 with increasing concentrations of PD or ART at an initial OD_{600nm} of 0.2. The cultures were incubated three days at 28°C with vigorous agitation for YPEth and without agitation for YP10 cultures. The OD_{600nm} were then recorded. For each growth condition, YP10 or YPEth, the data are presented as percentage of the OD_{600nm} of the untreated cultures. The growth experiments were repeated at least twice and the data averaged. Error bars represent standard deviation. (B) Effect of PD and ART treatment on cell O₂ consumption. Cells were grown for 24h in respiratory medium YPEth to an OD_{600nm} of around 5, and then incubated for another 24h in YPEth without inhibitor (control) or with 30 µM of PD or 6 µM of ART. The cells were then harvested. O₂ consumption rates with 20 µM CCCP (with CCCP) and without (w/o CCCP) were recorded. The data, normalised per OD_{600nm}, are presented as % of control rates (rates without CCCP of untreated cells). Each measurement was repeated at least three times and averaged. Error bars represent standard deviation.

PD action via oxidative stress

As the inhibition of respiratory growth by PD could not be explained by an impaired respiratory function, we then checked whether PD inhibitory action could be caused, at least in part, by the generation of an intracellular oxidative stress.

First, we monitored the effect of the absence of key enzymes of the oxidative stress defence, namely the superoxide dismutases Sod1 and Sod2 and the catalase Ctt1, on the sensitivity of the respiratory growth to PD (Fig.3A). We compared four strains from the BY4742 series: control, Δ sod1, Δ sod2 and Δ ctt1. The BY4742 control strain is resistant to PD because,

contrarily to AD1-9, the cells contain a full set of membrane transporters that are very active in pumping out exogenous compounds. Still, the deletion of *SOD2*, and, to a lesser extent of *SOD1* and *CTT1*, rendered the cells sensitive to PD. This clearly indicates that PD growth inhibitory activity is highly exacerbated in cells with lower oxidative stress defence, and thus that PD could act, at least in part, via the generation of oxidative stress. This is coherent with previous data showing a more oxidizing glutathione-dependent redox potential in intact living parasites treated with PD [5]. As a comparison, we observed that deletions of $\Delta SOD1$, *SOD2* and *CTT1* had no or minor effect on the sensitivity to ART in the same conditions (not shown).

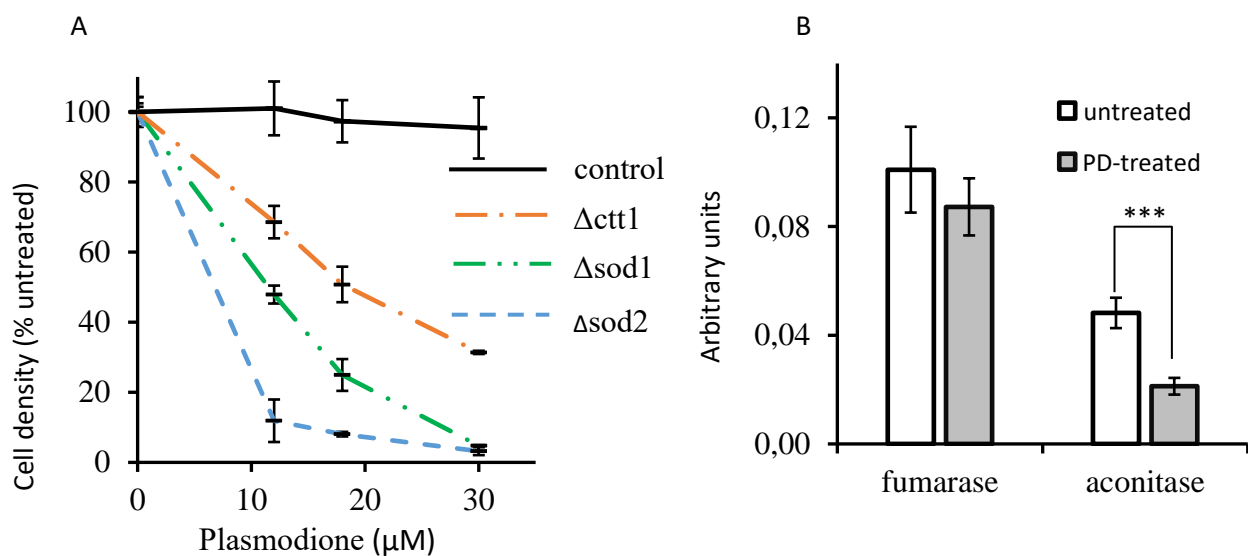


Figure 3: Effect of plasmodione (PD) on the respiratory growth of yeast mutants with lower oxidative stress defence and on the activity of the oxidative stress marker aconitase. Effect of deletion of oxidative stress defence genes on the sensitivity of respiratory growth to PD. Control and mutant $\Delta sod1$, $\Delta sod2$ and $\Delta ctt1$ strains were grown in YPEth medium with various concentrations of PD. $OD_{600\text{nm}}$ were measured after three days. For each strain, the data are presented as percentage of the $OD_{600\text{nm}}$ of the untreated culture. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. Error bars represent standard deviation. (B) Effect of PD treatment on aconitase and fumarase activities. The activities were assessed spectrophotometrically at 240 nm. Total cell extracts were obtained from a one day culture in YPGal with or without 12 μM PD. The reaction was started by addition of the cell extracts to potassium phosphate buffer containing isocitrate as substrate for the aconitase or malate as substrate for the fumarase. Values represent the averages of five experiments, and error bars, standard deviation. ***, $p < 0.001$ according to two-tailed Student's t test.

Second, we tested the effect of PD treatment on aconitase activity. This enzyme of the tricarboxylic acid (TCA) cycle is located in the mitochondrial matrix and contains a [4Fe-4S] (Fe-S) cluster that is exposed to solvent and easily damaged by oxidative stress. As a control, we monitored the activity of fumarase, a TCA enzyme that is not sensitive to oxidative damage. AD1-9 cells were cultured for 24h in YPGal in the absence or in presence of 12 μM PD. In YPGal with a good aeration, yeast cells can use both respiration and fermentation, and thus

display a lower sensitivity to PD. At 12 μ M PD in YPGal, growth was decreased to 35% of the control while, at the same concentration, it was fully inhibited in YPEth (Fig.2A). As shown in Fig.3B, PD treatment resulted in a 50% decrease in aconitase activity whereas fumarase activity was not significantly affected, further indicating that PD treatment triggers an oxidative stress.

Effect of deletion and overexpression of NADH-dehydrogenase encoding genes on PD inhibitory activity

The current model suggests that PD, or its metabolites, could disturb the redox balance of the parasitized red blood cells by acting as a subversive substrate of the parasite glutathione reductase, a NADPH-dependent flavoenzyme [1]. In yeast, we observed that PD inhibitory activity required an active respiratory function. Thus we hypothesized that flavoenzymes directly associated with the respiratory function might be involved in PD activity. The respiratory chain NADH-dehydrogenases (NDHs) appeared as best candidates. Yeast, as *Plasmodium*, lacks a mitochondrial complex I, which is replaced by NDHs. Yeast has three NADH-dehydrogenases or type II NADH:quinone oxidoreductases (NDHs): Nde1 and Nde2 (external NDHs) that are located at the inter-membrane side of the inner mitochondrial membrane, and Ndi1 (internal NDH), located at the matrix side.

To assess the role of NDHs in PD activity, we tested the effect of the deletion and over-expression of NDH-encoding genes on the sensitivity of respiratory growth to PD.

We reasoned that if NDH activity is required for the inhibitory activity of PD, cells with higher NDH content would be more sensitive to PD whereas cells with lower NDH content would be less sensitive. We evaluated the effect of the deletion and over-expression of *NDE1* and *NDE2*. We did not test *NDI1* as its deletion results in a severe respiratory growth defect.

AD1-9 cells transformed with a multi-copy *NDE1* or *NDE2*-bearing plasmid and Δ nde1 and Δ nde2 mutants issued from the same strain were tested for their sensitivity to PD.

The deletion of *NDE1* resulted in a major loss of sensitivity to PD while that of *NDE2* had no effect (Fig.4A). In parallel, we observed a three-fold decrease in NDH activity in mutant Δ nde1, and only a slight decrease in mutant Δ nde2 (Fig.4B). This was in agreement with a previous publication reporting that the deletion of *NDE2* had no effect on the rate of oxidation of cytosolic NADH whereas the deletion of *NDE1* had a severe effect [21], an observation that can be explained by the much higher content in Nde1 as compared to Nde2 (and Ndi1) in cells as revealed by the analysis of the protein steady-state levels [22].

Increased *NDE2* gene copy number resulted in a clear increase in PD sensitivity in control cells (Fig.4C), which correlates with a significant increased NDH activity (Fig.4B). Similarly, when cells lacking *NDE1* (thus with low NDH activity) were transformed with multi-copy plasmids bearing *NDE1* or *NDE2* (Fig.4C), a marked increase in PD sensitivity was observed.

Intriguingly, transformation of the control cells with the multicopy plasmid bearing *NDE1* only led to a small increase in NDH activity (Fig.4B) and, by consequent, had no or little effect on PD sensitivity (Fig.4C). We hypothesize that in the control cells containing a large amount of Nde1 (compared to Nde2), the level of Nde1 is tightly regulated and could not be further increased using a plasmid bearing *NDE1* gene under the control of its own promoter.

Taken together, our data show a strong correlation between NDH activity and PD sensitivity of yeast growth.

We obtained similar results with ART: deletion of *NDE1* resulted in a decreased ART susceptibility and over-expression of *NDE2* led to increased sensitivity while deletion of *NDE2* and over-expression of *NDE1* had no or minor effects (data not shown). NDH-encoding gene dosage effect on ART sensitivity has been previously reported [23].

To test whether other yeast flavoenzymes could be involved in PD activity, we transformed the *Ande1* mutant with multi-copy plasmids in order to overexpress a set of potential candidate genes, namely *LPD1*, *MCR1* and *GLR1*. *LPD1* encodes the mitochondrial matrix lipoamide dehydrogenase. *P. falciparum* possesses two distinct dihydrolipoamide dehydrogenases (LipDH), one in the mitochondria and the other in the apicoplast [24]. Recombinant *P. falciparum* mitochondrial LipDH displays kinetics similar to other members of the disulphide oxidoreductase family including the *Trypanosoma cruzi* enzyme, which is known to be able to use menadione as substrate [25]. *MCR1* encodes the mitochondrial NADH-cytochrome *b*₅ reductase. As in *in vitro* assays, *P. falciparum* glutathione reductase was shown to reduce slowly PD and very efficiently its metabolite PDO, which initiated redox-cycling [1], we also included *GLR1* encoding the yeast glutathione reductase that is located both in the cytoplasm and mitochondria.

Over-expression of these three genes resulted in a slight increase in PD sensitivity, suggesting that these enzymes could also contribute to PD inhibitory activity (Fig.4D).

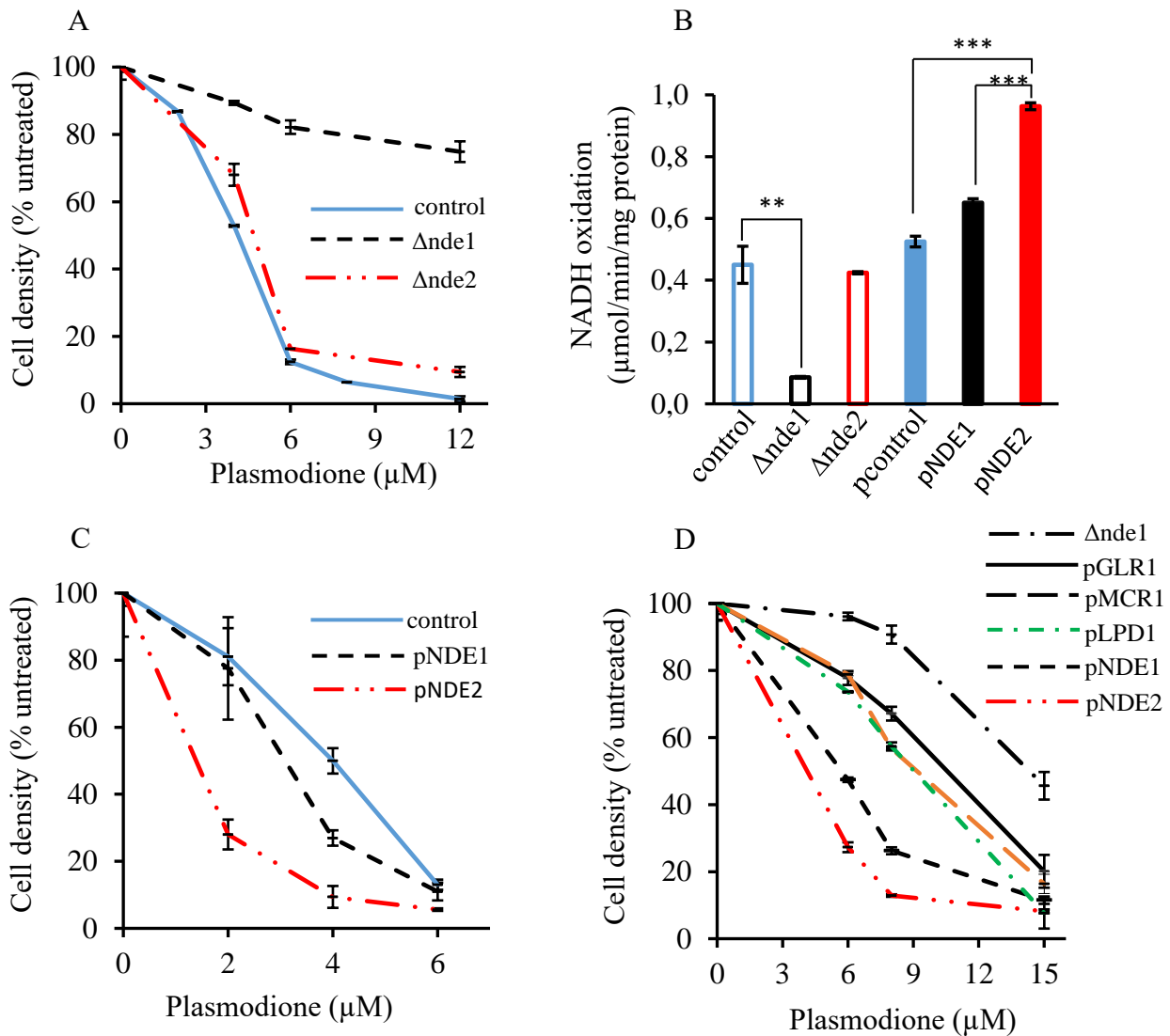


Figure 4: Effect of flavoenzyme-encoding gene dosage on plasmidione sensitivity. (A and C) Effect of deletion (A) and over-expression (C) of the NADH-dehydrogenase encoding genes *NDE1* and *NDE2* on PD sensitivity. Control and mutants were grown in YPEth medium with various concentrations of PD. OD_{600nm} were measured after three days. For each strain, the data are presented as percentage of the OD_{600nm} of the untreated culture. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. (A) AD1-9 control and isogenic deletion mutants $\Delta nde1$ and $\Delta nde2$. ; (C) AD1-9 control and AD1-9 transformed with a multicopy plasmid bearing *NDE1* (pNDE1) or *NDE2* (pNDE2); (B) NDH activity in the deletion mutants $\Delta nde1$ and $\Delta nde2$, in the over-expressing cells pNDE1 and in pNDE2, and in their respective controls. The rate of NADH oxidation was measured at 340 nm. Mitochondria were added at 60 to 240 μg protein per mL. The reaction was initiated by the addition of 100 μM decylubiquinone. Experiments were repeated at least twice and data averaged. The error bars represent standard deviation. **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.001$ according to two-tailed Student's t test. (D) Effect of the over-expression of flavoprotein encoding genes on PD sensitivity in a $\Delta nde1$ background. Deletion mutant $\Delta nde1$ and derived strains over-expressing *NDE1* (pNDE1), *NDE2* (pNDE2), *GLR1* (pGLR1), *LPD1* (pLPD1) or *MCR1* (pMCR1) were grown in YPEth medium with increasing concentration of PD. OD_{600nm} were measured after three days. For each strain, the data are presented as percentage of the OD_{600nm} of the untreated culture. The experiments were repeated at least twice and the data averaged.

PD and its putative metabolites as substrates of NADH-dehydrogenases

We found that yeast growth sensitivity to PD was modulated by the dosage of the NDH encoding genes. We then tested whether PD and derived compounds could act as substrates of NDH. The rate of NADH-oxidation was monitored using mitochondrial samples, NADH as electron donor and increasing concentrations of PD and six derived compounds, PDO, PD-bzol, 6-OH-PD, 7-OH-PD, PD-epoxide and benzoxanthone [26], as possible electron acceptors. The chemical structures are presented in Fig.1. Decylubiquinone (DQ), a synthetic electron acceptor, was used as a positive control. As shown in Fig.5, PD, PDO and PD-bzol can act as substrates for NDH. The rates of NADH-oxidation using PDO and PD-bzol as electron acceptors were higher than with DQ. PD was the least efficient electron acceptor and the reaction seemed inhibited at high PD concentration (100 μ M). These substrate activities were in agreement with previous observations made with the *P. falciparum* NADPH-dependent glutathione reductase [1]. Moreover bioactivation through benzylic oxidation of PD, leading to a benzhydrol (PD-bzol) or a benzoyl (PDO) analogue was shown to have a significant impact on redox properties and to markedly favor methemoglobin (Fe^{III}) reduction in the coupled assay with the human NADPH-dependent glutathione reductase [27,28].

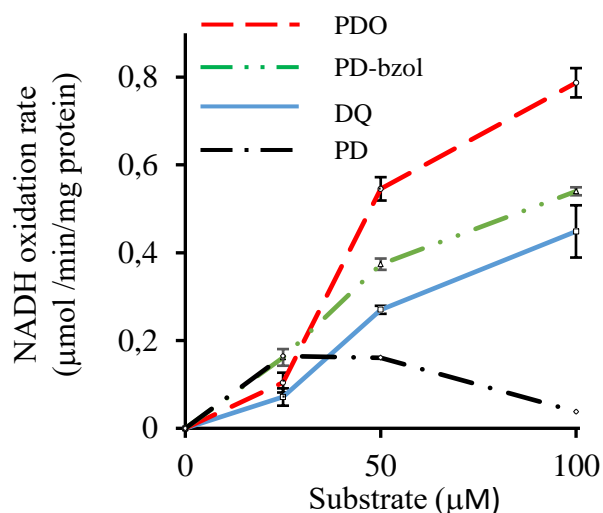


Figure 5: NADH-dehydrogenase activity initiated by plasmodione and its metabolites. NADH oxidation was measured at 340 nm. Mitochondria were added at around 60 μ g protein per mL. The reaction was initiated by the addition decylubiquinone (DQ), PD, PD-bzol or PDO as substrate at 25, 50 and 100 μ M. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. The error bars represent standard deviation.

By contrast, 6-OH-PD, 7-OH-PD, PD-epoxide and benzoxanthone did not act as NDH substrates. The same assay was performed with ART but no activity of the drug was detected

on NADH-oxidation, suggesting that, while yeast sensitivity to PD and ART correlated with NDH activity, the modes of action of the two drugs are different.

ROS production initiated by PD and its metabolites

To evaluate whether the NDH activity initiated by PD, PD-bzol and PDO could be associated with ROS production, we monitored the O₂ consumption by mitochondria using NADH as an electron donor in the presence of KCN. In this condition, the respiratory chain was fully blocked by KCN that inhibits cytochrome oxidase, and no O₂ consumption was observed (Fig.6A). Upon addition of PD-bzol, O₂ was consumed, indicating that PD-bzol reacting with NDHs resulted directly or indirectly in O₂ consumption and most likely in ROS production. Addition of SOD and catalase stopped the observed O₂ consumption. The sole scavenging of superoxide and hydrogen peroxide by SOD and catalase, respectively, could not explain this complete inhibition. The NADH-oxidation initiated by PDO and monitored as in Fig.5 was not inhibited by SOD and catalase (data not shown). Thus that cannot account for the stop in O₂ consumption. As crude mitochondria samples were used in the assays, a more complex mechanism might take place, resulting in the observed inhibition upon addition of SOD and catalase.

The rates of SOD and catalase-sensitive O₂ consumption were also estimated with PD and PDO (Fig.6B). The NADH - PD-bzol and NADH - PDO oxido-reduction reactions resulted in a ROS production 6-7 fold higher than the NADH - PD reaction. Of note, the O₂ consumption rate initiated by PD-bzol and PDO was higher than the rate of O₂ consumption by the respiratory chain (*i.e.* in the absence of KCN and of these compounds). By contrast, no SOD and catalase-sensitive O₂ consumption was observed after addition of 6-OH-PD, 7-OH-PD, PD-epoxide, benzoxanthone or ART to cyanide-inhibited mitochondria in the presence of NADH. Taken together, these results suggest that the mechanism of action of plasmodione is dependent on the production of PD-bzol and/or PDO that could redox-cycle with NDHs, potentially leading to a large production of ROS.

We then monitored the effect of the PD metabolites on the growth of control, Δ sod1, Δ sod2 and Δ ctt1 cells (Fig.6C). As for PD, the absence of Sod1 and Sod2 rendered the cells highly sensitive to PD-bzol and PDO, which seems coherent with ROS production initiated by these compounds, although we cannot exclude that Δ sod1 and Δ sod2 mutants might be more sensitive to other, possibly non-oxidative, insults. Δ sod2 cells, but not Δ sod1, were to a lesser extent sensitive to PD-epoxide and benzoxanthone.

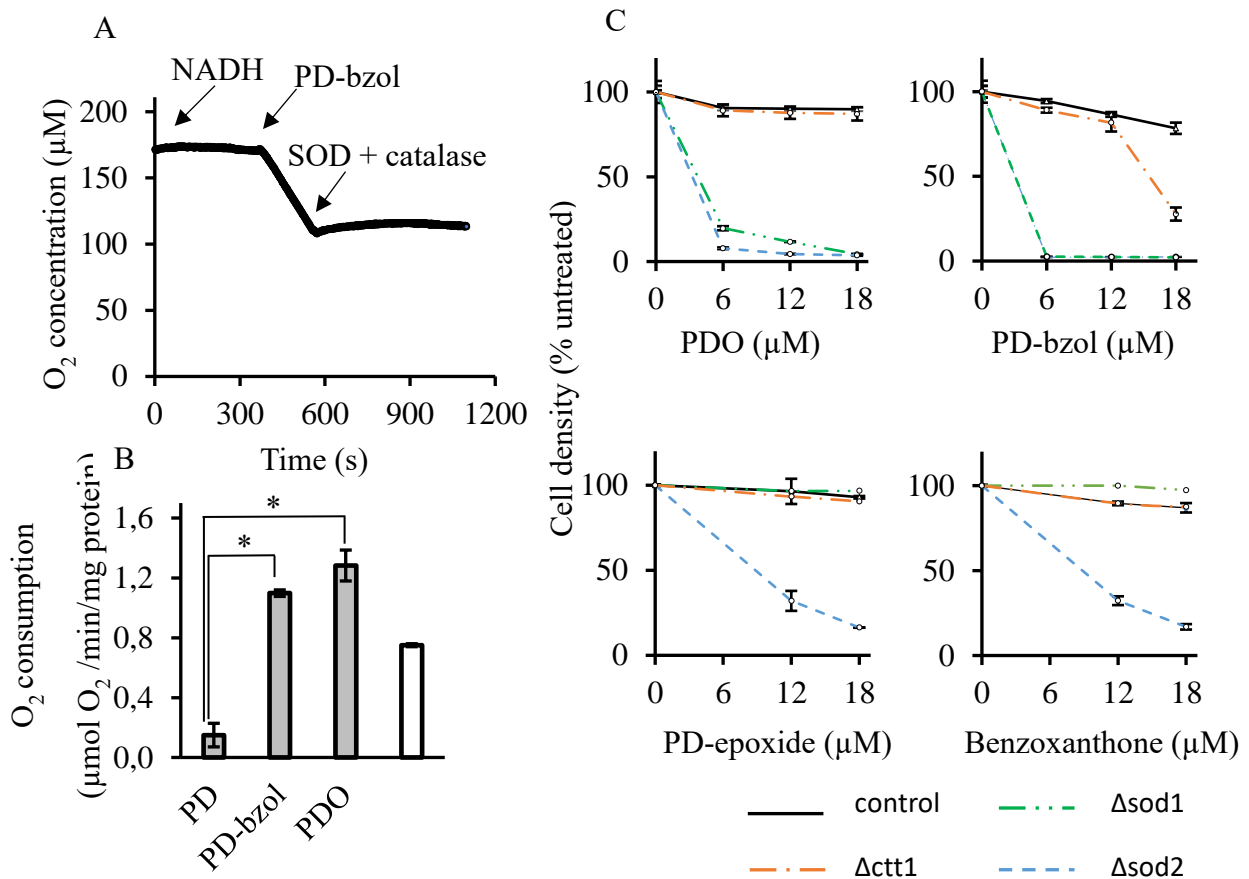


Figure 6: SOD and catalase-sensitive O₂ consumption activities initiated by plasmodione and its putative metabolites and their effect on the respiratory growth of mutants with lower oxidative stress defence. O₂ consumption of cyanide-inhibited mitochondria initiated by PD, PD-bzol and PDO. The trace shows the O₂ consumption by mitochondria (added at 18 µg.mL) in the presence of 2 mM KCN and 0.8 mM NADH. PD-bzol was added to a final concentration of 50 µM. SOD and catalase were added each at a final concentration of 300 U.mL. (B) Rates of SOD and catalase-sensitive O₂ consumption initiated by PD, PD-bzol and PDO. O₂ consumption was monitored as in (A). In white, rate of O₂ consumption of cytochrome oxidase active mitochondria (monitored in the same conditions but in absence of KCN and PD, PD-bzol or PDO). The averages of at least two experiments are shown, with error bars for standard deviation. *, p < 0.05 according to two-tailed Student's t test. (C) Effect of deletion of oxidative stress defence genes on the sensitivity to putative PD metabolites. Strains were grown in YPEth medium with various concentrations of PD derivatives. OD_{600nm} were measured after three day culture. For each strain, the data are presented as percentage of the OD_{600nm} of the untreated culture. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. The error bars represent standard deviation.

These two compounds are thus likely to induce also a stress, possibly but not necessarily oxidative, localised in the mitochondria and via a mechanism different from that of PDO and PD-bzol.

None of the mutants, Δsod1, Δsod2 or Δctt1, were sensitive to 6-OH-PD and 7-OH-PD (data not shown).

Direct effect of plasmodione putative metabolites PDO and PD-bzol on aconitase

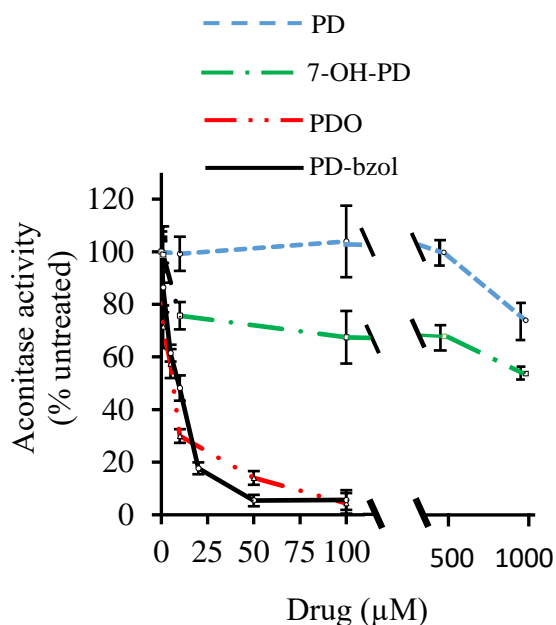


Figure 7: Effect of plasmodione and its putative metabolites PDO, PD-bzol and 7-OH-PD on purified aconitase activity. Purified mitochondrial aconitase (33 ng.mL^{-1}) was incubated for 20 min at room temperature with drugs at different concentrations. The reaction was started by addition of cis-aconitate and activity was monitored spectrophotometrically at 240 nm at 37°C . The activity is expressed as percentage of the activity obtained after incubation of the enzyme in the absence of drugs. The average of four measurements is shown with error bars for standard deviation.

We then checked whether PD, PDO, PD-bzol and 7-OH-PD could directly impair the activity of purified aconitase (Fig.7). Exposure to PDO and PD-bzol resulted in a decrease of aconitase activity in a concentration dependent manner, with a mid-point inhibitory concentration of $5 \mu\text{M}$ while PD and 7-OH-PD had a much milder effect. The effect of PDO on aconitase activity was also tested in anaerobic conditions in a glove box (Jacomex, $\text{O}_2 < 9 \text{ ppm}$, data not shown). The same decrease in activity was observed indicating that the aconitase impairment was not caused by an indirect effect via ROS production but by a direct effect. While the mechanism of direct inhibition needs to be elucidated, we hypothesize that it may pertain to iron chelation of aconitase $[4\text{Fe-4S}]$ prosthetic group. One iron of the $[4\text{Fe-4S}]$ group is not ligated to a protein residue, and thus can bind to hydroxyl groups of substrates or water. This iron is particularly labile and can be attacked by anionic oxidants leading to cluster degradation and enzyme inactivation [29]. Moreover, similar cluster degradation and protein inactivation was observed when purified aconitase was treated by iron chelator such as EDTA and bathophenanthroline disulfonate (BPS) [30] and ferrozine [31]. As it was observed that PDO, under its reduced form has an iron-binding site and an iron-chelating capacity (PDO_{red} , Fig.1) [5], we propose that PDO, and presumably PD-bzol, could directly affect aconitase activity *in vitro* by either chelating the exposed iron of the enzyme Fe-S cluster (converting the active $[4\text{Fe-4S}]$ cluster into the inactive $[3\text{Fe-4S}]$ cluster) or by binding this iron and preventing the binding of the substrate to the aconitase active site.

Therefore, in cells cultured in the presence of PD, the observed impairment of aconitase activity could result from both a direct reaction of the PD metabolites with the Fe-S cluster, and an indirect effect via PD-derived ROS.

Inhibition of the bc_1 complex by PD metabolites

Finally, we tested whether PD metabolites could inhibit the bc_1 complex. Several quinone antagonist inhibitors of the complex are known, for instance the antimalarial atovaquone that tightly binds into the Q_o -site of the bc_1 complex [32], or ELQ-271 that is active against *Toxoplasma gondii*, binding into the bc_1 complex Q_i -site [33,34].

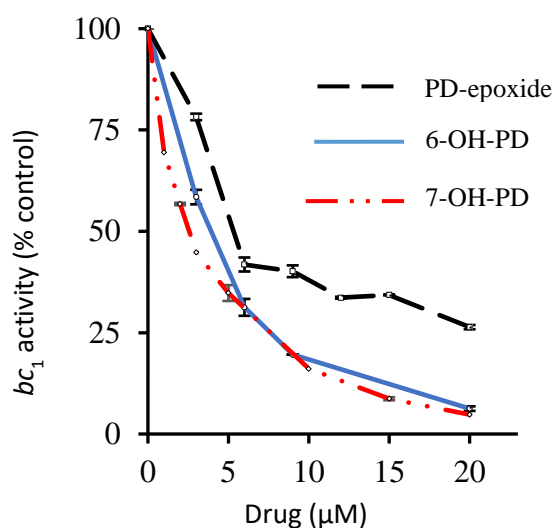


Figure 8: Inhibition of the bc_1 complex activity by putative plasmodione metabolites. Activities were determined by measuring the reduction of cytochrome *c* at 550-540 nm over 1-min time-course. Mitochondria were added to obtain a final concentration of around 2 nM bc_1 complex. Activity was initiated by the addition of decylubiquinol and initial rates were measured. The measurements were repeated with various concentrations of drugs. Each point corresponds to the average of at least two measurements, with the error bars representing standard deviation.

We monitored the bc_1 complex activity (measured as cytochrome *c* reduction rate at 550-540 nm) using decylubiquinol as substrate, with increasing concentrations of compounds (Fig.8). PDO, PD-bzol and benzoxanthone had no effect up to 100 µM. PD had a very mild inhibitory effect (with mid-point inhibition at around 120 µM). 6-OH-PD, 7-OH-PD and PD-epoxide inhibited the reaction with mid-point inhibitory concentrations of around 5 µM. As a comparison, we previously observed that the mid-point inhibitory concentration for atovaquone was in the nanomolar range [35]. Thus PD and its metabolites are not or weak inhibitors of the bc_1 complex. This result is in good agreement with previous report evidencing that PD itself would not act as atovaquone by inhibiting *P. falciparum* bc_1 complex in parasitized red blood cells [4].

We then checked whether mutations in the Q_o- and Q_i-sites known to cause resistance to atovaquone and ELQ-271, respectively, would affect the inhibitory efficiency of 6-OH-PD and 7-OH-PD. The inhibitor titration was repeated using mitochondrial samples prepared from cells carrying the Q_o-site mutation Y279S or the Q_i-site mutation M221Q. No resistance was observed. This suggests that 6-OH-PD and 7-OH-PD do not share the binding site of atovaquone or ELQ-271, or bind at both sites as does ELQ-400 [18].

Discussion

PD mode of action in yeast

Here we used the yeast model to investigate the mode of action of plasmodione, a novel antimalarial lead-compound. We found that the respiratory function was required for the growth inhibition by PD. But, in contrast to the antimalarial drug atovaquone, PD did not block the respiratory chain and had no or only a very weak inhibitory effect on the respiratory chain *bc*₁ complex. These results are in agreement with a previous report showing that, in *P. falciparum*, PD sensitivity, contrarily to atovaquone sensitivity, was not affected by the expression of yeast dihydroorotate dehydrogenase that renders the *bc*₁ complex activity dispensable for the parasite proliferation [2]. By contrast, we demonstrated that PD inhibitory activity is mainly mediated by the mitochondrial respiratory chain NADH-dehydrogenases (NDHs). Deletion of *NDE1* significantly lowered the NDH activity in cells and resulted in a major decrease in PD sensitivity, whereas overexpression of *NDE2* led to an increased NDH activity and increased PD sensitivity, indicating that NDHs are key for the growth inhibition caused by PD. Overexpression of other mitochondrial flavoenzymes, Mcr1, Lpd1 and Glr1, slightly increased yeast sensitivity to PD suggesting that they might play a minor role in PD activity and that PD can interact with multiple flavoenzymes.

We also provide a series of evidences indicating that PD inhibitory activity is mediated, in a large part, through the production of reactive oxygen species, in agreement with observations made in *P. falciparum* [5]. First, growth sensitivity to PD was markedly increased in strains that lack key components of the antioxidant defence, Sod1 and Sod2, the cytoplasmic and mitochondrial superoxide-dismutases, respectively, and, to a lower extent, catalase. Second, the reaction of PD and its metabolites with mitochondrial NDHs *in vitro*, led to ROS production.

Third, PD treatment of cell culture resulted in an impaired activity of aconitase, a mitochondrial enzyme whose Fe–S cluster is notoriously sensitive to ROS. Taken together, these observations suggest that PD treatment generates an oxidative stress that results in growth arrest.

Seven putative PD metabolites were previously synthesized and their antimalarial activities were monitored [26]. All compounds, except PDO, were efficient inhibitors of *P. falciparum* proliferation, with IC₅₀s below 1 μM suggesting that these metabolites could contribute to the antimalarial efficiency of the parent drug PD. Of note, the lower efficiency of PDO in parasite culture assays might be due to a lower ability to penetrate into the cells or to the observed high adsorption on serum proteins (E. D-C, unpublished data).

Of these putative PD metabolites, six were tested using the yeast model. Our results are summarised in Table 1.

	Increased sensitivity of Δsod cells	NDH substrate	NDH-dependent ROS production	<i>In vitro</i> aconitase inhibition	<i>bc</i> ₁ complex inhibition
PD	Δsod1, Δsod2	++	+	-	±
PDO	Δsod1, Δsod2	++++	++++	+++	-
PD-bzol	Δsod1, Δsod2	++++	++++	+++	-
6-OH-PD	no	-	-	nd	+
7-OH-PD	no	-	-	±	+
PD-epoxide	Δsod2	-	-	nd	+
benzoxanthone	Δsod2	-	-	nd	-
ART	no	-	-	nd	nd

Table 1: Effect of PD, PD-metabolites and ART on Δsod cells growth, on enzyme activities and ROS production. nd: not determined. +, activity; -, no activity

Taken together, our data suggest that most of PD activity on yeast would be mediated through two of its metabolites: PDO and PD-bzol. These two metabolites present a similar profile to PD, but with higher efficiency than PD, in agreement with our current model where PD is a prodrug (Fig.1). (1) As PD, they are alternative substrates of NDH, and are even better substrates than the electron acceptor decylubiquinone, and (2) through this activity, they

generate ROS, but in both cases, they are by far more efficient than PD. (3) Cells depleted for Sod1 and Sod2 are highly sensitive to PDO and PD-bzol; Δ sod1 growth was fully inhibited at 6 μ M PDO and PD-bzol but not abolished at 30 μ M PD. (4) In contrast to PD, PDO and PD-bzol can directly inhibit aconitase *in vitro*.

Other metabolites showed milder activities. Cells lacking the mitochondrial Sod2 were also sensitive to PD-epoxide and benzoxanthone, but these metabolites did not act as NDH substrates, suggesting that they may contribute to the generation of oxidative stress in the mitochondria through a different mechanism. Finally, three additional metabolites can inhibit the *bc*₁ complex activity, namely 6-OH-PD, 7-OH-PD and PD-epoxide. Interestingly, the main PD metabolite present in the urine of mice treated with PD was 6-OH-PD and its glucuronic ester derivative [26]. Thus they might also contribute to the antimalarial activity of the parent drug although the three compounds are much weaker inhibitors of the *bc*₁ complex than atovaquone.

The data we have obtained with the yeast model are coherent with the redox cycling model initially proposed (Fig.1) but using NDH instead of glutathione reductase as the main redox-cycling enzyme.

The inhibition of yeast growth caused by PD would be explained as follows:

(1) PD, once uptaken by the yeast cells, is oxidised generating PD-bzol and/or PDO. In yeast, as in *P. falciparum*, there is no CYP450. The reaction could be catalysed by free or protein-bound hemes *via* ferryl species.

(2) PD-bzol and PDO bind to NDH and accept electrons from NADH via the co-factor FAD. The binding of a menadione into NDH has been modelled *in silico* [36]. PD-bzol and PDO may bind in a similar manner. (3) Once reduced, PD-bzol and PDO react with O₂ to produce superoxide. (4) Re-oxidized compounds bind again to and are reduced by NDH in a redox-cycling mode. PDO and PD-bzol binding to NDH might also result in the accumulation of flavosemiquinone intermediates, which could react with O₂, producing superoxide. The superoxide generated by PDO (and PD-bzol) radicals and NDH flavosemiquinone damage ROS-sensitive enzymes, in particular enzymes containing Fe-S clusters that are likely the first targets of oxidative stress. In addition, the continuous oxidation of NADH results in NADH/NAD imbalance in the cells, possibly affecting the NADPH/NADP balance, increasing the oxidative stress and leading to growth arrest.

Our different assays using the yeast model also indicated that PD and ART do not share the same mode of action. Both compounds block the respiratory growth and their activity is exacerbated by the overexpression of NDH enzymes. However, in contrast to PD and PD metabolites, ART is not a substrate of NDHs in yeast; deletions of Sod1, Sod2 and catalase do not increase yeast sensitivity to ART; ART affects mitochondrial integrity, and ART blocks the fermentative growth.

From yeast to *P. falciparum*

Like yeast, *Plasmodium* does not possess a mitochondrial (protonmotive) complex I but a single type-II NDH called NDH2. Menadione can be a substrate of the parasite NDH2 [37]. Thus it seems possible that PD, PD-bzol and/or PDO could also enter into a redox cycle with *P. falciparum* NDH2. However there is a discrepancy between the expression profile of NDH2 and the parasite stages on which PD is most active. Transcriptomics and proteomics analyses [38-41] suggest that NDH2 is present at relatively low levels over the parasite asexual cycle, with very low expression at the ring stage where PD is most effective. NDH2 reaches its highest levels of expression during gametocytogenesis [42] at a stage where energy metabolism relies on a functional TCA cycle [43-45], while we showed that PD activity is limited to young gametocytes [2].

Still the decreased efficiency of PD at the mid to late gametocyte stages could be due to a lower ability to uptake or bioactivate PD, and the high efficiency of PD at ring stage might not be in contradiction with a possible redox-cycling role of NDH2 as PD might require only a low amount of the enzyme to be effective at killing the parasite, especially if in parallel, antioxidant enzymes are at low levels and thus cannot shield the ROS-sensitive cellular components. Moreover if NDH2 has a high catalytic activity and its diaphorase activity is increased by PD and/or its metabolites, the depletion of cellular NADH, that might result in a decreased NADPH/NADP⁺ ratio that could further exacerbate the oxidative stress.

In addition, other flavoproteins of both parasite and/or erythrocyte origin may play a role in mediating PD antimalarial activity, especially when they are present at high levels. For instance, the human NADPH-dependent glutathione reductase and methemoglobin are major proteins of the parasitized red blood cells during hemoglobin digestion at the trophozoite stage where they could sustain most of PD redox cycling. Of note, these proteins may be localised in different compartments, within the parasite or in the host erythrocyte. Indeed, moving of drug

metabolites between different compartments of the erythrocyte and parasite has already been reported in the case of other redox cyclers with antimalarial properties, such as indolone-N-oxides [46]. In order to explore the role of these enzymes in the antimalarial activity of PD, gene-dosage experiments will be carried out with parasites expressing NDH2 and other flavoenzymes at different levels.

Importantly, ROS-sensitive Fe-S cluster containing enzymes in the parasite, as in the yeast model, could be damaged by PD-produced ROS and by iron chelation by PD metabolites PDO and PD-bzol. It was reported that the TCA cycle, while not needed for parasite survival in asexual blood stages, is essential for gametocyte and mosquito stages. Aconitase knock-out parasites arrest as gametocytes and fail to transmit to mosquitoes [44], suggesting that ROS damage to aconitase could block or decrease parasite transmission. Thus the effect of PD and other benzylmenadiones should be tested on parasite transmission to mosquitoes.

In conclusion, our study of the mode of action of PD in the yeast model has generated data that are coherent with the model for PD bioactivation and mode of action and with previous observations obtained *in vitro* and in parasites. It provided additional experimental support to the redox cycling and ROS-producing properties of PD and its metabolites, and identified two metabolites that are more active than PD and could mediate most of PD activity in *Plasmodium* parasites. In addition, we uncovered the key role of the respiratory chain NADH-dehydrogenases in PD activity in yeast, which provides novel hypotheses to be tested in parasites and during parasite transmission to mosquitoes.

Acknowledgements

The work was supported by the French National Research Agency (ANR) (PlasmoPrim project to B.M, E.D.-C., M-P.G-C. and S.A.B.), by the Laboratoire d'Excellence (LabEx) ParaFrap (grant LabEx ParaFrap ANR-11-LABX-0024 to E.D.-C. and S.A.B.), by the ERC Starting Grant N°260918 to S.A.B., and by funding from CNRS (E.D.-C. and S.A.B), Inserm (S.A.B), and the University of Strasbourg (E.D.-C. and S.A.B). We are grateful to N. Fisher for his comments on the manuscript.

References

- [1] T. Müller, L. Johann, B. Jannack, M. Brückner, D.A. Lanfranchi, H. Bauer, C. Sanchez, V. Yardley, C. Deregnaucourt, J. Schrével, M. Lanzer, R.H. Schirmer, E. Davioud-Charvet, Glutathione reductase-catalyzed cascade of redox reactions to bioactivate potent antimalarial 1,4-naphthoquinones - A new strategy to combat malarial parasites, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 11557–11571. doi:10.1021/ja201729z.
- [2] K. Ehrhardt, C. Deregnaucourt, A.A. Goetz, T. Tzanova, V. Gallo, P. Arese, B. Pradines, S.H. Adjalley, D. Bagrel, S. Blandin, M. Lanzer, E. Davioud-Charvet, The redox cycler plasmodione is a fast-acting antimalarial lead compound with pronounced activity against sexual and early asexual blood-stage parasites, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 5146–5158. doi:10.1128/AAC.02975-15.
- [3] H.J. Painter, J.M. Morrisey, M.W. Mather, A.B. Vaidya, Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*, *Nature*. 446 (2007) 88–91. doi:10.1038/nature05572.
- [4] K. Ehrhardt, E. Davioud-Charvet, H. Ke, A.B. Vaidya, M. Lanzer, M. Deponce, The antimalarial activities of methylene blue and the 1,4-naphthoquinone 3-[4-(Trifluoromethyl)benzyl]-menadione are not due to inhibition of the mitochondrial electron transport chain, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 2114–2120. doi:10.1128/AAC.02248-12.
- [5] M. Bielitzka, D. Belorgey, K. Ehrhardt, L. Johann, D.A. Lanfranchi, V. Gallo, E. Schwarzer, F. Mohring, E. Jortzik, D.L. Williams, K. Becker, P. Arese, M. Elhabiri, E. Davioud-Charvet, Antimalarial NADPH-consuming redox-cyclers as superior glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency copycats, *Antioxid. Redox Signal.* 22 (2015) 1337–1351. doi:10.1089/ars.2014.6047.
- [6] R. V. Subba-Rao, M. Alexander, Bacterial and fungal cometabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) and its breakdown products, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 509–516.
- [7] J. Segrestaa, P. Vérité, F. Estour, S. Ménager, O. Lafont, Improvement of a biomimetic porphyrin catalytic system by addition of acids, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 50 (2002)

- 744–748. doi:10.1248/cpb.50.744.
- [8] T. Nakano, N. Agatsuma, S. Kodama, H. Kakuda, D. Dolphin, A biomimetic study of cytochrome P450 related oxidations of toluenes using synthetic hemin, *Bull.Chem.Soc.Jnp.* 69 (1996) 3513–3521.
- [9] P.P. Kelly, A. Eichler, S. Herter, D.C. Kranz, N.J. Turner, S.L. Flitsch, Active site diversification of P450cam with indole generates catalysts for benzylic oxidation reactions, *Beilstein J. Org. Chem.* 11 (2015) 1713–1720. doi:10.3762/bjoc.11.186.
- [10] T. Spolitak, P.F. Hollenberg, D.P. Ballou, Oxidative hemoglobin reactions: Applications to drug metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.* 600 (2016) 33–46. doi:10.1016/j.abb.2016.04.007.
- [11] D. Belorgey, D.A. Lanfranchi, E. Davioud-Charvet, dependent glutathione reductase-catalyzed redox cyclers as antimalarial agents, *Curr Pharm Des.* 19 (2013) 2512–2528.
- [12] S. Otilie, G.M. Goldgof, C.M. Calvet, G.K. Jennings, G. LaMonte, J. Schenken, E. Vigil, P. Kumar, L.-I. McCall, E.S.C. Lopes, F. Gunawan, J. Yang, Y. Suzuki, J.L. Siqueira-Neto, J.H. McKerrow, R.E. Amaro, L.M. Podust, J.D. Durrant, E.A. Winzeler, Rapid chagas disease drug target discovery using directed evolution in drug-sensitive yeast, *ACS Chem. Biol.* (2016) acschembio.6b01037. doi:10.1021/acschembio.6b01037.
- [13] J.-P. Lasserre, A. Dautant, R.S. Aiyar, R. Kucharczyk, A. Glatigny, D. Tribouillard-Tanvier, J. Rytka, M. Blondel, N. Skoczen, P. Reynier, L. Pitayu, A. Rotig, A. Delahodde, L.M. Steinmetz, G. Dujardin, V. Procaccio, J.-P. di Rago, Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies, *Dis. Model. Mech.* 8 (2015) 509–526. doi:10.1242/dmm.020438.
- [14] N. Fisher, C.K. Castleden, I. Bourges, G. Brasseur, G. Dujardin, B. Meunier, Human disease-related mutations in cytochrome *b* studied in yeast., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 12951–8. doi:10.1074/jbc.M313866200.
- [15] C. Lemaire, G. Dujardin, Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria: activity measurement and subunit composition analysis, *Methods Mol Biol* 432: 65-81.
- [16] A. Lalève, C. Vallières, M.-P. Golinelli-Cohen, C. Bouton, Z. Song, G. Pawlik, S.M.

- Tindall, S. V. Avery, J. Clain, B. Meunier, The antimalarial drug primaquine targets Fe–S cluster proteins and yeast respiratory growth, *Redox Biol.* 7 (2016) 21–29. doi:10.1016/j.redox.2015.10.008.
- [17] P. Hill, J. Kessl, N. Fisher, S. Meshnick, B.L. Trumpower, B. Meunier, Recapitulation in *Saccharomyces cerevisiae* of cytochrome *b* mutations conferring resistance to atovaquone in *Pneumocystis jiroveci*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 2725–2731. doi:10.1128/AAC.47.9.2725.
- [18] Z. Song, B.I. Iorga, P. Mounkoro, N. Fisher, B. Meunier, The antimalarial compound ELQ-400 is an unusual inhibitor of the *bc*₁ complex, targeting both Q_o and Q_i sites, *FEBS Lett.* (2018). doi:10.1002/1873-3468.13035.
- [19] J. Wang, L. Huang, J. Li, Q. Fan, Y. Long, Y. Li, B. Zhou, Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation., *PLoS One.* 5 (2010) e9582. doi:10.1371/journal.pone.0009582.
- [20] C. Sun, B. Zhou, The antimalarial drug artemisinin induces an additional, Sod1-suppressible anti-mitochondrial action in yeast, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864 (2017) 1285–1294. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.04.014.
- [21] M.A.H. Luttk, K.M. Overkamp, P. Kötter, S. De Vries, J.P. Van Dijken, J.T. Pronk, The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24529–24534. doi:10.1074/jbc.273.38.24529.
- [22] F. Gomes, E.B. Tahara, C. Busso, A.J. Kowaltowski, M.H. Barros, *nde1* deletion improves mitochondrial DNA maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* coenzyme Q mutants, *Biochem. J.* 449 (2013) 595–603. doi:10.1042/BJ20121432.
- [23] W. Li, W. Mo, D. Shen, L. Sun, J. Wang, S. Lu, J.M. Gitschier, B. Zhou, Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in action of artemisinin, *PLoS Genet.* 1 (2005) e36. doi:10.1371/journal.pgen.0010036.
- [24] P.J. McMillan, L.M. Stimmler, B.J. Foth, G.I. McFadden, S. Müller, The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses two distinct dihydrolipoamide dehydrogenases, *Mol. Microbiol.* 55 (2005) 27–38. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04398.x.

- [25] K. Blumenstiel, R. Schöneck, V. Yardley, S.L. Croft, R.L. Krauth-Siegel, Nitrofuran drugs as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase, *Biochem. Pharmacol.* 58 (1999) 1791–1799. doi:10.1016/S0006-2952(99)00264-6.
- [26] L. Feng, D.A. Lanfranchi, L. Cotos, E. Cesar-Rodo, K. Ehrhardt, A.-A. Goetz, H. Zimmermann, F. Fenaille, S.A. Blandin, E. Davioud-Charvet, Synthesis of plasmodione metabolites and ¹³C-enriched plasmodione as chemical tools for drug metabolism investigation, *Org. Biomol. Chem.* 16 (2018) 2647–2665. doi:10.1039/C8OB00227D.
- [27] L. Johann, D.A. Lanfranchi, E. Davioud-Charvet, M. Elhabiri, A Physico-biochemical study on potential redox-cyclers as antimalarial and antischistosomal drugs, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 3539–3566. doi:10.2174/138161212801327284.
- [28] P. Sidorov, I. Desta, M. Chessé, D. Horvath, G. Marcou, A. Varnek, E. Davioud-Charvet, M. Elhabiri, Redox polypharmacology as an emerging strategy to combat malarial parasites, *ChemMedChem.* 11 (2016) 1339–1351. doi:10.1002/cmdc.201600009.
- [29] H. Beinert, M.C. Kenneday, C.D. Stout, Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2335–2373.
- [30] M.C. Kennedy, M.H. Emptage, J.L. Dreyer, H. Beinert, The role of iron in the activation-inactivation of aconitase, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 11098–11105.
- [31] O. Gawron, A. Waheed, A.J. Glaid, A. Jaklitsch, Iron and aconitase activity, *Biochem. J.* 139 (2015) 709–714. doi:10.1042/bj1390709.
- [32] D. Birth, W.-C. Kao, C. Hunte, Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome *bc₁* complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4029. doi:10.1038/ncomms5029.
- [33] J.S. Doggett, A. Nilsen, I. Forquer, K.W. Wegmann, L. Jones-Brando, R.H. Yolken, C. Bordón, S. a Charman, K. Katneni, T. Schultz, J.N. Burrows, D.J. Hinrichs, B. Meunier, V.B. Carruthers, M.K. Riscoe, Endochin-like quinolones are highly efficacious against acute and latent experimental toxoplasmosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 15936–41. doi:10.1073/pnas.1208069109.
- [34] P.H. Alday, I. Bruzual, A. Nilsen, S. Pou, R. Winter, C. Ben Mamoun, M.K. Riscoe, J.S. Doggett, Genetic evidence for cytochrome b Qi site inhibition by 4(1H)-quinolone-3-

- diarylethers and antimycin in *Toxoplasma gondii*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (2017) e01866-16. doi:10.1128/AAC.01866-16.
- [35] C. Vallières, N. Fisher, B. Meunier, Reconstructing the Qo site of *Plasmodium falciparum* bc₁ complex in the yeast enzyme, *PLoS One.* 8 (2013) e71726. doi:10.1371/journal.pone.0071726.
- [36] J.N. Blaza, H.R. Bridges, D. Aragão, E.A. Dunn, A. Heikal, G.M. Cook, Y. Nakatani, J. Hirst, The mechanism of catalysis by type-II NADH:quinone oxidoreductases, *Sci. Rep.* 7 (2017) 40165. doi:10.1038/srep40165.
- [37] C.K. Dong, V. Patel, J.C. Yang, J.D. Dvorin, M.T. Duraisingh, J. Clardy, D.F. Wirth, Type II NADH dehydrogenase of the respiratory chain of *Plasmodium falciparum* and its inhibitors, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 972–975. doi:10.1016/j.bmcl.2008.11.071.
- [38] L. Florens, M.P. Washburn, J.D. Raine, R.M. Anthony, M. Grainger, J.D. Haynes, J.K. Moch, N. Muster, J.B. Sacci, D.L. Tabb, A.A. Witney, D. Wolters, Y. Wu, M.J. Gardner, A.A. Holder, R.E. Sinden, J.R. Yates, D.J. Carucci, A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle, *Nature.* 419 (2002) 520–526. doi:10.1038/nature01107.
- [39] E. Lasonder, Y. Ishihama, J.S. Andersen, A.M.W. Vermunt, A. Pain, R.W. Sauerwein, W.M.C. Eling, N. Hall, A.P. Waters, H.G. Stunnenberg, M. Mann, Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry, *Nature.* 419 (2002) 537–542. doi:10.1038/nature01111.
- [40] F. Silvestrini, Z. Bozdech, A. Lanfrancotti, E. Di Giulio, E. Bultrini, L. Picci, J.L. DeRisi, E. Pizzi, P. Alano, Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 143 (2005) 100–110. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.04.015.
- [41] T.D. Otto, D. Wilinski, S. Assefa, T.M. Keane, L.R. Sarry, U. Böhme, J. Lemieux, B. Barrell, A. Pain, M. Berriman, C. Newbold, M. Llinás, New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq, *Mol. Microbiol.* 76 (2010) 12–24. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07026.x.
- [42] N. Lang-Unnasch, A.D. Murphy, Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host, *Annu. Rev. Microbiol.* 52 (2002) 561–590. doi:10.1146/annurev.micro.52.1.561.

- [43] A. Srivastava, N. Philip, K.R. Hughes, K. Georgiou, J.I. MacRae, M.P. Barrett, D.J. Creek, M.J. McConville, A.P. Waters, E. Ashley, M. Dhorda, R. Fairhurst, C. Amaratunga, P. Lim, C. Homewood, Z. Bozdech, M. Llinas, B. Pulliam, E. Wong, J. Zhu *et al.* Stage-specific changes in *Plasmodium* metabolism required for differentiation and adaptation to different host and vector environments, *PLOS Pathog.* 12 (2016) e1006094. doi:10.1371/journal.ppat.1006094.
- [44] H. Ke, I.A. Lewis, M. Llina, H. Ke, I.A. Lewis, J.M. Morrissey, K.J. Mclean, S.M. Ganesan, H.J. Painter, M.W. Mather, M. Jacobs-Lorena, M. Llinás, A.B. Vaidya, Genetic investigation of tricarboxylic acid metabolism during the *Plasmodium falciparum* life cycle, *Cell Rep.* 11 (2015) 164–174. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.011.
- [45] J.I. MacRae, M.W. Dixon, M.K. Dearnley, H.H. Chua, J.M. Chambers, S. Kenny, I. Bottova, L. Tilley, M.J. McConville, Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *BMC Biol.* 11 (2013) 67. doi:10.1186/1741-7007-11-67.
- [46] H. Ibrahim, A. Pantaleo, F. Turrini, P. Arese, J.-P. Nallet, F. Nepveu, Pharmacological properties of indolone-N-oxides controlled by a bioreductive transformation in red blood cells, *Med. Chem. Commun.* 2 (2011) 860–869.
- [47] B.J. Reeder, The Redox Activity of Hemoglobins: From physiologic functions to pathologic mechanisms, *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 1087–1123. doi:10.1089/ars.2009.2974.
- [48] P. Arese, F. Turrini, E. Schwarzer, Band 3 /complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological Human Erythrocytes, *Cell. Physiol. Biochem.* (2005) 133–146.
- [49] H. Jiang, L. Chen, S. Herzberg, X. Shen, R. Hilgenfeld, K. Nagarajan, T. Hogg, C.L. Schmidt, M. Wecke, C. Blohmke, structural and functional characterization of falcipain-2, a hemoglobinase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 25425–25437. doi:10.1074/jbc.m603776200.

**Chapitre I-2 : Sélection des mutants résistantes à la
plasmodione et identification du mécanisme de
résistance**

Introduction

Pour identifier d'autres acteurs intervenant dans le mécanisme d'action de la plasmodione, j'ai sélectionné des souches résistantes à la plasmodione sur milieu respiratoire. Les mutations de résistance ont été ensuite identifiées par le séquençage du génome réalisé par la plateforme de séquençage à haut débit de l'I2BC qui s'est également chargée de l'analyse bio-informatique.

Onze mutants génétiquement indépendants ont été obtenus. Après une caractérisation phénotypique, les souches ont été classées selon leur capacité de croissance respiratoire et leur niveau de résistance. La majorité des mutations (9) sont localisées dans le gène *SDHI* codant pour la sous-unité 1 du complexe II de la chaîne respiratoire ou succinate déshydrogénase. Ces mutations résultent dans les phénotypes les plus marqués. Deux mutations sont localisées dans le gène *LPD1* et *LIP2* qui codent respectivement pour la lipoamide déshydrogénase et la lipoamide lyase.

Une fois les mutations identifiées et vérifiées, j'ai étudié leur effet sur l'activité enzymatique et leur possible rôle dans le mécanisme d'action de la plasmodione. Cela m'a permis de proposer que le complexe II serait impliqué dans la transformation de la plasmodione en PDO ou PD-bzol.

Les résultats de ce travail sont décrits en détails dans l'article en préparation ci-dessous.

Introduction

Malaria is one of the major public health issues in subtropical areas. The mosquito-borne infectious disease is caused by unicellular eukaryotic parasites of the genus *Plasmodium*. *P. falciparum* is responsible for the most severe forms of the disease. The parasites have a complex life cycle. In the human host, they mostly undergo asexual multiplication in red blood cells causing the malaria symptoms. A small population of the parasites differentiate in gametocytes that can infect mosquitoes upon a blood meal. Most drugs currently on the market target the symptomatic asexual forms. But increasing efforts are now made to develop drugs acting on the transmissible forms, the gametocytes, with the aim of malaria control and elimination. A major concern is the spread of resistance. The parasites have developed resistances to almost all drugs used so far to treat malaria, including artemisinin. There is thus an urgent need for new antimalarial compounds with different modes of action and low risk of resistance.

Plasmodione (3-[4-(trifluoromethyl)benzyl]-menadione) (PD) is a novel early lead compound displaying fast-acting antimalarial activity. It disrupts the redox balance of parasite-infected red blood cells. It is active against asexual blood stages and early gametocytes [1, 2].

The proposed mode of action of PD starts with its benzylic oxidation to form PDO (3-benzoylmenadione) by a mechanism yet to be elucidated that could be catalysed by free or protein-bound hemes (including haemoglobin) *via* ferryl species (see[3] and refs within). PDO then act as a subversive substrate of flavoprotein(s). *In vitro*, PDO is able to cycle with the NADPH-dependent glutathione reductase and methemoglobin (metHb(Fe^{III})) [1, 4]. In the cells, the redox-cycle would lead to redox unbalance and ultimately to the death of the parasites (see Fig.1 in [3]).

PD is also a potent inhibitor of yeast respiratory growth, acting most likely via an oxidative stress [3]. Genetic and biochemical analyses pointed towards a key role for the mitochondrial respiratory chain flavoprotein NADH-dehydrogenases (NDH) in the drug activity. We found that plasmodione metabolites benzhydrol (PD-bzol) and PDO acted as subversive substrates of the enzyme. The reaction resulted in ROS production, which in turn led to growth arrest. Increased NDH activity resulted in an increased sensitivity towards PD while decreased NDH activity resulted in a decreased sensitivity. Other flavoproteins could be involved in PD activity,

such as Glr1, Lpd1 and Mcr1 as we found that increased dosage of the genes encoding those proteins resulted in a moderate increased of PD sensitivity [3].

Here, in order to decipher further the mode of action of the drug and to uncover more enzymes involved in PD activity, we selected and studied yeast mutants resistant to PD. We found that the resistance was caused by defect in Lpd1, Lip2 or succinate dehydrogenase (SDH) that are components or partner of components of the Krebs cycle.

Materials and Methods

Growth media and yeast strains

The following growth media were used: YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glucose); YPEth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% ethanol); YPG (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glycerol).

Resistant mutants were selected from strain AD1-9 that lacks several membrane transporters (*α*, *ura3*, *his1*, *Δyor1*, *Δsnq2*, *Δpdr5*, *Δpdr10*, *Δpdr11*, *Δycf1*, *Δpdr3*, *Δpdr15*, *Δpdr1*), kindly provided by M. Ghislain, UCL, Belgium.

Growth assays and drug sensibility tests

Drug sensitivity was assessed by monitoring the inhibition of yeast cell proliferation. Yeast were grown in 5 mL culture medium YPEth with increasing concentrations of drugs. Cultures were inoculated at an OD_{600nm} of 0.2 and incubated at 28°C with vigorous shaking for three days. OD_{600 nm} were then measured. Data are plots for each strain as the percentage of growth relative to control, *i.e.* untreated by drugs. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. IC₅₀ (drug concentrations required to obtained 50% growth inhibition) were estimated from inhibitor titration plots.

Measurement of enzymatic activities

Mitochondria were prepared as in [5]. Protein concentration was determined by Bradford method.

Succinate-cytochrome *c* reductase activities were measured by monitoring the rate of reduction of cytochrome *c* spectrophotometrically at 550-540 nm over 5-min time-course. Measurements were performed at room temperature in 1 mL of 10 mM potassium phosphate pH 7, 2 mM KCN

and 20 μM cytochrome *c*. Mitochondria were added at around 120 μg of protein per mL. The reaction was initiated by the addition 5 mM succinate.

Lipoamide dehydrogenase activities were measured, as described in [6] by monitoring the rate of oxidation of NADH spectrophotometrically at 340 nm over 20 min time-course. Measurements were performed at room temperature in 1 mL of 50 mM potassium phosphate pH 6.5 and 0.9 mM of lipoamide. Mitochondria solubilized in triton X-100 for 10 min on ice were added at 60-100 μg per mL. The reaction was initiated by addition of 0.2 mM of NADH.

The activities of the α -ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase complexes were measured by monitoring the rate of reduction of NAD spectrophotometrically at 340 nm over 20 min time-course. Measurements were performed at room temperature in 1 mL of 50 mM potassium phosphate pH 7.8, 1 mG mL^{-1} BSA, 0.01 mM DTT (dithiothreitol), 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM TPP (thiamine pyrophosphate), 1 mM NAD^+ and 2 mM α -ketoglutarate or 2 mM pyruvate. The mitochondria were added at 60-100 μg per mL. The reaction was initiated with 0.25 mM Coenzyme A (trilithium salt).

Oxygen consumption activities were measured in a Clarke-type oxygen electrode. Mitochondria were added at around 80 μg of protein in 1 mL of 0.7 M sorbitol, 50 mM potassium phosphate pH 7.5 and 0.2 mM EDTA. The reaction was initiated by the addition of either 0.8 mM NADH or 5 mM succinate.

The measurements were repeated at least thrice and averaged.

Sequencing analysis

Whole genome sequencing (WGS) and the bioinformatics analysis was performed by the Next Generation Sequencing Core Facility of I2BC (www.i2bc.paris-saclay.fr). Presence of mutations were confirmed by PCR and sequencing of the mutated genes.

Results and discussion

Selection of the resistant mutants and identification of the mutations

The strain AD1-9, sensitive to plasmodione, was used to select resistant mutants. Several subclones from AD1-9 were grown on YPD, and then incubated on respiratory medium (YPG) supplemented with 100 μM plasmodione (PD) that fully abolished AD1-9 growth. Resistant

colonies appeared after three or four week incubation. Eleven genetically independent resistant colonies (each from different subclones of the parental AD1-9 strain) were then analysed.

First the respiratory growth competence and the level of resistance to PD were assessed. The resistant mutants were classed in three groups (Table 1): weak, moderate and strong resistance, which correlated with mild, moderate and strong defect in respiratory growth.

The IC₅₀ for PD in group 1, 2 and 3 mutants increased 2-, 4- and >10-fold as compared to control, respectively. The cell density (OD_{600nm}) after three-day culture of group 1, 2 and 3 mutants reached approximatively 65, 35 and 10% of the control density, respectively.

Table 1: Classification of the resistant mutants

phenotypic group	IC ₅₀ (μM)	OD _{600nm}	number of mutants
parental	4	45 +/- 5	
1	8	28 +/- 3	1
2	15	15 +/- 2	3
3	>25	4 +/- 1	7

The parental strain AD1-9 and mutants were grown in respiratory medium (YPEth) with increasing concentrations of PD. OD_{600nm} were measured after three-day culture. The IC_{50s} (concentrations required to obtain 50% growth inhibition) were estimated from the plots of OD_{600nm} versus PD concentrations.

Table 2: Identified mutations

phenotypic group	gene	amino-acid substitution	number of mutants
weak	<i>LPD1</i>	G94D	1
moderate	<i>LIP2</i>	G172V	1
	<i>SDH1</i>	G249C	2
strong	<i>SDH1</i>	G64S	3
	<i>SDH1</i>	W112L	2
	<i>SDH1</i>	D266G	1
	<i>SDH1</i>	C431Y	1

We then tested whether the resistance could be caused by a multidrug resistance mechanism. None of the mutants tested presented a cross-resistance to proguanil, azoxystrobin or atovaquone (not shown), suggesting a more specific mechanism of resistance to PD.

The mutants were then sequenced to identify the possible resistance mutations. The group 1 (weak resistance) mutant carries a mutation in *LPD1*. One group 2 (moderate resistance) mutant carries a mutation in *LIP2*. The remaining nine resistant mutants harbour mutations in *SDH1*. G249C were found in two group 2 (moderate resistance) mutants. In group 3 (strong resistance), G64S was observed in three mutants, W112L, in two mutants, D266G and C431Y were found once.

Resistance mutation in *LPD1*

LPD1 encodes the mitochondrial matrix lipoamide dehydrogenase (LPD). We previously showed that the overexpression of *LPD1*, in yeast, increased the sensitivity to PD, indicating that this flavoprotein would be involved in the drug activity, in concert with other flavoproteins such as the NADH-dehydrogenases [3]. The deletion of *LPD1* could not be tested as it causes respiratory growth deficiency.

The PD resistance mutation identified here results in the replacement of a glycine by an aspartate at position 94. Residue G94 is located at the interface between the two monomers in the yeast Lpd1 structure and is facing residue N104 (Fig.1A). G94D might induce a steric (and/or electrostatic) clash and destabilize the structure. We tested the activity of LPD in control and mutants (Fig.1B) and observed a severely decreased activity in lpd1-G94D mutant. As the mutant cells showed only a weak respiratory growth defect, it could be suggested that LPD activity is in large excess in control cells or that activity of the unstable mutant enzyme was further lost during the solubilisation of the mitochondria prior to LPD activity assays. In any case, it is most likely that the mutation decreases LPD activity in the cells, which results in a decreased sensitivity to PD.

Mutation *sdh1*-D266G had no effect on LPD activity whereas mutation *lip2*-G172V increased the activity (Fig.1B).

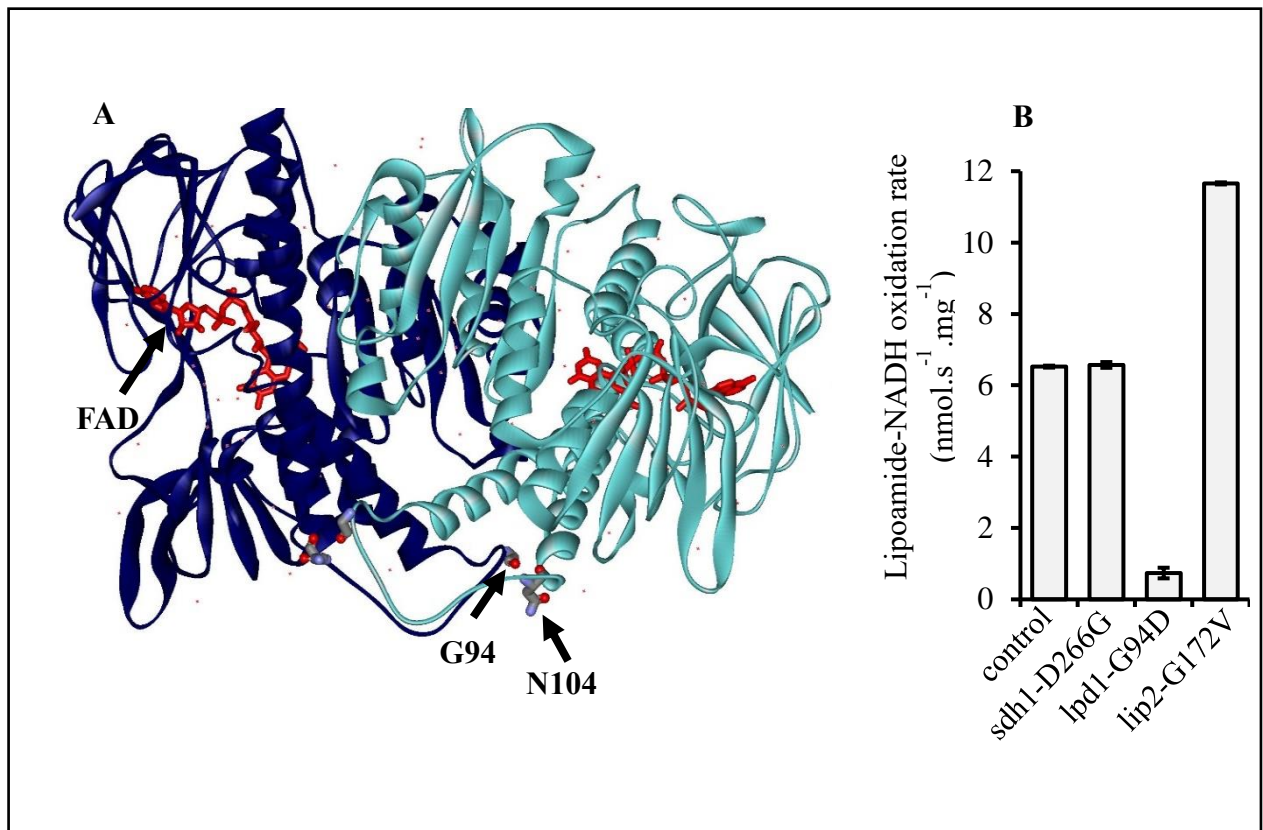


Figure 1. Lpd1 mutation

A) Location of the PD resistant mutation in yeast Lpd1 structure (PDB: 1JEH). FAD is in red. B) LPD activity in control and mutants. NADH oxidation rates were monitored at 340 nm using 0.9 mM lipoamide as electron acceptor. Detergent-solubilized mitochondria were added at 60-100 μ G per mL. The reaction was initiated by addition of 0.2 mM of NADH. The measurements were repeated at least thrice and the data averaged. Error bars represent standard deviation.

Resistance mutation in LIP2

LIP2 encodes the mitochondrial lipoyl transferase that participates in the attachment of the co-factor lipoic acid to three mitochondrial enzymes, namely the pyruvate dehydrogenase (PDH), the α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KDH) and the glycine decarboxylase. Based on the structure of *Mycobacterium tuberculosis* equivalent LipB (PDB: 1W66), the Lip2 substitution G172V is located in the catalytic domain [7-10].

First, we confirmed that the observed mutation in Lip2 was the cause of the moderate respiratory defect and the decreased sensitivity to PD. To that end, we transformed control and lip2 mutant with a multi-copy plasmid bearing a WT copy of *LIP2* under the control of its own promoter, and tested the growth and PD sensitivity of the resulting strains (Fig.2 A and B). The increased gene copy resulted in a slight growth defect in the control strain. The WT copy of *LIP2* restored the respiratory growth and PD sensitivity of lip2-G172V to WT level.

We then measured the activities of the α -ketoglutarate- and of the pyruvate-dehydrogenase complexes, as an impaired Lip2 activity should result in a defect in the lipoylation of these complexes and thus of their activities. While the activities reached WT level in *sdh1* mutant, they were severely decreased in *lip2* mutant. The *lpd1* mutant also presented defective activities, which was not unexpected as Lpd1 is the lipoamide dehydrogenase component (E3) of those two complexes.

The decreased activity of the pyruvate-dehydrogenase complex and the α -ketoglutarate-complex, one of the limiting steps of the Krebs cycle [11] would result in a decreased activity of the whole Krebs cycle and a lower production of NADH. In consequence, the activities of the NADH-dependent flavoenzymes, targets of PD would be decreased, which could explain the decreased sensitivity to PD.

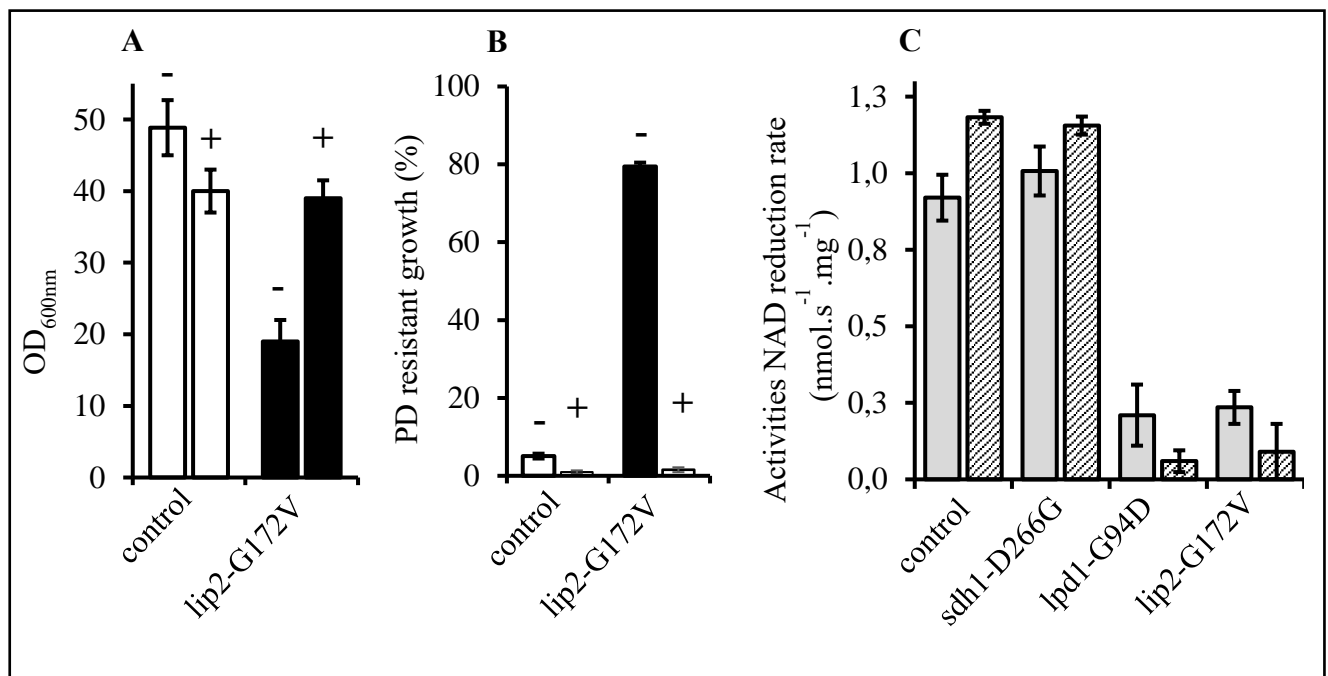


Figure 2. Lip2 mutation

A, B) Restoration of respiratory growth competence and PD sensitivity in *lip2*-G172V mutant. control (white) and *lip* mutant (black), without (-) and with (+) plasmid-borne wt copies of *LIP2* were grown in respiratory medium (YPEth) for three days. OD_{600nm} were then monitored. A) OD_{600nm} reached in absence of PD; B) Growth yield in medium supplemented with 6 μ M PD. Data are presented, for each strain, as % of OD_{600nm} reached in absence of PD.

C) Activity of the complexes α -ketoglutarate dehydrogenase (grey) and pyruvate dehydrogenase (hatched) in control and mutants. NAD⁺ reduction rates were monitored at 340 nm using either 2 mM α -ketoglutarate or 2 mM pyruvate as electron donor. Mitochondria were added at 60-100 μ G per mL. The measurements were repeated at least thrice and the data averaged. Error bars represent standard deviation.

We observed that the LPD activity (measured as lipoamide-driven NADH oxidation, the reverse activity of the E3 component of the complexes) was higher in *lip2* mutant than in control (Fig.1B). It could be suggested that a defect in lipoylation would result in an increased reverse activity.

Resistance mutations in *SDHI*

Of the eleven PD resistant mutants obtained (Table 2), nine harboured mutations in *SDHI* that encodes the FAD-binding subunit of SDH. Five different amino-acid substitutions were found, namely G64S, W112L, G249C, D266G and C431V. Residues G64, G249, D266 and C431 are located in the FAD-binding domain (Fig.3A) and their substitution might affect FAD binding, especially the replacement of D266 by a glycine as the side-chain of D266 is H-bonded to FAD in the structure of the porcine SDH [12]. W112 is outside the catalytic domain and the effect of W112L is difficult to predict.

We chose mutants D266G and G249C, presenting a strong and a moderate phenotype respectively, to pursue the analysis.

First, in order to confirm the effect of the mutations in *SDHI*, mutants *sdh1*-D266G and *sdh1*-G249C were transformed with a plasmid bearing the WT copy of *SDHI* under the control of its own promoter. We observed that the respiratory growth defect and the sensitivity to PD were fully restored (Fig.3B and C).

Then in order to test the effect of the PD resistance mutations on SDH activity, mitochondria were prepared from the parental and the mutant strains and the succinate-driven cytochrome *c* reductase activity was tested (Fig.3D).

In that assay, we monitored the combined activity of SDH (succinate-ubiquinone oxidoreductase) and complex III (ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase), as we followed the rate of cytochrome *c* reduction. The activity of SDH being the limiting factor of the reaction ([13] and references within), a decrease in SDH activity would result in a lower cytochrome *c* reduction rate. The control rate was approximately $2.5 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$. For comparison, the rate of NDH activity, measured as NADH-decylubiquinone oxidoreduction was around $7.5 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ [3]. In the mutants, the SDH activity was decreased to 15-30% of the control activity. We also monitored SDH activity in the *lip2* and *lpd1* mutants. In *lpd1*, the rate was similar to control rate while it was decreased by around 45 % in *lip2*.

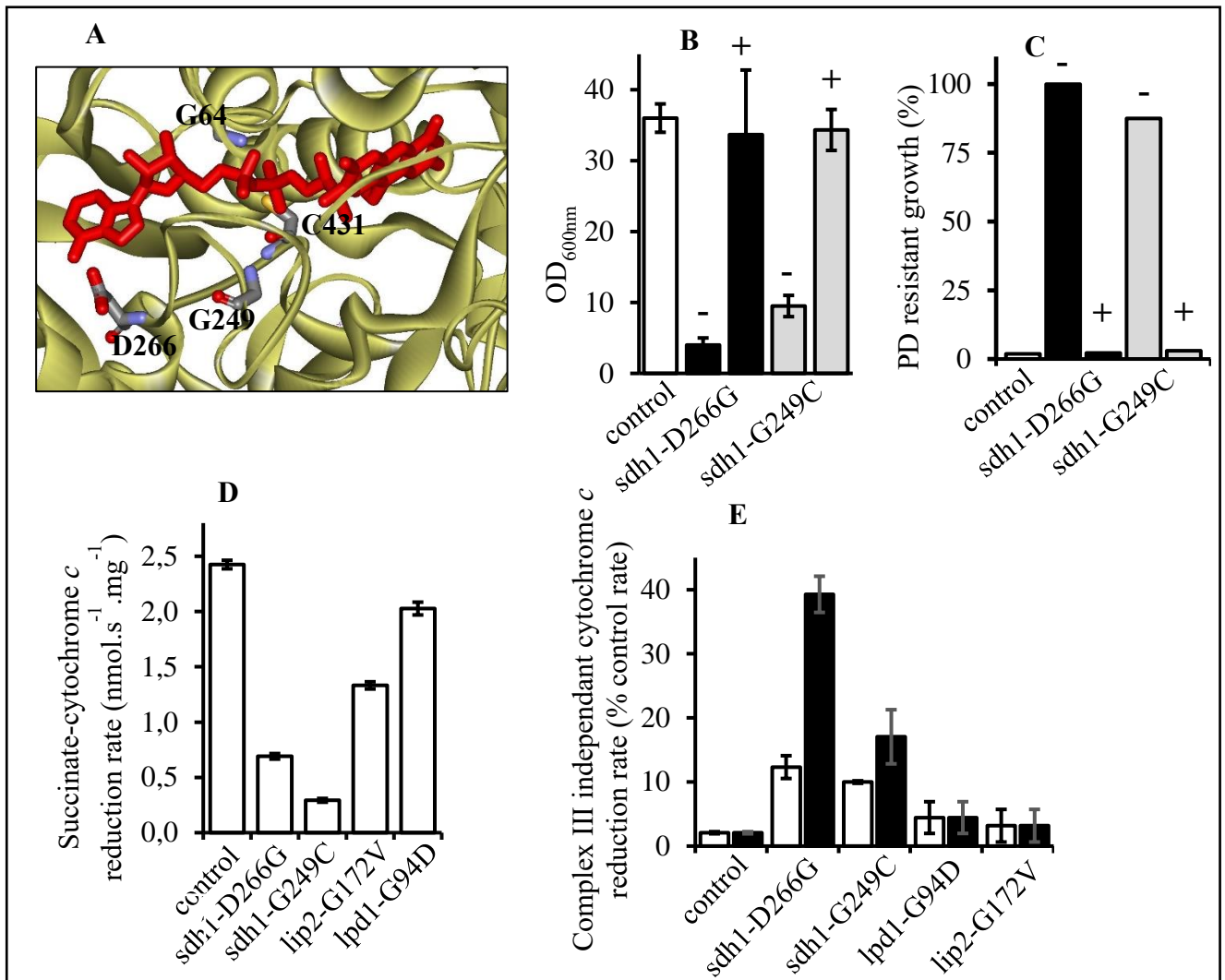


Figure 3. Sdh1 mutations

A) Location of the PD resistance mutations in the FAD-binding pocket of *SDH1*. The figure was drawing using the avian SDH structure (PDB: 2H88). FAD is in red.

B, C) Restoration of respiratory growth competence and PD sensitivity in *sdh1* mutants. Control (white) and *sdh1* mutants (black and grey), without (-) and with (+) plasmid-borne wt copies of *SDH1* were grown in respiratory medium (YPEth) for three days. OD_{600nm} were then monitored.

B) OD_{600nm} reached in absence of plasmidione; C) Growth yield in medium supplemented with 8 μM plasmidione. Data are presented, for each strain, as % of OD_{600nm} reached in absence of plasmidione.

D, E) SDH activity in control and PD resistant mutants. Succinate driven-cytochrome *c* reductase activities were measured by monitoring the reduction of cytochrome *c* at 550-540 nm. Mitochondria were added at around 120 μg of protein per mL. The reaction was initiated by the addition of 5 mM succinate. D) Cytochrome *c* reduction rates resulting from SDH and complex III combined activities. E) Cytochrome *c* reduction rates independent of complex III activity (in presence of 10 μM atovaquone that fully inhibits complex III), presented as % of the rates with active complex III (without atovaquone, as in Fig.3D). White, initial rates; black, rates after 10 min reaction.

The measurements were repeated at least twice and the data averaged. Error bars represent standard deviation

We then measured the rates of cytochrome *c* reduction in the samples with fully inhibited complex III (i.e. after addition of 10 μ M of the complex III specific inhibitor atovaquone) over a 20 min time course (Fig.3E). As expected, in the control, the rate of cytochrome *c* reduction fell to 2% of the rate of untreated sample i.e. with active complex III. The same behaviour was observed in *lpd1* and *lip2* mutants. By contrast, in the *sdh1* mutants, the rates were significantly higher and after 10 min reaction reached 39% (*sdh1*-D226G) and 14% (*sdh1*-G249C) of the untreated rate. The amino-acid substitutions in *Sdh1* are thus likely to result in an increased production of ROS, which reduce cytochrome *c* in absence of a functioning complex III, as cytochrome *c* can be directly reduced by superoxide anions [14].

Plasmodione metabolites, as subversive substrates of SDH

We then investigated whether PD metabolites PD-bzol and PDO could interfere with SDH activity. We previously showed that the compounds acted as substrates of NDH and that the reaction resulted in a production of ROS [3].

We monitored the succinate-driven O₂ consumption by mitochondria and compared to NADH-driven activity (Fig.4A). The rates of succinate-driven activities were lower than the rates of NADH-driven activities. Cyanide fully inhibited the O₂ consumption as expected. Addition of PD-bzol to the cyanide-inhibited samples resulted in O₂-consumption with rates similar to the uninhibited rates. Addition of SOD and catalase stopped the O₂ consumption, which suggested that the succinate-driven O₂ consumption resulted in ROS production, as observed for NADH-driven activity and previously reported [3].

To confirm further the effect of PD metabolites on SDH, we monitored the activity of succinate cytochrome *c* reduction in different conditions (Fig.4B). The addition of 50 μ M PDO decreased by 30% the reaction rate. PDO having no effect on complex III activity (tested at up to 100 μ M), this indicated that the compound interfered with SDH activity. When complex III activity was fully inhibited by atovaquone, addition of PDO initiated cytochrome *c* reduction. The rate of the PDO-driven cytochrome *c* reduction reached 20% of the control rate i.e. the rate of cytochrome *c* reduction by SDH-complex III. The PDO-driven cytochrome *c* reduction was partly abolished by the addition of SOD and catalase. It could thus suggested that PDO react with SDH and receive an electron. The PDO-radicals would then react with O₂ producing superoxide, which in turn would reduce cytochrome *c*. Addition of SOD and catalase, lowering superoxide level, would decrease cytochrome *c* reduction rate. The same experiment was performed with PD-bzol and similar results were obtained (not shown).

As a control, we also tested the effect of PD on the succinate cytochrome *c* reductase activity. In absence of atovaquone, thus when complex III was functional, a 25-30 % decrease in the reaction rate was observed at 50 μ M PD, as observed with PDO. A maximum 50% decrease was reached at 90 μ M PD. Higher doses of PD did not inhibit further the reaction (data not shown). It is thus clear that PD-induced yeast growth inhibition is not caused by the inhibition of SDH by PD. In presence of atovaquone when complex III was fully inhibited, addition of 50 μ M PD did not initiate cytochrome *c* reduction, contrarily to PDO and PD-bzol (data not shown).

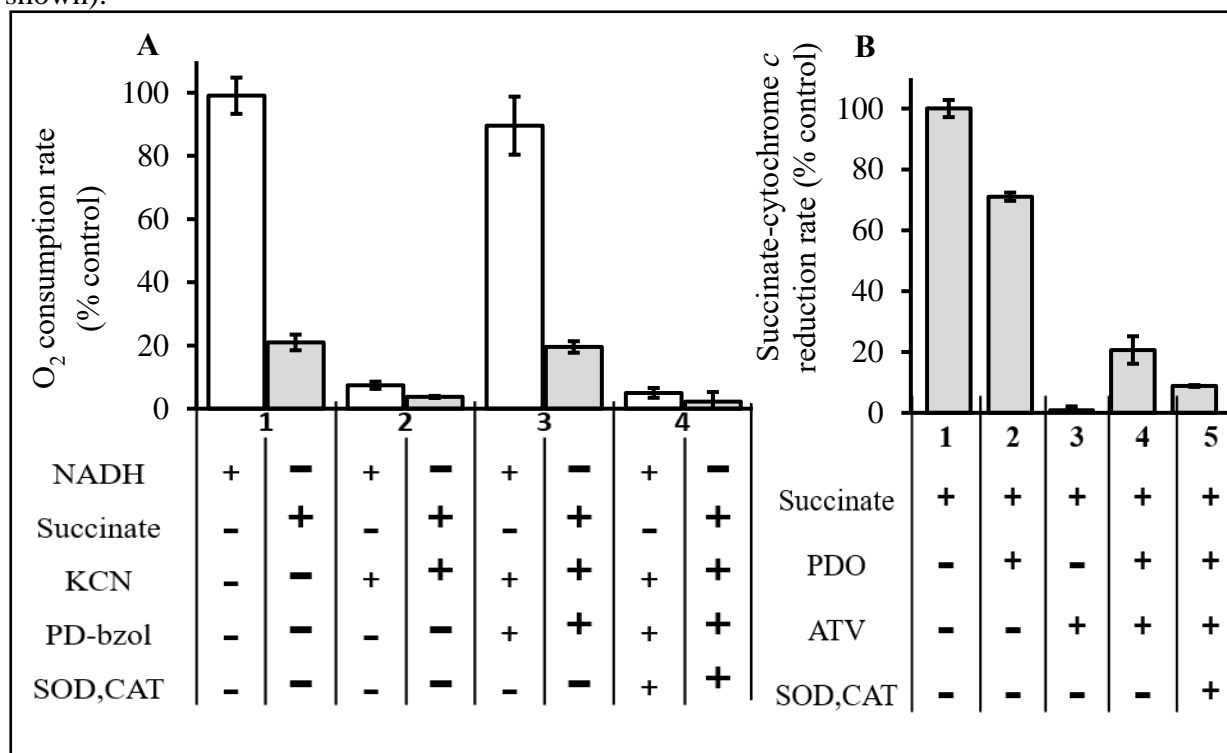


Figure 4. Effect of PD metabolites PD-bzol and PDO on O₂ consumption and SDH activities.

A) O₂ consumption activities. The reactions were initiated by the addition of 0.8 mM NADH (white) or 5 mM succinate (grey). Mitochondria were added at around 80 μ G per mL. The activities were monitored in different conditions: 1) standard conditions (active cytochrome *c* oxidase); 2) inhibition by 2 mM KCN; and sequential addition of 3) 50 μ M PD-bzol and 4) superoxide dismutase and catalase both at 300 U (SOD, CAT). The activities are presented as % of the NADH-driven rate of cytochrome *c* reduction in standard condition (1, white).

B) Succinate-driven cytochrome *c* reductase activities were measured by monitoring the rates of cytochrome *c* reduction at 550-540 nm. The mitochondria were added at around 120 μ G per mL. The reactions were initiated by the addition 5 mM succinate. Control rate (1) ; rates after addition of (2) 50 μ M PDO; (3) 10 μ M atovaquone (ATV); (4) PDO and ATV; (5) PDO and ATV with superoxide dismutase and catalase both at 300 U per mL (SOD, CAT).

The measurements were repeated at least twice and the data averaged. Error bars represent standard deviation

PD is most likely a prodrug that generates PDO (and/or PD-bzol), substrates of SDH and NDH (and possibly of other flavoenzymes such as Lpd1) and key actors in redox-cycling. The reaction would result in ROS production, leading to growth arrest. As previously observed, increasing NDH activity in cells by the overexpression of *NDE2* caused an increased sensitivity to PD whereas decreasing NDH activity by the deletion of *NDE1* resulted in PD resistance [3]. We tested whether increasing NDH activity in *sdh1-D226G* could restore PD sensitivity. We compared the mutant with its parental strain, both overexpressing *NDE2* (Fig.5A). While *NDE2* overexpression increased PD sensitivity in the control as previously shown, it had no effect on PD resistance of *sdh1* mutant, indicating that the increase in NDH activity could not rescue the decrease in SDH activity (as regards to PD sensitivity). In addition, in cells, SDH activity is lower than NDH activity, as judged by the difference in O₂-consumption rates (Fig.4A). If SDH had the same role as NDH, thus if their activity in PD sensibility were solely additive, a decreased activity of SDH should have a minor effect on PD resistance, which is in contraction with the observed severe loss in PD sensitivity of *sdh1-D226G* mutant (Fig.5A and B).

We then compared the sensitivity to PD and PD-bzol of *sdh1-D266G* and $\Delta nde1$ (Fig.5B and C). Both mutants were resistant to PD. $\Delta nde1$ was also resistant to PD-bzol. *Lip2-G172V* presented the same profile as $\Delta nde1$ (not shown). By contrast, *sdh1-D226G* showed an increased sensitivity to PD-bzol as compared to control. This increased sensitivity could be due to an enhanced production of ROS (Fig.3E). We previously observed that $\Delta sod2$ mutant, lacking the mitochondrial superoxide dismutase and thus accumulating more ROS, was highly sensitive to PD-bzol [3].

However, taken together, the data suggested that PD resistance in *sdh1* mutant could not be explained solely by the decrease of SDH-driven PDO/PD-bzol-reducing activity. We can infer that SDH would play a role (partly) different from NDH and most likely act upstream of PDO/PD-bzol in PD inhibitory pathway. It is tempting to suggest that SDH could be involved in the first step of PD bioactivation and the generation of PDO (and PD-bzol), which involves reduction, possibly via the FAD cofactor, and then, benzylic oxidation via the heme.

SDH is composed of four subunits, Sdh1-4. Sdh1 binds the FAD cofactor and Sdh2, three Iron-Sulphur clusters. Sdh3 and Sdh4, the membrane anchored subunits bind a heme *b* and form the ubiquinone reduction site. The electrons are transferred from the succinate oxidation site to the ubiquinone reduction site along a chain of redox groups, starting with FAD, then the three Iron-Sulphur groups. The role of the heme *b* remains poorly understood. The catalytic activity of SDH has been investigated in details (for a review, see for instance [15]).

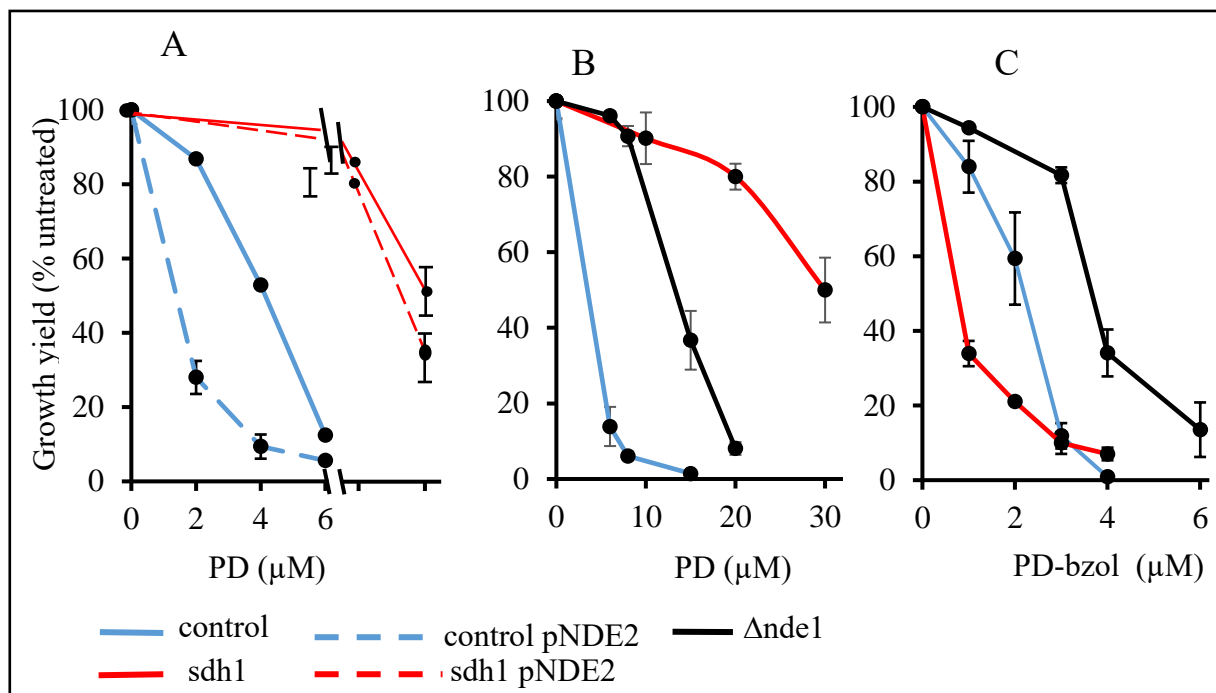


Figure 5. Effect of *SDH1* mutation and *NDH* gene dosage on growth sensitivity to PD and PD-bzol. Control and mutants were grown in YPEth medium with increasing concentrations of drugs. Cell density (OD_{600nm}) were measured after three days culture. For each strain, the data are presented as percentage of the OD_{600nm} of the untreated culture. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. Error bars represent standard deviation. A) Effect of increased NDH level on PD sensitivity of control and *sdh1*-D266G (*sdh1*). Control (blue) and *sdh1* (red) (straight lines) compared to control and *sdh1* transformed with a multicopy plasmid bearing *NDE2* (dotted lines); B and C) Effect of SDH and NDH decreased level on PD and PD-bzol sensitivity. Blue, Control; black, mutant $\Delta nde1$; red, mutant *sdh1*-D266G.

As presented in Table 2, of the eleven PD resistant mutants selected, two harboured a mutation in either Lpd1 or Lip2 and nine, an amino-acid substitution in Sdh1. Five different amino-acid replacements in Sdh1 were found. Of these, four were located in the FAD-binding site.

To test whether mutations in other locations in SDH could also result in PD resistance, we constructed mutants harbouring mutations in the ubiquinone binding site and substitutions of the heme ligands.

Three mutations located in the ubiquinone binding site and previously studied were chosen, namely *sdh3*-R75K, *sdh4*-Y120I and *sdh4*-D119N. Residue *sdh4*-Y120 is required for ubiquinone reduction and might have a role in the protonation of ubiquinone [16]. Mutations *sdh4*-D119N and *sdh3*-R75K resulted in a severely decreased ubiquinone reduction activity and increased ROS production [17]. We checked the respiratory growth and PD sensitivity of the

mutants. Mutant R75K was unable to grow on respiratory medium and could not be further tested. Sdh4-Y120I and sdh3-D119N presented strong and moderate growth defect, respectively, as observed with sdh1-D226G and sdh1-G249C. However contrarily to the sdh1 mutants, sdh4 and sdh4 mutants were sensitive to PD (Fig.6A and B). SDH defect caused by mutations in the ubiquinone binding site did not result in PD resistance, which argued for a specific role of the FAD-binding domain in PD activity. SDH bound FAD might be required for the reduction of PD prior to the benzylic oxidation to generate PDO (and PD-bzol).

We then asked whether SDH heme *b* could be involved in PD activity. Replacements of heme *b* ligands sdh3-H134 and sdh3-C109 by an alanine, were then tested. It was reported that the heme was not required for yeast SDH as the double mutation H134A-C109A had no or only weak effect on respiratory growth and SDH activity [18].

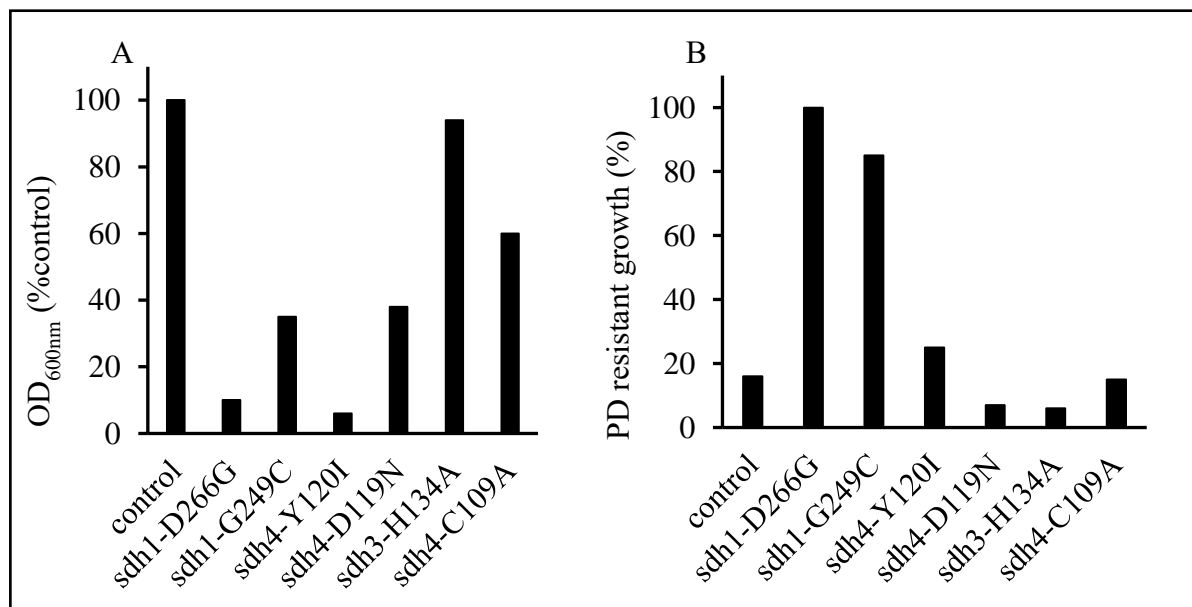


Figure 6. Effect of *SDH3* and *SDH4* mutations on respiratory growth and PD sensitivity Control and mutants were grown in YPEth medium (A) without and (B) with 6 μ M PD. Cell density (OD_{600nm}) were measured after three days culture. A) The data are presented as % of OD_{600nm} of the control. B) For each strain, the data are presented as percentage of the OD_{600nm} of the untreated culture.

We observed that sdh3-H134A had no effect on respiratory growth while sdh4-C109A resulted in a slightly decreased growth. Both mutants were sensitive to PD (Fig.6A and B), suggesting that an alteration of heme *b* binding or properties had no effect on PD activity. A role for SDH heme *b* cannot be ruled out as the substitution of both heme ligands might be needed to abolish its function in PD bioactivation.

We could also propose that the generation of PDO (and PD-bzol) requires FAD-bound SDH and free heme or other hemoproteins.

To go further in the study, it might be possible to purify SDH and investigate the reaction of PD into PDO using ^{13}C -enriched plasmodione [19]. This might highlight a novel property of SDH.

References

- [1] T. Müller, L. Johann, B. Jannack, M. Brückner, D.A. Lanfranchi, H. Bauer, C. Sanchez, V. Yardley, C. Deregnacourt, J. Schrével, M. Lanzer, R.H. Schirmer, E. Davioud-Charvet, Glutathione reductase-catalyzed cascade of redox reactions to bioactivate potent antimalarial 1,4-naphthoquinones - A new strategy to combat malarial parasites, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 11557–11571. doi:10.1021/ja201729z.
- [2] K. Ehrhardt, C. Deregnacourt, A.A. Goetz, T. Tzanova, V. Gallo, P. Arese, B. Pradines, S.H. Adjalley, D. Bagrel, S. Blandin, M. Lanzer, E. Davioud-Charvet, The redox cycler plasmodione is a fast-acting antimalarial lead compound with pronounced activity against sexual and early asexual blood-stage parasites, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 5146–5158. doi:10.1128/AAC.02975-15.
- [3] P. Mounkoro, T. Michel, S. Blandin, M.P. Golinelli-Cohen, E. Davioud-Charvet, B. Meunier, Investigating the mode of action of the redox-active antimalarial drug plasmodione using the yeast model, *Free Radic. Biol. Med.* 141 (2019) 269–278. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.026.
- [4] M. Bielitz, D. Belorgey, K. Ehrhardt, L. Johann, D.A. Lanfranchi, V. Gallo, E. Schwarzer, F. Mohring, E. Jortzik, D.L. Williams, K. Becker, P. Arese, M. Elhabiri, E. Davioud-Charvet, Antimalarial NADPH-consuming redox-cyclers as superior glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency Copycats, *Antioxid. Redox Signal.* 22 (2015) 1337–1351. doi:10.1089/ars.2014.6047.
- [5] C. Lemaire, G. Dujardin, Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria: activity measurement and subunit composition analysis. *Methods Mol Biol.* 432 (2008) 65–81.
- [6] R.A. Vaubel, P. Rustin, G. Isaya, Mutations in the dimer interface of dihydrolipoamide dehydrogenase promote site-specific oxidative damages in yeast and human cells, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 40232–40245. doi:10.1074/jbc.M111.274415.
- [7] M.S. Schonauer, A.J. Kastaniotis, V.A.S. Kursu, J.K. Hiltunen, C.L. Dieckmann, Lipoic acid synthesis and attachment in yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 23234–23242. doi:10.1074/jbc.M109.015594.
- [8] M.E. Marvin, P.H. Williams, A.M. Cashmore, The isolation and characterisation of a

- Saccharomyces cerevisiae* gene (*LIP2*) involved in the attachment of lipoic acid groups to mitochondrial enzymes, *FEMS Microbiol. Lett.* 199 (2001) 131–136. doi:10.1016/S0378-1097(01)00170-7.
- [9] Q. Ma, X. Zhao, A.N. Eddine, A. Geerlof, X. Li, J.E. Cronan, S.H.E. Kaufmann, M. Wilmanns, The *Mycobacterium tuberculosis* LipB enzyme functions as a cysteine/lysine dyad acyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 8662–8667. doi:10.1073/pnas.0510436103.
- [10] J. Storm, Lipoic Acid Metabolism of *Plasmodium* - A suitable drug target, *Curr. Pharm. Des.* (2012) 3480–3489. doi:10.2174/138161212801327266.
- [11] S. Goncalves, V. Paupe, E.P. Dassa, J.J. Brière, J. Favier, A.P. Gimenez-Roqueplo, P. Bénit, P. Rustin, Rapid determination of tricarboxylic acid cycle enzyme activities in biological samples, *BMC Biochem.* 11 (2010). doi:10.1186/1471-2091-11-5.
- [12] F. Sun, X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, M. Bartlam, Z. Rao, Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II, *Cell.* 121 (2005) 1043–57. doi:10.1016/j.cell.2005.05.025.
- [13] G. Brasseur, D. Lemesle-Meunier, F. Reinaud, B. Meunier, Q_o site deficiency can be compensated by extragenic mutations in the hinge region of the iron-sulfur protein in the *bc₁* complex of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24203–11. doi:10.1074/jbc.M311576200.
- [14] J. Butler, W.H. Koppenol, E. Margoliash, Kinetics and mechanism of the reduction of ferricytochrome *c* by the superoxide anion, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 10747–10750.
- [15] G. Cecchini, Function and structure of complex II of the respiratory chain, *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003) 77–109. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700.
- [16] Y. Silkin, K.S. Oyedotun, B.D. Lemire, The role of Sdh4p Tyr-89 in ubiquinone reduction by the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767 (2007) 143–150. doi:10.1016/j.bbabi.2006.11.017.
- [17] S.S.W. Szeto, S.N. Reinke, B.D. Sykes, B.D. Lemire, Ubiquinone-binding site mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase generate superoxide and lead to the accumulation of succinate, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 27518–27526. doi:10.1074/jbc.M700601200.

- [18] K.S. Oyedotun, C.S. Sit, B.D. Lemire, The *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase does not require heme for ubiquinone reduction, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767 (2007) 1436–1445. doi:10.1016/j.bbabi.2007.09.008.
- [19] L. Feng, D.A. Lanfranchi, L. Cotos, E. Cesar-Rodo, K. Ehrhardt, A.-A. Goetz, H. Zimmermann, F. Fenaille, S.A. Blandin, E. Davioud-Charvet, Synthesis of plasmodione metabolites and ¹³C-enriched plasmodione as chemical tools for drug metabolism investigation, *Org. Biomol. Chem.* 16 (2018) 2647–2665. doi:10.1039/C8OB00227D.

Chapitre I-3 : Recherche de partenaires de la plasmodione en utilisant le modèle levure

Recherche de partenaires de la plasmodione en utilisant le modèle levure

Introduction et méthodes

Introduction

La plasmodione est une molécule antipaludique en cours de développement présentant une efficacité très similaire à celle des artémisinine et de l'atovaquone. Ces deux molécules, très utilisées en thérapie, sont sur le marché sous forme combinée avec d'autres molécules antipaludiques. Ceci est une stratégie thérapeutique importante. L'OMS recommande le développement des médicaments antipaludiques contenant au moins deux molécules antipaludiques. Les combinaisons de molécules permettent de diminuer le risque d'apparition des souches résistantes (c'est le cas des combinaisons avec les artémisinines) et aussi d'augmenter l'efficacité du traitement (c'est le cas de la combinaison synergique atovaquone-proguanil). De plus, tester l'effet de la combinaison de molécules peut aussi apporter des informations sur leur mode d'action.

J'ai utilisé dans ce travail cinq classes de molécules choisies sur la base de leur mécanisme d'action et de leur intérêt thérapeutique : des azoles antifongiques, l'endoperoxyde artésunate, l'inhibiteur du complexe bc_1 atovaquone, des chélateurs de fer et l'inhibiteur de la biosynthèse de la glutathione propargylglycine. Ce choix a été fait en collaboration avec E.Davioud-Charvet et S. Blandin (Université d'Strasbourg) qui vont tester ces combinaisons de molécules chez le parasite.

Cette étude a pour but de rechercher des possibles candidats partenaires de la plasmodione mais également de voir l'effet de l'inhibition d'une voie métabolique donnée sur l'efficacité de la plasmodione.

Matériels et méthodes

Souches et milieux de culture

La souche AD1-9 qui porte différentes délétions de gènes codants pour des transporteurs d'efflux membranaire (*mata*, *ura3*, *his1*, *Δyor1*, *Δsnq2*, *Δpdr5*, *Δpdr10*, *Δpdr11*, *Δycf1*, *Δpdr3*, *Δpdr15*, *Δpdr1*) est utilisée comme souche contrôle dans la plupart des expériences. La souche BY4742 et son mutant isogénique $Δsod2$ sont également utilisées dans certaines expériences.

Les milieux de cultures utilisés sont : YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glucose), YPEth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% éthanol), CSM-uracile (0.7% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.1% du mélange de suppléments moins uracile de Bio101 (San Diego, CA, USA)).

Tests de croissance

Tous les tests de croissances ont été réalisés en milieu respiratoire YPEth. Les cellules sont inoculées dans 5 ml YPEth à une $D.O_{600nm}$ de 0.2 à partir d'une préculture fraîche en YPD ou en CSM-uracile si la souche contient un plasmide avec le marqueur de sélection *URA3*. Après 72 h de cultures à 28 °C sous agitation, les $D.O_{600nm}$ sont mesurées et l' IC_{50} (la dose inhibant 50 % de la croissance par rapport au contrôle non traité) est estimée. Les test sont répétés au moins deux fois.

Méthode des isobogrammes

La méthode des isobogrammes est une stratégie d'étude de l'interaction entre deux composés (A et B) combinés en diverses proportions. Un couple dose-réponse est défini pour chaque combinaison et pour les utilisations individuelles (par exemple IC_{50} ou EC_{90}). Toutes les concentrations du composé A sous forme combinée qui permettent d'obtenir la réponse X sont divisées par la concentration du composé A donnant la réponse X lorsqu'il est utilisé de manière individuelle. La valeur obtenue est appelée IC_{50} fractionnée ou $FIC_{50} A$. La même approche est utilisée pour le composé B pour obtenir $FIC_{50} B$. Ainsi pour une combinaison z, on obtient un couple de valeur $FIC_{50} A_z / FIC_{50} B_z$ qui constituent les coordonnées du point Z_{AB} sur le graphique isobogramme. Une courbe ou isobole permet de relier différents points du graphique c'est-à-dire différentes combinaisons de doses qui produisent le même effet. Une ligne basale qui lie les conditions où les composés sont utilisés de manière individuelle est aussi tracée. La situation de l'isobole par rapport à la ligne basale permet de déterminer le type d'interaction qui existe entre les deux composés. Plus l'isobole se situe en dessous de la ligne basale plus l'interaction a tendance vers la synergie c'est-à-dire un composé rend plus actif l'autre. Si l'isobole se situe en dessus de la ligne basale, il s'agit d'une interaction antagoniste c'est-à-dire que l'un des composés diminue l'efficacité de l'autre. Lors que les deux composés sont indépendants c'est-à-dire que l'effet de la combinaison n'est que la somme des effets individuels, l'isobole se situe sur la ligne basale.

Méthode des unidoses

La méthode unidose consiste à prendre une ou plusieurs doses du composé A qui ont un effet X sur l'inhibition de la croissance puis de les combiner à différentes concentrations du composé B. La comparaison des réponses obtenues dans les conditions de combinaison à celles où les molécules sont utilisées de manière individuelles permet de déterminer le type d'interaction potentielle entre les deux composés. Cette stratégie est moins précise car il est parfois difficile de distinguer la synergie de l'effet additif.

Résultats et discussion

- Combinaison de l'artésunate avec la plasmodione

L'artémisinine et ses dérivés, dont l'artésunate, sont des antipaludiques de type endoperoxyde. Ils se caractérisent par une structure chimique particulière avec un pont endoperoxyde, essentiel à leur activité. Chez le parasite, l'artémisinine réagit avec du fer ferreux hémique (ou avec d'autres donneurs d'électrons), le pont endoperoxyde est rompu et un radical très réactif est formé. Ce radical réagit avec l'oxygène et produit des ROS, causant un stress oxydant mais aussi alkyle des protéines et des lipides.

Comme l'hème a un rôle clé dans la bioactivation de l'artémisinine, la mitochondrie est probablement le site d'action ou de bioactivation de l'artémisinine chez la levure. De plus la fonction respiratoire joue un rôle important dans la production de ROS. [1]

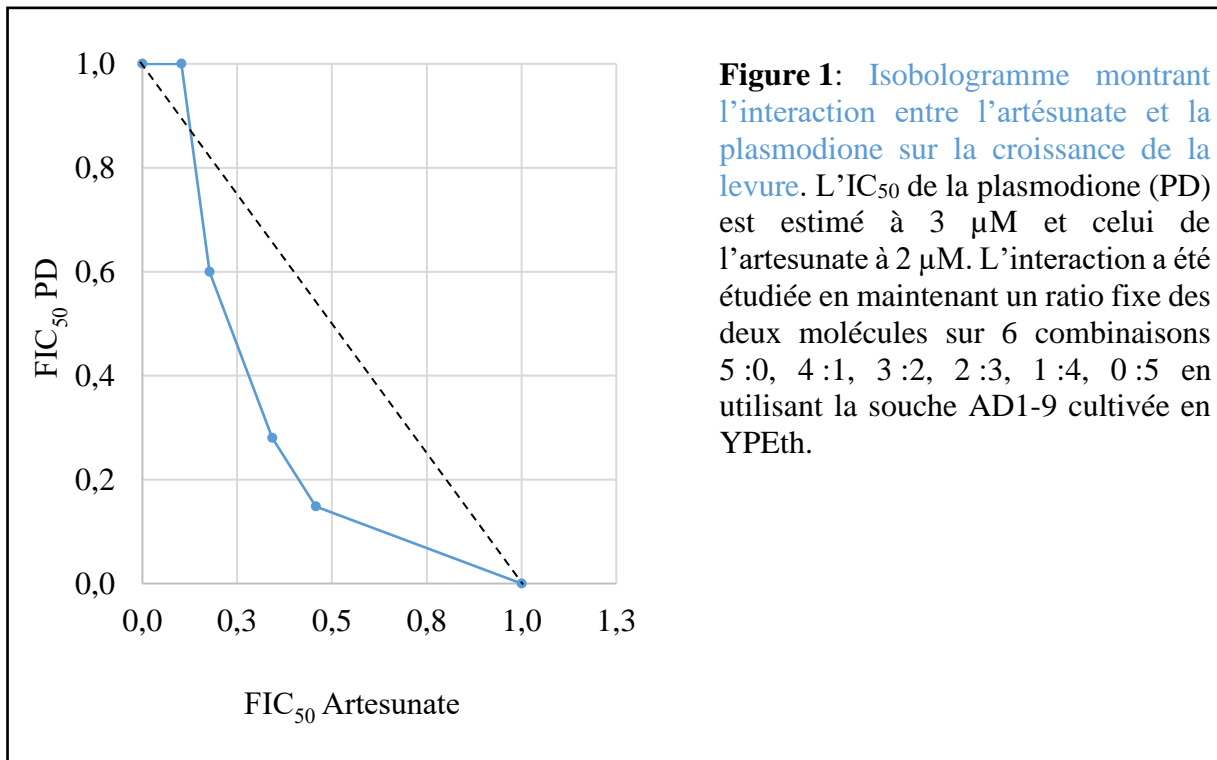
Les endoperoxydes présentent un grand intérêt pour le développement des molécules antipaludiques en raison de leur rapide effet inhibiteur. Cependant ils présentent l'inconvénient d'avoir une courte demi-vie, ce qui a amené l'OMS à recommander l'usage de combinaisons de molécules avec les artémisinines.

Les artémisinines agissent synergiquement avec le bleu de méthylène au stade gamétoocyte du parasite [2]. Ce stade est caractérisé par une forte activité mitochondriale. Le bleu de méthylène et la plasmodione ont des ressemblances dans leur mode d'action. Les deux molécules (ou leurs métabolites dans le cas de la plasmodione) agissent comme substrat de flavoenzymes, la réaction produisant des ROS. [3]

Il m'a donc semblé intéressant de tester la combinaison de la plasmodione avec l'endoperoxyde artésunate sur la croissance respiratoire de la levure.

La **figure 1** montre que ces deux molécules agissent de manière synergique en inhibant la croissance de la levure.

La synergie entre la plasmodione et l'artémisinine a également déjà été observé chez le parasite [4]. Le mécanisme de cette synergie n'est pas encore bien compris mais le stress oxydant pourrait être le facteur majeur. En effet, l'activité de l'artésunate est amplifiée en présence d'une molécule inductrice de stress oxydant [5]. Les ROS résultant de l'activité de la plasmodione (comme décrit dans le **chapitre I-1** et présenté dans la référence [6]) pourraient augmenter la toxicité de l'artésunate.



- Combinaison des azoles antifongiques avec la plasmodione

Les azoles antifongiques sont des molécules inhibitrices de la croissance du champignon pathogène *Candida albicans*. Avec une structure chimique constituée d'un cycle azole ou noyau azole, ils sont classés en deux groupes selon le nombre d'atome d'azote dans le noyau azole : les imidazoles qui ont deux atomes d'azote dans leur noyau azole (clotrimazole, éconazole, kétoconazole, miconazole, tioconazole....) et les triazoles qui en ont trois (fluconazole, itraconazole, posaconazole, voriconazole...).

Les azoles antifongiques sont des inhibiteurs de la lanostérol 14-alpha-déméthylase fongique (et de la levure), membre de la famille des cytochromes P450, qui convertit le lanostérol en ergostérol. La conséquence de cette inhibition est la diminution du niveau d'ergostérol et l'accumulation de ses précurseurs. Ceci entraîne une désorganisation de la membrane

plasmique et l'arrêt de la croissance [7,8]. Je me suis intéressé à trois imidazoles, l'éconazole, le miconazole et le kétoconazole.

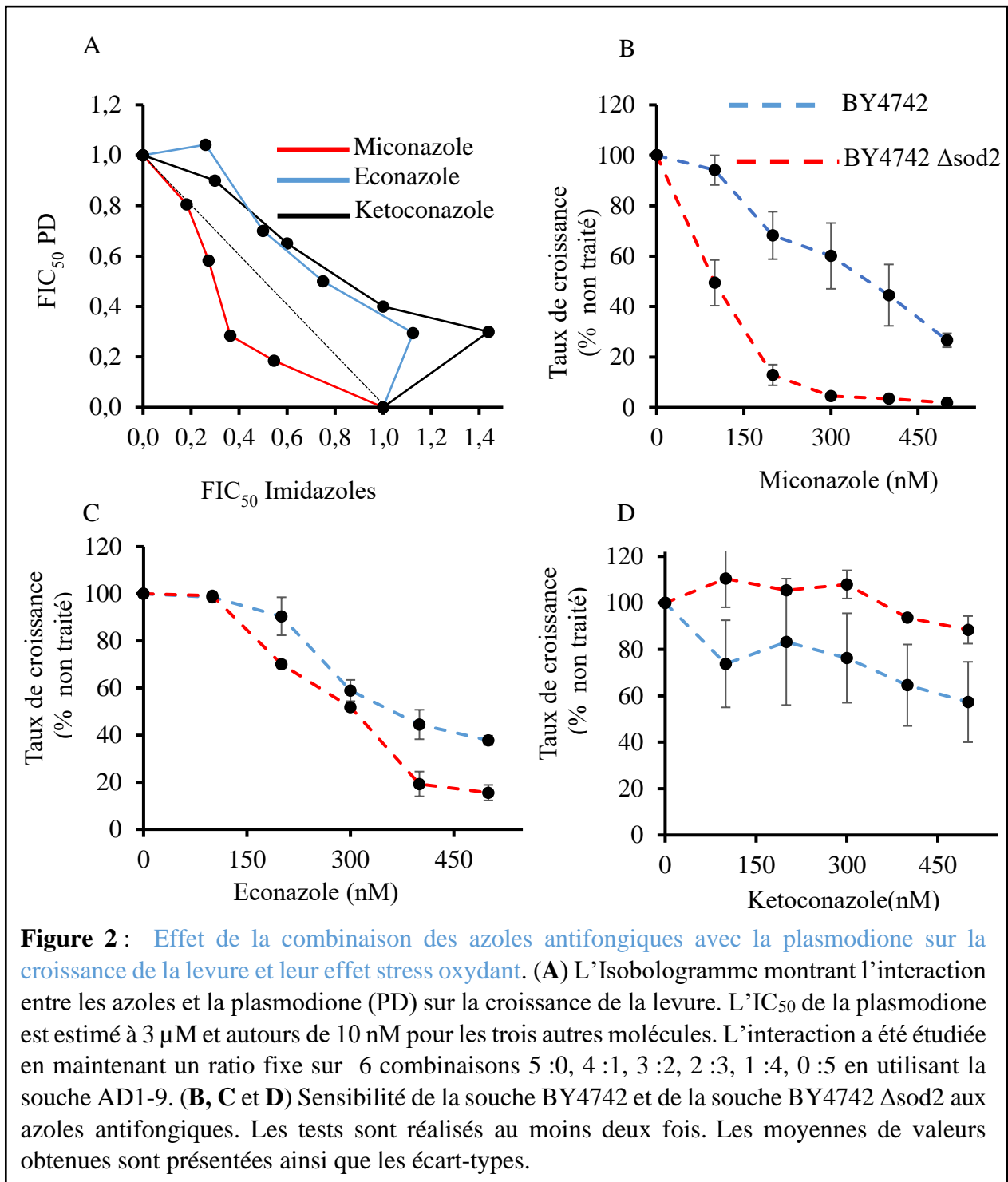
Ces azoles inhiberaient l'activité du lanostérol 14-alpha-déméthylase en se fixant au niveau du fer hémique de l'enzyme, perturbant son état redox et inhibant ainsi l'activité enzymatique [9]. Mais ces azoles auraient des effets (en partie) différents. En effet il a été montré que le miconazole induit une production de ROS alors que les deux autres n'ont pas ou très peu d'effet sur la production de ROS [10]. De plus chez *Plasmodium*, un effet synergique artésunate – miconazole a été observé [5] alors que la combinaison kétoconazole-artémisinine a un effet antagoniste [11]. Artémisinine et artésunate partagent le même mécanisme d'action lié à la présence du pont endoperoxyde [12].

J'ai donc testé l'effet de ces azoles sur la croissance de la levure en présence de la plasmodione. Comme le montre la **figure 2A**, le miconazole agit de manière synergique en présence de la plasmodione alors que l'éconazole et le kétoconazole sont de faibles antagonistes de la plasmodione, ce qui serait en accord avec les données obtenues pour les endoperoxydes.

Pour mieux comprendre les comportements différents de ces azoles, j'ai testé l'effet de la délétion de *SOD2*, codant pour la superoxyde dismutase mitochondriale, sur la sensibilité à ces trois molécules. Comme le montre la **figure 2B, C et D**, la délétion de *SOD2* n'a pas d'effet sur la sensibilité des cellules au kétoconazole et à l'éconazole alors qu'elle augmente d'un facteur 4 la sensibilité au miconazole, suggérant donc que le miconazole agit (en partie) *via* un stress oxydant dont les effets sont amplifiés en absence de Sod2.

La plasmodione pourrait donc avoir deux types de comportement lorsqu'elle est combinée à un azole antifongique. Lorsque l'azole, comme le miconazole, a un effet que l'on pourrait appeler secondaire et produit des ROS, le stress oxydant causé par la plasmodione serait amplifié, résultant en une synergie entre les deux molécules.

Lorsque l'azole agit uniquement par l'inhibition de la lanostérol 14-alpha-déméthylase ou d'autres hémoprotéines telle que la flavohémoglobine [10], il y a un léger antagonisme. Le mécanisme de cet antagonisme serait complexe à expliquer mais nous pourrions suggérer que ces azoles altèrent une hémoprotéine impliquée dans la transformation de la plasmodione en ses métabolites PDO et PD-bzol. En effet, la première étape dans la voie d'activité de la plasmodione est une oxydation benzylique qui peut être catalysée par des hémoprotéines (voir **figure 1** du **chapitre I-1**). Cette oxydation serait nécessaire pour l'effet stress oxydant de la plasmodione.



- Combinaison chélateurs de fer et plasmodione

Le fer est un élément essentiel à la plupart des organismes vivants. Il est principalement utilisé par les cellules comme cofacteur dans les réactions de transport d'oxygène et le transfert d'électrons. Le fer peut jouer ce rôle car il peut basculer entre deux formes, fer ferreux Fe²⁺ et fer ferrique Fe³⁺. Dans la nature, il se trouve principalement sous forme ferrique, insoluble et donc non biodisponible.

La forme Fe^{2+} est soluble mais disponible à de très faibles concentrations. Ainsi pour se procurer du fer, la plupart des cellules utilisent des ferro-réductases pour réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} , ce qui est requis pour sa complexation aux chélateurs de fer et pour son transport vers le cytoplasme [13]. A l'intérieur des cellules, le fer est incorporé dans les protéines qui le requièrent. Si la grande partie du fer intracellulaire se trouve sous forme lié, une petite partie y est présente sous forme libre insoluble (Fe^{3+}).

En présence d'un donneur d'électron, cette forme peut être réduite en Fe^{2+} qui peut alors interagir avec le peroxyde d'hydrogène pour donner du radical hydroxyle ($HO\cdot$) très toxique. C'est la réaction de Fenton. Celle-ci et le stress oxydant sont diminués en présence d'un chélateur de fer et augmentés lorsque le niveau de fer intracellulaire s'accroît.

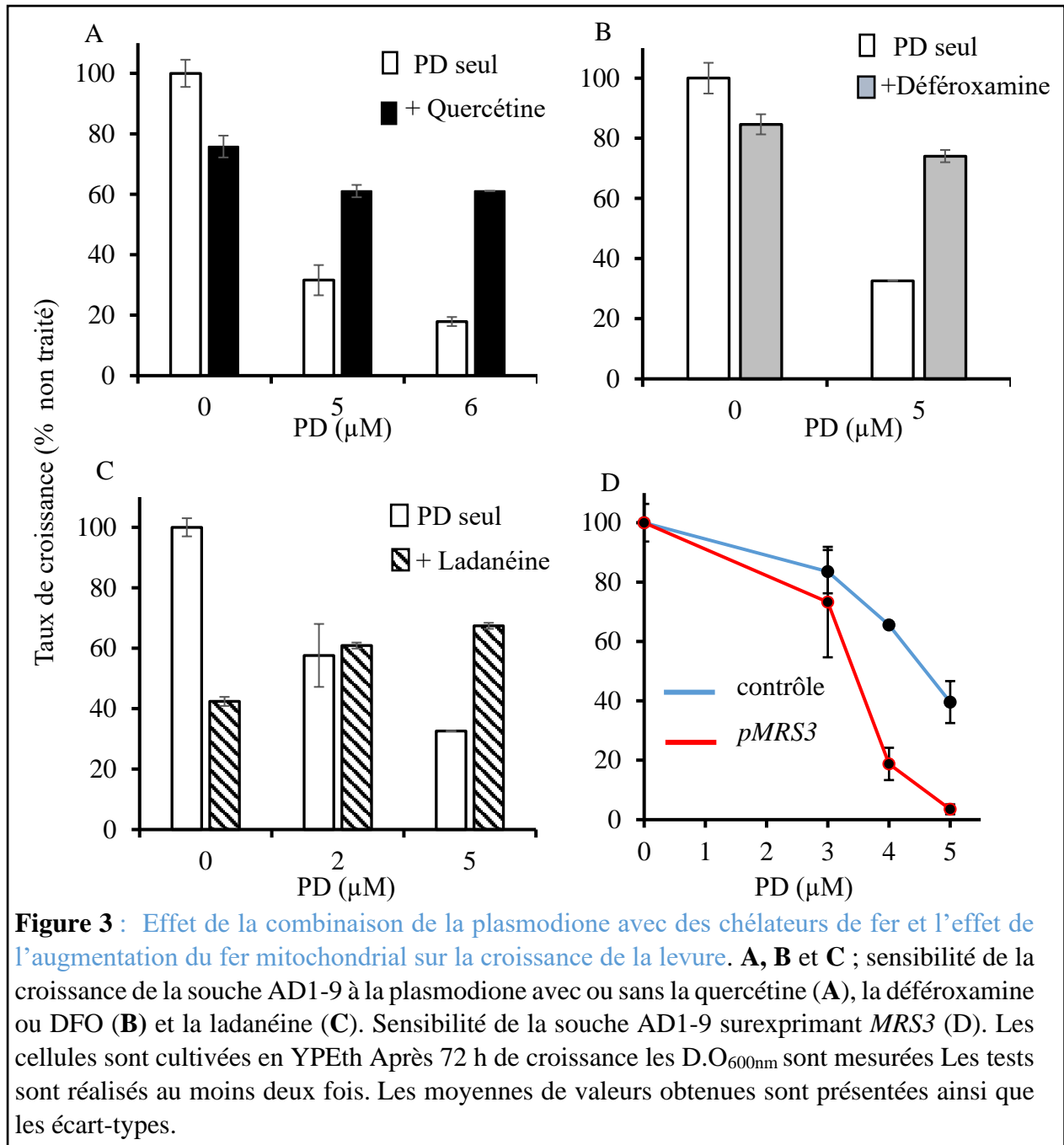
Comme la plasmodione agit *via* un stress oxydant (**chapitre I-1**), j'ai testé son effet inhibiteur de la croissance en présence de trois chélateurs de fer, la quercétine, la déféroxamine et la ladanéine. En présence de molécules inductrices de stress oxydant, ces chélateurs de fer s'opposent à leur activité en diminuant la réaction de Fenton [14-17]. La **figure 3** montre que la dose de 5 μ M de plasmodione entraîne une inhibition de la croissance de 70 %. En présence des chélateurs de fer déféroxamine (500 μ M), quercétine (500 μ M) et ladanéine (100 μ M), la croissance de la levure est inhibée de 20 à 40 %. En combinant la plasmodione et ces chélateurs de fer, aucune augmentation de l'inhibition n'est observée. Au contraire la plasmodione devient moins efficace montrant clairement que la relation entre la plasmodione et ces molécules est de type antagoniste.

La plasmodione étant une molécule inductrice de stress oxydant chez la levure et chez le parasite, l'antagonisme de ces molécules avec la plasmodione pourrait donc s'expliquer par l'inhibition de la réaction de Fenton. Il a été montré que la présence de la déféroxamine diminuait l'activité inhibitrice de la plasmodione sur la croissance des parasites [6].

J'ai ensuite testé si l'augmentation de la quantité de fer mitochondriale pouvait augmenter l'effet inhibiteur de la plasmodione. La levure possède deux transporteurs Mrs3 et Mrs4 dont le niveau d'expression module la quantité de fer mitochondrial [18,19]. J'ai testé l'effet de la surexpression de *MRS3*. Pour cela, la souche AD1-9 a été transformée par un plasmide multicopie portant *MRS3* sous le contrôle de son propre promoteur.

Comme le montre la **figure 3D**, la surexpression de *MRS3* entraîne une plus forte sensibilité des cellules à la plasmodione. Comme montré au **chapitre I-1**, le traitement à la plasmodione

résulte probablement dans la surproduction mitochondrial d'ions superoxyde. Ceci pourrait entrainer la production de radicaux hydroxyle, *via* la réaction de Fenton. En augmentant la quantité de fer mitochondrial, cette réaction est favorisée, ce qui expliquerait la plus forte sensibilité des cellules au stress oxydant comme il a déjà été observé avec le pathogène *Cryptococcus neoformans* [20].

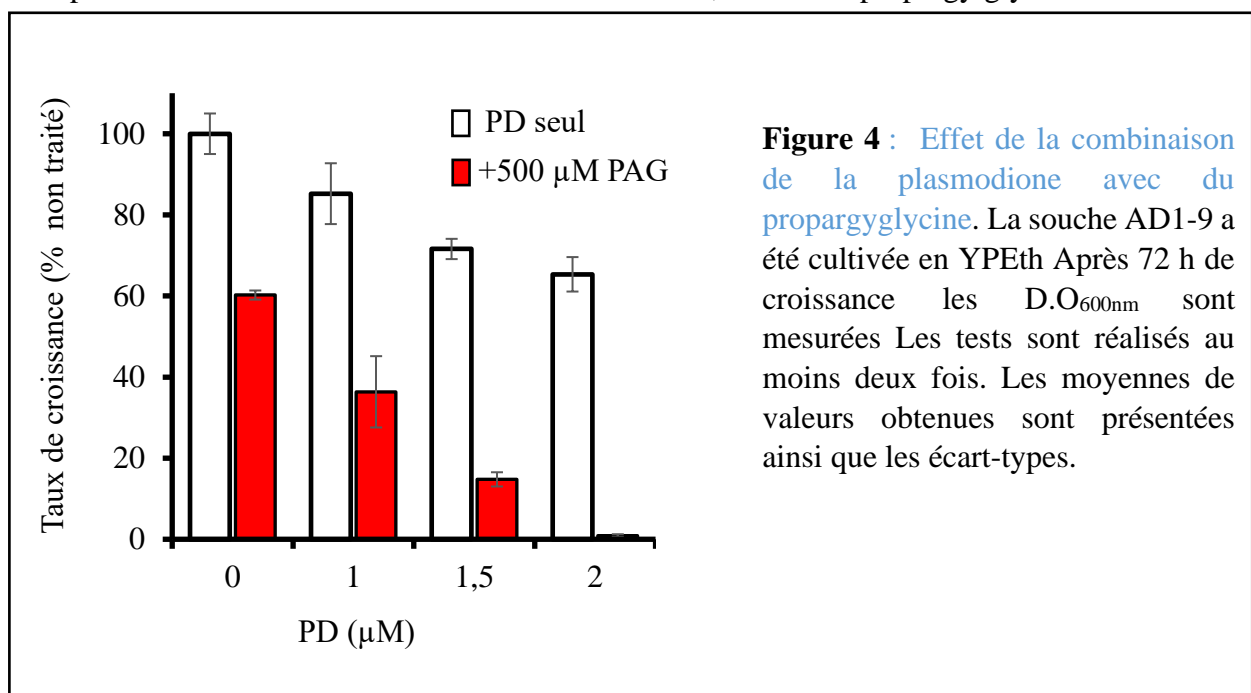


Comme chez tous les eucaryotes, le fer est un élément indispensable pour *Plasmodium*. Le métabolisme du fer chez le parasite est relativement complexe. Une grande partie de son cycle de vie se réalise à l'intérieur des globules rouges très riches en hémoglobine et donc en fer. De l'hémoglobine provient l'essentiel des nutriments, mais pas le fer [21] et les chélateurs de fer

peuvent inhiber l'acquisition de fer [22]. Il a également été montré que l'inhibition de la croissance causée par un inducteur de ROS pouvait être corrigée en présence d'un chélateur de fer [23]. On pourrait donc s'attendre à une diminution de l'efficacité de la plasmodione en présence de chélateurs de fer chez le parasite comme chez la levure.

- Combinaison propargylglycine et plasmodione

La glutathione est un tripeptide (acide glutamique, cystéine et glycine) qui est impliquée dans de nombreuses réactions de détoxification et protection contre les ROS. La biosynthèse de ce peptide exige donc la biodisponibilité de ces trois acides aminés, notamment la cystéine. La cystéine est un acide aminé sulfuré qui est synthétisé à partir de l'acide aminé méthionine suite à une série de réactions appelée voie de trans-sulfuration. La cystathionine γ -lyase est la dernière enzyme intervenant dans cette voie [24]. Elle a un rôle clé dans la voie de biosynthèse de la cystéine, et donc du glutathion. De ce fait, elle est nécessaire pour la détoxification des cellules contre les ROS *via* l'augmentation du niveau de glutathione cellulaire [25]. Son rôle a été particulièrement étudié en utilisant des inhibiteurs, comme la propargylglycine.



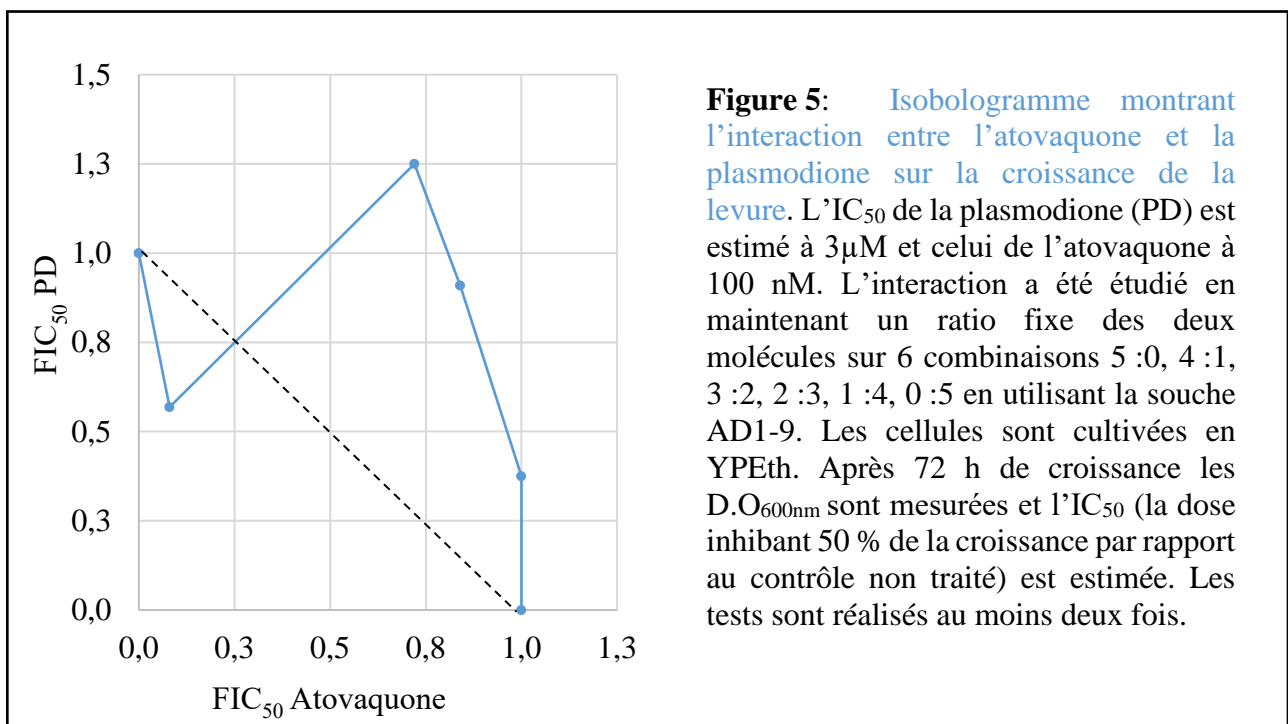
J'ai testé l'effet de cette molécule sur l'activité inhibitrice de la plasmodione. La propargylglycine est un mauvais inhibiteur de la croissance de la levure (50% d'inhibition avec 500 µM). Lorsqu'elle est combinée à la plasmodione, cette inhibition est accentuée suggérant une synergie avec la plasmodione (**figure 4**).

Il est très probable que suite à l'inhibant de la cystathionine γ -lyase par la propargylglycine, le niveau de glutathion cellulaire est diminué, et donc le niveau de défense contre le stress oxydant.

Cela fragiliserait les cellules face à un inducteur de stress oxydant d'où la synergie avec la plasmodione.

- Combinaison atovaquone et plasmodione

Le complexe bc_1 de la chaîne respiratoire mitochondriale est une cible validée pour le développement des molécules antipaludiques. En effet, le complexe est essentiel pour le parasite *Plasmodium*. L'atovaquone, un inhibiteur ciblant la site Q_o du complexe est un antipaludique utilisé depuis de nombreuses années (**introduction générale**).



La **figure 5** montre une interaction antagoniste entre la plasmodione et l'atovaquone. Cet antagonisme n'est pas encore compris. Il est possible qu'une inhibition de la chaîne respiratoire affecte l'activité de la plasmodione puisque les activités NDH et SDH semblent jouer un rôle clé dans l'activité de la plasmodione (**chapitres I-1 et I-2**). Cependant une interaction chimique entre les deux molécules n'est pas à exclure.

Chez le parasite, ces deux molécules agissent de manière simplement additive c'est-à-dire indépendante et non antagoniste [4]. La différence entre levure et parasite pourrait être expliquée par l'importance relative des différents facteurs intervenant dans l'activité de la plasmodione. Chez la levure, les acteurs principaux seraient donc NDH et SDH avec d'autres

acteurs d'importance mineure (Grl1, Mcr1, Lpd1) comme nous l'avons vu au **chapitre I-1** et très probablement d'autres flavoprotéines qui n'ont pas été testées. Chez le parasite, NDH et SDH jouent très probablement aussi un rôle mais d'autres acteurs peuvent prendre le dessus, selon le stade du cycle de vie, par exemple la GR qui, sur la base d'études *in vitro*, avait été proposée comme impliquée dans le redox-cycling des métabolites de la plasmodione (**chapitre I-1, Fig. 1**).

Références

- [1] C. Sun, B. Zhou, The molecular and cellular action properties of artemisinins: what has yeast told us?, *Microb. Cell.* 3 (2016) 196–205. doi:10.15698/mic2016.05.498.
- [2] D. Coertzen, J. Reader, M. van der Watt, S.H. Nondaba, L. Gibhard, L. Wiesner, P. Smith, S. D'Alessandro, D. Taramelli, H.N. Wong, J.L. du Preez, R.W.K. Wu, L.-M. Birkholtz, R.K. Haynes, artemisone and artemiside are potent panreactive antimalarial agents that also synergize redox imbalance in *Plasmodium falciparum* Transmissible gametocyte stages, *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018) 1–17. doi:10.1128/AAC.02214-17.
- [3] K. Ehrhardt, E. Davioud-Charvet, H. Ke, A.B. Vaidya, M. Lanzer, M. Deponce, The Antimalarial activities of methylene blue and the 1,4-naphthoquinone 3-[4-(Trifluoromethyl)Benzyl]-menadione are not due to inhibition of the mitochondrial electron transport chain, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 2114–2120. doi:10.1128/AAC.02248-12.)
- [4] K. Ehrhardt, C. Deregnaucourt, A.A. Goetz, T. Tzanova, V. Gallo, P. Arese, B. Pradines, S.H. Adjalley, D. Bagrel, S. Blandin, M. Lanzer, E. Davioud-Charvet, The redox cyler plasmodione is a fast-acting antimalarial lead compound with pronounced activity against sexual and early asexual blood-stage parasites, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 5146–5158. doi:10.1128/AAC.02975-15.
- [5] S.R. Krungkrai, Y. Yuthavong, The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81 (1987) 710–714. doi:10.1016/0035-9203(87)90003-4.
- [6] M. Bielitz, D. Belorgey, K. Ehrhardt, L. Johann, D.A. Lanfranchi, V. Gallo, E. Schwarzer, F. Mohring, E. Jortzik, D.L. Williams, K. Becker, P. Arese, M. Elhabiri, E. Davioud-Charvet, Antimalarial NADPH-consuming redox-cyclers as superior glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency copycats, *Antioxid. Redox Signal.* 22 (2015) 1337–1351. doi:10.1089/ars.2014.6047.
- [7] J.E. Parker, M. Merkamm, N.J. Manning, D. Pompon, S.L. Kelly, D.E. Kelly, Differential azole antifungal efficacies contrasted using a *Saccharomyces cerevisiae* strain humanized for sterol 14 α -demethylase at the homologous locus, *Antimicrob.*

- Agents Chemother. 52 (2008) 3597–3603. doi:10.1128/AAC.00517-08.
- [8] J.E. Nett, D.R. Andes, Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 30 (2016) 51–83.
doi:10.1016/j.idc.2015.10.012.
- [9] Y. Yuzo, A. Yuri, Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-45014DM purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes, *Biochem. Pharmacol.* 36 (1987) 229–235. doi:10.1016/0006-2952(87)90694-0.
- [10] A. Ezzine, M. Moussaoui, E. El Hammi, M.N. Marzouki, L. Baciou, Antimicrobial agents act differently on *Staphylococcus aureus* and *Ralstonia eutropha* flavohemoglobins, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173 (2014) 1023–1037.
doi:10.1007/s12010-014-0938-7.
- [11] L.C. Mishra, A. Bhattacharya, V.K. Bhasin, Antiplasmodial interactions between artemisinin and triclosan or ketoconazole combinations against blood stages of *Plasmodium falciparum in vitro*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76 (2007) 497–501.
- [12] W.E. Ho, H.Y. Peh, T.K. Chan, W.S.F. Wong, Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial, *Pharmacol. Ther.* 142 (2014) 126–139.
doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.001.
- [13] J. Wang, K. Pantopoulos, Regulation of cellular iron metabolism, *Biochem. J.* 434 (2011) 365–381. doi:10.1042/BJ20101825.
- [14] T. Zhu, B.S. Lim, H.C. Park, K.M. Son, H.C. Yang, Effects of the iron-chelating agent deferoxamine on triethylene glycol dimethacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate, hydrogen peroxide-induced cytotoxicity, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 100 B (2012) 197–205. doi:10.1002/jbm.b.31939.
- [15] S. Luangaram, U. Kukongviriyapan, P. Pakdeechote, V. Kukongviriyapan, P. Pannangpetch, Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 448–455. doi:10.1016/j.fct.2006.09.008.
- [16] M. Leopoldini, N. Russo, S. Chiodo, M. Toscano, Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6343–6351.
doi:10.1021/jf060986h.

- [17] I.F. Cheng, K. Breen, On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the fenton reaction of the iron-ATP complex, *BioMetals*. 13 (2000) 77–83. doi:10.1023/A:1009229429250.
- [18] E.M. Froschauer, R.J. Schweyen, G. Wiesenberger, The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788 (2009) 1044–1050. doi:10.1016/j.bbamem.2009.03.004.
- [19] H. Lin, L. Li, X. Jia, D.M.V. Ward, J. Kaplan, Genetic and biochemical analysis of high iron toxicity in yeast: Iron toxicity is due to the accumulation of cytosolic iron and occurs under both aerobic and anaerobic conditions, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 3851–3862. doi:10.1074/jbc.M110.190959.
- [20] K.J. Nyhus, L.S. Ozaki, E.S. Jacobson, Role of mitochondrial carrier protein Mrs3/4 in iron acquisition and oxidative stress resistance of *Cryptococcus neoformans*, *Med. Mycol.* 40 (2002) 581–591. doi:10.1080/mmy.40.6.581.591.
- [21] P.F. Scholl, A.K. Tripathi, D.J. Sullivan, Bioavailable iron and heme metabolism in *Plasmodium falciparum*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 295 (2005) 293–324. doi:10.1007/3-540-29088-5_12.
- [22] M. Loyevsky, C. John, B. Dickens, V. Hu, J.H. Miller, V.R. Gordeuk, Chelation of iron within the erythrocytic *Plasmodium falciparum* parasite by iron chelators, *Mol. Biochem. Parasitol.* 101 (1999) 43–59. doi:10.1016/S0166-6851(99)00053-5.
- [23] S.R. Meshnick, Y.Z. Yang, V. Lima, F. Kuypers, S. Kamchonwongpaisan, Y. Yuthavong, Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu), *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 (1993) 1108–1114. doi:10.1128/AAC.37.5.1108.
- [24] J.I. Sbodio, S.H. Snyder, B.D. Paul, Regulators of the transsulfuration pathway, *Br. J. Pharmacol.* 176 (2019) 583–593. doi:10.1111/bph.14446.
- [25] J. Cui, L. Liu, J. Zou, W. Qiao, H. Liu, Y. Qi, C. Yan, Protective effect of endogenous hydrogen sulfide against oxidative stress in gastric ischemia-reperfusion injury, *Exp. Ther. Med.* 5 (2013) 689–694. doi:10.3892/etm.2012.870.

Discussion du chapitre et Perspectives

La plasmodione serait une 'prodrogue' qui est transformée, dans la cellule, en métabolites actifs (PDO et PD-bzol) qui entrent ensuite dans un processus d'oxydo-réduction catalysé par des flavoenzymes. Cela résulterait dans une surproduction de ROS, conduisant à l'arrêt de croissance.

Les données obtenues avec le modèle levure ont permis d'identifier différents acteurs dans ce processus (**Fig.ix**). Les NDHs ont un rôle important dans ce processus d'oxydo-réduction. D'autres flavoenzymes interviendraient également comme Lpd1, Mcr1 et Glr1.

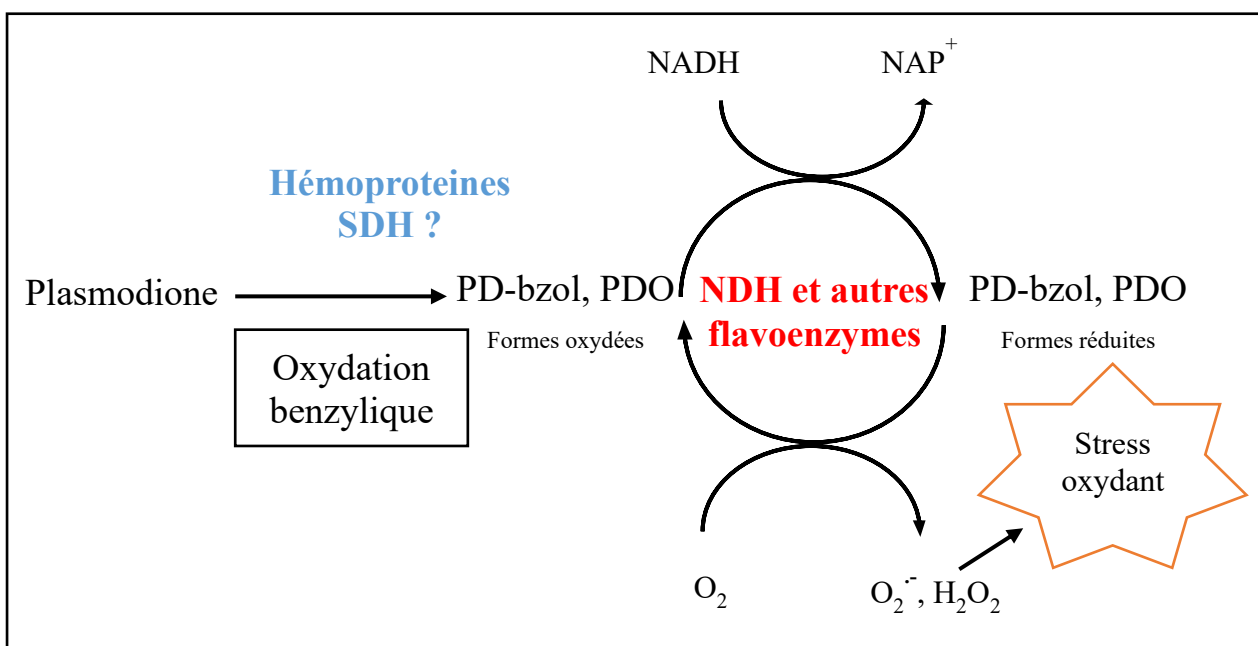


Figure ix : *Schéma du mode d'action de la plasmodione*

Dans le modèle du mécanisme d'action de la plasmodione proposé par E. Davioud-Charvet, Glr1 (GR, son équivalent chez le parasite et chez l'homme) est la flavoenzyme responsable du cycle d'oxydo-réduction des métabolites de la plasmodione. Mais chez la levure, Glr1 jouerait un rôle mineur. Cependant chez le parasite, elle pourrait être un acteur principal au stade érythrocytaire en raison du niveau élevé de cette enzyme (Patzewitz, Wong, and Tobias 2011) alors que l'activité NDH semble être faible à ce stade (Ke *et al.* 2019). Lors de la différenciation des gamétocytes, les fonctions mitochondriales, et donc la NDH, deviennent plus importantes. Le rôle de la GR pourrait devenir secondaire. Le **tableau iii** présente les équivalents de Glr1, Lpd1, Mcr1 et NDH chez le parasite. Leur rôle, chez le parasite, est en cours d'étude dans le

laboratoire de Stéphanie Blandin (Université de Strasbourg). Des parasites (*P.falciparum*) mutants (délétion et surexpression des gènes codant pour ces enzymes) seront construits. S'ils sont viables, l'impact du niveau d'expression des enzymes sur la sensibilité à la plasmodione sera étudié. Cela nous permettra de valider ou invalider le modèle levure. Des résultats préliminaires obtenus avec des parasites portant une délétion de NDH semble confirmer les données obtenues avec la levure (communication personnelle).

Tableau iii : *Flavoenzymes impliquées dans l'activité de la plasmodione, identifiées chez la levure et leurs équivalents chez le parasite.*

Acteurs	<i>S.cerevisiae</i>		<i>P.falciparum</i>	
	Gènes	Localisation	Gène	Localisation
Ndhs	NDE1 / YMR145C	MIM	-----	-----
	NDE2 / YDL085W	MIM	-----	-----
	NDI1 / YML120C	MIM	PF3D7_0915000	MIM
Mcr1	MCR1 / YKL150W	MEM, IIM	PF3D7_1367500	M-Cyto
Lpd1	LPD1 / YFL018C	MTM	PF3D7_1232200	MTM
Glr1	GLR1/YPL091W	MTM, Cyto	F3D7_1419800	Cyto

MIM : membrane interne mitochondriale, MEM : membrane externe mitochondriale, Cyto : cytoplasme, MTM : matrice mitochondriale, M-Cyto : membrane cytoplasmique

Il pourrait être intéressant d'étudier, chez la levure, d'autres flavoenzymes mitochondriales (**Tab.iv**) pour continuer à identifier des acteurs. Parmi celles-ci, Gut2 (glycerol-3-phosphate déshydrogénase) pourrait être particulièrement intéressante car cette enzyme utilise l'ubiquinone comme récepteur d'électrons et de ce fait est branchée sur la chaîne respiratoire.

La succinate déshydrogénase (SDH) semble avoir un rôle particulièrement intéressant. Comme discuté dans l'article au **chapitre I-2**, la SDH agirait en amont de la NDH et pourrait être impliquée dans la transformation de la plasmodione en PDO et/ou PD-bzol. Nous avons émis l'hypothèse que son hème *b* interviendrait dans l'oxydation benzylique de PD mais les mutations des ligands de cet hème n'ont pas d'effet sur la sensibilité à la plasmodione. Or si l'hème était requis pour la transformation de la plasmodione en PDO ou PD-bzol, nous pourrions nous attendre à une diminution de la sensibilité, résultant d'une diminution du niveau de l'hème. Pour confirmer cela, il sera nécessaire de construire et étudier un double mutant (sdh3-H106A + sdh4C78A) pour obtenir une SDH sans hème.

Il se peut donc que l'hème de la SDH n'ait pas de rôle dans la transformation de la plasmidone en PDO et qu'un autre hème/hémoprotéine intervienne en combinaison avec la SDH.

Tableau iv : *Flavoenzymes mitochondriales de la levure*

Enzyme et fonction	Gène
Cyb2 -Cytochrome b2 (L-lactate cytochrome-c oxidoreductase)	YML054C
Dld1 -Major mitochondrial D-lactate dehydrogenase; oxidizes D-lactate to pyruvate	YDL174C
Dld2 -D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, and minor D-lactate dehydrogenase	YDL178W
Alo1 - D-Arabinono-1,4-lactone oxidase	YML086C
Gut2 -Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase	YIL155C
Hem14 - Protoporphyrinogen oxidase	YER014W
Emi5 -Protein required for flavinylation of Sdh1p	YOL071W
Glt1 -NAD(+)-dependent glutamate synthase (GOGAT)	YDL171C
Pdx3 - Pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase	YBR035C
Met13 -Major isozyme of methylenetetrahydrofolate reductase	YGL125W
Cir2 -Putative ortholog of human ETF-dh	YOR356W
Aim45 -Putative ortholog of mammalian ETF-alpha	YPR004C
Put1 -Proline oxidase	YLR142W
Cbr1 -Cytochrome b reductase and NADH-dependent reductase for Dph3p	YIL043C
Ncp1 -NADP-cytochrome P450 reductase	YHR042W
Ndi1 -NADH:ubiquinone oxidoreductase	YML120C
Tah18 -Conserved NAPDH-dependent diflavin reductase	YPR048W
Mto1 -Mitochondrial Translation Optimization	YGL236C
Erv1 -Flavin-linked sulfhydryl oxidase of the mitochondrial IMS	YGR029W
Yhb1 -Nitric oxide oxidoreductase; flavohemoglobin that plays role in oxidative and nitrosative stress responses	YGR234W
Bna4 -Kynurenine 3-monooxygenase	YBL098W
Coq6 -Flavin-dependent monooxygenase involved in ubiquinone biosynthesis	YGR255C
Cyc2 -ligation of heme to apocytochromes <i>c</i> and <i>c</i> ₁	YOR037W
Ilv2 -Acetolactate synthase	YMR108W
Fas1 -Fatty Acid Synthetase	YKL182W
Phr1 - NA photolyase involved in photoreactivation	YOR386W
Ycp4 - sequence and structural similarity to flavodoxins	YCR004C
Aif1 - Mitochondrial cell death effector	YNR074C

L'analyse des mutants de résistance à la plasmidone montre clairement que le cofacteur FAD de la SDH a un rôle important.

Le mécanisme d'oxydation benzylique de la plasmidone n'est pas connu. L'hypothèse de travail du groupe d'E. Davioud-Charvet est que la plasmidone doit d'abord être réduite avant

l'oxydation benzylique. Il est possible, au vu des résultats présentés ici, que le cofacteur FAD de la SDH puisse transférer les électrons du succinate à la plasmodione. La plasmodione réduite pourrait alors réagir avec un hème d'une hémoprotéine pour donner du PDO ou PD-bzol. Au **chapitre I-3**, j'ai proposé que le léger antagonisme entre plasmodione et kétoconazole/éconazole pourrait s'expliquer par une altération, par ces azoles, d'hémoprotéines impliquées dans l'oxydation benzylique de la plasmodione. Continuer la recherche et l'identification de mutants de résistance à la plasmodione permettrait peut-être d'identifier cette/ces hémoprotéines. Il se peut que plusieurs hémoprotéines puissent réaliser la réaction. Dans ce cas, il serait difficile qu'une mutation dans une de ces hémoprotéines puisse bloquer la réaction et donc conférer la résistance.

Chez le parasite au stade érythrocytaire, la SDH et le cycle de Krebs semblent peu fonctionnels et peu importants pour le métabolisme du parasite, comme mentionné dans l'introduction générale. D'autres hémoprotéines à la fois du parasite mais aussi de l'hôte peuvent être responsables de la transformation de la plasmodione en PDO, comme l'hémoglobine, très abondante. Au stade gamétocytaire, par contre, le rôle de la SDH pourrait devenir prépondérant.

Bien de questions sont encore ouvertes sur le mode d'action de la plasmodione. Plus d'études seront nécessaires pour déchiffrer toutes les étapes et acteurs.

La plasmodione est un composé antipaludique prometteur qui pourrait être développé en médicament. Le groupe d'Elisabeth Davioud-Charvet travaille à l'amélioration de sa biodisponibilité, ainsi qu'à l'identification de composés partenaires qui pourraient augmenter son efficacité antipaludique.

Utilisant le modèle levure, j'ai étudié différentes combinaisons de molécules (**chapitre I-3**). Les résultats montrant la synergie de la plasmodione avec le miconazole et l'artésunate sont particulièrement intéressants. Il s'agit de deux molécules disponibles sur le marché et déjà bien étudiées. Il serait possible de les utiliser en bithérapie avec la plasmodione. L'OMS recommande la combinaison de médicaments, surtout avec les artémisinines.

La synergie entre plasmodione et artémisinine a été observé aussi chez le parasite (Ehrhardt *et al.* 2016), confirmant de nouveau, la validité du modèle levure.

Chapitre II : Etude du mode d'action du proguanil

Introduction du chapitre

Le proguanil appelé également chlorguanide ou chlorguanil est un antipaludique de type biguanide qui a été développé et mis sur le marché dans les années 1940s. Il est utilisé en thérapie sous forme combinée principalement avec l'atovaquone.

Le proguanil est considéré comme un pro-médicament. Chez l'homme, il est transformé en un métabolite cyclique ou cycloguanil par le cytochrome CYP2C19 (famille des cytochromes P450) des cellules hépatiques. Le cycloguanil est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme essentielle de la voie de biosynthèse des pyrimidines du parasite. En inhibant la synthèse des pyrimidines, il inhibe également celui de l'ADN. Pour cette raison, le proguanil a été classé parmi les antipaludiques antifolates.

L'atovaquone est un inhibiteur du complexe bc_1 de la chaîne respiratoire du parasite. La conséquence majeure de l'inhibition de ce complexe serait l'arrêt de la biosynthèse des pyrimidines. En effet, une étude réalisée en 2007 par Vaidya Akil et collègues a permis de mettre en évidence le rôle clé du complexe bc_1 dans la biosynthèse des pyrimidines (Painter *et al.* 2007). La dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), une enzyme mitochondriale essentielle de la voie de biosynthèse des pyrimidines, nécessite l'ubiquinone (ou coenzyme Q) sous forme oxydée comme accepteur d'électrons. Le complexe bc_1 étant la seule enzyme de la mitochondrie capable d'oxyder l'ubiquinol en ubiquinone, son inhibition affecte donc la biosynthèse des pyrimidines. Cela a été démontré en exprimant la DHODH de la levure chez le parasite. La DHODH de levure, contrairement à celle du parasite, ne nécessite pas l'ubiquinone comme accepteur d'électron. En l'exprimant chez le parasite, la biosynthèse des pyrimidines devient indépendante de l'activité du complexe bc_1 . Le traitement à l'atovaquone, comme je l'ai mentionné dans l'introduction générale, a résulté dans la sélection de parasites résistants, la résistance étant causée par des mutations dans le site de liaison de l'atovaquone dans le complexe bc_1 . En combinant l'atovaquone avec du proguanil, la sélection de parasites résistants à l'atovaquone diminueraient.

D'autre part, le proguanil n'est pas complètement métabolisé par les cellules hépatiques et possède une activité antipaludique propre. Cette activité est nettement inférieure à celle de son métabolite cycloguanil. Par ailleurs, la forme non métabolisée du proguanil potentialise l'activité de l'atovaquone. Lorsqu'il faut 0,18 nM d'atovaquone et 7 μ M de proguanil, utilisés en combinaison, pour inhiber 50 % de la croissance du parasite, il faut 0.9 nM d'atovaquone ou 36 μ M de proguanil utilisés seuls (Jones and Ward 2002). Cette synergie est également observée lorsque la DHODH de la levure est exprimée chez le parasite suggérant clairement que la

synergie ne réside pas au niveau de l'effet sur la biosynthèse des pyrimidines. Elle pourrait être liée à la phosphorylation oxydative. Un modèle a été proposé par Vaidya Akhil et collègues (**Fig.x**). L'inhibition du complexe bc_1 par l'atovaquone, et donc de la chaîne respiratoire, entraîne une chute du potentiel de membrane mitochondrial. Un système dit "alternatif" interviendrait alors pour assurer le maintien du potentiel membranaire essentiel à la survie de la cellule. Le proguanil ciblerait une des composantes de ce système, ce qui accentuerait l'effet de l'atovaquone expliquant ainsi la synergie de ces deux molécules (Painter *et al.* 2007). Ce modèle doit être vérifié. Il est donc nécessaire de comprendre le mode d'action du proguanil.

Pour cela, la levure est un bon outil. Elle ne possède pas de DHFR et de CYP2C19, ce qui permet d'étudier le mode d'action du proguanil indépendamment de son métabolite cycloguanil. J'ai donc utilisé ce modèle cellulaire et différentes stratégies génétiques et biochimiques.

Après avoir observé la synergie entre le proguanil et différents inhibiteurs du complexe bc_1 dont l'atovaquone, j'ai montré que le complexe bc_1 joue bien un rôle essentiel dans cette synergie. La levure semble donc être un modèle fiable dans cette étude. Mes résultats suggèrent que le système alternatif du maintien du potentiel de membrane ne joue pas de rôle dans le mode d'action du proguanil, contrairement au modèle proposé. J'ai également observé que le traitement au proguanil cause une forte mortalité, contrairement à l'atovaquone qui seul n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules mais l'atovaquone accentue la mortalité en combinaison avec le proguanil. Pour aller loin, j'ai sélectionné des souches résistantes au proguanil. Le séquençage du génome total de ces souches est en cours. De premiers résultats m'ont permis d'identifier des acteurs cellulaires intervenant dans la sensibilité de la cellule au proguanil.

Les principaux résultats de cette étude sont décrits dans l'article en préparation qui suit.

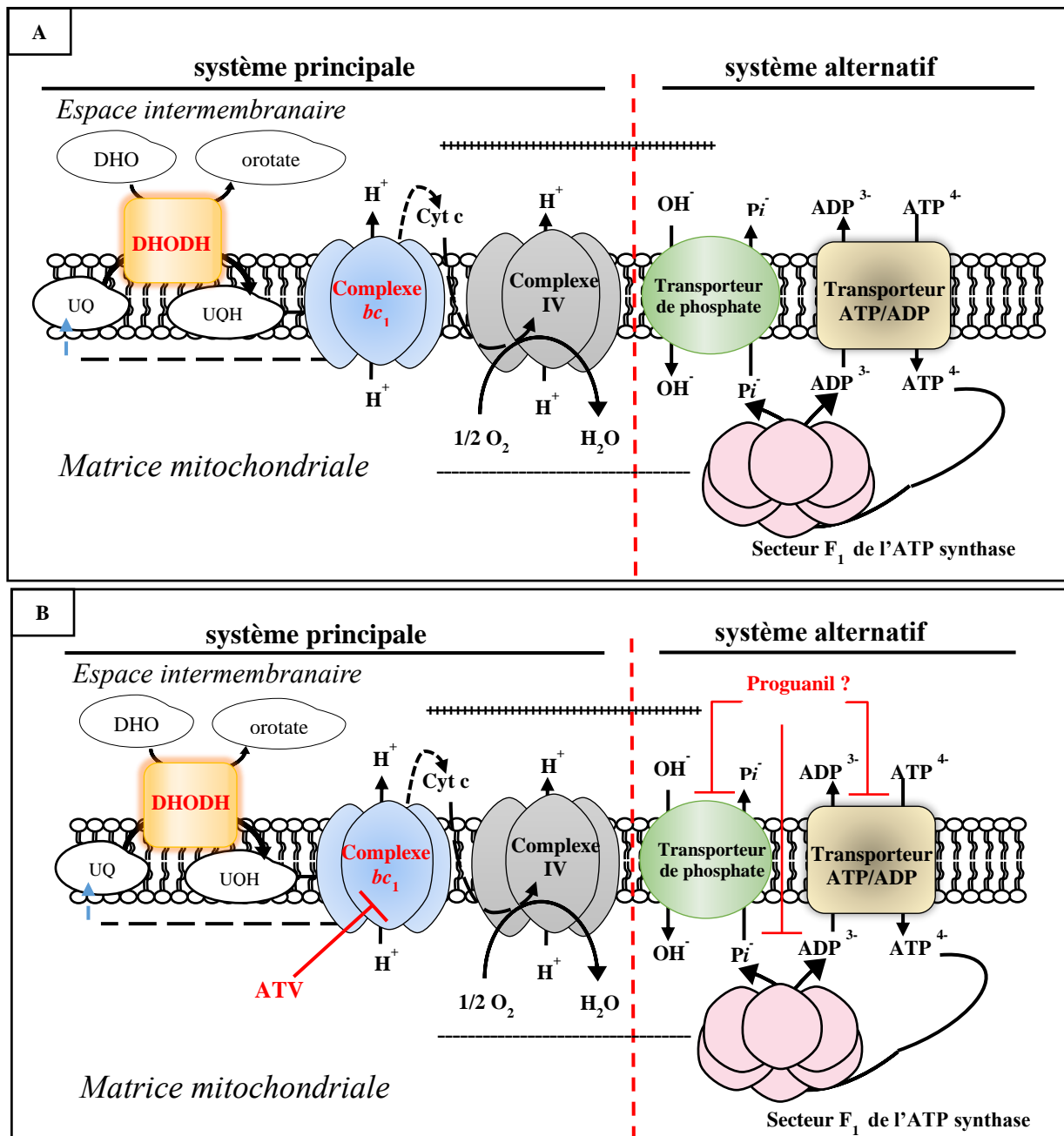


Figure x : *Modèle du mécanisme de la synergie entre l'atovaquone et le proguanil adapté de (Painter et al. 2007).* (A) Le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire entraîne la translocation de protons conduisant à l'établissement d'un gradient de protons et crée un potentiel de membrane. Dans cette condition, le système alternatif de maintien du potentiel de membrane n'est pas essentiel. (B) L'inhibition de la chaîne respiratoire par l'atovaquone rend le système alternatif essentiel. Ce système fait intervenir trois acteurs : Le transporteur d'ATP/ADP, le transporteur de phosphate et le secteur F_1 de l'ATP synthase. L'ATP provenant du cytoplasme est transporté dans la mitochondrie contre de l'ADP. Cet ATP est ensuite hydrolysé en ADP et phosphate inorganique (P_i) par le secteur F_1 de l'ATP synthase (fonctionnant en sens inverse). Le P_i est, à son tour, transporté vers l'espace intermembranaire contre de l'hydroxyle. L'activité de ce système entraîne un mouvement de charges générant ainsi du potentiel membranaire. Le proguanil ciblerait ce système, ce qui expliquerait sa synergie avec l'atovaquone. La combinaison des deux molécules inhibant à la fois la chaîne respiratoire et le système alternatif, le potentiel de membrane ne pourrait plus être maintenu.

Introduction

Proguanil in combination with its synergistic partner atovaquone has been used for malaria treatment and prophylaxis for decades. Atovaquone is an inhibitor of the mitochondrial respiratory chain cytochrome *bc*₁ and binds in the Q_o-site of the complex [1]. The drug is highly potent against the malaria agents *Plasmodium*. However, its inhibitory action is compromised by resistant mutations located in its binding site, such as Y268C and Y278S found in atovaquone resistant *P. falciparum* parasites (see [2] and refs within).

A potent fast-acting activity of proguanil is attributed to its metabolite cycloguanil, which acts as an inhibitor of the dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR mutations causing resistance to cycloguanil were reported [3]. Proguanil itself (and a cyclization-blocked analogue) shows slow-acting anti-parasitic activity [4]. The efficiency of the combined atovaquone-proguanil therapy is not due to cycloguanil but rather to proguanil [4,5]. Although the synergistic effect of the two compounds is well documented [6-7], the mode of action of proguanil is still poorly understood. The drug has no effect on the respiration of the parasite [5]. It was hypothesized that, in the parasite, proguanil target the alternative system of mitochondrial membrane potential generation, comprising the F₁ domain of the ATP synthase with the adenine nucleotide translocator and the phosphate carrier, which is essential for the cell in absence of an active respiratory chain [7]. This could explain why proguanil potentiates the activity of atovaquone. The combination of the two drugs would impair the generation of membrane potential by both the respiratory chain and the alternative system. It was reported that proguanil inhibited ATP hydrolysis by the ATP synthase prepared from animal source. However this effect did not seem specific to proguanil as it was also observed with cycloguanil and other biguanides [8].

Here we used the yeast model to study the mode of action of proguanil. Yeast, as *P.falciparum*, does not possess P450 cytochromes that could metabolise proguanil in cycloguanil, as occurs in human liver. Therefore a growth inhibition observed upon addition of proguanil in the culture medium would be caused by that compound itself and not its metabolite.

As observed with the parasite, we showed that proguanil acted in synergy with atovaquone to inhibit yeast growth and that the inhibition of the *bc*₁ complex by atovaquone was required for the synergy. Absence of the mitochondrial Sod2 –but not of the cytoplasmic Sod1- increased proguanil sensitivity, strongly arguing for a mitochondrial site of action. We then compared the wt strain and its rho^o derivative that exclusively relies on the alternative system for the generation of membrane potential. We observed the same sensitivity to proguanil, thus suggesting that the drug would not act *via* the inhibition of that system. Interestingly, proguanil treatment was found to severely increase cell lethality, indicating that the drug impairs essential mitochondrial functions. In order to decipher the mode of action, proguanil resistant mutants were selected and studied.

Materials and Methods

Growth media and yeast strains

The following growth media were used: YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glucose), YPEth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% ethanol), YPG (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glycerol), YPGal (1% yeast extract, 2% peptone, 0.2% glucose, 2% galactose). Cells were cultured at 28°C with agitation (150 rpm) for a good aeration.

Two series of yeast strains were used for the growth assays: 1) BY4742 (*α*, *his3*, *leu2*, *lys2*, *ura3*) and its derived isogenic deletion strains from Euroscarf (Frankfurt, Germany); 2) AD1-9 that lacks several membrane transporters (*α*, *ura3*, *his1*, *Δyor1*, *Δsnq2*, *Δpdr5*, *Δpdr10*, *Δpdr11*, *Δycf1*, *Δpdr3*, *Δpdr15*, *Δpdr1*) kindly provided by M. Ghislain, UCL, Belgium. From AD1-9, deletion and over-expressing mutants were constructed, respectively, by PCR-based deletion or by transformation with a multi-copy plasmid (yEP352) containing the genes of interest under the control of their own promoter. Proguanil resistant mutants were selected using AD1-9

Growth assays and drug sensibility tests

Drug sensitivity was assessed by monitoring the inhibition of yeast cell proliferation. Yeast were grown in YPEth or YPGal with increasing concentrations of drugs. Cultures were inoculated at an OD_{600nm} of 0.2 and incubated at 28°C with vigorous shaking for two or three days. OD_{600 nm} were then measured. Data were plotted for each strain as the percentage of growth relative to control, *i.e.* untreated. The experiments were repeated at least twice and the

data averaged. IC₅₀ (drug concentration required to obtain 50% growth inhibition) were estimated from inhibitor titration plots.

Drug combination

In vitro drug-drug interactions were investigated using the fixed-ratio isobologram method established by Fivelman *et al.* [9]. This approach is based on determining the IC₅₀ values of each individual drug alone and the IC₅₀ values of a mixture of both drugs at fixed concentration ratios. Drugs were applied alone or in combination at fixed concentration ratios (A:B ratios [vol/vol] of 1:4, 2:3, 3:2, and 4:1). The FIC₅₀ of each drug in a given combination was estimated as follows: FIC₅₀ (A) = IC₅₀ of A in combination / IC₅₀ of A alone; FIC₅₀ (B) = IC₅₀ of B in combination / IC₅₀ of B alone. All FIC₅₀s were confirmed by independent experiments. The isobolograms were drawn by plotting pairs of FIC₅₀ values of drug A and drug B for each combination. The straight line indicated an indifferent interaction (no interaction or additive action), a concave curve towards the origin of the axes represented synergy and a convex curve towards the opposite indicated antagonism.

Aconitase and fumarase measurement using yeast cell extracts

The aconitase and fumarase activities were determined spectrophotometrically by monitoring the formation of cis-aconitate and fumarate at 240 nm and 25°C as described [10]. Briefly, cell extracts were prepared from 2.10⁸ cells grown on YPGal, by glass bead breakage, aliquoted and frozen immediately in liquid nitrogen. The aconitase activities were measured in 50 mM potassium phosphate pH 7.4, 30 mM sodium isocitrate, 0.6 mM MnCl₂. The fumarase activities were measured in 50 mM potassium phosphate, pH 7.4, 50 mM L-malic acid. Cell extracts were added at 150-250 µg of protein for a final volume of 1 mL. The absorbance changes were measured for 5-10 min, and the activity was calculated from the slope of the linear portion using $\epsilon = 3.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for cis-aconitate and $2.44 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for fumarate.

Preparation of mitochondria and measurement of O₂ consumption of mitochondria and of intact cells

Mitochondria were prepared as described in [11]. Oxygen consumption activities were measured in a Clarke-type oxygen electrode. Mitochondria were added at around 50 µg of protein in 1 mL of 0.7 M sorbitol, 50 mM potassium phosphate pH 7.5 and 0.2 mM EDTA. The reaction was initiated by the addition of 0.8 mM NADH.

O₂ consumption of intact cells were also recorded in a Clarke-type oxygen electrode. Cells were harvested after 24h incubation with or without drug, washed and immediately added to 1 mL of fresh YPEth into the oxygen electrode chamber at around 4 DO_{600nm}. The O₂ consumption rates were monitored without and with 8 μM CCCP. The results were normalised per OD_{600nm}

Spectroscopic analysis of cytochromes in whole cells

Cytochrome spectra of whole cells were recorded with a Cary 400 (Varian, San Fernando, CA) spectrophotometer at low temperature.

Sequencing analysis

The Next Generation Sequencing Core Facility of I2BC (www.i2bc.paris-saclay.fr) performed whole genome sequencing (WGS) and the bioinformatics analysis. Presence of mutations were confirmed by PCR and sequencing of the mutated genes.

Results & Discussion

Effect of proguanil and atovaquone combination on yeast respiratory growth

Before investigating the mode of action of proguanil in yeast, we addressed the question of the relevance of the yeast model. To that end, we checked whether yeast showed the same behaviour as the parasite in regards to the sensitivity to atovaquone-proguanil combination.

For the growth assays, we used the respiratory growth medium YPEth and the strain AD1-9 (and its derivatives) that lacks several membrane transporters, which renders the cells more sensitive to compounds as previously shown for atovaquone and other anti-malaria drug [12].

First, we checked whether proguanil and atovaquone acted synergistically to inhibit yeast growth, as observed in *P. falciparum*. We also tested the combination of proguanil with three others drugs: the antimalarial plasmodione, a potent yeast respiratory growth inhibitor acting *via* oxidative stress [13], and two *bc*₁ complex inhibitors, the antifungal azoxystrobin and the anti-parasitic ELQ-271 [14,15]. Atovaquone and azoxystrobin bind at the Q_o-site of the complex while ELQ-271 targets its Q_i-site.

As shown in fig.1A, proguanil acts synergistically with atovaquone, azoxystrobin and ELQ-271 while it antagonizes plasmodione in growth inhibition assays. The antagonistic effect of

plasmodione was previously observed with the malaria parasite [16]). The synergistic effect of the *bc*₁ complex inhibitor ELQ-300, structurally similar to ELQ-271 was reported in *P.falciparum* [4].

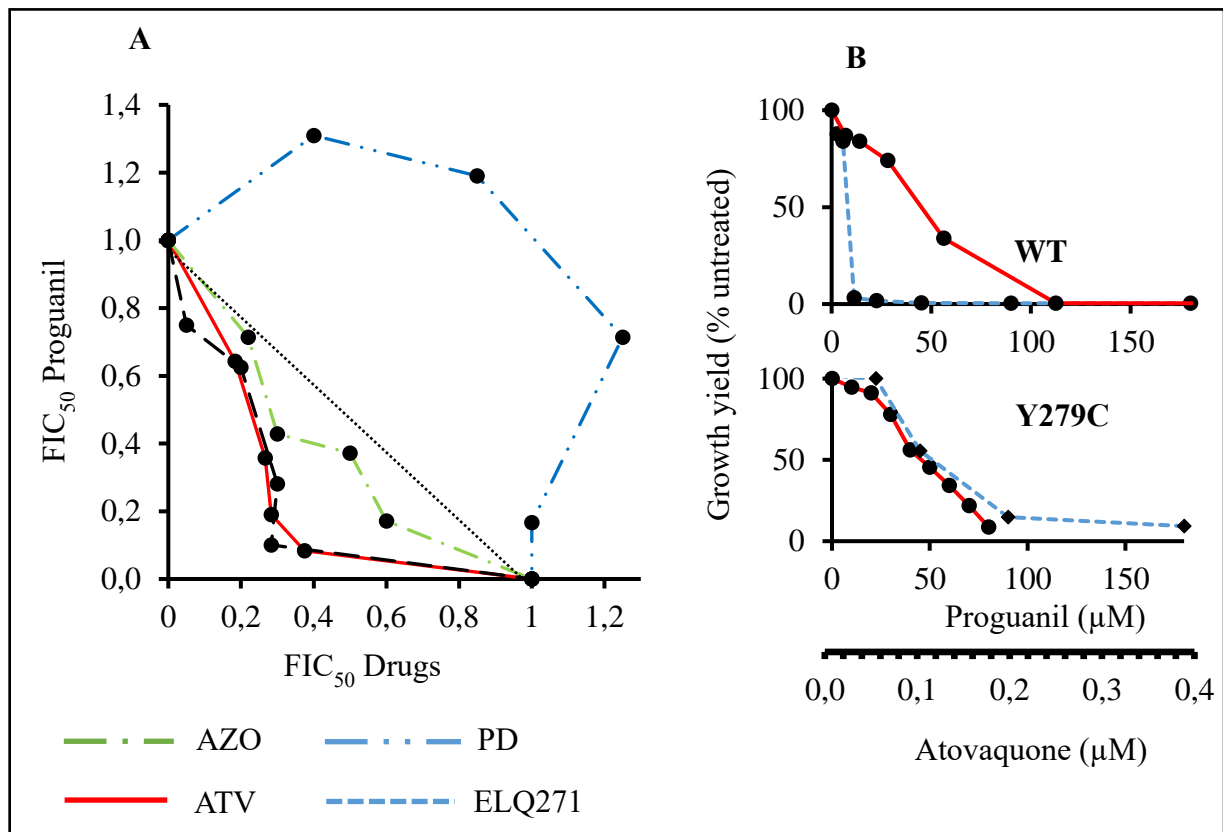


Figure 1: Effect of proguanil combination with respiratory growth inhibitors.

(A) Isobologram showing proguanil combination with atovaquone (ATV), azoxystrubin (AZO), ELQ271 and plasmodione (PD) in yeast growth. The dotted line shows a theoretical indifferent interaction. **(B)** Respiratory growth sensitivity of the atovaquone resistant strain Y279C and WT to proguanil alone (red line) and proguanil-atovaquone combination (blue dashed line). Cells were grown in YPEth with increasing concentration of drugs. OD_{600nm} were measured after three days culture at 28°C. The results are presented as % of growth yield without treatment.

Secondly, we asked whether atovaquone potentiates proguanil by inhibiting the *bc*₁ complex or whether another drug-drug interaction, independent of *bc*₁ complex inhibition, should be proposed. To that end, we tested the effect of the drug combination on the atovaquone resistant mutant Y279C, derived from the control strain AD1-9. The cytochrome *b* mutation Y279C (corresponding to Y268C in *P. falciparum*) confers a high level of atovaquone resistance in yeast as in the parasite [17]. In yeast growth assays, the IC₅₀ of the control strain was around 0.1 μM atovaquone whereas it was >10 μM for Y279C. Fig.1B top panel shows the proguanil

and combined proguanil-atovaquone inhibition curves of the control. A dramatically increased inhibition was observed with the drug combination. By contrast, as shown in the bottom panel, the proguanil and proguanil-atovaquone inhibition curves were identical for Y279C. Thus atovaquone did not potentiate proguanil activity in the mutant. This confirmed that, as previously reported for the malaria parasite [18], the atovaquone-proguanil synergistic effect observed in the control (Fig.1B top panel) required the inhibition of the *bc₁* complex by atovaquone. Another drug-drug interaction independent of atovaquone inhibitory action on the respiratory chain complex seems excluded.

Then, in order to pursue the comparison with data obtained with the malaria parasite, we tested the effect of proguanil on the O₂ consumption of mitochondria isolated from yeast control strain. Addition of proguanil had no effect on the respiratory chain activity (data not shown). We also checked the effect of atovaquone-proguanil combination on O₂ consumption activity. No difference was observed between the inhibitory effect of atovaquone and of combined atovaquone-proguanil (data not shown). Thus proguanil did not potentiate the inhibitory effect of atovaquone on the respiratory chain, which was also in agreement with results obtained with the parasites [5].

Thus based on these first data, yeast seems an appropriate model to decipher the mode of action of proguanil.

Consequence of proguanil treatment on cell viability

We tested whether proguanil had a cytostatic or a cytotoxic effect on yeast. Cells were grown in YPEth to an OD_{600nm} of 2 and then treated with different concentrations of proguanil. After 24h treatment, the OD_{600nm} were recorded (fig.2A). The cells were then harvested, resuspended in water, counted, serially diluted and plated on YPD medium. After 4 days of incubation at 28°C, the colonies were counted and their number was reported to the number of plated cells (fig.2B). O₂ consumption of the cells harvested after 24h treatment was also monitored with or without CCCP (fig.2C). The uncoupling compound CCCP releases electron transfer through the respiratory chain, thus the O₂ consumption rate, from the control of the mitochondrial membrane potential.

Proguanil treatment at concentrations inhibiting cell proliferation severely lowered cell viability and resulted in the loss of cell respiratory function. After treatment with a high dose of proguanil, the O₂ consumption rate was not increased by CCCP, which could suggest that the mitochondria membrane was damaged.

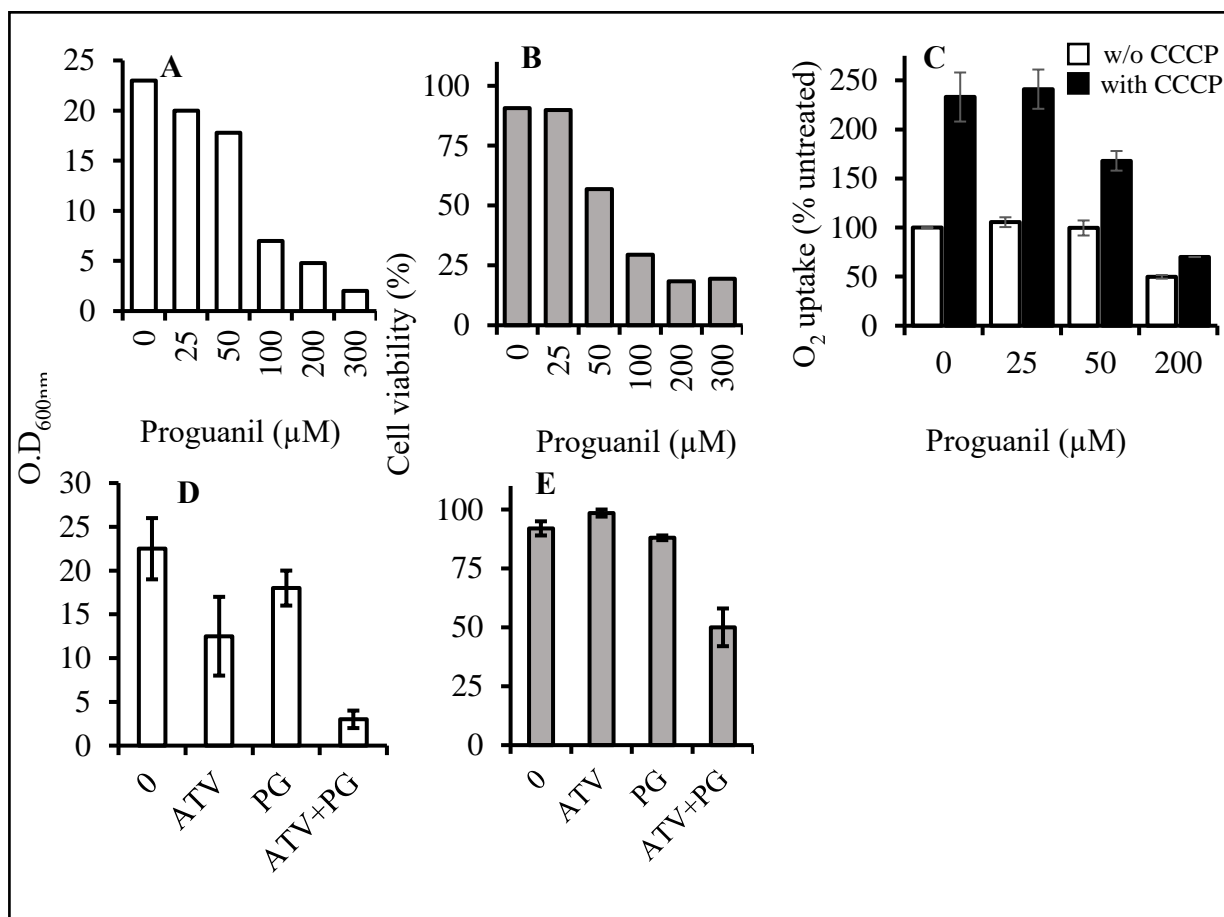


Figure 2: Effect of proguanil treatment in cell viability and respiration. Cells were grown for 24h in YPEth to an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of around 2, and then incubated for another 24h in YPEth without or with drugs. The $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of cultures were then recorded (A, D). The cells were then harvested, counted and plated on YPD. The number colonies observed is then reported on the number of expected colonies to determine the percentage of viability (B,E). O_2 consumption rates of proguanil-treated cells were recorded (C) without or with 8 μM CCCP. The results were normalised per $\text{OD}_{600\text{nm}}$ and are presented as % of control rates (rates without CCCP of untreated cells). Each measurement was repeated at least three times and averaged. Error bars represent standard deviation.

A effect on cell viability was previously observed with artesunate treatment [13]. By contrast, treatment with primaquine [10], plasmodione [13] or with bc_1 complex inhibitors had no effect on cell viability. A 24h treatment with atovaquone at concentrations that fully inhibited respiratory growth did not result in cell death (not shown). However atovaquone enhanced cell death induced by proguanil. As shown in fig.2, atovaquone added at 100 nM and proguanil at 25 μM had no effect on cell viability, but their combination resulted in a 50% decrease in cell viability (fig.2 D) and, as expected, a severe growth inhibition (fig.C).

A role for the respiratory chain and for the alternative system for mitochondrial membrane potential generation

We then addressed the question of the role of the respiratory chain and the alternative mechanism for the generation of mitochondrial membrane potential in proguanil activity.

To that end, we compared the sensitivity to proguanil of the control strain AD1-9 and its derived rho^o mutant without mtDNA. Rho^o cells lack the respiratory chain complexes III and IV and the F_O-part of complex V (or ATP synthase), as part of their components are mitochondrially encoded.

The cells were grown in YPGal with a vigorous agitation for a good aeration of the cultures. In these conditions, the control cells use mainly the respiratory function while the rho^o cells produce their energy by glycolysis.

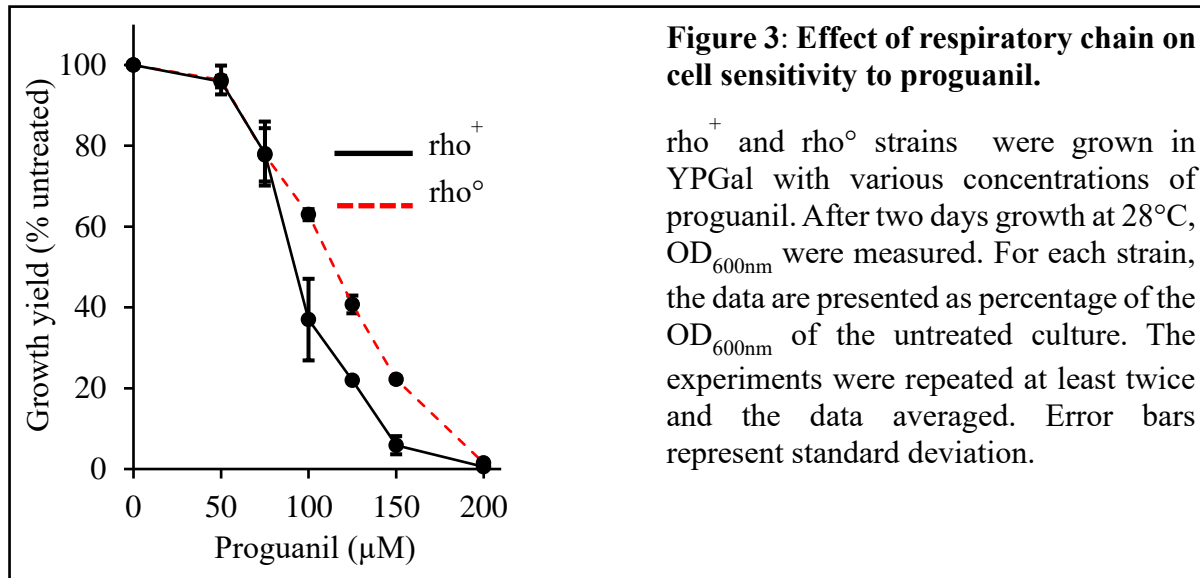
If the inhibitory activity of proguanil requires an active respiratory chain, the control cells would be sensitive to the drug while the rho^o cells would be unaffected. This is observed for plasmodione and primaquine [10, 13], and of course for atovaquone.

By contrast, if the drug interferes with the alternative mechanism for mitochondrial membrane potential generation, the rho^o cells should be more sensitive than control cells as they rely exclusively on that mechanism.

In wt cells, the mitochondrial membrane potential is generated by the activity of the respiratory chain. In rho^o cells, the mitochondrial membrane potential (indispensable even when ATP derived from glycolysis) is maintained by an alternative mechanism, by the electrogenic exchange of ATP⁴⁻ / ATP³⁻ *via* the adenine nucleotide translocator in concert with the ATP hydrolysis activity of the F₁ domain of complex V and the phosphate carrier. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by mutation or by bongkreikic acid, or inhibition of the F₁ domain of complex V is lethal for the rho^o cells [19, 20].

As shown in fig.3, rho^o cells were slightly less sensitive to proguanil, suggesting that the respiratory chain plays only a minor role, if any, in proguanil sensitivity. It could also be inferred that the activities of the adenine nucleotide translocator, the F₁-domain of complex V and the phosphate carrier were not impaired by proguanil. It thus seems that the drug would not act *via* the inhibition of the alternative system for membrane potential generation, and that other possible mechanisms need to be investigated. Its synergy with atovaquone argues for

mitochondrial targets. Its effect on cell viability points towards essential mitochondrial functions.



In order to obtain clues on proguanil mode of action, we first addressed the question of a role for oxidative stress in the drug inhibitory activity.

A role for the oxidative stress

We monitored the effect of proguanil treatment on the activities of the oxidative stress-sensitive aconitase and, as control, of the oxidative stress-insensitive fumarase, both enzymes of the Krebs cycle located in the mitochondrial matrix. The cells were grown in YPGal without and with 80 and 100 μM proguanil during 24h. The final OD_{600nm} were recorded, the cell extracts were prepared and the activities of both enzymes measured (fig.4A).

Treatment with 80 μM proguanil resulted in 50% growth inhibition and had no effect on aconitase activity. Increasing the treatment to 100 μM proguanil resulted in a severe 85 % growth inhibition but a moderate 40 % decrease of aconitase activity. Thus proguanil had only a minor effect on the ROS-sensitive aconitase. It seems unlikely the observed growth inhibition would be caused by a major oxidative stress induced by the drug.

Nevertheless, it seemed interesting to ask whether decreasing the antioxidant defence of the cells might increase their sensitivity to proguanil. Thirteen mutants harbouring deletion of genes involved in protection against oxidative damage were tested (Table 1). These mutants derived from strain BY4742. This strain, contrarily to AD1-9, possesses a full set of membrane

transporters, which very efficiently pump out of the cells a variety of drugs and thus prevent the drugs to reach concentrations that would affect their intracellular targets. This explain the insensibility of the strain to proguanil at up to 200 μM (fig.4B).

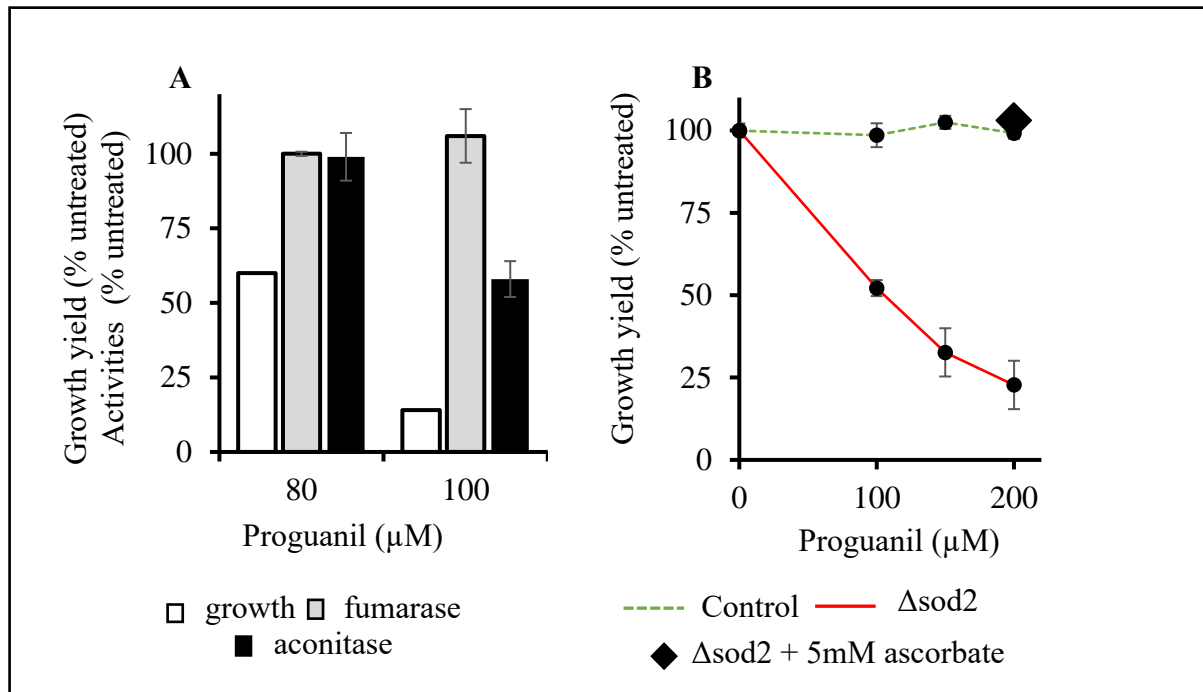


Figure 4: Effect of proguanil on the activity of the oxidative stress marker aconitase and on the growth of Δsod2 mutant.

(A) Effect of proguanil treatment on aconitase and fumarase activities. The activities were assessed spectrophotometrically at 240 nm. Total cell extracts were obtained from a one day culture in YPGal with or without 80 and 100 μM of proguanil. The reaction was started by addition of the cell extracts topotassium phosphate buffer containing isocitrate as substrate for the aconitase or malate as substrate for the fumarase. t test. (B) Effect of deletion of *SOD2* on the growth sensitivity to proguanil. Control (BY4742) and mutant (BY4742 Δsod2) strains were grown in YPEth with various concentrations of proguanil. $\text{OD}_{600\text{nm}}$ were measured after three days. For each strain, the data are presented as percentage of the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of the untreated culture. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. Error bars represent standard deviation

From the thirteen mutants tested, two presented an increased sensitivity to proguanil, namely, Δsod2 and, Δnfu1 .

Nfu1 is involved in the protection of [4Fe-4S] clusters against oxidative damages. It is part of the Iron-Sulphur cluster (ISC) biogenesis pathway in the mitochondria, as the protein, with other partners, transfers Fe-S cluster to mitochondrial clients. As a control, we checked whether impairing the ISC biogenesis might exacerbate proguanil sensitivity. Mutations, Δisu2 , Δisa2

and, *Δgrx5* were tested but the deletion of these genes encoding key actors of the ISC biogenesis pathway did not increase the drug sensitivity (Table 1). It thus seems unlikely that the main target of proguanil would be the ISC biogenesis, as lowering the activity of that pathway did not render the cells more sensitive to the drug. The increased sensitivity of, *Δnfu1* mutant might rather be linked to its role in oxidative damage protection.

Table 1 : Deletion mutants tested for proguanil sensitivity. The deletion mutants derived from BY4742. The strain possesses a full set of membrane transporters, which renders the cells naturally insensitive to proguanil as the drug cannot accumulate in the cells. The sensitivity of the mutants were tested in YPEth or YPGal medium at 200 and/or 400 μM proguanil

Deleted gene	Function	Localisation	Sensitivity to proguanil
<i>SOD1</i>	superoxide dismutase	mainly cytoplasm (and small population in IMS)	no
<i>SOD2</i>	superoxide dismutase	mitochondrial matrix	yes
<i>CTT1</i>	catalase	cytoplasm	no
<i>CTA1</i>	catalase	peroxisome	no
<i>CCP1</i>	cytochrome <i>c</i> peroxidase	IMS	no
<i>GLR1</i>	glutathione oxidoreductase	cytoplasm and mitochondria	no
<i>GPX1</i>	glutathione peroxidase	cytoplasm, mitochondria, peroxisome	no
<i>GPX2</i>	glutathione peroxidase	cytoplasm and mitochondria	no
<i>GPX3</i>	glutathione peroxidase	peroxisome and IMS	no
<i>GRX1</i>	glutaredoxin	cytoplasm	no
<i>GRX2</i>	glutaredoxin	mitochondria	no
<i>PRX1</i>	thioredoxin peroxidase	mitochondria	no
<i>NFU1</i>	ISC assembly; protection of [4Fe-4S] from oxidative damage	mitochondria	yes
<i>ISU2</i>	ICS assembly	mitochondria	no
<i>ISA1</i>	ISC assembly	mitochondria	no
<i>GRX5</i>	ISC assembly	mitochondria	no

Sod2, the mitochondrial superoxide dismutase seems to protect the cells against proguanil as its absence renders the cells more sensitive to the drug. The addition of ascorbate to the 200 μM proguanil-supplemented medium restored the growth of, *Δsod2* to wt level (fig.4B), stressing the link between increased ROS level and proguanil sensitivity. Interestingly, *Sod1*, the mainly cytosolic superoxide dismutase would not share that role.

We then checked if iron could have a role in the drug activity, as increased iron content could result in higher ROS production.

We overexpressed *MRS3*, encoding the mitochondrial iron transporter, in the control strain AD1-9 and monitored proguanil sensitivity (fig.5A). *MRS3* overexpression increased the drug potency, suggesting that higher mitochondrial iron content enhanced proguanil activity.

We tested the effect of adding the iron chelators desferoxamine and quercetin in growth medium (fig.5B). The compounds had a clear protective effect against proguanil, suggesting a role for iron in the drug activity, which could be indirect and due to an increased redox imbalance associated with higher mitochondrial iron content.

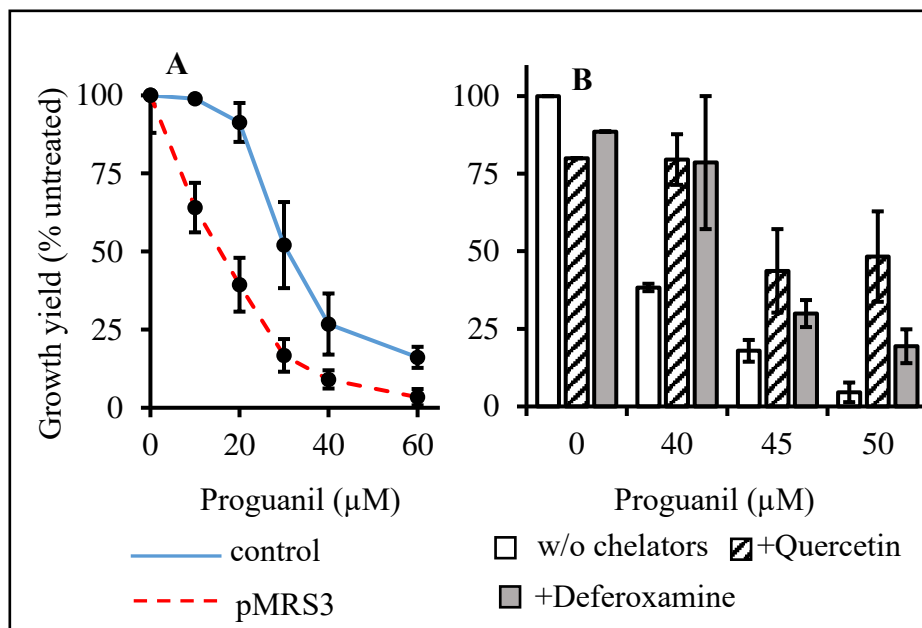


Figure 5: Effect of mitochondrial iron transporter and iron chelators on cell sensitivity to proguanil.

(A) Effect of proguanil on the growth sensitivity of AD1-9 transformed with a multicopy plasmid bearing *MRS3*. (B) Effect of iron chelators quercetin and deferoxamin on growth sensitivity to proguanil. The cells were grown in YPEth with various concentrations of proguanil. OD_{600nm} were measured after three days. For each strain, the data are presented as percentage of the OD_{600nm} of the untreated culture. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. Error bars represent standard deviation.

Taken together, the results confirmed the mitochondrial site of proguanil action, in particular the difference between the drug sensitivity of $\Delta sod2$ and $\Delta sod1$ mutants (Table 1), as only the absence of the mitochondrial Sod enhanced proguanil potency, and they pointed towards an exacerbating effect of mitochondrial oxidative imbalance on proguanil inhibitory activity.

In the attempt to unravel proguanil mechanism of action, we then selected and studied resistant mutants. Uncovering the cell strategies to decrease proguanil inhibitory effect could give information about its mode of action.

Possible cell strategies to decrease proguanil inhibitory effect

CoQ5 and mitochondrial membrane permeability

To select proguanil resistant mutants, several subclones from AD1-9 were grown on YPD, and then incubated on YPG supplemented with 150 μ M of proguanil, which fully abolished cell growth. Resistant colonies appeared after two months of incubation at a low frequency ($1.2 \cdot 10^{-10}$). Four genetically independent resistant colonies (each from different subclones of the parental strain) were obtained and analysed. First their respiratory growth competence (as judged by the OD_{600nm} reached after three day culture in YPEth) and sensitivity to proguanil were assessed. The mutants presented an unaffected growth competence and a moderate resistance to proguanil as their IC₅₀ increased 3-fold as compared to control. No cross-resistance to plasmodione or atovaquone were observed.

Whole genomic sequencing was performed and revealed the same mutation for the four mutants: a T to G nucleotide substitution at position 41 downstream *PUF3* coding sequence, in the terminator region [21]. The mRNA-binding protein Puf3 was reported to have several mitochondrial targets. In particular it was shown to regulate Coq5 abundance and Co-enzyme Q (CoQ) biosynthesis [22]. Therefore we tested whether the deletion of *COQ5* could affect the sensitivity to proguanil. *COQ5* encodes the 2-hexaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone methyltransferase, forming a large complex with other CoQ biosynthetic enzymes.

We compared Δ coq5 with mutant rho^o, both derived from AD1-9 and both defective in respiratory function, and presenting same growth behaviour (fig.6A). Interestingly, the absence of coq5 and thus of CoQ synthesis, resulted in a decreased sensitivity to proguanil. It should be reminded that wt and rho^o showed the same or very similar sensitivity (fig.3).

We then tested the effect of adding the CoQ analogue decylubiquinone in the growth medium, using the control strain AD1-9 (fig.6B). Addition of decylubiquinone increased proguanil inhibitory effect.

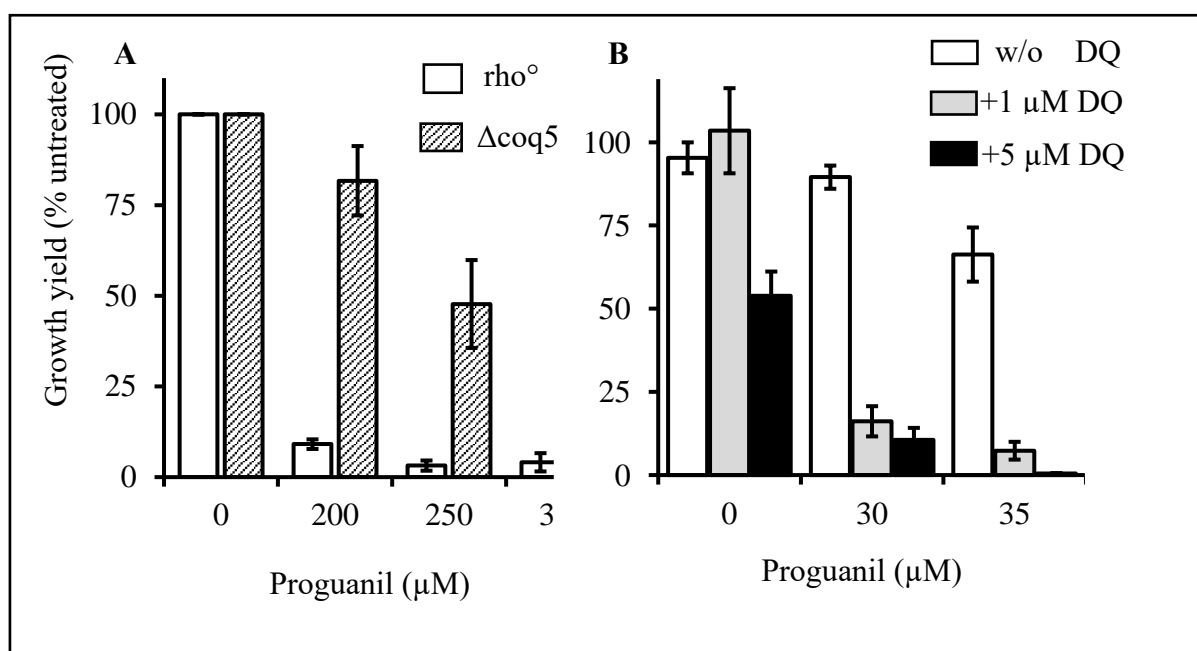


Figure 6: Effect of coenzyme Q biosynthesis mutant and decylbiquinone addition on growth sensitivity to proguanil.

(A) Growth sensitivity of coenzyme Q mutant Δcoq5 and rho° mutant to proguanil (B). Effect of decylbiquinone addition on the growth sensitivity to proguanil. Cells were grown in YPGAL (A) or YPEth (B) under agitation with various concentrations of proguanil at 28°C. $\text{OD}_{600\text{nm}}$ were measured after three days. For each strain, the data are presented as percentage of the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of the untreated culture. The experiments were repeated at least twice and the data averaged. Error bars represent standard deviation

CoQ plays a key and well-known role in electron transfer and has been shown to act as an antioxidant that protects the membrane lipids against peroxidation (see for instance, [23] and references within). Yeast synthesize only saturated and monounsaturated fatty acids that are not prone to peroxidation but CoQ-deficient yeast cells were shown to be hypersensitive to the auto-oxidation of added polyunsaturated fatty acids [24].

CoQ was also reported to stabilize the phospholipid membrane [25]. In presence of CoQ-10 the membranes are less permeable to hydrophilic solutes.

The effect of Δcoq5 mutation that abolishes CoQ biosynthesis on proguanil sensitivity might be related to that property. As proguanil and other biguanides are positively charged molecules, they could be concentrated inside mitochondria by the mitochondrial membrane potential (Bridges *et al.* 2014). The compounds might reach high concentrations that impair

mitochondrial functions and/or block transporters, which could be lethal for the cells. In the absence of CoQ, the mitochondrial membrane might be more permeable, facilitate the diffusion of proguanil out of the mitochondria and reduce its accumulation. We could also hypothesize that proguanil would be transported into the mitochondria by a transporter whose activity is modulated by CoQ.

Little is known about the transport of proguanil into the mitochondria. In mammalian cells, the drug seems unable to access the mitochondrial matrix contrarily to the related biguanide phenformin whose uptake would involve the organic cation/cartinine transporter (OCTN1) [8, 26, 27]. In yeast as in the malaria parasite, it is most likely that proguanil could accumulate into the mitochondria as the data point toward a mitochondrial location of the drug activity: for instance the synergy with atovaquone that specifically targets the *bc₁* complex and as shown in yeast, the effect of $\Delta sod2$.

Heme and sequestration of proguanil

In order to obtain more proguanil resistant mutants, we used another strategy. We transformed AD1-9 with a multicopy genomic library and tested around 15,000 transformants for resistance on YPG supplemented with 150 μ M of proguanil. One transformant only presented a weak resistance. Sequencing of the plasmid-born insert revealed that it contained a partial sequence of *HEM13* and the complete sequence of *NRG1*. Nrg1 was identified as a transcriptional repressor of glucose-repressed genes [28] and reported to be involved in the regulation of *HEM13* expression [29].

Next, we used AD1-9 transformed with the multicopy plasmid bearing *NRG1* to select others resistant strains. Nine genetically independent resistant strains were obtained. The plasmid was then removed from the resistant cells without loss of the resistance.

The resistant mutants could be classed in two groups.

The first group contains five resistant mutants. They shared a moderate resistance (two fold increase in IC_{50}) and presented a 60 % decrease of in respiratory growth capacity. The whole genome sequencing of the mutants is in progress to identify the mutation.

The second group contains four mutants with an intriguing phenotype. They presented an unaffected respiratory growth and a moderate resistance (2.5-fold increase in IC_{50}). When grown to late stationary phase, the cells showed a pink colour. Optical spectra of the mutant

and of control cells were recorded (fig.7). An accumulation of a (haemoglobin like) pigment with a peak at 575 nm was observed in the mutant cells. In cells from five days cultures, that pigment formed the main optical signal and masked the cytochrome spectra. The pigment did not accumulate in cells grown in glucose-rich medium without aeration (not shown), which was not unexpected as heme biosynthesis required oxygen. These cells when devoid of pigment lost the resistance to proguanil, thus showing that the resistance was caused by the pigment accumulation.

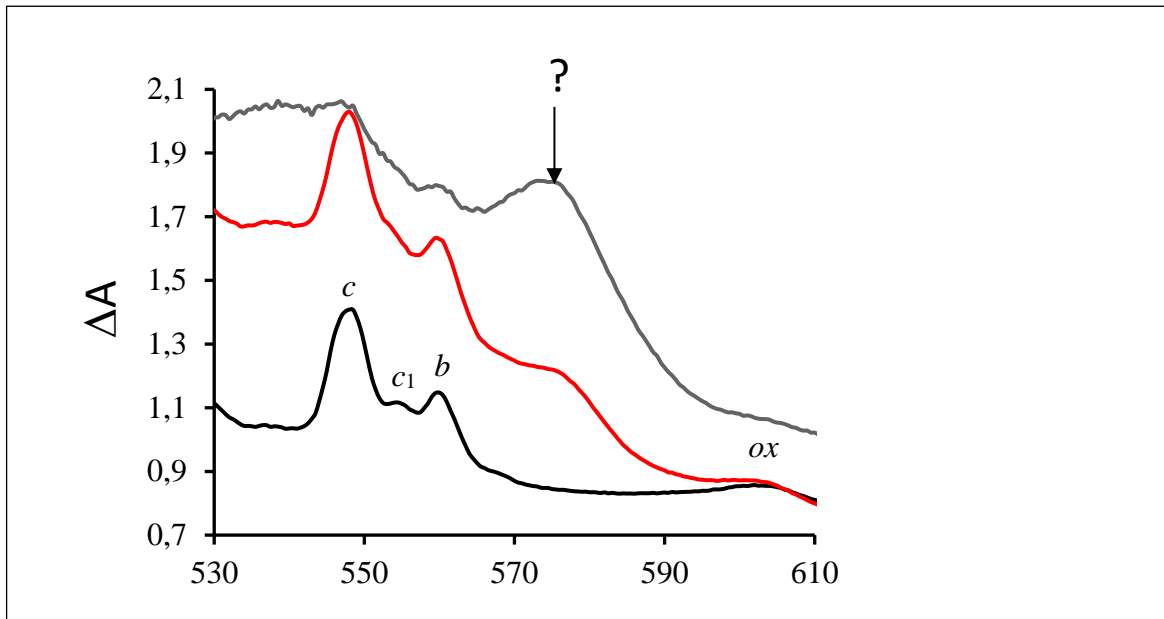


Figure 7: Optical spectra of whole cells. Cytochrome spectra were recorded with a spectrophotometer Cary 400 (Varian, San Fernando, USA) at low temperature. WT and mutants were grown on YPD plates for 1 or 5 days. Cells were collected and reduced with dithionite before freezing in liquid nitrogen and scanning. Black, WT; Red, proguanil resistant mutant, one day growth; Grey, proguanil resistant mutant, five days growth. The signal corresponding to cytochromes *c*, *c*₁, *b* and oxidase are indicated. The peak at 575 nm is indicated by a question mark.

We checked whether the accumulation of the pigment could be due to the over-expression of the haemoglobin like proteins present in yeast that are encoded by *YHB1* [30] and *YNL234W* [31]. The deletion of the genes had no effect, which ruled out a role for these proteins. The whole genome sequencing of the mutants is in progress to identify the genetic cause of that phenotype.

Regardless of the mutation causing the pigment accumulation, we could speculate on the link between decreased proguanil sensitivity and pigment accumulation.

A report suggested that the biguanide metformin could target heme and bind to its iron [32]. We could hypothesize that proguanil could bind to the pigment present at high levels in the mutants. Its sequestration would decrease its toxic accumulation in the mitochondria.

The identification of the mutations conferring proguanil resistance will provide more information. It might also be possible to purify and then identify the pigment by mass spectroscopy, which could also reveal the possible binding of proguanil.

References

- [1] D. Birth, W.-C. Kao, C. Hunte, Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome *bc*₁ complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4029. doi:10.1038/ncomms5029.
- [2] G. Cottrell, L. Musset, V. Hubert, J. Le Bras, J. Clain, Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: insights from computational modeling and clinical case reports, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 4504–14. doi:10.1128/AAC.02550-13.
- [3] D.S. Peterson, W.K. Milhous, T.E. Wellems, Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 3018–3022. doi:10.1073/pnas.87.8.3018.
- [4] T.S. Skinner-Adams, G.M. Fisher, A.G. Riches, O.E. Hutt, K.E. Jarvis, T. Wilson, M. von Itzstein, P. Chopra, Y. Antonova-Koch, S. Meister, E.A. Winzeler, M. Clarke, D.A. Fidock, J.N. Burrows, J.H. Ryan, K.T. Andrews, Cyclization-blocked proguanil as a strategy to improve the antimalarial activity of atovaquone, *Commun. Biol.* 2 (2019) 1–14. doi:10.1038/s42003-019-0397-3.
- [5] A.B. Vaidya, Indresh K. Srivasta, A Mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 1334–1339. doi: 10.1128/AAC.43.6.1334
- [6] K. Jones, S.A. Ward, Biguanide-atovaquone synergy against *Plasmodium falciparum* *in vitro*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2700–2703. doi:10.1128/AAC.46.8.2700-2703.2002.
- [7] H.J. Painter, J.M. Morrissey, M.W. Mather, A.B. Vaidya, Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*, *Nature.* 446 (2007) 88–91. doi:10.1038/nature05572.
- [8] H.R. Bridges, A.J.Y. Jones, M.N. Pollak, J. Hirst, Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria, *Biochem. J.* 462 (2014) 475–487. doi:10.1042/bj20140620.
- [9] Q.L. Fivelman, I.S. Adagu, D.C. Warhurst, Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin

- against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 4097–4102. doi:10.1128/AAC.48.11.4097-4102.2004.
- [10] A. Lalève, C. Vallières, M.-P. Golinelli-Cohen, C. Bouton, Z. Song, G. Pawlik, S.M. Tindall, S. V. Avery, J. Clain, B. Meunier, The antimalarial drug primaquine targets Fe–S cluster proteins and yeast respiratory growth, *Redox Biol.* 7 (2016) 21–29. doi:10.1016/j.redox.2015.10.008.
- [11] C. Lemaire, G. Dujardin, Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria: activity measurement and subunit composition analysis, *Methods Mol Biol.* 432 (2008) 65–81.
- [12] P. Hill, J. Kessl, N. Fisher, S. Meshnick, B.L. Trumppower, B. Meunier, Recapitulation in *Saccharomyces cerevisiae* of Cytochrome b Mutations Conferring Resistance to Atovaquone in *Pneumocystis jiroveci*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 2725–2731. doi:10.1128/AAC.47.9.2725.
- [13] P. Mounkoro, T. Michel, S. Blandin, M.P. Golinelli-Cohen, E. Davioud-Charvet, B. Meunier, Investigating the mode of action of the redox-active antimalarial drug plasmodione using the yeast model, *Free Radic. Biol. Med.* 141 (2019) 269–278. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.026.
- [14] P.H. Alday, I. Bruzual, A. Nilsen, S. Pou, R. Winter, C. Ben Mamoun, M.K. Riscoe, J.S. Doggett, genetic evidence for cytochrome *b* Q_i site inhibition by 4(1H)-quinolone-3-diarylethers and antimycin in *Toxoplasma gondii*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2016) AAC.01866-16. doi:10.1128/AAC.01866-16.
- [15] J.S. Doggett, A. Nilsen, I. Forquer, K.W. Wegmann, L. Jones-Brando, R.H. Yolken, C. Bordón, S. a Charman, K. Katneni, T. Schultz, J.N. Burrows, D.J. Hinrichs, B. Meunier, V.B. Carruthers, M.K. Riscoe, Endochin-like quinolones are highly efficacious against acute and latent experimental toxoplasmosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 15936–41. doi:10.1073/pnas.1208069109.
- [16] K. Ehrhardt, C. Deregnaucourt, A.A. Goetz, T. Tzanova, V. Gallo, P. Arese, B. Pradines, S.H. Adjalley, D. Bagrel, S. Blandin, M. Lanzer, E. Davioud-Charvet, The redox cyler plasmodione is a fast-acting antimalarial lead compound with pronounced activity against sexual and early asexual blood-stage parasites, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 5146–5158. doi:10.1128/AAC.02975-15.

- [17] Z. Song, J. Clain, B.I. Iorga, Z. Yi, N. Fisher, B. Meunier, Yeast-based mutational analysis of the *bc₁* complex Q_o site residue 279 to study the trade-off between atovaquone resistance and function, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 4053-4058. AAC.00710-15. doi:10.1128/AAC.00710-15.
- [18] I.K. Srivastava, J.M. Morrissey, E. Darrouzet, F. Daldal, A.B. Vaidya, Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome *b* in malaria parasites, *Mol. Microbiol.* 33 (1999) 704–11. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01515.x.
- [19] M.F. Giraud, J. Velours, The absence of the mitochondrial ATP synthase δ subunit promotes a slow growth phenotype of rho⁻ yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F₁, *Eur. J. Biochem.* 245 (1997) 813–818. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00813.x.
- [20] C.H. Dupont, J.P. Mazat, B. Guerin, The role of adenine nucleotide translocation in the energization of the inner membrane of mitochondria isolated from ρ^+ and ρ_0 strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132 (1985) 1116–1123. doi:10.1016/0006-291X(85)91922-9.
- [21] L. Wei, Z. Wang, G. Zhang, B. Ye, Characterization of Terminators in *Saccharomyces cerevisiae* and an exploration of factors affecting their strength, *ChemBioChem.* 18 (2017) 2422–2427. doi:10.1002/cbic.201700516.
- [22] C.P. Lapointe, J.A. Stefely, A. Jochem, P.D. Hutchins, G.M. Wilson, N.W. Kwiecien, J.J. Coon, M. Wickens, D.J. Pagliarini, Multi-omics reveal specific targets of the rna-binding protein puf3p and its orchestration of mitochondrial biogenesis, *Cell Syst.* 6 (2018) 125-135.e6. doi:10.1016/j.cels.2017.11.012.
- [23] M. Turunen, J. Olsson, G. Dallner, Metabolism and function of coenzyme Q, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1660 (2004) 171–199. doi:10.1016/j.bbamem.2003.11.012.
- [24] T.Q. Do, J.R. Schultz, C.F. Clarke, Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 7534–7539. doi:10.1073/pnas.93.15.7534.
- [25] V. Agmo Hernández, E.K. Eriksson, K. Edwards, Ubiquinone-10 alters mechanical properties and increases stability of phospholipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848 (2015) 2233–2243. doi:10.1016/j.bbamem.2015.05.002.

- [26] H.R. Bridges, V.A. Sirviö, A.N.A. Agip, J. Hirst, Molecular features of biguanides required for targeting of mitochondrial respiratory complex I and activation of AMP-kinase, *BMC Biol.* 14 (2016) 1–11. doi:10.1186/s12915-016-0287-9.
- [27] Y. Shitara, N. Nakamichi, M. Norioka, H. Shima, Y. Kato, T. Horie, Role of organic cation/carnitine transporter 1 in uptake of phenformin and inhibitory effect on complex I respiration in mitochondria, *Toxicol. Sci.* 132 (2013) 32–42. doi:10.1093/toxsci/kfs330.
- [28] S.H. Park, S.S. Koh, J.H. Chun, H.J. Hwang, H.S. Kang, Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of *STA1* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 2044–2050. doi:10.1128/mcb.19.3.2044.
- [29] K.D. MacIsaac, T. Wang, D.B. Gordon, D.K. Gifford, G.D. Stormo, E. Fraenkel, An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*, *BMC Bioinformatics.* 7 (2006) 1–14. doi:10.1186/1471-2105-7-113.
- [30] H. Zhu, A.F. Riggs, Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 5015–5019. doi:10.1073/pnas.89.11.5015.
- [31] G. Sartori, L. Aldegheri, G. Mazzotta, G. Lanfranchi, H. Tournu, A.J.P. Brown, G. Carignani, Characterization of a new hemoprotein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 5032–5037. doi:10.1074/jbc.274.8.5032.
- [32] X. Li, X. Wang, M.P. Snyder, Metformin affects heme function as a possible mechanism of action, *G3 Genes, Genomes, Genet.* 9 (2019) 513–522. doi:10.1534/g3.118.200803.

Discussion du chapitre et questions ouvertes

Cette étude du mode d'action du proguanil et du mécanisme de synergie avec l'atovaquone a apporté de nombreux résultats mais bien des questions restent ouvertes. Plus de travail sera nécessaire pour y répondre.

L'hypothèse formulé par A. Vaidya pour expliquer la synergie n'est pas validée par les résultats présentés ici. Il avait proposé que le proguanil affecterait le système alternatif qui maintient le potentiel de membrane mitochondrial quand la chaîne respiratoire est inhibée. Ce ne semble pas être le cas et une autre explication doit être trouvée.

Il se pourrait que le proguanil s'accumule dans la mitochondrie, sans avoir de cibles spécifiques, mais à une concentration telle que le fonctionnement de la mitochondrie soit sévèrement perturbé et, que peut-être, les transporteurs ne marchent plus, ce qui conduirait à la mort cellulaire observée. Bridges *et al.* (Bridges *et al.* 2014) suggèrent que les biguanides peuvent s'accumuler dans la matrice mitochondriale à des concentrations 1000 fois supérieures à celles du milieu extracellulaire, en réponse au potentiel de membrane (membranes plasmique et mitochondriale) et selon la présence de transporteurs. Notons que Jones et Ward (Jones and Ward 2002) ont testé quatre autres biguanides, en plus du proguanil, chez le parasite, et ont montré que l'atovaquone agit en synergie avec ces composés. Cet effet n'est donc pas spécifique au proguanil mais partagé par cette classe de composés.

La stratégie des levures pour réduire leur sensibilité au proguanil serait de diminuer son accumulation dans la mitochondrie. Reste à prouver cette hypothèse. L'utilisation de proguanil radioactif permettrait d'évaluer sa concentration dans la matrice mitochondrie. Mais ce sont des expériences lourdes et coûteuses. L'identification de plus de mutations de résistance apportera probablement des informations.

Comment expliquer la sensibilité accrue au proguanil du mutant $\Delta sod2$? Si le proguanil s'accumule dans la mitochondrie au point que son fonctionnement est fortement altéré, la surproduction de ROS (causé par l'absence de Sod2) va probablement exacerber le dysfonctionnement. Le traitement à la plasmodione, comme décrit au **chapitre I-1** résulte, très probablement, dans la surproduction de ROS. De ce fait, un effet synergique entre plasmodione et proguanil serait attendu. Or c'est un antagonisme qui est observé chez la levure comme chez le parasite. La plasmodione empêcherait-elle le proguanil de s'accumuler dans la mitochondrie ? Y aurait-il compétition pour des transporteurs ? Y aurait-il une interaction

directe entre les deux composés qui annulerait leurs activités ? Une fois, le mécanisme d'action du proguanil mieux compris, il serait bon de revenir à ces questions.

Enfin, la question de la synergie avec l'atovaquone (et les autres inhibiteurs du complexe bc_1) reste intrigante. Nous avons vu que l'inhibition du complexe bc_1 par l'atovaquone est nécessaire pour observer la synergie. De plus, l'atovaquone potentialise l'effet du proguanil non seulement sur la croissance des cellules (**Fig.1**) mais aussi sur leur viabilité (**Fig.2**). Une diminution du potentiel de membrane suite à l'inhibition de la chaîne respiratoire ne semble pas pouvoir expliquer cela. En effet, nous avons vu qu'un mutant ρ^o (sans chaîne respiratoire) n'est pas plus sensible au proguanil que son parent ρ^+ . De plus, si l'accumulation du proguanil dépend du potentiel de membrane, la diminution de ce potentiel devrait avoir un effet inverse c'est-à-dire diminuer la sensibilité au proguanil. C'est en fait ce qui est observé lorsque l'on compare ρ^o et ρ^+ . Il y a une légère diminution de la sensibilité du mutant ρ^o (**Fig.3**). De même, lorsque la souche contrôle est cultivée en milieu de fermentation, la sensibilité au proguanil (IC_{50}) diminue d'un facteur 3 environ (données non présentées). Pour cela, les cellules sont cultivées en tubes dans un milieu riche en glucose et sans agitation, ce qui réduit beaucoup l'aération.

Comment l'inhibition du complexe bc_1 par l'atovaquone (ou un autre inhibiteur) pourrait-elle favoriser l'accumulation du proguanil dans la mitochondrie (si c'est bien là le mode d'action du proguanil) ?

Est-ce spécifiquement l'inhibition du complexe bc_1 qui provoque ce phénomène ? Malheureusement, il n'y a pas de bons inhibiteurs spécifiques des NADH déshydrogénases pour tester leurs effets ? Quant aux inhibiteurs de la cytochrome oxydase (KCN, azide), trop toxiques, ils ne peuvent pas être utilisés pour des tests de culture dans nos conditions habituelles. De plus en inhibant un complexe de la chaîne respiratoire, le complexe bc_1 sera aussi inhibé. Les résultats ne seront peut-être pas concluants.

Une hypothèse pourrait être que l'inhibition du complexe bc_1 affecte le / les transporteurs du proguanil qui rentre plus facilement ou sort plus difficilement de la mitochondrie et donc s'accumule davantage, expliquant la synergie.

L'étude d'une panoplie plus large de mutants de résistance au proguanil pourrait nous donner des indications. On pourrait espérer toucher ce/ces transporteurs hypothétiques.

Conclusion générale et perspective

Avec près de 219 millions de personnes malades en 2017, le paludisme constitue un des grands fléaux du XXI^{ème} siècle. Derrière ce problème de santé public, se trouvent de nombreux enjeux socio-économiques. Dans les pays en voie de développement, notamment les pays d'Afrique, le paludisme constitue un des acteurs majeurs du ralentissement du développement. Dans ces pays, il constitue la principale maladie de travail mais aussi l'une des principales sources de dépenses familiales, ce qui en fait un facteur d'appauvrissement. En effet l'OMS estime que le paludisme serait responsable d'une perte de près de 115 milliards d'euros du PIB (produit intérieur brute) Africain soit 32% de ce PIB. Cette maladie est également une préoccupation majeure pour les pays développés qui sont constamment en coopération humanitaire avec les zones endémiques dont les pays Africains. Le drame humain que constitue le paludisme est aussi effroyable car il est la principale cause de décès infantile dans ces pays. Ces différents aspects ont fait du paludisme l'une des priorités des organisations mondiales.

Une bonne connaissance du paludisme et de l'agent responsable *Plasmodium* est essentiel pour faire face à la maladie. Cette connaissance a bien évolué au cours de ces dernières années. Les progrès majeurs ont été une meilleure compréhension du cycle de vie du parasite et le séquençage complet de son génome, ainsi que les études de transcriptomiques. Malgré ces avancées scientifiques qui permettraient d'identifier des cibles, il n'existe pas encore de vaccin contre le paludisme. L'utilisation de médicaments antipaludiques restent le seul moyen thérapeutique. Une large panoplie de médicaments existe. Malheureusement, de nombreux cas d'échecs thérapeutiques liés à l'apparition des souches résistances ont été observés.

Le développement de nouvelles molécules antipaludiques et/ou l'amélioration des molécules déjà présentes sur le marché constitue actuellement une urgence sanitaire. Des molécules pouvant cibler tous les stades de répllication du parasite seraient idéales. Ces molécules pourraient ainsi servir au traitement symptomatique de la maladie, à la prévention des cas de rechute mais aussi au blocage de la transmission de la maladie. Malheureusement aucune molécule n'existe actuellement avec cette caractéristique.

Cependant, certaines molécules sont particulièrement intéressantes en raison de leur capacité à cibler à la fois le stade sanguin (symptomatique) et le stade transmissible du parasite. Une molécule connue de très longue date a cette propriété, le bleu de méthylène. Cette molécule a été sur le marché mais maintenant retirée à cause de ses effets secondaires (coloration bleue de la peau). Une nouvelle molécule en développement, la plasmodione, étudiée dans cette thèse, partage certaines caractéristiques avec le bleu de méthylène, sans présenter cet effet secondaire. La plasmodione agit aussi aux stades sanguin et transmissible du parasite, et comme le bleu de

méthylène, agirait par stress oxydant *via* un cycle d'oxydo-réductions. Ce mode d'action semble particulièrement intéressant dans la conception de molécules antipaludiques. Il faut, pour que la molécule ait une action spécifique sur le parasite sans toxicité pour le patient, que ce mécanisme d'action par cycle d'oxydo-réductions fasse intervenir des acteurs cellulaires spécifiques au parasite ou à la cellule parasitée. C'est le cas par exemple, d'un promédicament qui requière une bio-activation par des composants du parasite. La plasmodione a ce profile.

Même si la plasmodione est potentiellement un bon antipaludique, il pourra être utile de la combiner avec une autre molécule lors de son développement comme médicament, en particulier une molécule qui agit en synergie avec la plasmodione. Cela permet de diminuer les doses à utiliser lors du traitement et le risque d'apparition de résistance. Les partenaires déterminés chez la levure, dans ce travail, peuvent être d'intéressants candidats en particulier l'artésunate. Beaucoup de médicaments antipaludiques sur le marché actuellement se trouvent sous forme combinée avec les artémisinines.

Dans le développement de médicament antipaludique, le coût financier est également un paramètre à considérer. Ces médicaments étant majoritairement destinés aux pays africains dont les capacités économiques sont relativement modestes, il est important que le coût du médicament soit proportionné. L'exemple typique est celui du Malarone[®]. Constitué d'atovaquone et de proguanil, cet antipaludique est très cher pour les pays en voie de développement. Son coût élevé est principalement dû à celui de l'atovaquone. Il faudrait pouvoir trouver un autre partenaire moins couteux au proguanil ou améliorer l'efficacité de la combinaison atovaquone-proguanil pour pouvoir diminuer les doses.

Le proguanil est métabolisé en cycloguanil, inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR) essentielle au parasite. Mais le proguanil lui-même est un excellent partenaire synergique de l'atovaquone, contrairement à son métabolite. En bloquant la cyclisation du proguanil, la synergie atovaquone-proguanil est favorisée, ce qui pourrait peut-être permettre de réduire les doses et donc le cout.

Une autre stratégie serait peut-être l'utilisation d'une molécule qui possède le même mode d'action que le proguanil mais encore plus efficace en combinaison avec l'atovaquone. Il faudra bien sûr garder la spécificité, c'est-à-dire des molécules toxiques pour le parasite mais sans ou avec peu d'effet sur les cellules humaines. Dans le cas de l'atovaquone, la spécificité vient surtout de différences structurales dans sa cible, le site Q_o du complexe *bc*₁ entre l'enzyme humaine et l'enzyme du parasite. Quant au proguanil, il ne semble pas pouvoir entrer dans la

mitochondrie des cellules mammifères. Sa spécificité viendrait de différences entre les transporteurs mitochondriaux. Par contre, une autre molécule de la même famille, la metformine, est utilisée très largement pour traiter le diabète.

Pour pouvoir développer ou améliorer cette combinaison proguanil-atovaquone, la compréhension du mode d'action du proguanil est essentiel.

Les résultats apportés dans cette étude ont permis d'avancer dans l'étude du mode d'action de la plasmodione. Ces données devront être validées chez le parasite. La comparaison des résultats obtenus chez les deux organismes montrera sans doute l'intérêt de l'utilisation du modèle levure mais aussi ses limites. Quant au mécanisme d'action du proguanil, bien des questions restent ouvertes.

Bibliographie

Références bibliographiques

- Auerbach, Daniel, Anthony Arnoldo, Boris Bogdan, Michael Fetchko, and Igor Stagljar. 2005. “Drug Discovery Using Yeast as a Model System: A Functional Genomic and Proteomic View.” *Current Proteomics* 2 (1): 1–13. doi:10.2174/1570164053507790.
- Awad, Agape M., Michelle C. Bradley, Lucía Fernández-del-Río, Anish Nag, Hui S. Tsui, and Catherine F. Clarke. 2018. “Coenzyme Q₁₀ Deficiencies: Pathways in Yeast and Humans.” *Essays in Biochemistry* 62 (3): 361–76. doi:10.1042/EBC20170106.
- Bender, Andreas, Giel G. Van Dooren, Stuart A. Ralph, Geoffrey I. McFadden, and Gisbert Schneider. 2003. “Properties and Prediction of Mitochondrial Transit Peptides from *Plasmodium falciparum*.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 132 (2): 59–66. doi:10.1016/j.molbiopara.2003.07.001.
- Bielitza, Max, Didier Belorgey, Katharina Ehrhardt, Laure Johann, Don Antoine Lanfranchi, Valentina Gallo, Evelin Schwarzer, et al. 2015. “Antimalarial NADPH-consuming redox-cyclers as superior Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency” *Antioxidants & Redox Signaling* 22 (15): 1337–51. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6047>.
- Birth, Dominic, Wei-Chun Kao, and Carola Hunte. 2014. “Structural Analysis of Atovaquone-Inhibited Cytochrome *bc*₁ Complex Reveals the Molecular Basis of Antimalarial Drug Action.” *Nature Communications* 5 (May): 1–11. doi:10.1038/ncomms5029.
- Bornhövd, Carsten, Frank Vogel, Walter Neupert, and Andreas S. Reichert. 2006. “Mitochondrial Membrane Potential Is Dependent on the Oligomeric State of F₁F₀-ATP Synthase Supracomplexes.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (20): 13990–98. doi:10.1074/jbc.M512334200.
- Boyer, Paul D. 1997. “The Atp Synthase—a Splendid Molecular Machine.” *Annual Review of Biochemistry* 66 (1): 717–49. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.717.
- Bridges, Hannah R., Andrew J. Y. Jones, Michael N. Pollak, and Judy Hirst. 2014. “Effects of Metformin and Other Biguanides on Oxidative Phosphorylation in Mitochondria.” *Biochemical Journal* 462 (3): 475–87. doi:10.1042/bj20140620.

- Bushell, Ellen, Ana Rita Gomes, Theo Sanderson, Burcu Anar, Gareth Girling, Colin Herd, Tom Metcalf, *et al.* 2017. “Functional Profiling of a *Plasmodium* Genome Reveals an Abundance of Essential Genes.” *Cell* 170 (2): 260-272.e8.
doi:10.1016/j.cell.2017.06.030.
- Cardol, Pierre. 2011. “Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) in Eukaryotes: A Highly Conserved Subunit Composition Highlighted by Mining of Protein Databases.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1807 (11): 1390–97.
doi:10.1016/j.bbabi.2011.06.015.
- Cecchini, Gary. 2003. “Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain.” *Annual Review of Biochemistry* 72 (1): 77–109.
doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700.
- Couturier, Jérémy, Brigitte Touraine, Jean-François Briat, Frédéric Gaymard, and Nicolas Rouhier. 2013. “The Iron-Sulfur Cluster Assembly Machineries in Plants: Current Knowledge and Open Questions.” *Frontiers in Plant Science* 4 (July): 1–22.
doi:10.3389/fpls.2013.00259.
- D’Alessandro, Manuela, and B. Andrea Melandri. 2010. “ATP Hydrolysis in ATP Synthases Can Be Differently Coupled to Proton Transport and Modulated by ADP and Phosphate: A Structure Based Model of the Mechanism.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1797 (6–7): 755–62. doi:10.1016/j.bbabi.2010.03.007.
- Dellibovi-Ragheb, Teegan A., Jolyn E. Gisselberg, and Sean T. Prigge. 2013. “Parasites FeS Up: Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Eukaryotic Pathogens.” *PLoS Pathogens* 9 (4): e1003227. doi:10.1371/journal.ppat.1003227.
- Devenish, Rodney J., Mark Prescott, Xavier Roucou, and Phillip Nagley. 2000. “Insights into ATP Synthase Assembly and Function through the Molecular Genetic Manipulation of Subunits of the Yeast Mitochondrial Enzyme Complex.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1458 (2–3): 428–42. doi:10.1016/S0005-2728(00)00092-X.
- Dooren, Giel G Van, Luciana M Stimmler, and Geoffrey I Mcfadden. 2006. “Metabolic Maps and Functions of the *Plasmodium* Mitochondrion.” *Federation of European Microbiological Societies* 30: 596–630. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00027.x.
- Ehrhardt, Katharina, Elisabeth Davioud-Charvet, Hangjun Ke, Akhil B. Vaidya, Michael Lanzer, and Marcel Deponte. 2013. “The Antimalarial Activities of Methylene Blue and

- the 1,4-Naphthoquinone 3-[4-(Trifluoromethyl)Benzyl]-Menadione Are Not Due to Inhibition of the Mitochondrial Electron Transport Chain.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (5): 2114–20. doi:10.1128/AAC.02248-12.
- Ehrhardt, Katharina, Christiane Deregnacourt, Alice Anne Goetz, Tzvetomira Tzanova, Valentina Gallo, Paolo Arese, Bruno Pradines, *et al.* 2016. “The Redox Cyclor Plasmodione Is a Fast-Acting Antimalarial Lead Compound with Pronounced Activity against Sexual and Early Asexual Blood-Stage Parasites.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (9): 5146–58. doi:10.1128/AAC.02975-15.
- Elena Maklashina and Gary Cecchini. 2010. “The Quinone-Binding and Catalytic Site of Complex II.” *Biochim Biophys Acta*. 1797 (12): 1877–1882. doi:10.1016/j.bbabi.2010.02.015.
- Eyasu, Mebrahtu. 2015. “Antimalarial Drug Resistance: In the Past, Current Status and Future Perspectives.” *British Journal of Pharmacology and Toxicology* 6 (1): 1–15. doi:10.19026/bjpt.6.5186.
- Feng, Liwen, Don Antoine Lanfranchi, Leandro Cotos, Elena Cesar-Rodo, Katharina Ehrhardt, Alice Anne Goetz, Herbert Zimmermann, François Fenaille, Stephanie A. Blandin, and Elisabeth Davioud-Charvet. 2018. “Synthesis of Plasmodione Metabolites And ¹³C-Enriched Plasmodione as Chemical Tools for Drug Metabolism Investigation.” *Organic and Biomolecular Chemistry* 16 (15): 2647–65. doi:10.1039/c8ob00227d.
- Fivelman, Quinton L., Geoffrey A. Butcher, Ipemida S. Adagu, David C. Warhurst, and Geoffrey Pasvol. 2002. “Malarone Treatment Failure and *in Vitro* Confirmation of Resistance of *Plasmodium falciparum* Isolate from Lagos, Nigeria.” *Malaria Journal* 1: 1–4. doi:10.1186/1475-2875-1-1.
- Franken, Angelique C.W., B. Christien Lokman, Arthur F.J. Ram, Peter J. Punt, Cees A.M.J.J. Van Den Hondel, and Sandra De Weert. 2011. “Heme Biosynthesis and Its Regulation: Towards Understanding and Improvement of Heme Biosynthesis in Filamentous Fungi.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (3): 447–60. doi:10.1007/s00253-011-3391-3.
- Friedman, Jonathan R., and Jodi Nunnari. 2014. “Mitochondrial Form and Function.” *Nature* 505 (7483): 335–43. doi:10.1038/nature12985.

- Froschauer, Elisabeth M., Rudolf J. Schweyen, and Gerlinde Wiesenberger. 2009. "The Yeast Mitochondrial Carrier Proteins Mrs3p/Mrs4p Mediate Iron Transport across the Inner Mitochondrial Membrane." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788 (5): 1044–50. doi:10.1016/j.bbamem.2009.03.004.
- Gbelská, Yveta, Július Šubík, Augustin Svoboda, André Goffeau, and Ladislav Kováč. 1983. "Intramitochondrial ATP and Cell Functions: Yeast Cells Depleted of Intramitochondrial ATP Lose the Ability to Grow and Multiply." *European Journal of Biochemistry* 130 (2): 281–86. doi:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07148.x.
- Gerber, Jana, Ulrich Mühlenhoff, and Roland Lill. 2003. "An Interaction between Frataxin and Isu1/Nfs1 That Is Crucial for Fe/S Cluster Synthesis on Isu1." *EMBO Reports* 4 (9): 906–11. doi:10.1038/sj.embor.embor918.
- Gray, Michael W, Michael W Gray, Gertraud Burger, and B Franz Lang. 2008. "Mitochondrial Evolution." *Science* 1476 (March): 1–16. doi:10.1126/science.283.5407.1476.
- Guggisberg, Ann M., Rachel E. Amthor, and Audrey R. Odom. 2014. "Isoprenoid Biosynthesis in *Plasmodium falciparum*." *Eukaryotic Cell* 13 (11): 1348–59. doi:10.1128/ec.00160-14.
- Han, George M. Carman and Gil-Soo. 2013. "Regulation of Phospholipid Synthesis in the Yeast," 859–83. doi:10.1194/jlr.R800043-JLR200.
- Henriquez, Fiona L., Thomas A. Richards, Fiona Roberts, Rima McLeod, and Craig W. Roberts. 2005. "The Unusual Mitochondrial Compartment of *Cryptosporidium parvum*." *Trends in Parasitology* 21 (2): 68–74. doi:10.1016/j.pt.2004.11.010.
- Herrmann, Walter Neupert and Johannes M. 2007. "Translocation of Proteins into Mitochondria." *Annu Rev Biochem* 76: 723–49. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409.
- Hino, Akina, Makoto Hirai, Takeshi Q Tanaka, Yoh-ichi Watanabe, Hiroyuki Matsuoka, and Kiyoshi Kita. 2012. "Critical Roles of the Mitochondrial Complex II in Oocyst Formation of Rodent Malaria Parasite *Plasmodium berghei*." *Journal of Biochemistry* 152 (3): 259–68. doi:10.1093/jb/mvs058.
- Hoffman, Marta, Monika Góra, and Joanna Rytka. 2003. "Identification of Rate-Limiting

- Steps in Yeast Heme Biosynthesis.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310 (4): 1247–53. doi:10.1016/j.bbrc.2003.09.151.
- Hyung J. Kim, Oleh Khalimonchuk, Pamela M. Smith, and Dennis R. Winge. 2012. “Structure, Function, and Assembly of Heme Centers in Mitochondrial Respiratory Complexes.” *Biochim Biophys Acta*. 1823 (9): 1604–1616. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.04.008.
- Imlay, James A. 2006. “Iron-Sulphur Clusters and the Problem with Oxygen.” *Molecular Microbiology* 59 (4): 1073–82. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05028.x.
- Jones, K, and S A Ward. 2002. “Biguanide-Atovaquone Synergy against *Plasmodium falciparum* in Vitro.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (8): 2700–2703. doi:10.1128/AAC.46.8.2700-2703.2002.
- Ke, Hangjun, Suresh M. Ganesan, Swati Dass, Joanne M. Morrissey, Sovitj Pou, Aaron Nilsen, Michael K. Riscoe, Michael W. Mather, and Akhil B. Vaidya. 2019. “Mitochondrial Type II NADH Dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* (PfNDH2) Is Dispensable in the Asexual Blood Stages.” *PLoS ONE* 14 (4): 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0214023.
- Ke, Hangjun, Ian A. Lewis, Joanne M. Morrissey, Kyle J. McLean, Suresh M. Ganesan, Heather J. Painter, Michael W. Mather, Marcelo Jacobs-Lorena, Manuel Llin?s, and Akhil B. Vaidya. 2015. “Genetic Investigation of Tricarboxylic Acid Metabolism during the *Plasmodium falciparum* Life Cycle.” *Cell Reports* 11 (1): 164–74. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.011.
- Ke, Hangjun, Paul A Sigala, Kazutoyo Miura, Joanne M Morrissey, Michael W Mather, Jan R Crowley, Jeffrey P Henderson, Daniel E Goldberg, Carole A Long, and Akhil B Vaidya. 2014. “The Heme Biosynthesis Pathway Is Essential for *Plasmodium falciparum* Development in Mosquito Stage but Not in Blood Stages.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34827–37. doi:10.1074/jbc.M114.615831.
- Kunji, Edmund R.S., Antoniya Aleksandrova, Martin S. King, Homa Majd, Valerie L. Ashton, Elizabeth Cerson, Roger Springett, *et al.* 2016. “The Transport Mechanism of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1863 (10): 2379–93. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.03.015.
- Lange, Heike, Gyula Kispal, and Roland Lill. 1999. “MEMBRANES AND BIOENERGETICS : Mechanism of Iron Transport to the Site of Heme Synthesis inside

- Yeast Mitochondria Mechanism of Iron Transport to the Site of Heme Synthesis inside Yeast Mitochondria *.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (27): 18989–96. doi:10.1074/jbc.274.27.18989.
- Larosa, Véronique, and Claire Remacle. 2018. “Insights into the Respiratory Chain and Oxidative Stress.” *Bioscience Reports* 38 (5): 1–14. doi:10.1042/BSR20171492.
- Lefebvre-Legendre, Linnka, Axelle Balguerie, Stéphane Duvezin-Caubet, Marie France Giraud, Piotr P. Slonimski, and Jean Paul Di Rago. 2003. “F₁-Catalysed ATP Hydrolysis Is Required for Mitochondrial Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* Growing under Conditions Where It Cannot Breathe.” *Molecular Microbiology* 47 (5): 1329–39. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03371.x.
- Lill, Roland, Bastian Hoffmann, Sabine Molik, Antonio J Pierik, Nicole Rietzschel, Oliver Stehling, Marta A Uzarska, Holger Weibert, Claudia Wilbrecht, and Ulrich Mühlenhoff. 2012. “The Role of Mitochondria in Cellular Iron–Sulfur Protein Biogenesis and Iron Metabolism.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823 (9): 1491–1508. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.009.
- Lill, Roland, and Ulrich Mühlenhoff. 2005. “Iron-Sulfur-Protein Biogenesis in Eukaryotes.” *Trends in Biochemical Sciences* 30 (3): 133–41. doi:10.1016/j.tibs.2005.01.006.
- Luttik, Marijke A H, Karin M Overkamp, Peter Kötter, Simon De Vries, Johannes P Van Dijken, and Jack T Pronk. 1998. “The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 Genes Encode Separate Mitochondrial NADH Dehydrogenases Catalyzing the Oxidation of Cytosolic NADH.” *Journal of Biological Chemistry* 273 (38): 24529–34. doi:10.1074/jbc.273.38.24529.
- Lv, Xiaomei, Fan Wang, Pingping Zhou, Lidan Ye, Wenping Xie, Haoming Xu, and Hongwei Yu. 2016. “Dual Regulation of Cytoplasmic and Mitochondrial Acetyl-CoA Utilization for Improved Isoprene Production in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Nature Communications* 7: 1–12. doi:10.1038/ncomms12851.
- Macedo, Cristiana Santos De, Maria Laura Uhrig, Emilia A. Kimura, and Alejandro Miguel Katzin. 2002. “Characterization of the Isoprenoid Chain of Coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*.” *FEMS Microbiology Letters* 207 (1): 13–20. doi:10.1016/S0378-1097(01)00547-X.
- MacRae, James I, Matthew W A Dixon, Megan K Dearnley, Hwa H Chua, Jennifer M

- Chambers, Shannon Kenny, Iveta Bottova, Leann Tilley, and Malcolm J McConville. 2013. “Mitochondrial Metabolism of Sexual and Asexual Blood Stages of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*.” *BMC Biology* 11 (1): 67. doi:10.1186/1741-7007-11-67.
- Malina, Carl, Christer Larsson, and Jens Nielsen. 2018. “Yeast Mitochondria: An Overview of Mitochondrial Biology and the Potential of Mitochondrial Systems Biology.” *FEMS Yeast Research* 18 (5): 1–17. doi:10.1093/femsyr/foy040.
- McConnell, Erin V., Igor Bruzual, Sovitj Pou, Rolf Winter, Rozalia A. Dodean, Martin J. Smilkstein, Alina Krollenbrock, *et al.* 2018. “Targeted Structure-Activity Analysis of Endochin-like Quinolones Reveals Potent Q_i and Q_o Site Inhibitors of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* Cytochrome bc₁ and Identifies ELQ-400 as a Remarkably Effective Compound against Acute Experimental Tox.” *ACS Infectious Diseases*. doi:10.1021/acsinfecdis.8b00133.
- Melber, Andrew, Un Na, Ajay Vashisht, Benjamin D Weiler, Roland Lill, James A Wohlschlegel, and Dennis R Winge. 2016. “Role of Nfu1 and Bol3 in Iron-Sulfur Cluster Transfer to Mitochondrial Clients.” *ELife* 5: 1–24. doi:10.7554/elife.15991.
- Meunier, B., N. Fisher, S. Ransac, J. P. Mazat, and G. Brasseur. 2013. “Respiratory Complex III Dysfunction in Humans and the Use of Yeast as a Model Organism to Study Mitochondrial Myopathy and Associated Diseases.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1827 (11–12): 1346–61. doi:10.1016/j.bbabi.2012.11.015.
- Moukoro, Pierre, Thomas Michel, Rafik Benhachemi, Georgiana Surpateanu, Bogdan I Iorga, Nicholas Fisher, and Brigitte Meunier. 2018. “Mitochondrial Complex III Q_i-Site Inhibitor Resistance Mutations Found in Laboratory Selected Mutants and Field Isolates.” *Pest Management Science*. doi:10.1002/ps.5264.
- Muhlenhoff, U. 2002. “The Yeast Frataxin Homolog Yfh1p Plays a Specific Role in the Maturation of Cellular Fe/S Proteins.” *Human Molecular Genetics* 11 (17): 2025–36. doi:10.1093/hmg/11.17.2025.
- Mühlenhoff, Ulrich, Nadine Richhardt, Jana Gerber, and Roland Lill. 2002. “Characterization of Iron-Sulfur Protein Assembly in Isolated Mitochondria. A Requirement for ATP, NADH, and Reduced Iron.” *The Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 29810–16. doi:10.1074/jbc.M204675200.

- Nakamoto, Robert K., Christian J. Ketchum, and Marwan K. Al-Shawi. 1999. "Rotational Coupling in the F₀ F₁ ATP Synthase." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 28 (1): 205–34. doi:10.1146/annurev.biophys.28.1.205.
- Nina, Praveen Balabaskaran, Natalya V. Dudkina, Lesley A. Kane, Jennifer E. van Eyk, Egbert J. Boekema, Michael W. Mather, and Akhil B. Vaidya. 2010. "Highly Divergent Mitochondrial ATP Synthase Complexes in *Tetrahymena thermophila*." *PLoS Biology* 8 (7): 3–6. doi:10.1371/journal.pbio.1000418.g005.
- Nina, Praveen Balabaskaran, Joanne M. Morrissey, Suresh M. Ganesan, Hangjun Ke, April M. Pershing, Michael W. Mather, and Akhil B. Vaidya. 2011. "ATP Synthase Complex of *Plasmodium falciparum*: Dimeric Assembly in Mitochondrial Membranes and Resistance to Genetic Disruption." *Journal of Biological Chemistry* 286 (48): 41312–22. doi:10.1074/jbc.M111.290973.
- Nishi, A., and O. H. Scherbaum. 1962. "Oxidative Phosphorylation in Synchronized Cultures of *Tetrahymena pyriformis*." *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 65 (3): 419–24. doi:10.1016/0006-3002(62)90443-2.
- Overkamp, Karin M., Barbara M. Bakker, Peter Kötter, Arjen Van Tuijl, Simon De Vries, Johannes P. Van Dijken, and Jack T. Pronk. 2000. "In Vivo Analysis of the Mechanisms for Oxidation of Cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria." *Journal of Bacteriology* 182 (10): 2823–30. doi:10.1128/JB.182.10.2823-2830.2000.
- Oyedotun, Kayode S., Clarissa S. Sit, and Bernard D. Lemire. 2007. "The *Saccharomyces cerevisiae* Succinate Dehydrogenase Does Not Require Heme for Ubiquinone Reduction." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1767 (12): 1436–45. doi:10.1016/j.bbabi.2007.09.008.
- Painter, Heather J., Joanne M. Morrissey, Michael W. Mather, and Akhil B. Vaidya. 2007. "Specific Role of Mitochondrial Electron Transport in Blood-Stage *Plasmodium falciparum*." *Nature* 446 (7131): 88–91. doi:10.1038/nature05572.
- Pala, Zarna Rajeshkumar, Vishal Saxena, Gagandeep Singh Saggu, and Shilpi Garg. 2018. "Recent Advances in the [Fe–S] Cluster Biogenesis (SUF) Pathway Functional in the Apicoplast of *Plasmodium*." *Trends in Parasitology* 34 (9): 800–809. doi:10.1016/j.pt.2018.05.010.
- Patzewitz, Eva Maria, Eleanor H. Wong, and Sylke Müller. 2012. "Dissecting the Role of

- Glutathione Biosynthesis in *Plasmodium falciparum*.” *Molecular Microbiology* 83 (2): 304–18. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07933.x.
- Recht, Judith, Elizabeth A. Ashley, and Nicholas J. White. 2018. “Use of Primaquine and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Testing: Divergent Policies and Practices in Malaria Endemic Countries.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (4): 1–27. doi:10.1371/journal.pntd.0006230.
- Rich, Peter R., and Amandine Maréchal. 2010. “The Mitochondrial Respiratory Chain.” *Essays In Biochemistry* 47: 1–23. doi:10.1042/bse0470001.
- Richardson, Des R, Darius J R Lane, Erika M Becker, H Huang, Megan Whitnall, Yohan Suryo Rahmanto, Alex D Sheftel, and Prem Ponka. 2010. “Mitochondrial Iron Trafficking and the Integration of Iron Metabolism between the Mitochondrion and Cytosol” 107 (24). doi:10.1073/pnas.0912925107.
- Rudolf, Jana, Vasso Makrantonis, W. John Ingledew, Michael J R Stark, and Malcolm F. White. 2006. “The DNA Repair Helicases XPD and FancJ Have Essential Iron-Sulfur Domains.” *Molecular Cell* 23 (6): 801–8. doi:10.1016/j.molcel.2006.07.019.
- Sartori, Geppo, Laura Aldegheri, Gabriella Mazzotta, Gerolamo Lanfranchi, Helene Tournu, Alistair J.P. Brown, and Giovanna Carignani. 1999. “Characterization of a New Hemoprotein in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (8): 5032–37. doi:10.1074/jbc.274.8.5032.
- Sharma, Chiranjeev, and Satish Kumar Awasthi. 2015. “Recent Advances in Antimalarial Drug Discovery — Challenges and Opportunities.” *An Overview of Tropical Diseases*, no. December. doi : 10.5772/61191.
- Sloan, Daniel B., Andrew J. Alverson, John P. Chuckalovcak, Martin Wu, David E. McCauley, Jeffrey D. Palmer, and Douglas R. Taylor. 2012. “Rapid Evolution of Enormous, Multichromosomal Genomes in Flowering Plant Mitochondria with Exceptionally High Mutation Rates.” *PLoS Biology* 10 (1). doi:10.1371/journal.pbio.1001241.
- Song, Zehua, Jérôme Clain, Bogdan I Iorga, Zhou Yi, Nicholas Fisher, and Brigitte Meunier. 2015. “*Saccharomyces cerevisiae*-Based Mutational Analysis of the bc1 Complex Qo Site Residue 279 To Study the Trade-Off between Atovaquone Resistance and function.”

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (7): 4053–58. doi:10.1128/AAC.00710-15.
- Srivastava, Indresh K., Joanne M. Morrley, Elisabeth Darrouzet, Fevzi Daldal, and Akhil B. Vaidya. 1999. “Resistance Mutations Reveal the Atovaquone-Binding Domain of Cytochrome *b* in Malaria Parasites.” *Molecular Microbiology* 33 (4): 704–11. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01515.x.
- Theos, Alexander C, A Martina, Ilse Hurbain, Andrew A Peden, Elena V Sviderskaya, Abigail Stewart, Margaret S Robinson, *et al.* 2005. “Yeast AMID Homologue Ndi1p Displays Respiration- Restricted Apoptotic Activity and Is Involved in Chronological Aging.” *Molecular Biology of the Cell* 16 (November): 5356–72. doi:10.1091/mbc.E05.
- Tobias, M, Laure Johann, Beate Jannack, Margit Br, Don Antoine Lanfranchi, Holger Bauer, Cecilia Sanchez, *et al.* 2011. “Glutathione Reductase-Catalyzed Cascade of Redox Reactions To Bioactivate Potent Antimalarial 1, 4-Naphthoquinones À A New Strategy to Combat Malarial Parasites,” 11557–71. doi:10.1021/ja201729z.
- Tonhosolo, Renata, Fabio L. D’Alexandri, Fernando A. Genta, Gerhard Wunderlich, Fabio C. Gozzo, Marcos N. Eberlin, Valnice J. Peres, Emilia A. Kimura, and Alejandro M. Katzin. 2005. “Identification, Molecular Cloning and Functional Characterization of an Octaprenyl Pyrophosphate Synthase in Intra-Erythrocytic Stages of *Plasmodium falciparum*.” *Biochemical Journal* 392 (1): 117–26. doi:10.1042/BJ20050441.
- Tran, Uyen Phuong C., and Catherine F. Clarke. 2007. “Endogenous Synthesis of Coenzyme Q in Eukaryotes.” *Mitochondrion* 7 (SUPPL.): 1–17. doi:10.1016/j.mito.2007.03.007.
- Truscott, Kaye N., Katrin Brandner, and Nikolaus Pfanner. 2003. “Mechanisms of Protein Import into Mitochondria.” *Current Biology* 13 (8): 326–37. doi:10.1016/S0960-9822(03)00239-2.
- Vaidya, Akhil B, and Michael W Mather. 2009. “Mitochondrial Evolution and Functions in Malaria Parasites.” *Annual Review of Microbiology* 63 (1): 249–67. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073424.
- Valenciano, Ana Lisa, Maria L. Fernández-Murga, Emilio F. Merino, Nicole R. Holderman, Grant J. Butschek, Karl J. Shaffer, Peter C. Tyler, and Maria Belen Cassera. 2019. “Metabolic Dependency of Chorismate in *Plasmodium Falciparum* Suggests an Alternative Source for the Ubiquinone Biosynthesis Precursor.” *Scientific Reports* 9 (1): 1–13. doi:10.1038/s41598-019-50319-5.

- Vallières, Cindy, Nicholas Fisher, and Brigitte Meunier. 2013. “Reconstructing the Q_o Site of *Plasmodium falciparum* bc₁ Complex in the Yeast Enzyme.” *PLoS ONE* 8 (8). doi:10.1371/journal.pone.0071726.
- Vries, Simon De, and Carla A M Marres. 1988. “The Mitochondrial Respiratory Chain of Yeast. Structure and Biosynthesis and the Role in Cellular Metabolism” 895 (1987): 205–39.
- Yankovskaya, Victoria, Rob Horsefield, Susanna Törnroth, César Luna-Chavez, Hideto Miyoshi, Christophe Léger, Bernadette Byrne, Gary Cecchini, and So Iwata. 2003. “Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation.” *Science* 299 (5607): 700–704. doi:10.1126/science.1079605.
- Yeh, Ellen, and Joseph L. DeRisi. 2011. “Chemical Rescue of Malaria Parasites Lacking an Apicoplast Defines Organelle Function in Blood-Stage *Plasmodium falciparum*.” *PLoS Biology* 9 (8). doi:10.1371/journal.pbio.1001138.
- Zehua Song¹, Bogdan I. Iorga, Pierre Mounkoro, Nicholas Fisher and Brigitte Meunier. 2018. “The Antimalarial Compound ELQ-400 Is an Unusual Inhibitor of the bc₁ Complex, Targeting Both Q_o and Q_i Sites.” *FEBS LETTERS*. doi:10.1016/j.febslet.2018.08.035.
- Zhang, Min, Chengqi Wang, Thomas D. Otto, Jenna Oberstaller, Xiangyun Liao, Swamy R. Adapa, Kenneth Udenze, *et al.* 2018. “Uncovering the Essential Genes of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* by Saturation Mutagenesis.” *Science* 360 (6388). doi:10.1126/science.aap7847.
- Zimorski, Verena, Chuan Ku, William F. Martin, and Sven B. Gould. 2014. “Endosymbiotic Theory for Organelle Origins.” *Current Opinion in Microbiology* 22: 38–48. doi:10.1016/j.mib.2014.09.008.

Titre : *Etude du mode d'action de composés antipaludiques qui ciblent la fonction mitochondriale, en utilisant la levure comme modèle*

Mots clés : Modèle levure, Fonction mitochondriale, Molécules antipaludiques, Flavoenzymes, Cycle d'oxydo-réduction, Stress oxydant

Résumé : Causé par un parasite du genre *Plasmodium* transmis par les moustiques, le paludisme est encore aujourd'hui un fléau causant des centaines de milliers de morts tous les ans. Le développement de nouvelles molécules antipaludiques et/ou l'amélioration des molécules déjà présentes sur le marché est une urgence sanitaire. Des molécules pouvant cibler tous les stades du cycle de vie du parasite seraient idéales. Ces molécules permettraient le traitement symptomatique et la prévention des rechutes mais aussi empêcheraient la transmission de la maladie.

Dans ce travail, j'ai étudié le mécanisme d'action de deux molécules à activité antipaludique : la plasmodione et le proguanil. La plasmodione est en cours de développement et cible le parasite à la fois au stade sanguin et sous sa forme gamétoocyte responsable de la transmission de l'homme au moustique. Le proguanil est une molécule déjà sur le marché depuis longtemps mais dont le mode d'action n'est pas encore compris bien qu'il soit un excellent partenaire synergique de l'antipaludique atovaquone, un inhibiteur du complexe bc1 de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Pour cette étude, à l'aide du modèle levure, j'ai utilisé une approche génétique (construction, sélection et analyse de mutants) et biochimique (test d'activité enzymatique) afin de décrypter le mode d'action de ces molécules.

Les résultats obtenus indiquent que la plasmodione est une 'pro-drogue' qui est transformée en métabolites actifs qui entrent ensuite dans un cycle de réactions d'oxydo-réduction (redox) produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le stress oxydant qui en résulte provoque l'arrêt de croissance. Ces résultats sont en accord avec les données venant des études avec le parasite. J'ai montré que des flavoprotéines mitochondriales, principalement de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs, jouent un rôle clé dans l'activité de la plasmodione. Ainsi les NADH déshydrogénases catalysent les réactions redox en utilisant les métabolites actifs de la plasmodione comme substrats aboutissant à une production de ROS. La succinate-déshydrogénase pourrait être impliquée dans la transformation de la plasmodione en métabolites actifs. Le fonctionnement de ces enzymes mitochondriales est donc requis pour que l'activité inhibitrice de la plasmodione soit observée.

La mitochondrie est aussi un élément clé dans le mode d'action du proguanil. Dans une étude publiée précédemment, les auteurs avaient émis l'hypothèse que le proguanil ciblerait un système enzymatique mitochondrial participant au maintien du potentiel membranaire. Mais les résultats que j'ai obtenus ici ne semblent pas valider ce modèle. Ils conduisent plutôt à l'hypothèse que le proguanil s'accumulerait dans la mitochondrie, peut-être à de fortes concentrations. Cette accumulation affecterait des fonctions mitochondriales essentielles, résultant dans la mort de la cellule. De nombreuses questions restent ouvertes et plus de travail sera requis pour décrypter le mode d'action du proguanil.

Title: *Mode of action of antimalarial compounds targeting the mitochondrial function using yeast as a model*

Keywords : Yeast model, Mitochondrial function, Antimalarial drugs, Flavoenzymes, Redox cycling, Oxidative stress

Abstract : Malaria is caused by the *Plasmodium* parasite transmitted by mosquitoes. The disease remains today a major health issue with hundreds of thousands deaths every year. The development of new antimalarial compounds and/or the improvement of already available drugs is urgently needed. Compounds that could target all the stages of the life cycle of the parasite would be the best. Such drugs could be used in symptomatic treatment, for relapse prevention but also to block the transmission of the disease.

In this work, I studied the mode of action of two antimalarial compounds, namely plasmodione and proguanil. Plasmodione is a new lead compound that targets the parasite both at the blood stage and at the gametocyte stage responsible for the transmission from human to mosquito. Proguanil has been in use for many years. Yet its mode of action is not understood although it is known to be an efficient synergistic partner of the antimalarial atovaquone that targets the mitochondrial respiratory chain bc1 complex.

I used yeast as a model organism and an approach of genetics (construction, selection and analysis of mutants) and biochemistry (enzymatic activity tests) in order to decipher the mode of action of these compounds.

The results indicate that plasmodione is a pro-drug transformed into active metabolites that then enter in a cycle of oxido-reductions (redox) producing reactive oxygen species (ROS). The resulting oxidative stress causes growth arrest. These data are in agreement with results obtained with the parasite. I showed that mitochondrial flavoproteins, mainly of the respiratory chain and Krebs cycle, play a key role in plasmodione activity. The NADH-dehydrogenases catalyse the redox reactions using the active plasmodione metabolites as substrates, leading to ROS production. The succinate-dehydrogenase is likely to be involved in the transformation of plasmodione in its active metabolites. Thus the functioning of the mitochondrial enzymes are required for the activity of plasmodione.

The mitochondria is also a key element in the mode of action of proguanil. In a previously published report, the authors had hypothesized that proguanil would target a mitochondrial enzymatic system involved in the generation of the membrane potential. However the data I obtained do not seem to validate that hypothesis. They lead rather to the following hypothesis: proguanil would accumulate in the mitochondria, probably to high concentrations, which would affect essential mitochondrial functions leading to cell death. A number of questions remain open and more work are needed to uncover proguanil mode of action.