



**HAL**  
open science

# Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la protéine AAA-ATPase PbRpt3 de Plasmodium berghei : étude de sa fonction régulatrice de PP1c et analyse de son réseau d'interactions chez le parasite

Claudianne Lainé

## ► To cite this version:

Claudianne Lainé. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la protéine AAA-ATPase PbRpt3 de Plasmodium berghei : étude de sa fonction régulatrice de PP1c et analyse de son réseau d'interactions chez le parasite. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS043 . tel-04390242

**HAL Id: tel-04390242**

**<https://theses.hal.science/tel-04390242v1>**

Submitted on 12 Jan 2024

**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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

**Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire**

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Présentée par

Mme Claudianne Lainé

**Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille**

**Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la protéine AAA-ATPase PbRpt3 de  
*Plasmodium berghei* : étude de sa fonction régulatrice de PP1c et analyse de son réseau  
d'interactions chez le parasite.**

Molecular and functional characterisation of the AAA-ATPase protein PbRpt3 from *Plasmodium berghei* : study of its PP1c regulatory function and analysis of its interaction network in the parasite.

Soutenue publiquement le 13 novembre 2023

Devant le Jury composé de :

Pr. Jean François Bodart	Président du Jury
Pr. Rachel Cerdan	Rapporteur
Dr. Aude Dupré	Rapporteur
Dr. Olivier Silvie	Examineur
Dr. Christine Pierrot	Directrice de thèse



## RESUME

Le paludisme, causé par le parasite *Plasmodium* est la parasitose la plus létale au monde, avec plus de 600 000 décès en 2021, et touche en grande majorité des enfants de moins de 5 ans principalement en Afrique. Contre cette maladie infectieuse, le vaccin RTS,S/A01 est recommandé depuis 2021 par l’OMS. Néanmoins, son efficacité relative, associée aux résistances apparues chez le parasite contre les combinaisons chimio-thérapeutiques à base d’artémisinine (Artemisinin Combined Therapies) et aux résistances du vecteur aux insecticides, engendrent la nécessité de poursuivre les efforts de recherche pour mieux comprendre la biologie du parasite et concevoir de nouvelles molécules anti-parasitaires. La phosphorylation réversible des protéines joue un rôle crucial lors du développement du parasite. Ainsi, il a récemment été démontré que la sérine/thréonine phosphatase PP1c était essentielle lors des stades tardifs de la schizogonie, notamment lors de la phase de sortie (« egress ») du globule rouge. Notre équipe étudie les régulateurs de la sous-unité catalytique de la phosphatase (PP1c). Au cours de deux études d’interactome de PP1c chez *Plasmodium berghei*, notre équipe a observé une interaction potentielle entre PP1c et différentes protéines du protéasome parasitaire, dont l’AAA-ATPase PbRpt3 (PBANKA\_0715600). Cette protéine possède deux motifs RVxF, décrits pour être majoritairement présents chez les protéines interagissant avec PP1c. De plus, grâce à des approches globales, Rpt3 a été prédite comme essentielle chez *P. falciparum*, alors que chez *P. berghei* les parasites déficients pour cette ATPase présentent un phénotype lent. Le protéasome 26S est un complexe protéique impliqué dans la dégradation des protéines, contribuant à l’homéostasie et à la réponse au stress des cellules eucaryotes. Il est composé d’un complexe 20S portant l’activité catalytique, associé à un ou deux complexes régulateurs 19S composé de protéines ATPases (Rpt) et non-ATPases (Rpn). La protéine PbRpt3 appartiendrait au complexe 19S du protéasome parasitaire. Au cours de ma thèse, j’ai caractérisé la sous-unité régulatrice PbRpt3, démontré qu’elle interagissait avec PP1c *in vitro*, et qu’elle activait la fonction phosphatase de PP1c à la fois *in vitro* et dans un modèle hétérologue d’ovocytes de Xénope. Par une approche de mutagenèse dirigée, nous avons observé que les motifs RVxF de PbRpt3 étaient impliqués dans sa fonction de liaison et de régulation de PP1c. Nous avons construit un modèle 3D de la protéine PbRpt3 par homologie comparative, ce qui nous a permis de prédire les acides aminés intervenant dans la stabilisation de l’ATP. La mutation de ces acides aminés, combinée à l’approche en ovocytes de Xénope a conduit à montrer que l’activité enzymatique de PbRpt3 serait impliquée dans sa fonction d’activation de la phosphatase PP1c. Grâce à des études de génétique inverse, nous suggérons un rôle essentiel de Rpt3 lors des stades intra-érythrocytaires chez *P. berghei* car aucune lignée de parasites déficients pour PbRpt3 n’a été obtenue chez la souris malgré de nombreuses tentatives de clonage et l’utilisation du système PlasmoGem. Une approche de Knock-in, en utilisant le tag mCherry a permis de localiser la protéine au cours du cycle intra-érythrocytaire, avec une présence dans le cytoplasme lors des stades trophozoïte à schizonte, et une concentration localisée dans le noyau chez les gamétocytes. Enfin, des immunoprécipitations suivies d’une analyse en spectrométrie de masse ont permis de caractériser l’interactome de PbRpt3 chez le parasite au stade schizonte. Ainsi, nous avons confirmé que PbRpt3 appartiendrait au complexe protéasome 19S, et observé que cette ATPase s’associe à plusieurs protéines connues pour lier les phospholipides membranaires. Ces observations suggèrent que PbRpt3 pourrait jouer un rôle direct, ou via ses partenaires, dans la dynamique des membranes chez *P. berghei*.

Protéasome, Complexe régulateur 19S, Rpt3, *Plasmodium*, PP1.





## ABSTRACT

Malaria, caused by the *Plasmodium* parasite, is the most lethal parasitosis in the world, with more than 600,000 deaths in 2021, and mostly affects children under the age of 5, mainly in Africa. The RTS,S/A01 vaccine against this infectious disease has been recommended by the WHO since 2021. However, its relative efficacy, combined with the parasite's resistance to artemisinin-based chemo-therapeutic combinations (Artemisinin Combined Therapies) and the vector's resistance to insecticides, implies that further research is needed to gain a better understanding of the parasite's biology and design new anti-parasitic molecules. Reversible protein phosphorylation plays a crucial role in the development of the parasite. For example, it has recently been shown that the serine/threonine phosphatase PP1 is essential during the late stages of schizogony, particularly during the egress phase of the red blood cell. Our team studies the regulators of the catalytic subunit of the phosphatase (PP1c). Two PP1c interactome studies in *Plasmodium berghei*, have led our team to observe a potential interaction between PP1c and various proteins belonging to the parasite proteasome, including the AAA-ATPase PbRpt3 (PBANKA\_0715600), which possesses two RVxF motifs, described as being predominantly present in proteins interacting with PP1c. Furthermore, using global approaches, Rpt3 was predicted to be essential in *P. falciparum*, whereas in *P. berghei* parasites deficient for this ATPase show a slow phenotype. The 26S proteasome is a protein complex involved in protein degradation, contributing to homeostasis and the stress response in eukaryotic cells. It is composed of a 20S complex carrying the catalytic activity, associated with one or two 19S regulatory complexes composed of ATPase (Rpt) and non-ATPase (Rpn) proteins. The PbRpt3 protein is thought to belong to the 19S complex of the parasite proteasome. During my thesis, I characterised the PbRpt3 regulatory subunit, demonstrated that it interacts with PP1c *in vitro*, and that it activates the phosphatase function of PP1c both *in vitro* and in a heterologous model of *Xenopus* oocytes. Using a site-directed mutagenesis approach, we observed that the RVxF motifs of PbRpt3 were involved in its binding to PP1c, and in the regulatory function towards this phosphatase. We built a 3D model of the PbRpt3 protein by comparative homology, which enabled us to predict the amino acids involved in ATP stabilisation. The mutation of these amino acids, combined with the *Xenopus* oocyte approach, led us to show that the enzymatic activity of PbRpt3 would be involved in the activation of the PP1c phosphatase. Using reverse genetics studies, we suggest an essential role for Rpt3 during the intra-erythrocytic stages in *P. berghei*, as no PbRpt3-deficient parasites were obtained in mice despite numerous cloning attempts and the use of the Plasmogem system. A Knock-in approach, using the mCherry tag, enabled the protein to be located during the intra-erythrocytic cycle, showing a presence in the cytoplasm during the trophozoite to schizont stages, and a localised concentration in the nucleus in gametocytes. Finally, immunoprecipitation followed by mass spectrometry analysis enabled us to characterise the PbRpt3 interactome in the parasite during the schizont stage. We confirmed that PbRpt3 belongs to the 19S proteasome complex and observed that this ATPase associates with several proteins known to bind to membrane phospholipids. These observations suggest that PbRpt3 could play a direct role, or indirect, through interacting with partners, in the membrane dynamics of *P. berghei*.

Proteasome, 19S regulatory particle, Rpt3, *Plasmodium*, PP1.



*A ma famille,*

**« Permettez-moi de vous révéler le secret qui m'a conduit à atteindre mon but.**

**Ma force repose uniquement sur ma ténacité. »**

**Louis Pasteur**



## SOMMAIRE

Résumé	3
Sommaire	9
Table des matières	11
Liste des figures & Liste des tableaux	15
Abréviations	19
Introduction	21
Cadre & Objectifs	73
Résultats	75
Discussion & Perspectives	123
Matériel & Méthodes	145
Références bibliographiques	157
Annexes	179



## TABLE DES MATIERES

RESUME / ABSTRACT	3
TABLE DES MATIERES	11
LISTE DES FIGURES / LISTE DES TABLEAUX	15
ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION	21
I. Le Paludisme	22
A. Données géographiques et épidémiologiques	22
B. Le parasite <i>Plasmodium</i> , taxonomie et phylogénétique	23
C. Vecteurs	24
1. Lutter contre les vecteurs du paludisme - ou lutter contre <i>Plasmodium</i> chez ses vecteurs	24
2. Différents hôtes, différents vecteurs	25
D. Cycle de développement	25
E. Evasion immune et adaptations de l'hôte	27
F. Pathologie	29
1. Le paludisme asymptomatique et sans complications	29
2. Le paludisme sévère	29
3. La malaria cérébrale ou neuropaludisme	29
4. Le paludisme congénital	30
G. Les traitements	30
1. Histoire et évolution des traitements	30
2. Traitements actuels	31
3. Les résistances aux traitements antipaludiques	34
4. Les résistances aux ACT	34
5. D'autres résistances	35
6. La résistance aux insecticides	35
7. Développement de nouveaux traitements	36
H. Les vaccins	37
1. Le vaccin RTS,S/AS01	38
2. Un candidat vaccin prometteur : le R21/MM	38
3. Vaccins en cours de développement	38
II. La phosphorylation réversible des protéines : un mécanisme essentiel au développement du parasite	40
A. Généralités sur les kinases	43
B. Les kinases de <i>Plasmodium</i>	43
C. Les phosphatases chez les eucaryotes, un focus sur <i>Plasmodium</i>	45
1. Les Sérine/thréonine phosphatases	46



a. Les Phosphoprotein phosphatases-like _____	46
b. Les PPM_____	47
c. Les HAD_____	48
2. les Tyrosine phosphatases_____	48
3. Les pseudophosphatases_____	48
4. La Protéine Phosphatase 1 (PP1)_____	48
a. Les régulateurs de PP1_____	51
b. La phosphatase PP1 chez <i>Plasmodium</i> _____	52
c. Les régulateurs de PP1 chez <i>Plasmodium</i> _____	53
i. Des inhibiteurs de PP1c chez <i>Plasmodium</i> _____	53
ii. Des activateurs de PP1c chez <i>Plasmodium</i> _____	55
III. La dégradation ciblée des protéines par le protéasome chez <i>Plasmodium</i> _____	57
A. Généralités sur le protéasome_____	57
1. Le corps catalytique du protéasome : le complexe 20S_____	59
2. La sélection des substrats et régulation du 20S par le complexe 19S_____	60
3. Intervention de l'Ubiquitine et importance des déubiquitinasés_____	60
4. Localisation du protéasome 26S_____	62
5. Régulation du protéasome par phosphorylation/déphosphorylation_____	64
B. Le protéasome 26S chez <i>Plasmodium</i> _____	65
1. Conservation du protéasome 26S_____	65
2. Effets des inhibiteurs de protéasome sur <i>Plasmodium</i> _____	66
3. Synergie entre l'ART et des inhibiteurs de protéasome_____	68
C. La protéine Rpt3 et son rôle_____	69
1. Rpt3 et ses interactants_____	69
2. Rôle de Rpt3 au sein et en dehors du protéasome_____	70
3. Les modifications post-traductionnelles de Rpt3_____	71
CADRE ET OBJECTIFS_____	73
RESULTATS_____	75
I. Caractérisation moléculaire de la protéine PbRpt3 : Analyse <i>in silico</i> _____	75
A. Analyse détaillée de la séquence PBANKA_0715600 et de la protéine PbRpt3_____	75
B. Comparaison des séquences Rpt3 de <i>Plasmodium berghei</i> et d'autres organismes_____	78
1. Conservation des motifs RVxF_____	78
2. L'extrémité C-terminale de Rpt3 : FYK Vs FYNI_____	79
C. Construction du modèle 3D_____	81
1. Stabilisation de la protéine PbRpt3 grâce à la fixation d'une molécule d'ATP et d'un ion Mg <sup>2+</sup> _____	83
2. Accessibilité des motifs RVxF de PbRpt3_____	84
II. Production de la protéine PbRpt3 sous forme recombinante_____	87

A. Clonage de PbRpt3 en vecteur d'expression pETDuet-1 et induction de l'expression des protéines en <i>E. coli</i> BL21-DE3	88
B. Production et purification de Rpt3-30kDa et Rpt3-45kDa en BL21-DE3 : conditions non-dénaturantes versus dénaturantes	90
C. Une nouvelle stratégie de production avec différentes souches de bactéries <i>E. coli</i>	95
1. Tests avec la souche Rosetta DE3 pRARE	95
2. Production avec la souche de bactéries <i>E. coli</i> Arctic Express	97
D. Production des protéines PbRpt3 mutées	97
III. Etude de l'interaction entre PbRpt3 et PP1c <i>in vitro</i> et chez l'ovocyte de Xénope ; rôle fonctionnel de cette interaction	98
A. Résultats des expériences <i>in vitro</i>	98
1. Interaction <i>in vitro</i> entre PbRpt3 et PfPP1c	98
2. Rôle fonctionnel de PbRpt3 sur l'activité de PP1c <i>in vitro</i>	100
B. Interaction PbRpt3-PP1c et activité fonctionnelle chez l'ovocyte de Xénope	102
1. PbRpt3 interagit avec XePP1c et présente une activité fonctionnelle en ovocytes de Xénope	103
2. Contribution des motifs RVxF de PbRpt3 à l'interaction avec PP1c, et à son activité fonctionnelle en ovocytes de Xénope	105
3. Rôle fonctionnel de PbRpt3 chez l'ovocyte de Xénope : contribution de sa capacité à lier l'ATP	106
IV. Etude de l'essentialité de PbRpt3 au cours du développement intra-érythrocytaire de <i>P. berghei</i>	110
V. Etude de la localisation de PbRpt3 chez <i>P. berghei</i>	113
V. Analyse de l'interactome de PbRpt3	115
A. Détection du complexe protéasome 19S	116
B. Identification de protéines impliquées dans l'interaction avec des phospholipides	119
C. Identification de protéines impliquées dans la régulation des gènes	121
D. Identification de protéines impliquées dans l'egress	121
DISCUSSION & PERSPECTIVES	123
I. Analyse <i>in silico</i> de PbRpt3 et production des protéines recombinantes	124
A. L'analyse <i>in silico</i>	124
1. Positionnement de l'ATP dans la structure prédite de PbRpt3	125
2. Intégration du modèle 3D de PbRpt3 au sein du complexe 19S et 26S	125
3. Etude de la séquence FYNI en C-terminal de PbRpt3	126
4. Analyse phylogénétique	128
B. La production des protéines recombinantes	129
II. Etude de l'interaction entre PbRpt3 et PP1c et régulation de l'activité de la phosphatase <i>in vitro</i> et en ovocytes de Xénope	130
A. Effet des protéines PbRpt3-45 kDa et PbRpt30-kDa sur l'interaction et l'activité de PP1c	130
B. Rôle des motifs RVxF dans l'interaction entre les deux protéines, et dans l'activation	

de PP1c par PbRpt3	131
C. Rôle de l'activité ATPase : exploration en ovocytes de Xénope	132
III. Le système PlasmogEM utilisé pour l'extinction du gène codant pour PbRpt3	133
IV. Knock-in : étude de la localisation de la protéine PbRpt3	136
A. Localisation de PbRpt3 chez le parasite	130
B. Localisation de PbRpt3 dans la cellule hôte ?	138
V. Etude de l'interactome de PbRpt3 : des pistes pour appréhender son rôle chez le parasite	138
A. Présence du 19S, absence du 20S	139
B. Comparaison entre l'interactome de la Rpt3 humaine PSMC4 et l'interactome de PbRpt3	140
C. PbRpt3 : un rôle dans des voies liées aux Phospholipides ?	140
D. Interaction avec la phosphatase PbPP1c et rôle de PbRpt3 dans l'egress ?	141
VI. Conclusion	143
MATERIEL ET METHODES	145
I. Ethique et Animaux	146
II. Analyse de séquence de PbRpt3 et modélisation moléculaire	146
III. Plasmides et mutagénèse dirigée	146
IV. Expression de protéines recombinantes	150
V. Etude de l'interaction entre PbRpt3 et PP1c	151
VI. Etude de l'effet de PbRpt3 sur PP1c	151
VII. Analyse de la maturation chez les ovocytes de Xénope et immunoprécipitation des protéines synthétisées	152
VIII. Isolation des stades parasitaires	152
IX. Génération de parasites transgéniques	153
X. Immunofluorescence	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXES	179

## LISTE DES FIGURES

### Introduction

1. Carte de la distribution du Paludisme dans le monde en 2020	23
2. Diagramme représentant les relations phylogénétiques entre des membres de la classe des hématozoaires et du genre <i>Plasmodium</i>	24
3. Cycle de vie de <i>P. falciparum</i>	27
4. Structure de l'artémisinine (ART) et certains de ses dérivés	31
5. Les cinq principales MPT covalentes de chaînes latérales protéiques	41
6. Histogrammes des MPT de <i>P. falciparum</i> et des érythrocytes infectés	42
7. Les principales MPT chez <i>P. falciparum</i>	42
8. Proportion des kinases de chaque famille, chez différents organismes	44
9. Classification des phosphatases	46
10. Familles de phosphatases les plus représentées, en pourcentage, chez l'humain, <i>P. falciparum</i> et <i>T. gondii</i>	47
11. Représentation de la structure 3D de la phosphatase PP1c humaine	49
12. Schéma montrant un classement des régulateurs de la PP1c humaine par leur motif d'interaction	51
13. Les mécanismes d'inhibition de PP1c par trois protéines régulatrices : SDS22, I2 et I3	52
14. Modélisation de la portion de la protéine RCC-PIP de <i>P. falciparum</i> portant les motifs RCC1	55
15. Schématisation de la dégradation des protéines par les protéasomes 26S, 20S et l'immunoprotéasome	57
16. Classement des régulateurs du complexe 20S du protéasome par ordre d'abondance	58
17. Structure et composition du protéasome 26S	59
18. Sites de modifications post-traductionnelles de l'Ubiquitine	61
19. Le processus d'ubiquitination dans les cellules eucaryotes	62
20. Présence de protéasomes dans 25 sécrétions ou fluides chez l'homme	63
21. Structure chimique du Bortezomib	64
22. Action synergique des dérivés de l'ART et des inhibiteurs du protéasome chez <i>P. falciparum</i>	68
23. Schéma représentant le mécanisme d'action de l'ART conduisant à la mort ou à la survie du parasite chez des mutants pour la protéine K13	69

### Résultats et Discussion

24. Analyse par PCR des fragments génomiques et codants de PbRpt3	77
25. Analyse de domaines et motifs de la protéine PbRpt3	77
26. Séquence en acides aminés de la protéine PbRpt3 (PBANKA_0715600)	78
27. Alignement des protéines PSMC4, PbRpt3 et PfRpt3 indiquant la position de certains motifs ou acides aminés	80
28. Structure 3D prédite de PbRpt3	82
29. Positionnement de l'ATP au sein de la structure 3D de PbRpt3	83
30. Positionnement de la poche de maintien de l'ATP au sein de la structure 3D de PbRpt3	84
31. Représentation en 3D de la protéine PbRpt3 au sein du protéasome humain 26S	86
32. Modélisation de l'encombrement autour du motif RKIEF de la protéine PbRpt3 positionnée au sein du protéasome 19S	87
33. Illustration des régions de PbRpt3 étudiées	88
34. Analyse par SDS-PAGE de l'induction de l'expression des protéines PbRpt3-45kDa et PbRpt3-30kDa	89

35. Analyse par SDS-PAGE de l'expression des protéines PbRpt3-30kDa et PbPbRpt3-45 kDa dans différentes conditions de température et de temps d'induction	89
36. Analyse en Western blot de l'expression et de la purification des protéines recombinantes PbRpt3-30kDa et PbRpt3-45kDa	90
37. Analyse des protéines recombinantes PbRpt3 30 kDa produites en BL21	92
38. Analyse de la qualité de deux lots de protéines recombinantes PbRpt3-45kDa	93
39. Analyse de la qualité du lot 7 de la protéine recombinante PbRpt3-45kDa en SDS-PAGE coloré en bleu de Coomassie	93
40. Résultats de l'analyse en spectrométrie de masse des bandes correspondant à la migration en gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de la protéine purifiée PbRpt3 45kDa	94
41. Analyse en SDS-PAGE et Western blot anti 6-His de la production de PbRpt3 30 kDa en <i>E. coli</i> BL21-Rosetta avec deux conditions d'induction	95
42. Analyse de la présence de la protéine recombinante PbRpt3-30kDa produite en <i>E. coli</i> Arctic Express dans sa fraction soluble ou insoluble	96
43. Analyse de la qualité des protéines recombinantes PbRpt3-45kDa et PbRpt3-30kDa	97
44. Analyse de la qualité des lots de protéines recombinantes PbRpt3-30 kDa mutées KATA, RKAEA et double mutée KATA/RKAEA	98
45. Analyse de l'interaction <i>in vitro</i> entre PbRpt3 et PfPP1c	99
46. Etude de l'interaction entre les protéines PbRpt3 native ou mutées avec PfPP1c	99
47. Etude de l'activité phosphatase de PRpt3-30 kDa, des différentes protéines mutées sur les motifs RVxF, ainsi que des protéines contrôle BSA, Pfl2 et PfPP1c grâce à un test pnPP	100
48. Effet de PbRpt3-45 kDa, PbRpt3-30 kDa, BSA ou Pfl2 sur l'activité phosphatase de PfPP1c	101
49. Effet de PbRpt3-30 kDa, PbRpt3-30 kDa mutée KATA, PbRpt3-30 kDa mutée RKAEA, PbRpt3-30 kDa mutée KATA/RKAEA, BSA ou Pfl2 sur l'activité phosphatase de PfPP1c	102
50. Analyse par Immunoblot de l'expression de la protéine PbRpt3, en utilisant le modèle d'ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	103
51. Analyse de l'interaction entre PbRpt3 et PP1c dans le modèle d'ovocytes de Xénope	104
52. Analyse de l'apparition de la GVBD chez les ovocytes de Xénope après micro-injection de Pfl2 et PbRpt3	104
53. Analyse chez l'ovocyte de Xénope de l'effet de PbRpt3 sur l'induction de la GVBD par la progestérone	105
54. Analyse par Immunoblot de l'expression des protéines PbRpt3 mutées pour les motifs RVxF, en utilisant le modèle d'ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	106
55. Rôle des motifs RVxF dans l'activité fonctionnelle de PbRpt3 et dans son interaction avec XePP1c	107
56. Analyse par Immunoblot de l'expression de la protéine PbRpt3 mutée pour les sites de fixation à l'ATP en utilisant le modèle d'ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	108
57. Rôle des sites prédits de fixation de l'ATP dans l'activité fonctionnelle de PbRpt3 en ovocytes de Xénope	109
58. Construit PlasmogEM (PbGEM-022521)	110
59. Analyse par génotypage des parasites <i>P. berghei</i> obtenus après transfection obtenus après transfection avec le construit PlasmogEM	111
60. Analyse par génotypage des parasites <i>P. berghei</i> PlasmogEM après passages successifs chez la souris	112
61. Analyse par génotypage des parasites <i>P. berghei</i> PlasmogEM après clonage par dilution limite	112
62. Stratégie de KI (Knock-in) par l'étiquetage mCherry de PbRpt3 chez <i>Plasmodium berghei</i> en utilisant le vecteur pL1886	113

63. Analyse en immunoblot de l'expression de PbRpt3-mCherry chez les parasites transfectés avec le plasmide pL1886-PbRpt3-mCherry	114
64. Distribution cellulaire de PbRpt3-mCherry lors de différents stades érythrocytaires chez <i>P. berghei</i>	115
65. Analyse de l'interactome de PbRpt3 : détection des protéines appartenant au protéasome 19S	117
66. Analyse de l'interactome de PbRpt3 : détection des protéines intervenant dans des voies d'interaction aux phospholipides	119
67. Analyse STRING des 39 protéines appartenant à l'analyse GO de l'interactome de PbRpt3	120
68. Représentation des acides aminés qui diffèrent entre l'extrémité C-terminale de PbRpt3 (FYNI) ou de PSMC4 (FYK)	127
69. Génération de parasites transgéniques <i>P. berghei</i> exprimant DiCre	135
70. Analyse du transcriptome de PBANKA_0715600 (PbRpt3) de <i>P. berghei</i> ANKA lors du cycle intra-érythrocytaire	137
<b>Matériel et Méthodes</b>	
71. Séquence de PbRpt3 recodonisée, optimisée pour une transcription en <i>Xenopus laevis</i> , et séquence protéique correspondante	149

## LISTE DES TABLEAUX

### Introduction

I. Différentes familles de molécules utilisées pour traiter les infections à <i>Plasmodium</i>	32
II. Liste des molécules en développement pour le traitement du Paludisme	37
III. Liste des vaccins approuvés ou en cours d'essais cliniques indiquant le stade parasitaire ciblé	39
IV. Liste des inhibiteurs de protéasome de <i>P. falciparum</i> indiquant leur classe chimique, le type de liaison et leur cible	67
V. Données préliminaires sur les 6 Rpt de <i>P. berghei</i> identifiées dans l'interactome de PbPP1c	74

### Résultats et Discussion

VI. Matrice d'identité réalisée par Clustal 2.1 de protéines Rpt3 appartenant à différents organismes	78
VII. Conservation des motifs KVTF et RKIEF de la protéine Rpt3 chez différents organismes	79
VIII. Acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine Rpt3 de différents organismes	80
IX. Conditions de production, de purification et de dialyse des différents lots de protéines recombinantes PbRpt3-30kDa et PbRpt3-45 kDa	91
X. Analyse des processus biologiques, composants cellulaires et fonctions moléculaires enrichis dans l'interactome de PbRpt3	117
XI. Liste des protéines partenaires potentielles de PbRpt3 appartenant aux termes de GO enrichis	118
XII. Protéines putatives de régulation de l'expression des gènes détectées dans l'interactome de PbRpt3	121
XIII. Protéines détectées dans l'interactome de PbRpt3 et dont un rôle a déjà été décrit chez <i>Plasmodium</i> lors de la sortie (egress) du parasite des globules rouges	121
XIV. Comparaison entre la taille en acides aminés des protéines avoisinant PSMC4 au sein du complexe 26S et les protéines homologues chez <i>P. berghei</i>	125
XV. Analyse des interactants (directs) communs possibles entre la PSMC4 humaine et PbRpt3	140

### Matériel et Méthodes

XVI. Liste des amorces utilisées	148
----------------------------------	-----



## ABREVIATIONS

ADNc	ADN complémentaire	HbF	Hémoglobine fœtale
Ac	Anticorps	His	Histidine
ACT	Artemisinin Combination therapy	IgM	Immunoglobuline M
AL	Artémether-Lumefantrine	IRS	Indoor residual spraying
AMA1	Apical membrane antigen 1	ITN	Insecticide-treated bed nets
AP2-G	Apetala2-G transcription factor	I.V.	intra-veineuse
AS	Artésunate	MFQ	Méfloquine
ART	Artémisinine	MILDA	Moustiquaires Imprégnées à Longue Durées d'Action
AS-PY	Artesunate-Pyronaridine	MMV	Medicines for Malaria Venture
AS-AQ	Artesunate-Amodiaquine	MPT	Modifications post-traductionnelles
AS	Artesunate	MP2	Midgut peptide 2
ATP	Adénosine triphosphate	MSP1	Merozoite surface protein 1
ATM	Artémisone	MyPhoNE	Myosin phosphatase N-terminal element
CD4+	cluster de différenciation 4 +	NIMA	Never in mitosis gene A
CDC	Cell Division Cycle	NK	Natural killer
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
CDK	Cyclin dependent kinase	PAN	Proteasome-activating nucleotidase
CK2	Casein kinase 2	Pb	<i>Plasmodium berghei</i>
CQ	Chloroquine	PCR	Polymerase chain reaction
Cryo-EM	Cryo-microscopie électronique	Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
CSA	Chondroïtine sulfate A	PG	Progestérone
CSP	Circumsporozoite protein	PKA	Protéine kinase A
DARC	Duffy antigen Receptor for chemokines	PKG	Protéine kinase G
DBL	Duffy binding-like domain	pnPP	Paranitrophénylphosphate
DHA	Dihydro-Artémisinine	PPQ	Pipéraquline
DHA-PPQ	Dihydro-Artémisinine-Pipéraquline	PROSC	Plasmodium reactive oxidative stress complex
DHFR	Dihydrofolate réductase	PSG	Proteasome storage granule
DUB	Déubiquitinase	p21	Cyclin-dependent inhibitor 1
EMP1	Erythrocyte Membrane Protein-1	p53	Tumor suppressor protein 53
EPIP	Enolase-plasminogen interaction peptide	RIFIN	Repetitive interspersed family of polypeptides
ePK	Eucaryote Protein Kinase	RIPPO	Regulatory interactor of protein phosphatase one
GEC	Gene engineered cassette	Rpn	Regulatory particle non-ATPase
GO	Gene ontology	Rpt	Regulatory particle ATPase
GTS	Global Technical Strategy for malaria		
GVBD	Germinal vesicle break down		
Hb	Hémoglobine		



SDS22	Suppressor-of-Dis2-number 2
SLiM	Short linear motif
SP	Sulfadoxine-Pyriméthamine
STEVOR	Subtelomeric variant open reading frame
TES	Therapeutic Efficacy Studies
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF	Tumor necrosis factor
TPIp	Traitement préventif intermittent du paludisme
TRiC	T-complex protein-1 Ring Complex
UPR	Unfolded protein response
UPS	Ubiquitin Proteasome System
Ub	Ubiquitine
VLP	non-infectious virus-like particle
VSA	Variant surface antigen

## INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie causée par un parasite intracellulaire appartenant au phylum des Apicomplexes et au genre *Plasmodium*, transmise par les moustiques femelles du genre *Anopheles*. L'infection par *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), première parasitose mondiale, est responsable du plus grand nombre d'accès palustres mortels, avec 90% des décès concentrés en Afrique, représentant plus de 619 000 morts en 2021, et 247 millions de nouveaux cas répertoriés la même année selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ("World malaria report 2022"). Les principales zones de répartition du paludisme sont l'Afrique intertropicale, l'Amérique du Sud, l'Amérique Centrale et l'Asie du Sud.

Le parasite a été pour la première fois décrit par le militaire français Charles Louis Alphonse Laveran en 1880 en Algérie, après avoir constaté la présence de parasites dans le sang de patients décédés de fièvre palustre. Le rôle vectoriel du moustique du genre *Anopheles* a été confirmé par l'anglais Ronald Ross en 1895 et la description du cycle complet a bénéficié de l'expertise en zoologie du chercheur italien Giovanni Battista Grassi en 1899.

À la suite d'une infection par *Plasmodium*, les jeunes enfants présentent le plus de risque de développer des formes graves ou mortelles. Les décès, liés à une anémie sévère ou au neuropaludisme, sont principalement causés par *P. falciparum*, et surviennent majoritairement chez des enfants âgés de 6 mois à 5 ans. Ces enfants sont vulnérables car ils n'ont pas encore développé un système immunitaire suffisamment protecteur et ils ne bénéficient plus de la protection envers le parasite liée à la présence d'anticorps maternels durant les premiers mois de vie. Ils ont représenté en 2021 presque 80% des décès sur le continent Africain (World malaria report 2022).

Aujourd'hui, afin de contrer le taux important d'infection en zones d'endémie palustre, la stratégie de prévention consiste principalement en la distribution de dispositifs de protection comme les MILDA (Moustiquaires Imprégnées à Longue Durée d'Action), associée à la vaccination autorisée en 2021 (RTS,S).

Dans les pays endémiques pour le paludisme, et à la suite des recommandations de l'OMS en 2001, le traitement des patients infectés s'effectue par les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine ACT (Artemisinin-based Combination Therapy) en traitement de première intention lorsqu'il s'agit d'une infection à *P. falciparum* sans complications. Cependant, des résistances à ces traitements sont apparues depuis 2009 en Asie du Sud-Est, et de nouvelles mutations responsables de résistances aux ACT continuent d'apparaître : des pays jusqu'ici épargnés comme l'Ouganda ou le Rwanda, commencent à voir surgir des résistances depuis Septembre 2021. Ce phénomène, tout comme les précédentes résistances à la chloroquine et à la sulfadoxine pyriméthamine, associé à une protection insuffisante apportée par la vaccination - de l'ordre de 36 % sur des enfants de 5 à 17 mois suivis pendant deux ans après 4 doses de RTS,S/AS01 - accentuent la nécessité de mieux comprendre la biologie du parasite.

Dans le combat contre le vecteur, l'une des limites est l'apparition de résistances aux insecticides associée à des changements de comportement des moustiques ayant tendance à piquer avant la tombée du jour, ainsi que l'expansion d'espèces de moustiques vectrices du paludisme en dehors des régions rurales vers des zones densément peuplées. Ainsi, le moustique *Anopheles stephensi* poursuit sa progression vers de nouvelles régions jusqu'alors épargnées par ce vecteur tels que Djibouti depuis 2012, l'Éthiopie et le Soudan depuis 2016, la Somalie depuis 2019, et le Nigéria depuis 2020. En lien

avec l'expansion de cette espèce très adaptée aux zones urbaines et résistante à la plupart des insecticides, le nombre de cas de paludisme augmente dans certains pays d'Afrique, comme à Djibouti où le nombre de cas a presque triplé entre 2018 et 2020. « L'un des principaux obstacles à l'éradication du paludisme est la compréhension incomplète de la biologie fondamentale du parasite » (Morano et al., 2023). En effet, le génome de *Plasmodium* a été séquencé en 2002, mais de nombreux éléments restent inconnus quant à la fonction des multiples protéines codées par son génome nucléaire d'approximativement 23Mb et 5500 gènes.

Mieux comprendre les mécanismes d'actions et d'interaction entre les protéines de *Plasmodium* permettra de clarifier les mécanismes de développement mis en jeu chez le parasite avec l'objectif de poursuivre le développement de composés antiparasitaires durables, ou de vaccins permettant à terme d'éradiquer cette épidémie mondiale.

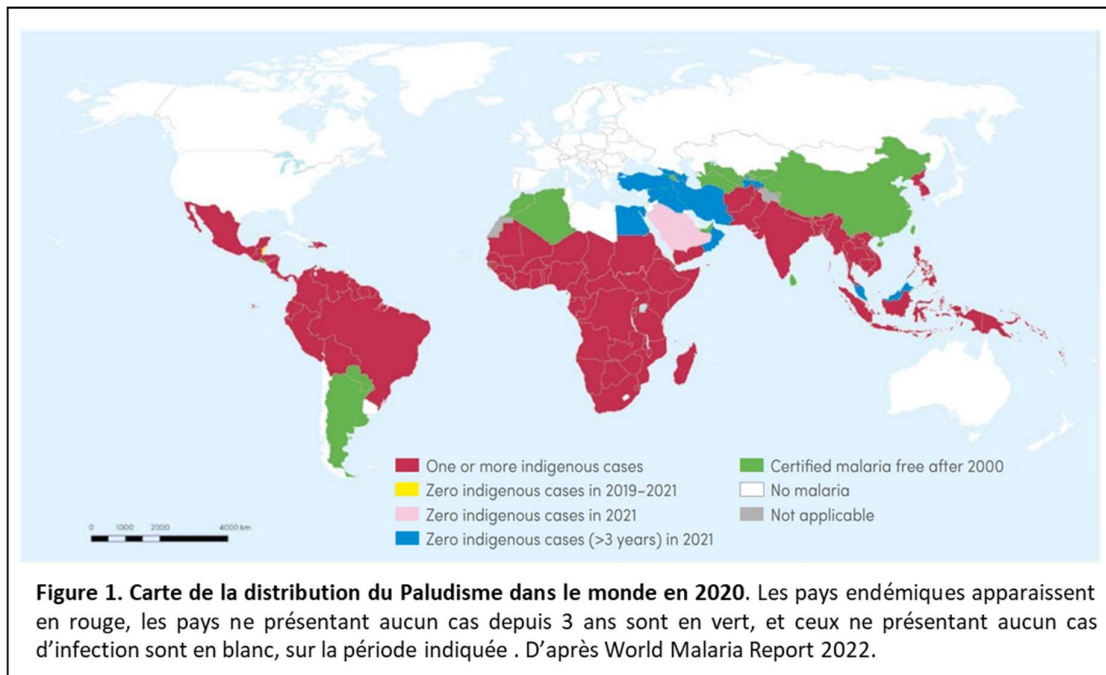
## I. Le Paludisme

### A. Données géographiques et épidémiologiques

Dans le monde, 84 pays sont considérés comme endémiques pour le paludisme avec 29 pays concentrant 96% des cas ("World malaria report 2022"). Quatre pays Africains : le Nigeria, la République Démocratique du Congo, l'Ouganda et le Mozambique regroupent presque la moitié des cas de paludisme (figure 1). Après une période où le nombre d'infections a beaucoup diminué (années 2000-2015), la tendance s'est inversée et ce nombre croit de nouveau chaque année, causant 245 millions de cas en 2020 et 247 millions l'année suivante. Le plan GTS (Global Technical Strategy for malaria) élaboré en 2015 pour les années 2016–2030, visait une stratégie de contenance de l'épidémie à 230 millions de cas annuels.

Parmi les 5 espèces infectant l'humain, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* sont les espèces les plus létales : elles provoquent la grande majorité des cas et des décès. Les pays d'Afrique sub-Saharienne concentrent la plus grande densité de cas et de décès, englobant 95% des cas et 96% des décès pendant l'année 2020. De plus, 63 000 décès entre 2019-2021 durant la pandémie de COVID-19, ont été reliés aux perturbations des services antipaludiques essentiels, faisant ainsi état d'une aggravation de la situation due à la pandémie.

Dans les régions du monde autres que les zones endémiques pour le paludisme, des cas de paludisme apparaissent, il s'agit du « Paludisme d'importation » ("imported malaria") infectant des voyageurs ou des migrants revenant de zones endémiques. Des mesures sont adoptées, pour réaliser le suivi et le traitement de ces cas de paludisme présentant des variations selon les espèces infectantes (Mace, 2022). Le suivi de ces cas est fondamental car son absence peut conduire à la propagation de cas de paludisme comme cela vient d'être décrit le 26 juin 2023 dans un bulletin d'alerte du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) décrivant l'identification de 5 cas de paludisme acquis localement aux Etats-Unis : 4 cas au Texas et 1 cas en Floride. Cette situation peut être décrite comme étant préoccupante car la dernière occurrence d'infections locales avait eu lieu 20 ans auparavant, avec 8 cas relevés en Floride en 2003 ("Health Alert Network (HAN) - 00494 | Locally Acquired Malaria Cases Identified in the United States," 2023).

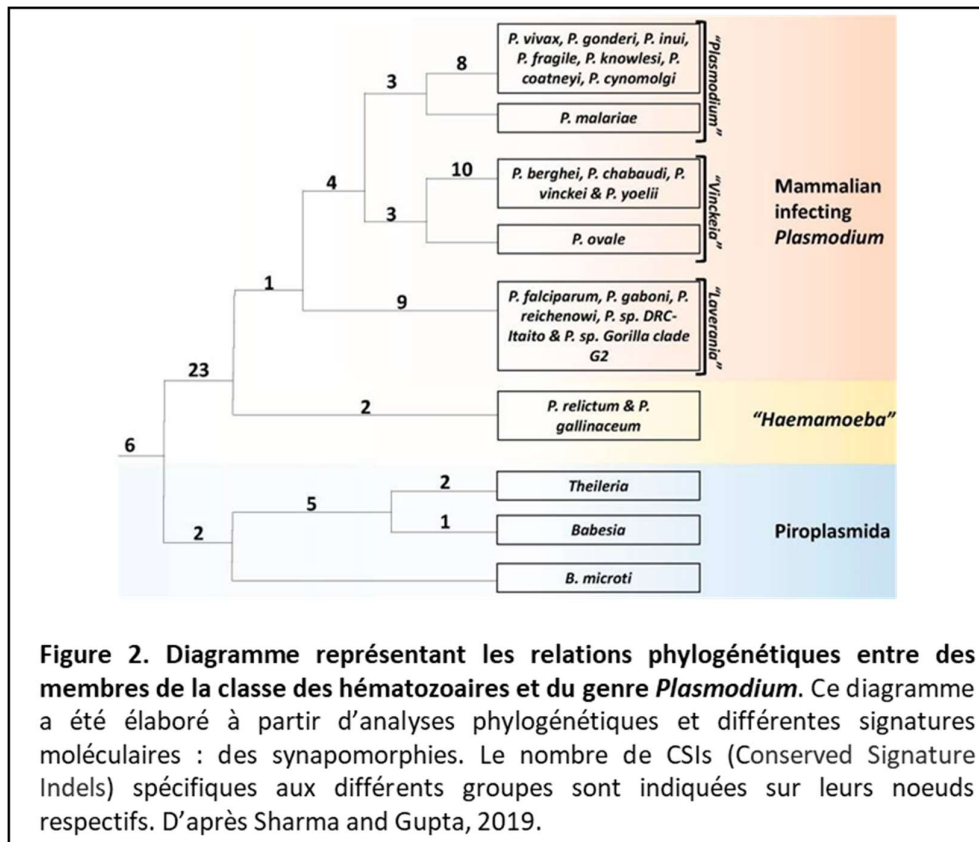


## B. Le parasite *Plasmodium*, taxonomie et phylogénétique

Les parasites du genre *Plasmodium* font partie du Phylum des Apicomplexes. Ces organismes possèdent un complexe apical situé à l'un des pôles de la cellule regroupant les rhoptries, les micronèmes et les granules denses : ce sont des organites sécrétoires de protéines permettant au parasite d'envahir les cellules hôtes puis d'y survivre lors des premiers stades de l'infection. Parmi les Apicomplexes, nous retrouvons également les genres *Toxoplasma* et *Cryptosporidium* infectant les humains, et les genres *Theileria* et *Eimeria* infectant respectivement les élevages de bétail ou de volaille. Ce Phylum intègre également les grégaires, des Apicomplexes parasites des invertébrés tels que les crevettes (Morrissette and Sibley, 2002).

La taxonomie de l'ordre des Haemosporidia prédit que le genre *Plasmodium* serait polyphylétique. Les sous-genres infectant les mammifères, sont aujourd'hui établis au nombre de trois : *Laverania* et *Plasmodium* (infectant tous deux des primates - humains et non humains), et *Vinckeia* infectant également des rongeurs (figure 2 - Sharma and Gupta, 2019).

Plus de 200 espèces de *Plasmodium* ont été formellement décrites (Sato, 2021). Cinq espèces peuvent infecter l'humain : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, et *Plasmodium knowlesi*, alors que 20 espèces de *Plasmodium* infectent les primates. Des analyses génomiques ont récemment mis en lumière des transferts horizontaux de deux gènes d'invasion parmi des parasites des espèces *Laverania* infectant les primates (Sundararaman et al., 2016). Ces gènes codent pour RH5 (reticulocyte-binding-like homologous protein 5) et pour CyRPA (cysteine-rich protective antigen). Leur transfert pourrait expliquer l'origine relativement récente de *P. falciparum* chez *Homo sapiens*, parasite qui diffère des 4 autres espèces de *Plasmodium* notamment de par sa grande virulence (Miller et al., 2002).



## C. Vecteurs

### 1. Lutter contre les vecteurs du paludisme - ou lutter contre *Plasmodium* chez ses vecteurs

L'étude des vecteurs du parasite est fondamentale : dans les régions endémiques pour le paludisme la plus grande partie de la lutte contre l'infection s'effectue à travers la lutte anti-vectorielle. Ainsi, pour fonctionner au mieux, les traitements anti-vectoriels doivent être adaptés aux comportements et à l'espèce de moustique en présence. Aujourd'hui, la lutte anti-vectorielle consiste principalement en l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (insecticide-treated bed nets ou ITNs) et la fumigation en intérieur (indoor residual spraying – IRS). Cependant, de nouvelles techniques telles que le contrôle génétique des insectes, comme le « gene drive », ou la technique de paratransgénèse sont développées et pourraient permettre, respectivement, de mieux contrôler les populations des moustiques ou de rendre les moustiques réfractaires au parasite. La technique du « gene drive » diffuse une cassette comportant un gène modifié (GEC) qui se transmet à sa progéniture. Cette technologie utilise les gènes HEG (homing endonuclease genes) et ses objectifs sont la suppression de populations de moustiques ou leur remplacement par des populations réfractaires au parasite (Dong et al., 2022). La paratransgénèse consiste à modifier génétiquement des organismes symbiotiques du vecteur tels que des virus, des champignons ou des bactéries, afin que ceux-ci produisent des molécules dirigées contre le parasite infectant ce vecteur. Nous pouvons citer l'exemple du champignon *Aspergillus oryzae*, transmis aux larves de *A. stephensi* à travers une inoculation dans l'eau. Ces champignons sont modifiés génétiquement pour sécréter des protéines anti-malariques effectrices MP2 et EPIP, inhibant ainsi le développement des oocystes chez le moustique (Kianifard et al., 2023).

Différentes espèces de moustiques véhiculent le paludisme, et certaines véhiculent également la Dengue, le chikungunya, Zika, l'onchocercose, la filariose lymphatique, la maladie de Chagas, l'encéphalite japonaise, la leishmaniose ou la fièvre jaune (Quinn and Nolan, 2020). Pour toutes ces pathologies, il sera utile d'accroître nos connaissances sur les vecteurs et sur leurs organismes endosymbiotiques.

## 2. Différents hôtes, différents vecteurs

Le parasite *P. falciparum* requiert, pour son développement, l'infection de deux hôtes : le moustique et l'humain. Le moustique femelle est qualifié d'hôte définitif car c'est chez cet hôte que s'opère la reproduction sexuée. C'est exclusivement par les Anophèles femelles que se réalise la transmission du paludisme à l'homme car la recherche d'un repas de sang est nécessaire à la femelle afin d'accomplir la production de ses œufs.

Trois espèces sont répertoriées comme étant des vectrices majeures du paludisme : *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles coluzzii*. Néanmoins, parmi les 484 espèces d'Anophèles dénombrées (Harbach, 2004), le nombre total d'espèces vectrices du paludisme dans le monde s'élève à une soixantaine dont 30 seraient majoritairement responsables de la transmission sur les différents continents (Carnevale and Robert, 2017). Actuellement, l'espèce *Anopheles stephensi*, identifiée à Djibouti en 2012 et capable de transmettre *P. falciparum* et *P. vivax* est jugée très préoccupante, par son efficacité à transmettre le parasite, et parce qu'elle réussit à survivre tout au long de l'année et à se propager dans des zones urbaines densément peuplées.

D'autres vertébrés peuvent être infectés par le genre *Plasmodium*, tels que des mammifères (primates non humains et rongeurs), ainsi que des reptiles et des oiseaux. Parmi les multiples espèces infectées, le parasite se transmet à travers des genres ou des espèces différentes de moustiques. À titre d'exemple, le moustique *Culex quinquefasciatus* transmet le paludisme aux oiseaux et son expansion, liée au réchauffement climatique met en péril la survie de certaines espèces d'oiseaux endémiques comme cela a été décrit à Hawaï en 2021 ("*Les oiseaux d'Hawaï ne cessent de mourir*," 2021). Plus de 50 espèces de moustiques sont vectrices du paludisme chez les oiseaux ; parmi celles-ci, nombreuses sont spécialistes, rattachant le vecteur à l'espèce d'oiseau. En revanche, d'autres espèces sont généralistes telles que *P. elongatum* infectant le plus grand nombre d'oiseaux au monde, et *P. relictum* qui cible jusqu'à 300 espèces d'oiseaux différentes (Palinauskas et al., 2016).

### D. Cycle de développement de *Plasmodium*

L'infection par le parasite se fait lors d'un repas de sang d'un moustique femelle au cours duquel des sporozoïtes sont injectés (figure 3 - Lee et al., 2014; Ross and Fidock, 2019). Chez l'humain, plusieurs dizaines de sporozoïtes atteignent la circulation sanguine lors d'une piqure de moustique. Ces formes mobiles et infectieuses ont subi une maturation dans les glandes salivaires du moustique et possèdent une signature protéique bien différente des sporozoïtes contenus dans les oocystes (Lasonder et al., 2008). Les sporozoïtes intègrent la circulation sanguine et atteignent le foie où ils se multiplient dans les hépatocytes. Cette étape que l'on nomme schizogonie exo-érythrocytaire, conduit à la libération de milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Ces mérozoïtes pénètrent alors dans les globules rouges principalement grâce à l'actine de leur cytosquelette (Morrissette and Sibley, 2002; Soldati and Meissner, 2004). Les espèces *P. vivax* et *P. ovale* peuvent subsister dans le foie sous un stade dormant que l'on appelle hypnozoïte et qui peut infecter les globules rouges plusieurs semaines à années après la première infection (Wells et al., 2010).

Une fois le globule rouge infecté, le parasite se développe *via* trois stades morphologiques successifs : la forme allongée qu'adopte son réticulum endoplasmique environ 8 heures après l'infection du globule rouge, visible en microscopie confocale, ressemble à un anneau, ce qui donne son nom au premier stade de développement intra-érythrocytaire. A ce stade anneau, succède ensuite le stade trophozoïte, pendant lequel l'ingestion de l'hémoglobine (Hb) se fait par endocytose (Aikawa et al., 1966). Une partie des composants de l'hémoglobine est utilisée comme nutriments, puis la détoxification de l'hème issue de la digestion de l'hémoglobine se fait par polymérisation et stockage dans la vacuole parasitaire. Le parasite poursuit son développement et se transforme en schizonte, qui est une forme multinucléée issue de la schizogonie. La phase de schizogonie érythrocytaire consiste en une mitose fermée où ont lieu des divisions nucléaires sans cytokinèse. Ainsi, 8 à 32 mérozoïtes sont produits à partir d'un seul globule rouge infecté. Les mérozoïtes libérés peuvent à nouveau envahir des globules rouges sains.

Avant leur sortie du globule rouge, 1% à 2% des mérozoïtes sont engagés dans la gamétoctogénèse. Ces mécanismes ne sont pas totalement élucidés, mais ils pourraient être associés au facteur de transcription AP2-G (Yuda et al., 2021). Ainsi, les gamétocytes matures se retrouvent dans la circulation sanguine jusque dans la micro-vascularisation et se concentrent dans les capillaires de la peau. Ils infectent le moustique lors d'un nouveau repas de sang et accomplissent ainsi, chez ce dernier, leur cycle sexué.

La sporogonie correspond au développement du parasite chez le moustique : dans l'intestin du moustique, chaque gamétocyte mâle produit, en quelques minutes et à la suite de trois phases de réplication d'ADN, 8 microgamètes. Le gamétocyte femelle subit, quant à lui, une maturation le transformant en macrogamète. Cette maturation dans l'intestin du moustique est dépendante de la température. C'est dans l'estomac du moustique que le microgamète mâle fusionne avec le macrogamète femelle formant un zygote qui se transforme en ookinète, une forme motile de *Plasmodium*. L'ookinète investit l'intestin du moustique et se transforme en oocyste. L'oocyste grossit, se rompt et libère des sporozoïtes, une nouvelle forme motile, qui se déplace jusqu'aux glandes salivaires du moustique pouvant ainsi réinfecter un nouvel hôte humain lors du prochain repas sanguin.

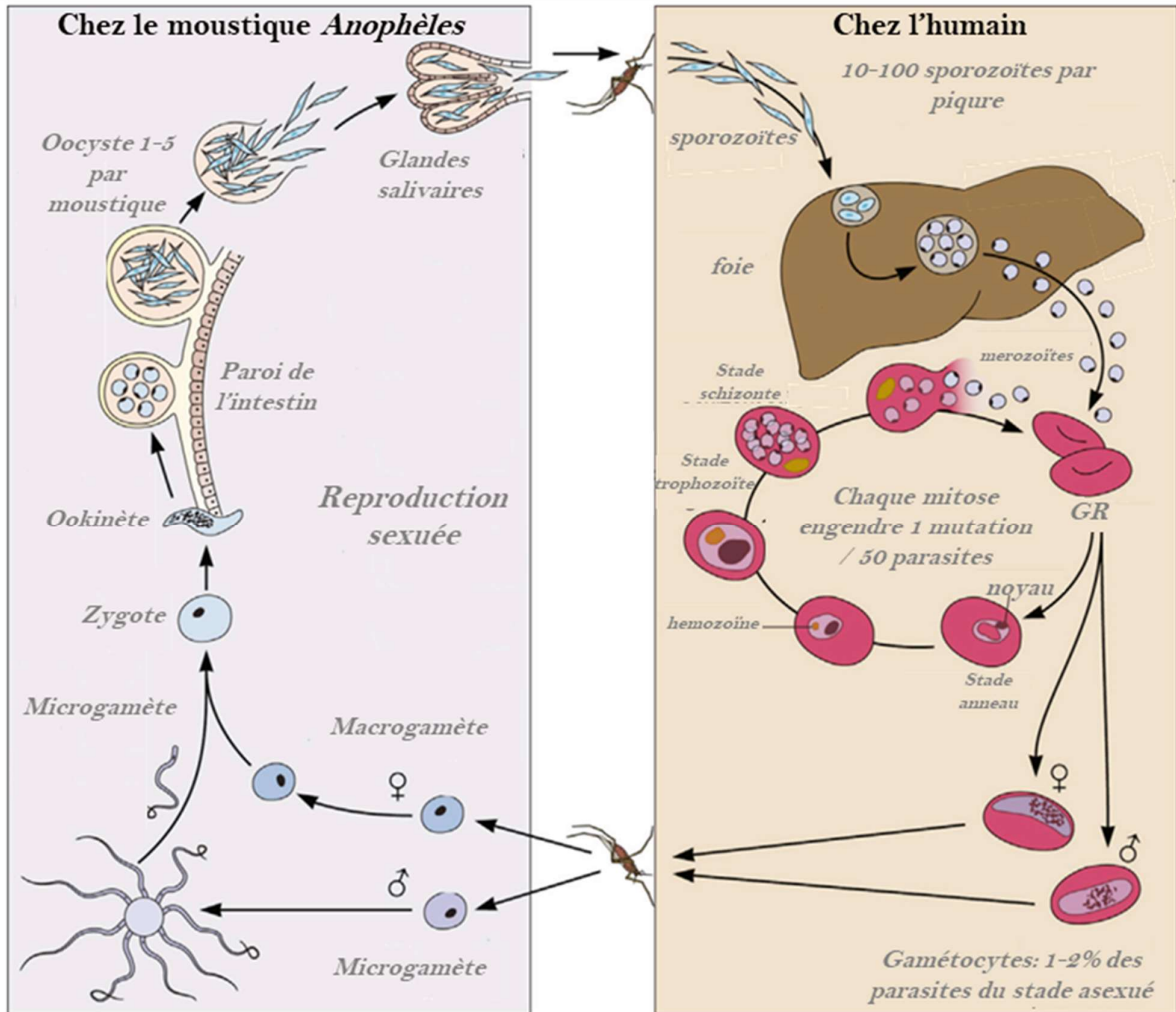


Figure 3. Cycle de vie de *P. falciparum*. Adapté de Ross et Fidock 2019, et de Lee et al., 2014.

### E. Evasion immune et adaptations de l'hôte

Les sporozoïtes injectés chez l'humain sont recouverts de la CSP (circumsporozoïte protein). Certains sont phagocytés par les cellules dendritiques qui présentent l'antigène dans le ganglion lymphatique drainant la peau au niveau du site de pique. Les sporozoïtes qui intègrent la circulation sanguine et atteignent le foie, réussissent une première phase d'évasion immunitaire en inhibant l'expression des gènes codant pour le CMH-I chez les macrophages résidents du foie : les cellules de Kupffer.

Une fois à l'intérieur des globules rouges, les parasites *P. falciparum* modifient la surface de la cellule hôte en exprimant des antigènes de surface (variant surface antigens : VSAs) tels que les protéines PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) et les RIFINs (repetitive interspersed family of polypeptides). Ces protéines sont codées par des gènes de virulence (au nombre de 60, classés en 3 sous-familles A, B et C) qui sont retrouvés dans des régions chromosomiques sub-télomériques et donc à l'origine d'une forte variation antigénique, empêchant ainsi la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte (Saito et al., 2017). Les globules rouges infectés expriment également des protéines d'adhésion parasitaires, ce qui provoque la formation de rosettes, globules rouges infectés



adhérant à deux ou plusieurs globules rouges sains (Adams et al., 2014). Il est aussi possible que ces protéines d'adhésion se lient à des récepteurs tissulaires de l'hôte ce qui empêche la détection et l'élimination des parasites par le système lymphatique.

Chez *P. falciparum*, lors de la lyse de globules rouges, les parasites, associés à l'endotoxine (constituée d'hémozoïne et d'ADN parasitaire) activent la voie TLR9, entraînant la production de TNF- $\alpha$  (Kwiatkowski et al., 1989) et de cytokines pro-inflammatoires: la fièvre est le résultat de la sécrétion de ces médiateurs pro-inflammatoires par les cellules du système immunitaire innée (Gowda et al., 2011).

Les adultes constamment infectés par le paludisme développent une immunité plus durable ; lors de l'infection, l'hôte produit en premier lieu des anticorps IgG circulants dirigés contre des protéines de surface des sporozoïtes, puis lors de la phase érythrocytaire les IgG sont dirigées contre des protéines de surface des mérozoïtes. Cette immunité est rapidement perdue et ne persiste qu'à l'âge adulte après de multiples réinfections et une exposition permanente au parasite (Gomes et al., 2016). Les anticorps produits contre les antigènes de mérozoïtes tels que AMA1 et MSP1 peuvent empêcher l'invasion des globules rouges par différents mécanismes tels que l'activation du complément, la neutralisation ou l'opsono-phagocytose. Les anticorps sont également dirigés contre les antigènes RIFINs, PfEMP1 et STEVORs qui constituent le groupe des antigènes VSA (Variant surface antigens) exprimés à la surface des globules rouges. Grâce à ces anticorps, la formation de rosettes ainsi que la cytoadhérence sont contenus, et les globules rouges infectés peuvent être éliminés (Gonzales et al., 2020).

Le parasite dispose d'un arsenal complémentaire dédié à l'évasion immune. En plus des aspects décrits plus haut, il a récemment été démontré que l'un des mécanismes d'évasion vis-à-vis de l'immunité innée, provenait de l'interaction entre des protéines de *P. falciparum* (VAR2CSA, TM284VAR1, DBLMSP et DBLMSP2) et les IgM humaines. Chacune de ces protéines se lierait aux IgM d'une manière différente et toujours avec une forte affinité (valeur de Kd 7-30 nm) (Ji et al., 2023). Il a de même été démontré que des EMP1 de *P. falciparum* pouvaient se lier aux IgM avec un ratio de 2 :1 (Stevenson et al., 2015; Akhouri et al., 2016). Cette « interception » des IgM place la défense immunitaire humorale en défaut, car les IgM ont pour rôle d'activer la voie du Complément afin de conduire à l'élimination des parasites.

En contrepartie, l'être humain a développé des mécanismes de résistance anti-parasitaire. Chez *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi*, l'infection des réticulocytes nécessite l'expression, par ces cellules, de l'antigène de surface DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines). Cet antigène permet la reconnaissance par le parasite des cellules à infecter. Dans certaines régions d'Afrique de l'ouest et centrale, la prévalence du génotype Duffy négatif protège les populations contre l'infection par ces deux espèces de *Plasmodium* (Howes et al., 2011). De même, certaines hémoglobinopathies telles que la drépanocytose ou les thalassémies protègent les hommes des formes sévères du paludisme au sein des zones endémiques (May et al., 2007; Taylor et al., 2012). Le mécanisme d'action dans le cas de ces mutations peut différer : il a été proposé, par exemple, pour la mutation HBB (mutation du gène codant pour la sous-unité beta de l'Hb), que la moindre concentration en oxygène induite par la mutation affecterait la croissance de *P. falciparum*. De manière générale, il a également été démontré que lors de la présence d'hémoglobine S (HbS – Sickle hemoglobin) les globules rouges étaient plus rapidement retirés de la circulation par des mécanismes immunologiques impliquant notamment la rate, ces cellules seraient également moins sujets à l'adhésion cellulaire dans les phases tardives intra-érythrocytaires, ce qui diminuerait le risque de formes sévères (Uyoga et al., 2022).

## **F. Pathologie**

Si *P. falciparum* reste l'espèce la plus létale pour l'humain, *P. vivax* rejoint progressivement cette première dans sa capacité à causer une infection pouvant être mortelle chez des personnes non immunisées ou peu immunisées (Anstey et al., 2009).

Il est à noter que la sévérité de la maladie dépend, en plus de l'espèce infectante ou de l'immunité de l'hôte, de l'exposition préalable au parasite. Trois classifications existent pour désigner l'infection : asymptomatique, sans complication, ou sévère.

### **1. Le paludisme asymptomatique et sans complications**

Le paludisme, dans sa forme asymptomatique, correspond à la détection de parasites sanguins, sans symptômes de la maladie. Lors d'un accès palustre simple, on observe différents symptômes : de la fièvre, des frissons, des maux de tête, des nausées, des douleurs musculaires, de l'anémie et des symptômes digestifs tels que les vomissements ou des diarrhées. Ces symptômes peuvent évoluer vers une forte fièvre accompagnée d'hyperhidration et d'une très grande fatigue. Dans cette forme, il n'y a pas d'atteinte au niveau du fonctionnement des organes (Phillips et al., 2017).

### **2. Le paludisme sévère**

Le paludisme sévère, ou paludisme avec complications entraîne une anémie aigue, il est associé à une hyperparasitémie et à un risque de décès plus élevé. Le plus fréquemment causé par *P. falciparum*, le paludisme sévère peut aussi être provoqué par *P. vivax* ou *P. knowlesi*. L'anémie devient sévère, une hypoglycémie peut apparaître, et des atteintes du fonctionnement de certains organes : notamment au niveau pulmonaire, rénal ou cérébral (Phillips et al., 2017). Dans ce dernier cas, il s'agit du neuropaludisme qui sera présenté ci-dessous.

### **3. La malaria cérébrale ou neuropaludisme**

*P. falciparum* peut provoquer des complications sévères dont le neuropaludisme aussi appelé malaria cérébrale. Cette pathologie neurovasculaire entraîne un taux de mortalité pouvant atteindre 15-25% (Molyneux et al., 1989; Newton et al., 1998). En effet, contrairement aux bactéries et virus qui infectent le parenchyme cérébral, l'infection par *Plasmodium* peut entraîner des altérations neurologiques liées à des hémorragies causées par un mécanisme différent de celui causé par ces premiers pathogènes, provoquant la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Rénia et al., 2012). Le neuropaludisme est initié par les cellules dendritiques qui présentent des antigènes de surface aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Les macrophages et cellules NK seront activés par les globules rouges infectés, et secréteront des cytokines. L'export de protéines parasitaires telles que EMP-1, parvenues à la membrane du globule rouge provoque la formation de "Knobs", des protubérances de cyto-adhérence entre le globule rouge infecté et les cellules endothéliales du vaisseau sanguin où il circule. Les capillaires sanguins se retrouvent obstrués par les globules rouges infectés ayant subi un raidissement de leur membrane, ainsi que par des plaquettes et des lymphocytes CD8<sup>+</sup> de l'hôte infecté (Barrera et al., 2019; Grau et al., 2003). Les cellules endothéliales sont activées par les cytokines inflammatoires et présentent alors des antigènes parasitaires couplés au CMH-I qui vont se lier aux récepteurs des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. L'apoptose des cellules endothéliales ainsi provoquée, entraîne la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Song et al., 2022).

#### 4. Le paludisme congénital

Le paludisme congénital consiste en la transmission, *via* le placenta de formes asexuées de *Plasmodium*. Ainsi, le parasite sera détecté dans le sang périphérique du nouveau-né durant la première semaine de vie de l'enfant (Loke, 1982).

Malgré une majorité d'infections asymptomatiques ou sans complications, ou le fait qu'en zone d'endémie palustre, l'hémoglobine fœtale (HbF), ou la présence d'anticorps maternels puissent inhiber *in utero* le développement de *P. falciparum* (Shear et al., 1998), les enfants infectés *in utero* naissent le plus souvent avant-terme, possèdent un faible poids, et peuvent présenter des déficits cognitifs et moteurs qui auront de graves conséquences sur leur développement (“World malaria report 2022”).

La gravité du paludisme congénital est liée à l'expression, par le parasite, des antigènes de surface VAR2CSA qui se lient aux récepteurs à protéoglycane Chondroïtine sulfate A (CSA) du placenta. Ceci va déclencher une réaction inflammatoire provoquant des lésions placentaires pouvant conduire à une diminution des échanges materno-fœtaux et à l'hypoxie du fœtus. Ainsi, le plus grand danger pour la mère et le fœtus a lieu lorsque l'infection touche la femme primipare ou faiblement/non-immunisée. Lors des grossesses suivantes, la mère aura développé des anticorps dirigés contre les protéines d'adhésion et contre la VAR2CSA de *Plasmodium* (Malhotra et al., 2009). Dans les cas du paludisme congénital, la mortalité de la mère et de l'enfant est souvent importante, pour cette raison, les femmes enceintes doivent suivre un traitement préventif qui sera présenté plus avant.

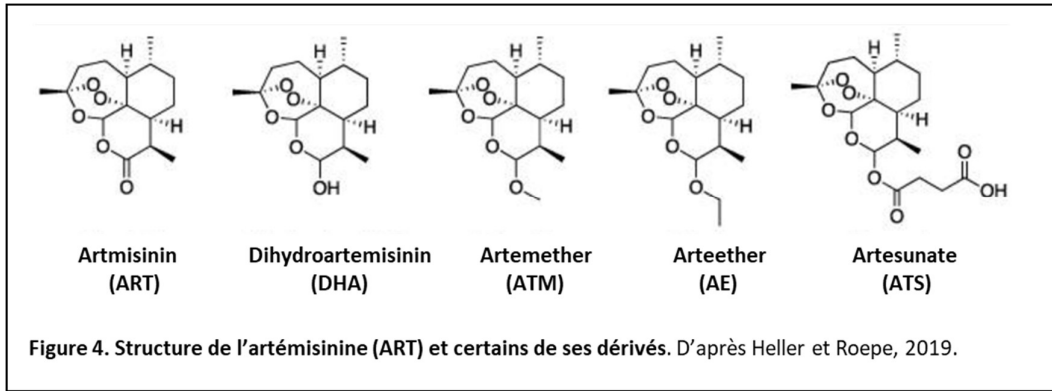
### G. Les traitements contre le paludisme

#### 1. Histoire et évolution des traitements

L'activité anti malarique de la quinine, substance extraite de l'écorce d'un arbre originaire d'Amérique du Sud, du genre *Cinchona*, a été démontrée au XVII<sup>ème</sup> siècle alors qu'elle était utilisée dans la médecine traditionnelle depuis des temps plus reculés.

La chloroquine, synthétisée depuis les années 1930 a progressivement été administrée, suivie de la production de dérivés. Plus récemment, l'artémisinine (ART), extraite d'*Artemisia annua*, une plante de la pharmacopée traditionnelle chinoise a été l'objet de nombreuses études et conduit à son utilisation systématique en traitement des formes sévères du paludisme en Afrique. C'est la Dr. Youyou Tu, lauréate du Prix Nobel en 2015, qui a décrit son procédé d'extraction et prouvé l'efficacité de l'artémisinine contre le paludisme dès les années 1970 (Tu, 1999), mais des preuves d'utilisation de la plante remontent à 340 ans J.-C. dans le traitement des fièvres cycliques (Ross and Fidock, 2019).

L'ART est le métabolite le plus actif de *Artemisia annua* et a permis de développer plusieurs dérivés (figure 4 - Heller and Roepe, 2019) : la DHA (Dihydro-artémisinine) ; l'artémether, une version lipophile de l'ART; l'artésunate, soluble dans l'eau, et l'artémisone qui présente une toxicité moindre et une demi-vie plus longue que l'ART. C'est l'artésunate, composé présentant une plus grande efficacité et une meilleure tolérance, qui est majoritairement utilisé en traitement de première ligne parmi les différents ACT disponibles (Crespo-Ortiz and Wei, 2012).



L'ART et ses dérivés seraient rendus actifs par des ions  $Fe^{2+}$  qui proviendraient de la digestion de l'Hb par le parasite. Ces formes réagiraient avec des composants cellulaires nucléophiles conduisant à leur déstructuration. Le parasite activerait donc la réponse UPR (Unfolded protein response) entraînant une dégradation massive de ses protéines via le complexe du protéasome 26S, ce qui sera présenté en 3<sup>ème</sup> partie de cette introduction. Cette dégradation protéique importante entraîne la mort du parasite (Tilley et al., 2016).

## 2. Traitements actuels

Le tableau suivant (Tableau I) récapitule les différents traitements utilisés pour lutter contre les infections à *Plasmodium* chez l'humain, ainsi que la classe chimique à laquelle ils appartiennent et les mutations génétiques associées aux résistances, que nous aborderons dans la prochaine partie.

Anti-malarique	Voie ciblée	Mutation génétique associée à la résistance
<b>Endoperoxydes</b>		
Artemisinins (ARTs): artesunate (AS), artemether (ATM), dihydroartemisinin (DHA)	Pleiotropic; triggers parasite stress response. Alkylates and oxidized heme, multiple proteins, and lipids	Mutations in <i>k13</i>
<b>4-aminoquinolines</b>		
Chloroquine (CQ)	Heme detoxification in digestive vacuole	Mutations in <i>pfcr1</i> and <i>pfmdr1</i>
Amodiaquine (AQ)	Heme detoxification in digestive vacuole	Mutations in <i>pfcr1</i> and <i>pfmdr1</i>
Piperaquine (PPQ)	Heme detoxification in digestive vacuole	<i>plasmepsin II and III</i> amplification, <i>pfcr1</i> mutations
Pyronaridine (PND)	Heme detoxification in digestive vacuole	None observed
<b>Aryl-amino alcools</b>		
Quinine (QN)	Might include inhibition of hemoglobin import and/or heme detoxification	<i>pfcr1</i> (QN), <i>pfmdr1</i> amplification and sequence (LMF and MFQ)
Lumefantrine (LMF)	Might include inhibition of hemoglobin import and/or heme detoxification	<i>pfcr1</i> (QN), <i>pfmdr1</i> amplification and sequence (LMF and MFQ)
Mefloquine (MFQ)	Might include inhibition of hemoglobin import and/or heme detoxification	<i>pfcr1</i> (QN), <i>pfmdr1</i> amplification and sequence (LMF and MFQ)
<b>Anti-folates</b>		
Pyrimethamine (PYR) + Sulfadoxine (SDX)	Folate biosynthesis in parasite cytosol	Mutations in <i>dhfr</i> and <i>dhps</i>
Proguanil (PG)	Folate biosynthesis in parasite cytosol	Mutations in <i>dhfr</i> and <i>dhps</i>
<b>Naphtoquinones</b>		
Atovaquone (ATQ)	Mitochondrial electron transport chain required for pyrimidine biosynthesis	Mutation(s) in <i>cytb</i>
<b>8-aminoquinolines</b>		
Primaquine (PQ)	Unknown	None observed
Tafenoquine	Unknown	None observed

**Tableau I. Différentes familles de molécules utilisées pour traiter les infections à *Plasmodium*.** D'après "Antimalarial Drugs and Associated Markers of Resistance in *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stage Parasites". World Malaria Report 2022.

Dans la région OMS Africaine (WHO African Region) où se trouve la plus forte incidence des infections par *P. falciparum*, le traitement de première ligne se compose de traitements par ACT avec les combinaisons artemether-lumefantrine (AL), artesunate-amodiaquine (AS-AQ), artesunate-pyronaridine (AS-PY) ou dihydro-artémisinine-piperaquine (DHA-PPQ). Parallèlement, l'utilisation du traitement préventif intermittent du paludisme (TPIp) par sulfadoxine-pyriméthamine (SP) dans les zones de transmission modérée à élevée du paludisme à *P. falciparum* reste fortement recommandée.

Dans d'autres régions du monde et pour les infections plasmodiales autres que rattachées à *P. falciparum*, la chloroquine continue d'être largement utilisée : son efficacité, associée à son innocuité et à son faible coût, octroie une place durable à ce traitement (Phillips et al., 2017).

Trois strates sont évaluées pour déterminer le choix d'un traitement lors d'une infection à *Plasmodium* : En premier lieu : les préconisations de l'OMS pour le traitement du paludisme établies selon des études d'efficacité thérapeutique TES (Therapeutic Efficacy Studies) conduite dans la région.

Pour donner un exemple, en région WHO Est-Méditerranéenne, entre 2015 et 2021, 36 TES comportant 20 patients chacune, ont été conduites et ont démontré, pour 2 TES en Somalie et au Soudan, un échec des traitements artesunate + sulfadoxine-pyriméthamine (AS+SP) supérieur à 10%. Ceci a modifié la préconisation pour ces deux pays : le traitement AS+SP a ainsi été substitué par un traitement de première ligne avec artemether-lumefantrine (AL).

La deuxième strate comporte la notion de « case management » (gestion des cas) qui comprend la prise en compte de la grossesse ou de l'âge du patient à traiter. Ainsi, l'utilisation du traitement préventif intermittent du paludisme pendant la grossesse (TPIp) est désormais recommandée pour la totalité des femmes enceintes en zone endémique, indifféremment du nombre de grossesses passées (WHO report 2022).

Enfin, la troisième strate comprend la prise en compte de la sévérité de l'infection et du risque de rechute : dans le cas d'infection par *P. vivax* et *P. ovale*, un traitement ACT est administré pour l'infection aiguë, complété avec un traitement par tafénoquine, autorisée par la FDA en 2018 (Haston, 2019) ou par primaquine (utilisée jusqu'alors), molécules faisant toutes deux partie de la famille des 8-aminoquinolines et permettant l'élimination des hypnozoïtes (antirelapse therapy). Seules les femmes enceintes ne peuvent recevoir de traitement par primaquine ni par tétracyclines (WHO Guidelines for Malaria 31 March 2022 - "WHO Guidelines for malaria")

D'autre part, les voyageurs se rendant en Afrique, notamment dans les zones endémiques, sont encouragés à suivre un traitement chimio-prophylactique qui consiste en la prise de l'un des quatre médicaments suivants comme recommandé par l'Institut Pasteur ("Recommandations générales," 2016):

- la chloroquine (Nivaquine ®100) : chez les individus pesant plus de 50 kg (à proscrire chez les femmes enceintes).
- Une association atovaquone (250 mg) - proguanil (100 mg) (Malarone®) qui peut être distribuée chez les individus pesant plus de 40 kg. Cette association est également à éviter chez les femmes enceintes.
- la méfloquine (Lariam® 250) qui peut être distribuée chez des personnes de plus de 45 kg ainsi que chez les femmes enceintes, avec un suivi des effets indésirables possibles.

- Le monohydrate ou l'hyclate de Doxycycline, un antibiotique (dont le mécanisme d'action est l'interférence avec le métabolisme de l'apicoplaste), mais qui est contre-indiqué avant l'âge de 8 ans, ainsi que durant la grossesse.

### 3. Les résistances aux traitements antipaludiques

L'apparition de souches résistantes aux traitements par chloroquine a eu lieu dans les années 1950. Comme pour les résistances à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), l'artémisinine (ART), la pipéraquline (PPQ) et la méfloquine (MFQ), ces résistances sont apparues en Asie du Sud Est puis se sont propagées en Afrique. Différents facteurs expliquent l'apparition de ces résistances, l'un étant le faible taux d'infection dans ces pays ou régions que sont le Sud de la Chine, le Cambodge, le Vietnam, le Laos, la Thaïlande et la Birmanie. Les populations développent ainsi une immunité moins robuste que dans les régions d'Afrique endémiques, entraînant un recours aux traitements plus fréquent. La pression médicamenteuse exerce ainsi une forte pression de sélection sur les parasites (Ross and Fidock, 2019). C'est ainsi que le parasite *Plasmodium* a développé 4 mécanismes de résistance différents :

- élimination ou séquestration du composé par le parasite,
- détoxification du composé,
- mutation de la cible,
- survie basé sur des mécanismes de réponse au stress (Ross and Fidock, 2019).

### 4. Les résistances aux ACT

Le traitement de la majorité des cas de paludisme en Afrique s'opère via des dérivés de l'ART tels que l'AS, la DHA, ou l'ATM. Le talon d'Achille de ces traitements est leur faible demi-vie plasmatique qui est estimée à 1 - 2 heures (White, 1997). Ceci contraint à les associer avec des composés partenaires, devenant ainsi les combinaisons que nous connaissons sous la dénomination d'ACT. Le temps de persistance est ainsi augmenté, mais après l'élimination des dérivés de l'ART, le patient se retrouve en monothérapie, ce qui accroît les chances de développer une résistance (Ross and Fidock, 2019).

Ce sont des mutations de la protéine parasitaire Kelch 13 (K13) qui sont responsables de la résistance du parasite aux dérivés d'ART. Cette protéine joue un rôle dans l'endocytose de l'hémoglobine. Sa mutation ralentirait l'endocytose de l'Hb, ce qui diminuerait l'activation de l'artémisinine, entraînant ainsi la survie du parasite lors des phases précoces de l'infection (Xie et al., 2020). Chez *P. falciparum*, Pfk13 est partiellement localisée dans le réticulum endoplasmique et elle est exprimée à tous les stades du cycle intra érythrocytaire asexué ainsi que dans les gamétocytes (Siddiqui et al., 2020). Cette résistance dépendante de Kelch13 serait reliée au système UPR (Mok et al., 2015) en faisant intervenir les ligases E3, la protéine K13 pouvant jouer le rôle d'adaptatrice des ligases E3 (Liu et al., 2016).

Par ailleurs, des analyses de transcriptomique ont démontré que les parasites résistants à l'ART augmentaient l'expression des sous-unités  $\beta$  du complexe 20S, ainsi que des protéines appartenant aux complexes de protéines chaperonnes PROSC (*Plasmodium* reactive oxidative stress complex) et TRiC (T-complex protein-1 Ring Complex) (Mok et al., 2015).

Lors de l'exposition aux ACT, il a également été observé que les parasites résistants avaient recours au stade quiescent (Witkowski et al. 2010), ceci leur permettant de réduire leur métabolisme, diminuant ainsi les dommages cellulaires induits par les ACT (Paloque et al., 2016). Après l'élimination de l'ART, l'activité de l'apicoplaste et de la mitochondrie, maintenue durant le traitement aux ACT, permettrait au parasite de reprendre le cours du cycle cellulaire.

## **5. D'autres résistances**

La Chloroquine (CQ) fait partie de la famille des 4-aminoquinolines et son mécanisme d'action est d'interférer avec le processus de détoxification de l'hème. Ainsi, la résistance à la CQ serait majoritairement liée à des mutations sur le gène PfCRT, codant pour une protéine à 10 domaines transmembranaires, localisée au niveau de la membrane de la vacuole digestive. Ces mutations confèrent à PfCRT la capacité à évacuer la CQ de la vacuole digestive (Summers et al., 2012).

Les résistances aux 4-aminoquinolines et aux aryl-amino-alcools sont dépendantes de mutations affectant les protéines PfCRT ou PfMDR1. Cette dernière est un transporteur membranaire de la famille ABC (ATP-binding cassette transporter), localisé au niveau la vacuole digestive. Sur ce transporteur, différentes mutations font varier le niveau de résistance parasitaire (Veiga et al., 2016).

Parmi les 4-amino-quinolines, des résistances à la PPQ sont également apparues à travers des mutations sur les plasmepsins II and III codant pour des hémoglobinasés, des protéines qui digèrent l'hémoglobine (Amato et al., 2017; Witkowski et al., 2017).

Des mutations ponctuelles sur les gènes de la DHFR (dihydrofolate reductase) ou de la DHPS (dihydroptéroate synthase) sont responsables des résistances aux antifolates PYR, SDX et PG (Gregson and Plowe, 2005).

Pour les naphthoquinones dont fait partie l'ATQ, les mutations conférant la résistance sont portées par le cytochrome b. Il y a donc inhibition de la chaîne de transports d'électrons, ce qui confère la résistance à ce composé. Ces mutations ne seraient pas transmissibles naturellement car se faisant, chez le moustique, au détriment du cycle sexué du parasite (Goodman et al., 2016).

## **6. La résistance aux insecticides**

Quatre grandes classes d'insecticides sont utilisés pour lutter contre les moustiques, il s'agit des pyréthrinoïdes, des organochlorés, des organophosphorés et des carbamates. Des résistances ont commencé à apparaître dans les années 1950 en Afrique, les moustiques développant différents types de résistances. Les moustiques peuvent, le plus fréquemment, présenter une résistance métabolique (par la dégradation enzymatique des molécules insecticides), une résistance envers la cible (en modifiant la cible contre laquelle sont dirigées les molécules insecticides), une résistance cuticulaire (empêchant l'insecticide de pénétrer dans l'organisme), ou une résistance comportementale (les moustiques évitent de se poser sur les surfaces traitées (Suh et al., 2023).



## 7. Développement de nouveaux traitements

La recherche de nouvelles molécules doit se poursuivre car une multirésistance quasi-totale aux traitements actuels a pu être développée par *P. falciparum* dans certaines régions en Asie du Sud-Est (Hamilton et al., 2019; Ménard et al., 2013).

Le tableau II récapitule les molécules en cours d'étude translationnelle pour le traitement du paludisme. Parmi ces composés listés dans le dernier rapport de l'OMS ("World malaria report 2022"), seuls deux réduiraient efficacement la transmission chez le moustique : le MMV183 et le MMV609. Le MMV183 est un composé qui inhibe l'acétyl-CoA synthétase, et le composé MMV609 bloque la PfATP4, une pompe à efflux de cations dont le rôle est de maintenir l'homéostasie Na<sup>+</sup> chez le parasite ("MMV's pipeline of antimalarial drugs"). D'autres composés ont pu rejoindre cette liste : M5717-pyronaridine, Ganaplacide-lumefantrine et Cipargamine présentés plus loin.

Il existe à ce jour 7 produits en phase de développement pour traiter le stade intra-érythrocytaire parmi lesquels nous retrouvons 3 dérivés d'artémisinine utilisés sous forme d'ACT, et 4 produits dont la cible est identifiée ou pas. Parmi ces 4 candidats, seule la Cipargamine agirait sur les formes sévères de paludisme :

M5717-pyronaridine : Le M5717 est un inhibiteur de PFEF2 et la pyronaridine perturbe le système de digestion parasitaire en modifiant les vacuoles et en inhibant la dégradation de l'hème.

Ganaplacide-lumefantrine (Novartis) : la cible du ganaplacide n'est pas encore élucidée mais ce composé interviendrait dans le système de sécrétion protéique, il est associé à la lumefantrine qui inhibe la conversion de l'hème en hemozoin.

Cipargamin (Novartis) : ce composé inhiberait la protéine PfATP4.

ZY19489-ferroquine : ZY19489 est une nouvelle classe d'inhibiteurs dont le mode d'action est inconnu, associé à la FQ inhibant la détoxification de l'hème.

La recherche de traitements par chimiothérapie est intéressante car ces traitements possèdent le double avantage de n'être pas soumis aux contraintes liées à la chaîne du froid comme pour les vaccins (vaccin inactivé ou composé de protéines recombinantes), et ils permettent également de s'exonérer de ce qui est propre au vaccin à savoir la spécificité liée à l'espèce ou à la souche de *Plasmodium* infectante. Ces éléments rendent l'administration de ces traitements en théorie plus efficace et moins coûteuse. Ces composés peuvent pour certains être qualifiés de « vaccins chimiques » car ils diminuent la charge parasitaire et, *in extenso*, ils diminueraient la transmission vers le moustique (Antonova-Koch et al., 2018). Cependant, il ne faut pas perdre de vue qu'à ce jour, la plupart des composés sont inactifs contre les gamétocytes : cela est notamment dû à la différenciation très nette qui s'opère lors du passage du stade intra-érythrocytaire aux gamétocytes : les gamétocytes en stades I à IV sont séquestrés dans la moelle osseuse et dans la rate jusqu'à maturation finale. Lors du stade V ils circulent dans le système sanguin périphérique plusieurs semaines, c'est pendant cette période qu'ils infectent les moustiques (van der Watt et al., 2022).

Différentes stratégies sont utilisées pour identifier de nouvelles molécules et parmi celles-ci, des études bioinformatiques permettent souvent de réaliser un criblage initial de grande ampleur pouvant ensuite être affiné par des études *in situ*. Par exemple, une étude de grande ampleur réalisée sur deux ans, avec un screening initial de 500,000 composés a démontré que la plus grande partie des composés efficaces agissaient sur le stade hépatocytaire et ne présentaient pas ou peu d'activité sur le stade érythrocytaire

(Antonova-Koch et al., 2018). Après un criblage, les molécules présentant le plus d'activité et le moins de toxicité ont été testées sur *P. berghei*, puis sur *P. vivax* ou *P. falciparum*. Il est intéressant de noter qu'à la suite de ces tests sur *P. falciparum*, 10 des 13 hits les plus efficaces étaient liés à la voie mitochondriale de transport d'électrons.

Molécules en développement pour le traitement du Paludisme	
Molécule	Description
MMV533	A highly potent compound against <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i> strains, although its mechanism of action is unknown. It demonstrates no cross-resistance and is unable to select for resistant mutants in vitro. It has a long half-life in humans, and a predicted low human dose which together with the fast-killing parasite activity are desirable attributes for a single-dose regimen. It has completed a Phase 1 first-in-human and controlled human malaria infection study.
INE963	A fast-killing compound that is highly potent against <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i> strains, although its mechanism of action is unknown. It demonstrates no cross-resistance and is unable to select for resistant mutants in vitro. It has a moderate half-life in humans. The molecule is currently being evaluated in a Phase 1 first-in-human study.
GSK701	A compound with a novel mechanism of action and fast-killing parasite activity, highly potent only against <i>P. falciparum</i> strains, with a predicted low human dose. It has a short half-life and is currently being evaluated in a Phase 1 first-in-human study.
MMV183	A compound with a low predicted human dose, a short to moderate half-life, and no pre-existing resistance or resistance generation in vitro. The very high solubility together with fast-killing activity make it an attractive candidate for use in severe malaria as an injectable formulation. It also has demonstrated transmission-blocking activity. It is currently in preclinical development.
GSK484	A fast-killing compound with a predicted long half-life and low human dose – attributes that, if confirmed in humans, make it an attractive candidate for a single-dose regimen. No resistant parasite strains have been identified in the laboratory. It is currently in preclinical development.
IWY357	A compound with a predicted low human dose and long half-life. It is fast killing and demonstrates no ability to select resistant mutants in vitro. It is currently in preclinical development.
MMV609	A compound that shares the same mechanism of action as cipargamin. It is a fast-killing compound, with a predicted low human dose and long half-life. It has demonstrated transmission-blocking activity. It is currently in preclinical development.

Tableau II. Liste des molécules en développement pour le traitement du Paludisme. Adaptée de « list and description of candidate molecules for malaria therapy in early development ». World Malaria Report 2022.

## H. Les vaccins

Aujourd'hui ce sont les vaccins développés contre les sporozoïtes qui sont les plus avancés en termes de recherche clinique. Le RTS,S/AS01 de GSK a reçu l'accord de préqualification par l'OMS en Juillet 2022 pour son utilisation chez les enfants dans les régions de transmission modérée à élevée en Afrique sub-Saharienne. Un mois après, l'UNICEF (United Nations Children's Fund) annonçait la commande de 18 millions de doses sur trois ans (2023–2025). La vaccination de 1.2 millions d'enfants au Ghana, Kenya et Malawi, a permis d'évaluer les effets positifs de cette vaccination qui va prochainement être étendue dans de nouvelles régions d'Afrique ("World malaria report 2022").

Le cout unitaire de ce vaccin est estimé actuellement à 9.30 € / dose. Le rapport WHO de 2022 rappelle que pour diminuer ce prix, deux stratégies doivent être employées : d'une part l'augmentation des approvisionnements de manière significative, et d'autre part le recours à d'autres vaccins ("World malaria report 2022").

## 1. Le vaccin RTS,S/AS01

Ce vaccin, de l'entreprise GSK, aussi appelé Mosquirix, a reçu un avis favorable de l'Agence Européenne des Médicaments en juillet 2015, il est administré par voie intramusculaire dès l'âge de 5 mois avec un schéma vaccinal de quatre doses dont les trois premières sont espacées d'un mois, et la dernière de 15 à 18 mois (Vandoolaeghe and Schuerman, 2018). Il déclenche la production d'anticorps contre la CSP (protéine circumsporozoïte) et protège également contre l'hépatite B. Il est composé d'une portion de la CSP fusionnée avec l'antigène S de surface du virus de l'hépatite B. Il est administré sous forme de VLP (non-infectious virus-like particles) produites en levure (*S. cerevisiae*) par la technologie de l'ADN recombinant. Son adjuvant, propriété de l'entreprise GSK, est composé de la fraction 21 de *Quillaja saponaria* Molina (un agoniste de TLR4 qui déclenche une réponse TH1 et stimule la production de cellules T cytotoxiques), et de MPL (3-Odesacyl-4'- monophosphoryl lipid A) un autre agoniste de TLR4.

Les essais cliniques de phase III ont été conduits dans 7 pays d'Afrique sub-Saharienne avec la vaccination de plus de 6 000 nourrissons âgés de 6-12 semaines et presque 9000 enfants âgés de 5-17 mois (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015): après un suivi sur 48 mois, l'efficacité vaccinale était de 40% envers les formes sans complications et de 30% envers les formes sévères chez les enfants ayant reçu la 4ème dose ("World malaria report 2021"). L'OMS a recommandé ce vaccin et son administration a débuté en 2021 dans trois pays d'Afrique (Ghana, Kenya et Malawi) (Syed, 2022).

## 2. Un candidat vaccin prometteur : le R21/MM

Ce vaccin est composé de R21 (produit en partenariat entre l'Université de Oxford et le Serum Institute of India) qui est également un assemblage de particules virales recombinantes (VLP) HBsAg produites chez la levure *Hansenula polymorpha*. Ces VLP contiennent la séquence Central-Repeat ainsi que la séquence C-terminale de la CSP de *P. falciparum* fusionnées à la partie N-terminale de HBsAg. Son adjuvant est le M-Matrix (MM), composé de saponine produit par Novavax (Uppsala, Sweden). Il ne contient pas de monophosphoryl lipid A ce qui le rend moins difficile et moins coûteux à produire que le vaccin RTS,S/AS01. Ce vaccin est administré par voie intramusculaire en trois doses chez des enfants de 5 à 17 mois. Après des essais cliniques de phase II où trois doses étaient administrées, l'efficacité vaccinale est de 74 % à 77% en fonction de la dose d'adjuvant utilisée, ce qui le place en tête des espoirs des alternatives vaccinales en phase d'essais cliniques (Datoo et al., 2022).

## 3. Vaccins en cours de développement

Certains vaccins ciblant le cycle érythrocytaire n'ont pas pu poursuivre leur développement car la production d'anticorps était insuffisante : la protection était lente à se mettre en place, elle était limitée dans le temps sans réexposition, ce à quoi s'ajoutait la variabilité des cibles antigéniques entraînant une réponse souche-dépendante.

Néanmoins, de nouveaux candidats vaccins sont actuellement en phases d'essais cliniques et listés en Tableau III. La plupart ciblent le parasite avant son arrivée dans le foie. On retrouve le vaccin R21/MM détaillé ci-dessus, celui-ci étant le plus avancé parmi tous les candidats. D'autres vaccins, actuellement en cours d'essais cliniques, ciblent des stades plus tardifs, ou sont dirigés contre *P. vivax*. D'autres vaccins visent aussi à protéger les femmes enceintes d'une contamination par *Plasmodium* en ciblant des antigènes VAR2CSA ("World malaria report 2022").

Il est intéressant de citer également le candidat vaccin PfSPZ-CVac qui emploie une stratégie différente. Ce vaccin chimio-atténué est composé de sporozoïtes de *P. falciparum* purifiés, cryo-préservés, et atténués par radiation. Ce vaccin peut désormais être produit *in vitro* (Eappen et al., 2022) et se trouve à présent en phase d'essais cliniques. Il a déjà été testé sur plus de 2000 personnes dans 6 pays d'Afrique, ainsi qu'en Asie, Etats Unis et Europe. PfSPZ-CVac protégerait à 100%, trois mois après l'injection (Mwakingwe-Omari et al., 2021). Des questions subsistent néanmoins quant aux améliorations souhaitées en termes de pureté, qualité, protection durable, immunogénicité chez l'homme (Eappen et al., 2022).

Stade pré-érythrocytaire
<p><b><i>P. falciparum</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ WHO recommended and prequalified - RTS,S/AS01 (circumsporozoïte protein)</li> <li>■ Phase 3 – R21/MatrixM (circumsporozoïte protein)</li> <li>■ Phase 2 – PfSPZ Vaccine (whole sporozoïte); PfSPZ-CVac (PfSPZ challenge under chemoprophylaxis)</li> <li>■ Phase 1 – VLPM01 (virus-like particle); rCSP/AP10-602 (circumsporozoïte protein); PfGAP3-KO (genetically attenuated whole sporozoïte); FMP013 and FMP014 (self-assembling nanoparticles); PfSPZ-GA1 (genetically attenuated whole sporozoïte); DNA-ChAd63 PfCSP (heterologous prime-boost)</li> </ul> <p><b><i>P. vivax</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Phase 2 – PvCSP (circumsporozoïte protein); PvSPZ (whole sporozoïte)</li> </ul>
Stade érythrocytaire
<p><b><i>P. falciparum</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Phase 2 – Rh5 (reticulocyte binding protein)</li> <li>■ Phase 1 – BK-SE36 (PfSERA5 antigen)</li> </ul> <p><b><i>P. vivax</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Phase 2 – PvDBP (Duffy-binding protein); Pf7G8 (chemically attenuated whole parasite); DNA-ChAd63 PfCSP PfAMA1 ME-TRAP (heterologous prime-boost)</li> </ul>
Stade sexué, sporogonie ou chez le moustique
<p><b><i>P. falciparum</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Phase 2 – Pfs230D1M-EPA/AS01B (pre-fertilization); Pfs25M-EPA/AS01B (post-fertilization)</li> <li>■ Phase 1 – Pfs25-IMX313/MatrixM (post-fertilization)</li> </ul> <p><b><i>P. vivax</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Phase 1 – Pvs25-IMX313/MatrixM (post-fertilization)</li> </ul>
Paludisme lors de la grossesse – ciblage des antigènes VAR2CSA
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Phase 1 – PRIMVAC; PAMVAC</li> </ul>

**Tableau III. Liste des vaccins approuvés ou en cours d'essais cliniques indiquant le stade parasitaire ciblé.** Figure adaptée de « The malaria vaccines currently in clinical development target various stages of the parasite life cycle, including the pre-erythrocytic stage (targeting sporozoïte or liver stage antigens), the blood stage, and the sexual, sporogonic or mosquito stage (targeting pre-fertilization gametocytes/gametes or postfertilization zygotes/oocinetes)”. World Malaria Report 2022

La vaccinologie inversée (« Reverse vaccinology ») est une autre stratégie de recherche qui consiste en la production de protéines de *Plasmodium*, comme celles qui sont cruciales aux processus d'invasion parasitaire. Ces protéines sont injectées à des lapins ou des souris et s'ensuit alors l'étude des anticorps produits par les animaux en réponse à ces injections. Les chercheurs peuvent ensuite comparer ces anticorps aux banques de données d'Ac produits chez des habitants des zones endémiques. Selon les résultats obtenus, l'objectif est de produire la protéine ou le fragment de protéine à même de déclencher une réponse immunitaire robuste et protectrice (“How ‘reverse vaccinology’ is identifying targets for a new malaria vaccine”).

Il n'est pas possible d'évoquer les vaccins sans mentionner les vaccins à ARNm, dont l'engouement est relié à leur rôle lors de la pandémie de COVID19. Ces vaccins sont composés de simples brins d'acides nucléiques codant pour un gène d'intérêt emboîté entre des séquences régulant la traduction (UTRs) ou jouant un rôle dans la stabilité de l'ARN (queue polyA de 250 à 300 résidus Adénosine). Le gène d'intérêt est intégré dans un plasmide que l'on utilise pour transformer des bactéries *E. coli*. Ces bactéries permettent d'amplifier les plasmides qui sont ensuite purifiés puis linéarisés à l'aide d'enzymes de restrictions. S'ensuit la transcription de l'ARNm en présence d'une enzyme RNA polymérase. Une étape de « capping » en 5' complète le processus pour la reconnaissance de l'ARNm (portant une 2'O méthylation) comme faisant partie du soi, ce qui permet sa traduction (Matarazzo and Bettencourt, 2023; Ramanathan et al., 2016).

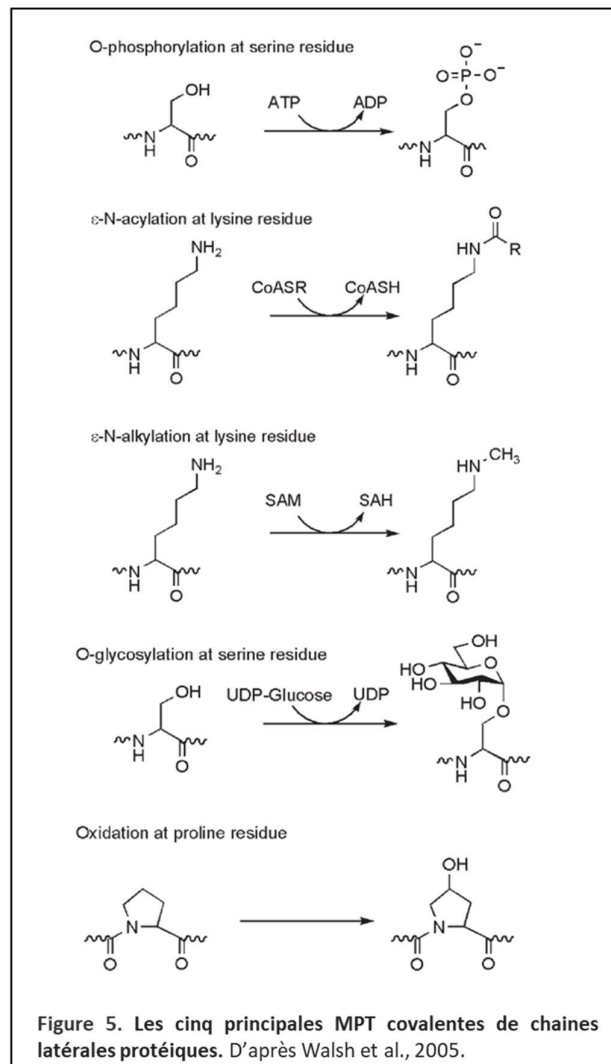
Cette stratégie de vaccin a ARNm a été développée en utilisant la protéine CSP comme cible. Ainsi, le 23 décembre 2022, l'entreprise BioNTech a édité un communiqué sur le déploiement d'essais cliniques de phase I pour le programme vaccinal contre le Paludisme appelé BNT165 dont le premier candidat est le BNT165b1 codant pour différentes régions de la protéine CSP ("BioNTech Initiates Phase 1 Clinical Trial for Malaria Vaccine Program BNT165").

La transmission du paludisme est influencée par différents facteurs. Parmi ceux-ci, l'accès aux soins et les migrations humaines jouent un rôle considérable. La température et l'humidité ont également une influence sur la reproduction et les comportements des moustiques, et le réchauffement climatique risque d'amplifier les zones de propagations des espèces d'*Anopheles* (Nordling, 2023). En 2015, les états membres de l'OMS adoptaient une stratégie de réduction de la mortalité et de l'incidence du paludisme de 90% au niveau mondial pour l'année 2030. Ce défi semble encore loin d'atteinte : il impliquerait une augmentation substantielle des fonds alloués pour combattre la maladie, une somme initialement estimée à 7.3 milliards de dollars pour l'atteinte des objectifs de 2030 (Hodson, 2023). La poursuite des efforts de recherche est donc indispensable afin de continuer à décrypter la biologie du parasite pour mieux comprendre les différents mécanismes essentiels à sa survie.

Ce travail de thèse interroge le rôle de la protéine Rpt3 qui est l'un des composants régulateurs du protéasome 26S. Cette enzyme a été identifiée suite à mes travaux comme étant une protéine régulatrice activatrice de la Protéine Phosphatase 1 (PP1). Avant cela, d'autres auteurs avaient déjà mis en évidence que certains régulateurs de PP1, jouaient un rôle aussi important que l'enzyme elle-même chez les parasites Apicomplexa (Daher et al., 2006; Deveuve et al., 2017; Fréville et al., 2013, 2012; Tellier et al., 2016). La seconde partie de cette introduction sera donc consacrée à la présentation des mécanismes de phosphorylation et la troisième partie abordera la dégradation ciblée des protéines par le complexe du protéasome chez *Plasmodium*.

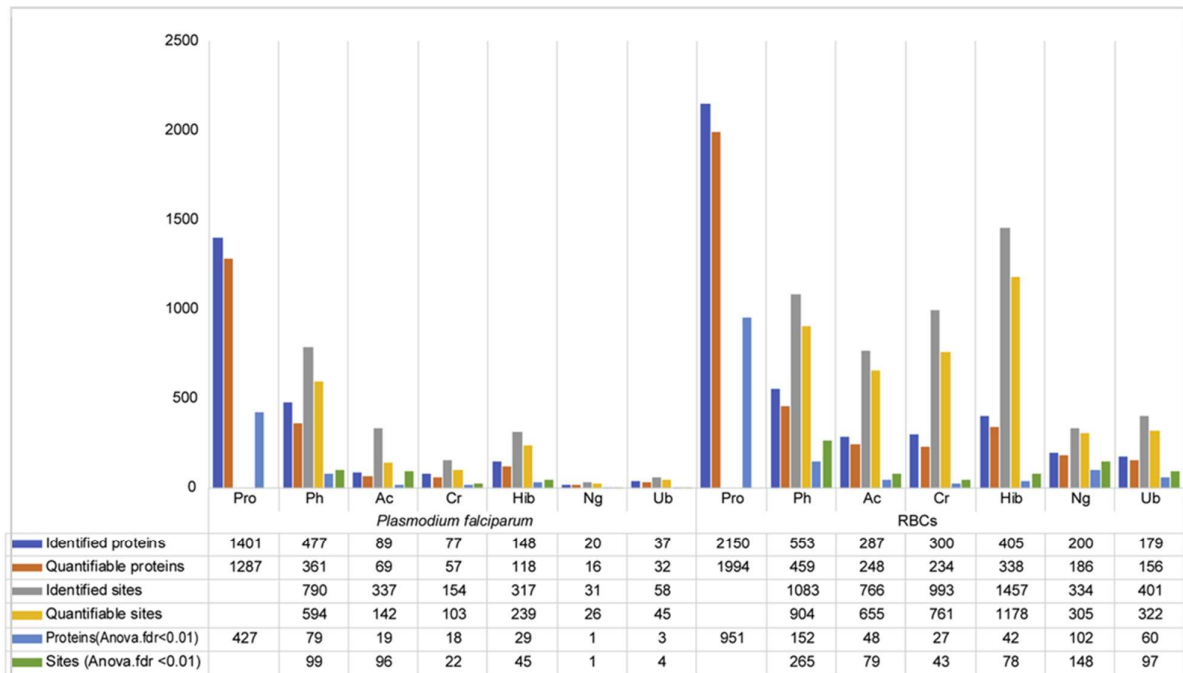
## **II. La phosphorylation réversible des protéines : un mécanisme essentiel au développement du parasite**

Chez les eucaryotes supérieurs jusqu'à 5% du génome coderait pour des protéines intervenant dans des mécanismes de régulation liés aux MPT (modifications post-traductionnelles) et chez les eucaryotes de manière générale, la phosphorylation réversible est l'un des mécanismes majeurs intervenant dans la transduction des signaux intracellulaires (Aggen et al., 2000). Les cinq MPT covalentes majeures sont présentées dans la figure 5 ci-dessous (Walsh et al., 2005).



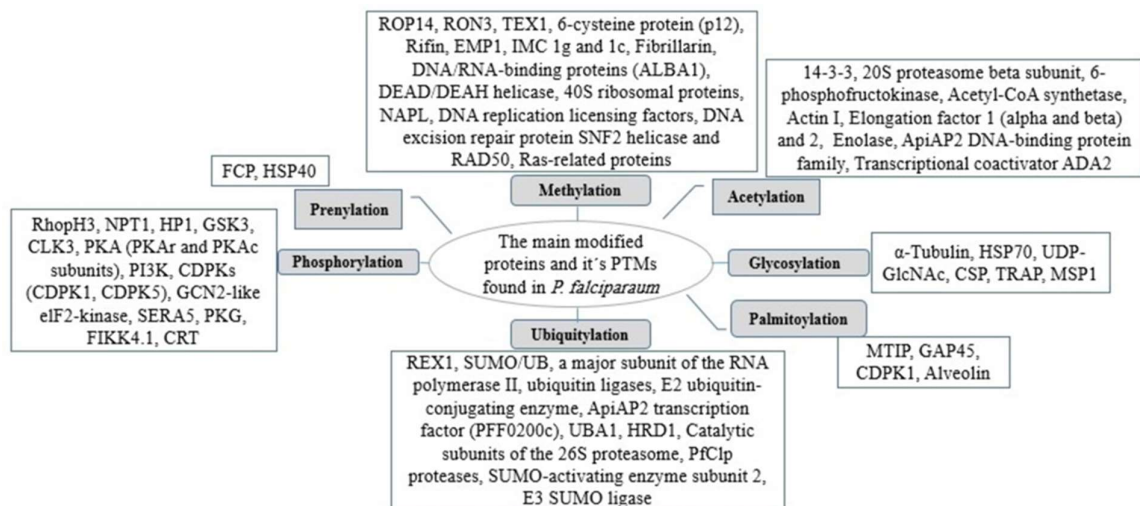
La croissance et la division rapides de *Plasmodium*, associées à son cycle de vie complexe, impliquent que le parasite emploie des mécanismes de régulation finement orchestrés. C'est la combinaison de plusieurs niveaux de contrôle, allant du contrôle épigénétique jusqu'à la dégradation ciblée par le système ubiquitine-protéasome de protéines mal repliées, dénaturées ou obsolètes, qui permet une adaptation rapide du parasite aux différents environnements qu'il rencontre.

Les analyses du génome de *P. falciparum* ont montré que les facteurs de transcription ne peuvent pas à eux seuls expliquer le contrôle du cycle parasitaire (Coulson et al., 2004). Dans ce sens, il est établi que les MPT revêtent une importance fondamentale pour l'adaptation du parasite à son environnement. Chez *P. falciparum*, une étude a permis d'identifier que parmi les 1401 protéines identifiées lors du stade érythrocytaire, 1518 MPT étaient présentes et se produisaient sur un total de 848 protéines (Wang et al., 2021). Parmi ces MPT, les auteurs ont très majoritairement retrouvé la phosphorylation, suivie de l'acétylation, la crotonylation, la 2-hydroxyisobutyrylation, la N-glycosylation, et l'ubiquitination, alors que 1924 protéines de l'hôte subissent des MPT sur 5034 sites. Ces dernières font état d'une distribution plus équilibrée parmi les phosphorylations, acétylations, crotonylations, et 2-hydroxyisobutyrylations (figure 6 - Wang et al., 2021).



**Figure 6. Histogrammes des MPT de *P. falciparum* et des érythrocytes infectés.** Seules les protéines identifiées ainsi que les sites modifiés avec une variation significative sont indiqués dans ces histogrammes (FDR < 0.01). D'après Wang et al., 2021.

Chez *P. falciparum*, les principales MPT répertoriées à ce jour seraient donc la phosphorylation, la glycosylation, l'ubiquitination, les lipidations (palmitoylation, myristoylation, prenylation), l'acétylation et la méthylation (Rashidi et al., 2021). La figure 7 récapitule certaines MPT détectées sur des protéines importantes au cours de cycle de vie du parasite comme par exemple les phosphorylations des protéines PKA et PKG, ou bien encore la méthylation de EMP1.



**Figure 7. Les principales MPT chez *P. falciparum*.** D'après Rashidi et al., 2021.



Dans cette introduction je me limiterai à aborder la phosphorylation et l'ubiquitination (voir partie III), des MPT directement impliquées dans les mécanismes étudiés au cours de ma thèse.

La phosphorylation réversible des protéines par les kinases/phosphatases représente un mécanisme central dans le contrôle du cycle de *P. falciparum* puisque des études ont démontré qu'approximativement la moitié des phosphatases et des kinases de *Plasmodium* seraient essentielles à la survie du parasite au cours du cycle érythrocytaire (Bushell et al., 2017; Guttery et al., 2014; Paul et al., 2020; Solyakov et al., 2011; Zhang et al., 2018).

## A. Généralités sur les kinases

Les kinases sont des protéines qui catalysent le transfert d'un groupement phosphate porté par l'ATP sur une autre protéine, provoquant sur cette dernière des changements fonctionnels et/ou structurels. Les protéines kinases peuvent être régulées par la phosphorylation de certains de leurs acides aminés, ou par des interactions avec des protéines régulatrices. Elles exercent un rôle important dans la régulation de signaux essentiels au sein de la cellule. Chez les eucaryotes, le déroulement des différentes étapes du cycle cellulaire et le contrôle de ces étapes est notamment orchestré par des cyclines et par des kinases dépendantes des cyclines (CDK) régulées elles-mêmes par phosphorylation et déphosphorylation. Le génome de *Homo sapiens* code pour 500 protéines kinases, et parmi celles-ci, 80% catalysent des phosphorylations sur des résidus Sérine et Thréonine (Berndt et al., 2017).

Les kinases sont regroupées en plusieurs familles, la plus importante chez les eucaryotes étant la famille des ePK qui regroupe les sous-familles AGC, CAMK, CMGC, TKL, CK1, RGC et TK et qui présente un domaine catalytique conservé composé de 12 sous-domaines. Parmi les ePK, les kinases **AGC** comprennent les kinases nucléotide cyclique et calcium-phospholipide-dépendantes, les kinases ribosomales S6-phosphorylantes, les kinases couplées à la protéine G, et d'autres membres assimilés à cette famille. Les **CAMK**, des kinases Calcium et Calmoduline-dépendantes, et le groupe de kinases **CMGC** qui interviennent dans la transduction de signaux et dans le cycle cellulaire (incluant les kinases cycline-dépendantes, les mitogen-activated protein kinases, les CDK-like kinases, et les kinases glycogène synthase) appartiennent également à cette famille. Les **TKL** sont des Tyrosine kinases-like kinases (s'apparentant aux tyrosine kinase) qui appartiennent aux Sérine/thréonine kinases. Les **CK1** sont des caséine kinases 1 et kinases assimilées. Enfin, les **RGC** sont des kinases à récepteur guanylate cyclase et les **TK** sont des tyrosine kinases (Miranda-Saavedra and Barton, 2007)). Toutes ces protéines appartiennent à la famille des ePK.

En dehors des ePK, chez les eucaryotes nous retrouvons également les aPK (atypical kinases) qui présentent une activité kinase sans posséder les 12 sous-domaines caractérisant les ePK (Adderley and Doerig, 2022).

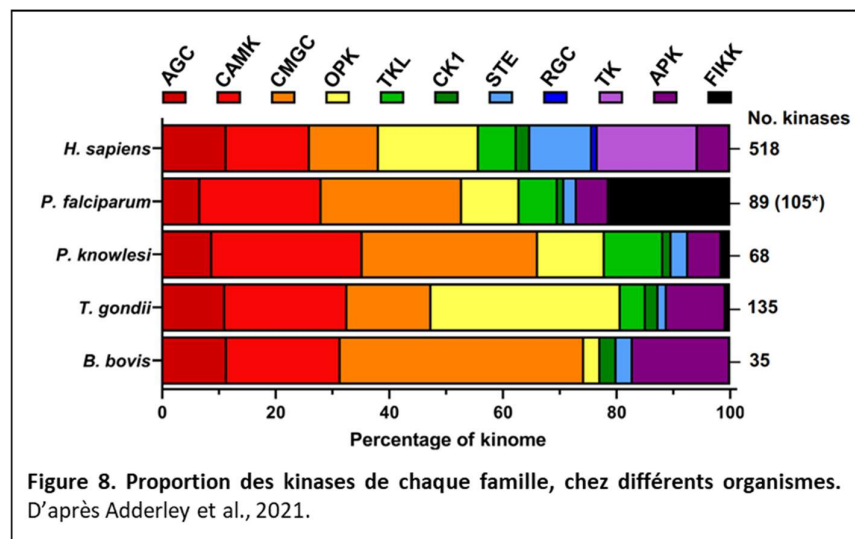
## B. Les kinases de *Plasmodium*

Jusqu'à présent, 85 à 99 kinases ont été identifiées chez *P. falciparum* par l'analyse du génome (Anamika et al., 2004; Ward et al., 2004). Des études de génétique inverse et par mutagénèse saturante à haut débit (Solyakov et al., 2011; Zhang et al., 2018) ont permis de mettre en lumière l'essentialité de 40 kinases lors du cycle intra-érythrocytaire du parasite. De même, chez *P. berghei*, parmi les 66 ePK, 43 kinases seraient essentielles au cours de différents stades (Tewari et al., 2010).



Néanmoins, la division cellulaire, très conservée chez les eucaryotes, ne suit pas les mêmes mécanismes chez *Plasmodium* (Morano et al., 2023) et le kinôme de *Plasmodium* est majoritairement divergent du kinôme humain (Ward et al., 2004). Pour ces raisons, l'étude des kinases de *Plasmodium* permettrait de mieux aborder la biologie du parasite, notamment lors des stades hépatocytaires et érythrocytaires pendant lesquels le parasite se multiplie *via* son cycle cellulaire particulièrement atypique.

La majorité des kinases de *P. falciparum* ont été attribuées à la famille des protéines kinases eucaryotes (ePK) (Ward et al., 2004) comme exposé en figure 8. Les 3 groupes les plus représentés sont les **CMGC**, les **CAMK**, suivies des **FIKK**, kinases uniques aux Apicomplexes et possédant un motif consensus (et leur octroyant un nom commun) composé de Phe-Ile-Lys-Lys. *Plasmodium* exprime également des kinases telles que les CDPK (de la sous-famille des CAMK) assimilées aux kinases retrouvées chez les plantes et possédant des séquences qui diffèrent des séquences humaines et qui pourraient représenter un intérêt en termes de cible (Solyakov et al., 2011).



Parmi les kinases dont l'expression est primordiale chez *Plasmodium*, nous pouvons citer la Protéine Kinase A (PKA) qui intervient en aval de la signalisation effectrice cAMP. Elle possède une sous-unité catalytique et une sous-unité régulatrice possédant deux sites de liaison cAMP. Sa sous-unité catalytique PfkAc serait impliquée dans le mécanisme d'invasion par les mérozoïtes *via* la phosphorylation de la protéine PfAMA1 (*P. falciparum* apical merozoite antigen 1) (Leykauf et al., 2010). Nous pouvons également citer la PKG (protein kinase G) qui intervient de manière directe et indirecte dans la phosphorylation de 69 protéines jouant un rôle dans les phénomènes d'egress et d'invasion parasitaire (Alam et al., 2015).

Le parasite utilise également des kinases humaines pour servir certaines étapes de son développement : ainsi, la protéine kinase érythrocytaire Syk phosphorylerait la glycoprotéine bande 3, protéine majoritaire du globule rouge. L'activité de la kinase Syk augmenterait progressivement au cours de la maturation des mérozoïtes et l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases a démontré que son activité serait indispensable pour permettre la sortie des parasites du globule rouge (Kesely et al., 2020).

La sélection de mutations chez *Plasmodium* rend inefficace un nombre croissant de composés anti-paludiques, certains chercheurs proposent donc de cibler des kinases de l'hôte à travers des thérapies

dirigées vers l'hôte (HDT – Host Directed Therapies), ce qui limiterait l'apparition de résistances (Adderley et al., 2020). En effet, l'arsenal d'inhibiteurs de kinases humaines est très développé et majoritairement employé en tant que traitements anti-cancéreux : plus de 200 inhibiteurs de kinases sont actuellement en cours d'essais cliniques et plus de 60 inhibiteurs de kinases ont déjà été approuvés par la FDA (US Food and Drug Administration). Il est à souligner que les kinases humaines ciblées par ces inhibiteurs sont, pour la plupart, nécessaires à la survie du parasite durant les stades hépatocytaires ou érythrocytaires (Wei et al., 2021).

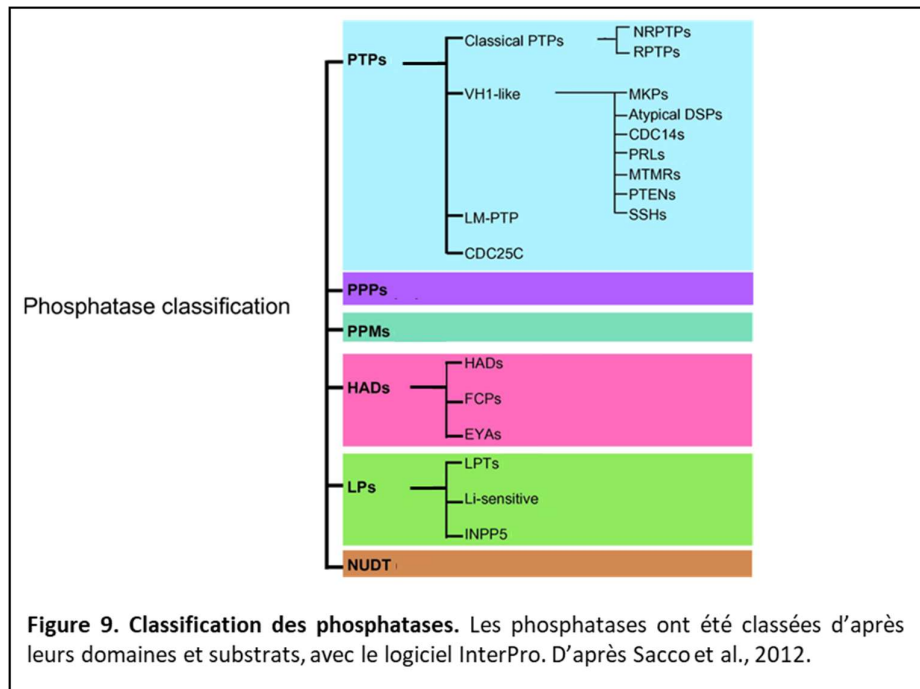
Les inhibiteurs de kinases peuvent établir des liaisons allostériques ou covalentes avec la kinase cible (Mogwera et al., 2023), mais la plupart des inhibiteurs interagissent au niveau du site de fixation de l'ATP empêchant ainsi sa liaison. Il y a plusieurs limites à l'utilisation de composés anti-cancéreux pour traiter le paludisme : l'une d'elles est de s'assurer de l'innocuité chez les jeunes enfants et les femmes enceintes, qui sont les plus gravement touchés par le paludisme mais qui ne sont pas les cibles préférentielles lors d'essais cliniques sur ces molécules. Par ailleurs, ces composés sont administrés à des doses qui permettent un traitement progressif et dont les effets s'observent sur une longue durée, alors que le traitement du paludisme sévère nécessite un traitement rapide et doit se montrer efficace dès les premières doses afin de ne pas compromettre la survie des patients. Ces différents éléments montrent que des essais sont encore à mener afin de repositionner au mieux des molécules initialement dédiées à traiter des pathologies cancéreuses (Wei et al., 2021). Actuellement, rares sont les composés testés pour cibler les kinases de *P. falciparum* : nous pouvons citer le composé MMV390048 (Paquet et al., 2017), qui cible la phosphatidylinositol-4-OH kinase (PfPI4K).

### C. Les phosphatases chez les eucaryotes, un focus sur *Plasmodium*

Les phosphatases catalysent l'élimination de groupes phosphate de certains substrats comprenant des protéines, ou des lipides (lipide phosphatases ou LP). Elles sont divisées en six familles d'après la configuration du domaine catalytique :

- les Protéines Tyrosine Phosphatases (PTP),
- les Phospho-protéines phosphatases (PPP),
- les Phosphatases métal-dépendantes (PPM)
- les Haloacides déshalogénases (HAD)
- les Lipides phosphatases (LP)
- les NUDIX phosphatases (NUDT)

Chacune de ces familles comprend différentes classes et sous-classes de phosphatases, en fonction du type de substrat déphosphorylé (figure 9 - Sacco et al., 2012).



Dans la partie suivante, nous aborderons les phosphatases agissant sur des protéines présentes chez les Apicomplexes et plus particulièrement chez *Plasmodium*. Il est à noter que le nombre de phosphatases chez *Plasmodium* reste bien loin derrière celui de l'homme qui s'élève à environ 140 phosphatases. Cette différence pourrait être expliquée premièrement par une régulation métabolique moins complexe chez le parasite par rapport aux mammifères, et deuxièmement par un accès aux nutriments plus aisé chez les Apicomplexes (Fréville et al., 2022a).

Les protéines phosphatases peuvent être classées en deux grands groupes : les Sérine/thréonine phosphatases et les Tyrosine Phosphatases.

### 1. Les Sérine/thréonine phosphatases

Les Sérine/thréonine phosphatases appartiennent à 3 grandes familles chez les Apicomplexes (Chen et al., 2017) :

- les phosphoprotéines phosphatases-like (PPPL) assimilées aux PPP,
- les PPM/PP2C qui sont des protéines phosphatases  $Mn^{2+}$  or  $Mg^{2+}$  dépendantes,
- les HAD ou haloacides déshydrogénases, dont le mécanisme catalytique fait intervenir un résidu Aspartate.

#### a. Les Phosphoprotéines phosphatases-like (PPPL)

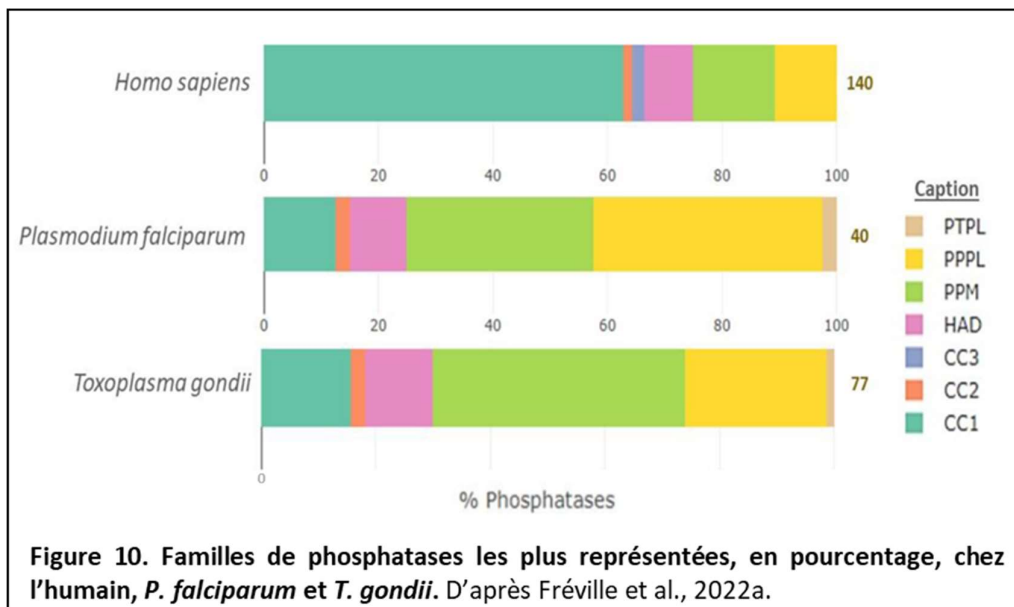
Deux sous-familles appartiennent aux PPPL : ce sont les PAP (Purple Acid Phosphatases) et les PPP (Phosphoprotéines phosphatases). Comme illustré en figure 10, la superfamille des PPPL est prédominante chez *P. falciparum*.

La sous-famille des PAP est ainsi nommée grâce à la couleur octroyée par l'incorporation de différents ions métalliques (Olczak et al., 2003), elle se différencie des autres phosphatases grâce à la composition en acides aminés, la localisation, la résistance à un traitement au tartrate et la fixation d'ions métalliques. En ce qui concerne ce dernier point, l'activité des PAP de *Plasmodium* ne semble pas toujours dépendre d'ions métalliques contrairement aux PAP bactériennes (Müller et al., 2010). Nous citons dans ce groupe et présentes chez *P. falciparum* la protéine GAP50 (glideosome associated protein 50) qui est intégrée à l'IMC (Inner membrane Complex) du mérozoïte et qui participe à l'invasion des globules rouges (Yeoman et al., 2011). Cette protéine possède deux domaines transmembranaires et une séquence d'ancrage, et elle participe à l'apport de nutriments au sein de la vacuole digestive.

Les PPP regroupent sept sous-familles que sont les phosphatases PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 et PP7. Deux autres phosphatases font partie de la famille des PPP, elles sont exclusives aux Apicomplexes, il s'agit de la SHLP (Shewanella-like protein phosphatase) et la PPKL (Kelch-like domain-containing protein phosphatase).

Le mécanisme d'action des PPP s'opère par la fixation de deux ions au niveau du site catalytique : un ion  $Zn^{2+}$  et un ion  $Fe^{2+}$  qui activent une molécule d'eau. Cette molécule hydrolyse le phosphate des protéines cibles (Goldberg et al., 1995). Les PPP possèdent une sous-unité catalytique très conservée chez les eucaryotes, et elles sont associées à des sous-unités régulatrices qui orientent leur localisation et définissent leur activité vis-à-vis du substrat ciblé.

La Protéine phosphatase 1, dont il est question dans ma Thèse, appartient à cette famille et sera présentée plus avant.



### b. Les PPM

Cette superfamille représente la 2<sup>ème</sup> famille la plus représentée chez *Plasmodium* avec 13 phosphatases chez *P. falciparum*. La plupart de ces protéines n'ont pas d'orthologue chez l'homme, ce qui les rend intéressantes en tant que cibles thérapeutiques (Wilkes and Doerig, 2008). Leur activité requiert la

fixation d'ions  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  et elles possèdent, outre leur site catalytique, des domaines qui régulent leur spécificité vis-à-vis du substrat.

### c. Les HAD

Cette superfamille est composée des sous-familles FCP (TFIIF-associating C-terminal domain (CTD) phosphatase) et NIF (NLI interacting factor-like phosphatase). Elles régulent la RNA polymérase II par la déphosphorylation des résidus Sérine de son domaine carboxy-terminal (CTD), ceci permet de réactiver cette enzyme après la fin de la transcription. Ces phosphatases interviennent également dans les interactions avec le facteur de transcription TFIIF (Wilkes and Doerig, 2008).

## 2. les Tyrosine phosphatases

Il est paradoxal d'observer que la majorité des phosphatases (65%) appartiennent à la famille de Protéines Tyrosine Phosphatases (PTP) chez l'homme (Alonso et al., 2004), alors qu'une étude sur 2000 phosphoprotéines d'eucaryotes a mis en lumière que les phospho-tyrosines ne représentaient que 1.8% des phosphorylations sur ces protéines, le reste étant distribué entre les phospho-thréonines (11.8%) et les phospho-sérines (86.4%) fortement majoritaires (Olsen et al., 2006).

Chez les Apicomplexes, 10 à 16% des phosphatases appartiennent à la famille des Tyrosine phosphatases, une proportion bien moindre que chez l'homme. Chez *Plasmodium*, les tyrosine phosphatases auraient co-émergé avec les tyrosines kinases à partir de sérine/thréonine phosphatases et kinases, permettant ainsi au parasite d'établir des nouvelles voies de signalisation. L'une de ces protéines serait PfPRL dont la localisation serait régulée par prénylation (Pendyala et al., 2008).

## 3. Les pseudophosphatases

Hormis les différentes phosphatases mentionnées ci-dessus, *Plasmodium* exprime aussi des pseudophosphatases. Ce sont des protéines qui ont perdu leur activité enzymatique, certaines pouvant intervenir dans certains processus cellulaires, comme la PfPPP8, une pseudophosphatase de *Plasmodium falciparum* de la famille des PPP, essentielle pour le maintien du complexe basal du parasite (Morano et al., 2023). Généralement ces protéines régulent des phosphatases en séquestrant leurs substrats phosphorylés (Reiterer et al., 2020).

## 4. La Protéine Phosphatase 1 (PP1)

Dans notre laboratoire, nous recherchons à mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la régulation de PP1 chez *P. falciparum* et *P. berghei*. Je vais donc procéder à la description de la protéine PP1 humaine et parasitaire, en réalisant un zoom sur les régulateurs de PP1c dont il est question dans cette Thèse.

PP1 est une phosphatase ubiquitaire qui fait partie de la famille des PPP. C'est une phosphatase majeure qui intervient dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires parmi lesquelles :

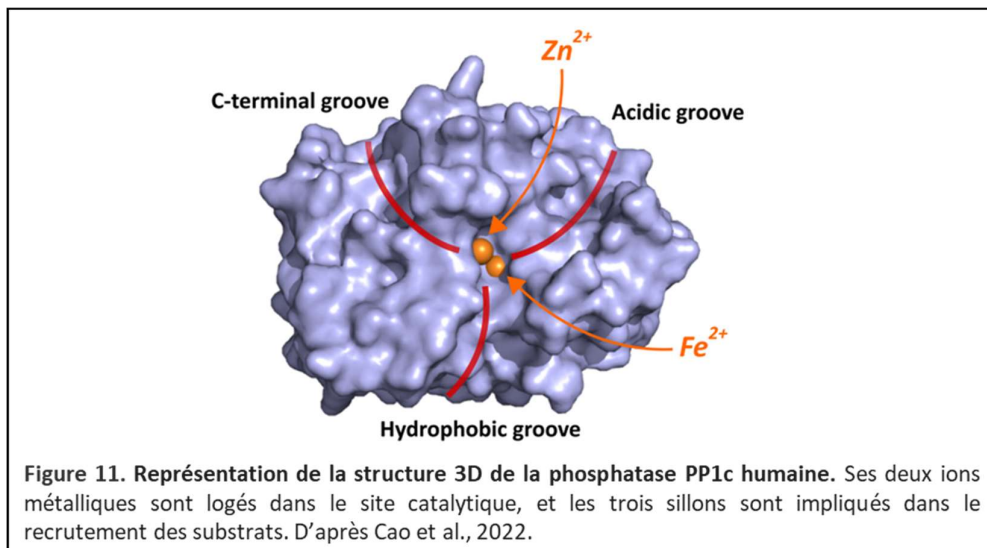
- la progression du cycle cellulaire notamment lors de la sortie de mitose et de la cytokinèse (Bollen et al., 2009) : au cours du cycle cellulaire, la distribution de PP1 au sein de la cellule

évolue : en phase de quiescence ou G1, la localisation est principalement cytoplasmique, alors qu'en phase G2, la concentration de PP1c dans le noyau augmente progressivement jusqu'en phases G2/M. Le traitement par des anticorps anti-PP1 a pu prouver le rôle essentiel de cette phosphatase notamment lors de la transition métaphase / anaphase (Fernandez et al., 1992). Pendant la mitose, l'inactivation de PP1c est assurée à la fois par sa liaison à l'inhibiteur 1 et via sa phosphorylation par la kinase CDK1 associée à la cycline B. Lors de la transition métaphase/anaphase, Cdk1 est dissociée de la cycline B et n'assure plus la phosphorylation de PP1c. Celle-ci peut partiellement s'auto-déphosphoryler, se dissocier de son inhibiteur-1 pour accomplir son rôle de phosphatase sur de nombreux résidus Sérine et Thréonine, permettant ainsi à la cellule d'effectuer la sortie de mitose (Potapova, Sivakumar et al. 2011, Wu, Guo et al., 2009). Deux autres phosphatases agissent de concert avec PP1c : les phosphatases CDC25 et CDC14 qui interviennent dans l'entrée et la sortie de mitose respectivement.

- PP1c intervient également dans le métabolisme du glycogène (Bhattacharyya et al., 2002; Bollen, 2001; Cohen, 2002).
- Son rôle a aussi été démontré dans la relaxation musculaire au sein du complexe phosphatasique MLCP (Myosin-light-chain phosphatase) en association avec les protéines MYPT1 (Myosin Phosphatase Target Subunit 1) et une sous-unité de 20 kDa M20 (Eto, 2009; Qiao et al., 2014).

Chez l'homme, PP1 est la plus abondante des sérine/thréonine phosphatases (Peti et al., 2012) codée par trois gènes situés sur trois différents chromosomes PPP1CA (11q13.2), PPP1CB (2p23.2) et PPP1CC (12q24.11). Le produit d'expression de ces gènes est constitué des trois isoformes PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$ , PP1 $\gamma$  de 35 à 38 kDa, très conservés, présentant environ 90% d'identité (Wakula et al., 2003) et présentant des variations mineures au niveau de leurs extrémités C-terminales (Korrodi-Gregório et al., 2014).

Trois sillons, le premier en C-terminal, le deuxième, un sillon acide, et un troisième sillon hydrophobe, participent au recrutement des différents substrats (figure 11). Néanmoins PP1 ne sélectionne pas ses substrats, la sélectivité est octroyée par l'interaction avec ses sous-unités régulatrices.



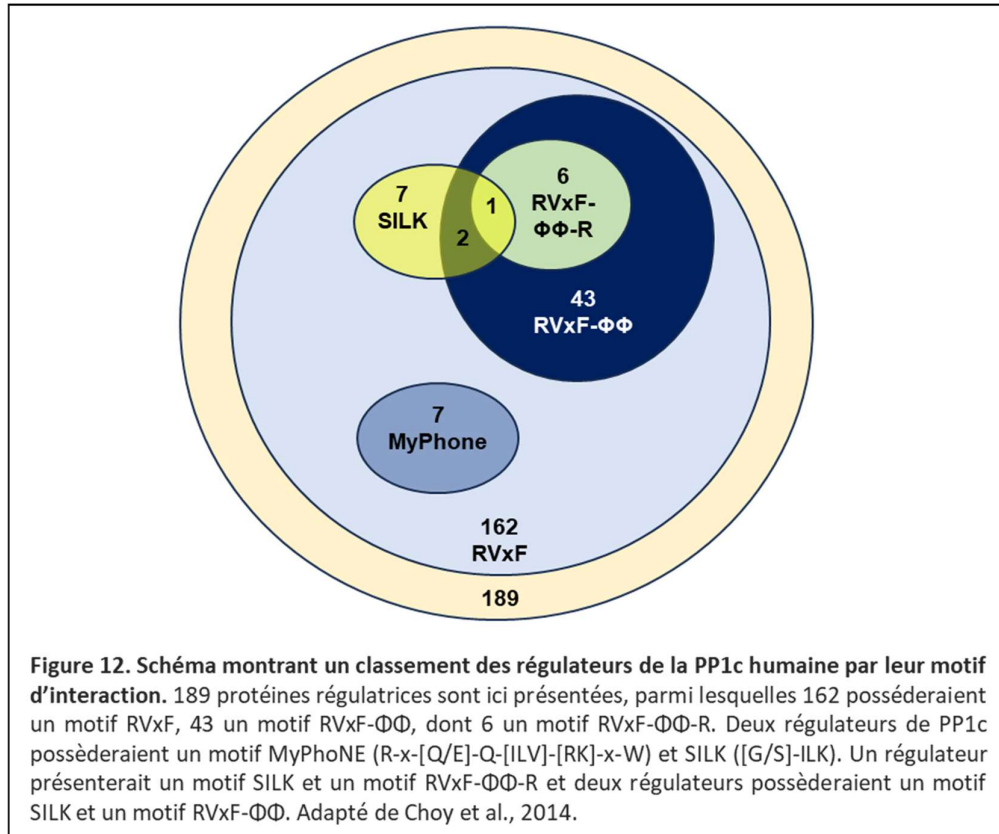
La régulation de PP1 peut avoir lieu *via* deux mécanismes :

- à travers la phosphorylation : pendant la mitose, PP1c est phosphorylée sur la Thr320 par la kinase CDK2 ce qui inhibe son activité phosphatase (Dohadwala et al., 1994; Li et al., 2006)
- ou, grâce à la fixation de sous-unités qui régulent son activité.

L'holoenzyme PP1 est donc composée d'une sous-unité catalytique (PP1c) associée à une ou plusieurs sous-unités régulatrices qui dirigent sa localisation, son activité et sa spécificité envers les substrats (Bollen, 2001; Bollen et al., 2010; Ceulemans and Bollen, 2004; Fardilha et al., 2010; Hendrickx et al., 2009).

La plupart des régulateurs de PP1c possèdent une caractéristique commune qui est la présence d'un ou plusieurs motifs de type SLIM (Short linear motif), définis comme étant de courts motifs fonctionnels permettant l'interaction entre deux protéines. Par le biais de ces séquences, une interaction de forte affinité est créée avec la phosphatase. Le motif d'interaction le plus répandu parmi les régulateurs de PP1c, est le motif de type RVxF (Choy et al., 2014; Heroes et al., 2013; Moorhead et al., 2007). Les motifs RVxF sont composés des acides aminés [RK]-X<sub>0-1</sub>-[VI]-{P}-[FW], où X est n'importe quel acide aminé, et {P} peut être tout acide aminé à l'exception d'une proline. Cependant, la présence d'une séquence d'acides aminés correspondant à ce consensus n'est pas suffisante pour constituer un motif d'interaction : de très nombreuses protéines possèdent ces séquences - estimées à environ un tiers des protéines chez les eucaryotes et à 10% chez l'homme (Cohen, 2002) - et n'interagissent pas pour autant à PP1c : ces motifs doivent être présents dans une région exposée et flexible de la protéine (Wakula et al., 2003). Les motifs RVxF se lient à PP1c avec une forte affinité au sein du sillon hydrophobe de PP1c, qui est éloigné du site catalytique (Egloff et al., 1997). La conformation ou l'activité de PP1 ne sont donc aucunement altérées par le simple fait d'interagir avec ces motifs. Par contre, la liaison de ces motifs entraîne une interaction secondaire avec d'autres sites de plus faible affinité, et ce sont toutes ces interactions combinées qui affectent l'activité de PP1c (Bollen, 2001). Ainsi, d'autres séquences peuvent aussi entrer en compte dans l'interaction avec PP1c, tels que les motifs FKK, SILK, ΦΦ, MyPhoNE et HYNE (Uhrig, Labandera et al. 2013). Une répartition des principaux motifs retrouvés sur les protéines régulatrices de la PP1c humaine est schématisée en figure 12 (Choy et al., 2014).

- Le motif FKK comporte la séquence FxxR/KxR/K,
- SILK est un motif [G/S]-ILK,
- Le motif ΦΦ motif est composé de deux résidus hydrophobes qui se fixent dans le sillon hydrophobe de PP1c,
- Le motif MyPhoNE est composé des résidus R-x-[Q/E]-Q-[ILV]-[RK]-x-W,
- Le motif HYNE est composé des acides aminés HYD, HYNE, HYDE ou HYRE.



### a. Les régulateurs de PP1

Une très forte identité entre la PP1c humaine et la PP1c de différents organismes (80% d'identité avec la PP1c de *Plasmodium*) ainsi qu'une structure secondaire relativement conservée rend l'étude de cette protéine intéressante. En effet, de multiples protéines interagissantes ont déjà été identifiées chez les vertébrés (>200) (Heroes et al., 2013) sans omettre que l'activité de cette phosphatase serait conservée vis-à-vis de différents substrats (Peti et al., 2013).

L'interaction entre PP1c et ses protéines régulatrices (PIP : PP1-interacting proteins) module l'activité de la phosphatase (Chatterjee and Köhn, 2013; Heroes et al., 2013). Ces régulateurs sont présents chez tous les eucaryotes et ils reçoivent également la dénomination de RIPPOs (regulatory interactor of protein phosphatase one).

Chez l'homme, environ 200 régulateurs de PP1c ont déjà été décrits (Wang et al., 2008) et parmi ces principaux régulateurs, nous pouvons citer SDS22 et Inhibiteur-3 (I3) qui forment un complexe avec PP1 jouant un rôle central lors de la mitose puisque leur délétion entraîne l'arrêt de la mitose (Cao et al., 2022). De même, l'interaction entre PP1c et I2 serait cruciale pour le cycle cellulaire puisqu'un KO de ce gène bloque la cytokinèse et produit des cellules multi-nuclées (Wang et al., 2008).

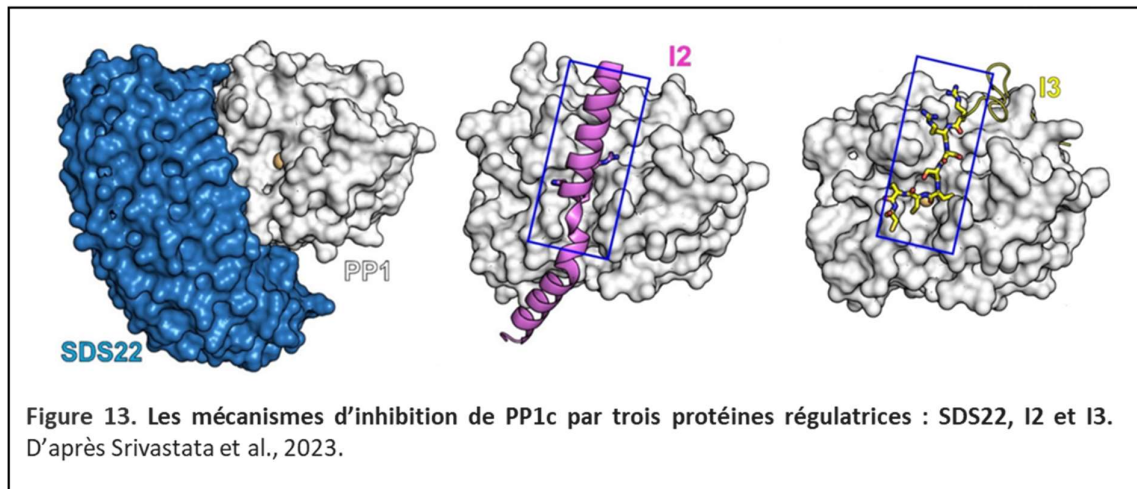
SDS22 (Suppressor-of-Dis2-number 2) est une protéine majoritairement constituée des domaines riches en leucine (Leucine-Rich Repeats ou LRRs) et ne possède pas de SLiMs. Cette protéine régule négativement PP1c (Choy et al., 2019) : l'inhibition se fait par la stabilisation de la phosphatase dans une conformation qui empêche la fixation de son ion M1, essentiel à l'activation de la molécule d'eau nucléophile et responsable de l'hydrolyse du phosphate sur sa cible. SDS22 inhibe également PP1c en



bloquant les sites de reconnaissance du substrat que constituent les régions hydrophobes en Cter de la phosphatase (Choy et al., 2019).

La protéine I2 constitue l'un des premiers régulateurs identifiés pour PP1c et cet inhibiteur est très conservé chez d'autres organismes dont la levure (GLC8). I2 n'exerce pas le même type de régulation que SDS22 car il agit en bloquant l'accès au site actif de PP1c, structurellement, grâce à son hélice comme montré en figure 13 (Srivastava et al., 2023). Plus précisément, l'interaction entre les deux protéines se fait par le biais de multiples contacts : à travers les motifs SILK et RVxF et l'hélice  $\alpha$  de I2 qui bloque l'accès aux sillons acide et hydrophobe de PP1c. Au niveau de la localisation, il a été démontré, dans des fibroblastes humains, une localisation ubiquitaire de I2 avec une accumulation dans le noyau en phase S du cycle cellulaire (Kakinoki et al., 1997).

Quant à l'inhibiteur I3, il s'agit d'une protéine majoritairement non-structurée qui inhibe PP1 à travers son interaction *via* une région conservée et des motifs SLiMs (motifs SILK et RVxF). Les interactions entre I3 et PP1c seraient plus transitoires que celles décrites entre I2 et PP1c, et feraient intervenir un court motif de trois cystéines CCC, interagissant transitoirement avec le site M2 de PP1c. Cet inhibiteur s'associe également avec SDS22 et PP1c dans une interaction tripartite ayant pour effet de recruter une ATPase (Cdc48/p97) qui, en hydrolysant de l'ATP, libère et active PP1c, la phosphatase pourra ainsi être transférée vers d'autres RIPPOs (Weith et al., 2018).



### b. La phosphatase PP1 chez *Plasmodium*

PP1 est impliquée dans la majorité des mécanismes de déphosphorylation chez *Plasmodium* (Yokoyama et al., 1998; Kumar et al., 2002; Paul et al., 2020). Cette phosphatase possède chez *P. falciparum* une séquence de 304 acides aminés, et présente la séquence « signature » des phosphatases à Sérine/Thréonine : LRGNHE. Au niveau de ses sites de phosphorylation, PP1 possède 5 sites de phosphorylation par la protéine caséine kinase II, et 2 sites de phosphorylation par la protéine kinase C (Bhattacharyya et al., 2002). Néanmoins, son intervention dans le cycle cellulaire serait différente de ce qui est connu chez l'humain par exemple, puisque *Plasmodium* n'exprime aucun homologue des phosphatases CDC25 et CDC14 qui agissent avec PP1c et dont le rôle est pourtant central dans l'entrée et sortie de mitose respectivement.

L'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases tels que l'acide okadaïque, la microcystine et la calyculine, a permis de mettre en lumière le rôle essentiel de la phosphatase PfPP1c dans les processus de

déphosphorylation et *in extenso* dans les différentes étapes de vie du parasite (Bhattacharyya et al., 2002; Dombrádi et al., 2004; Yokoyama et al., 1998). De plus, l'essentialité de cette phosphatase lors du cycle érythrocytaire a été confirmée grâce à des études phénotypiques de parasites *P. falciparum* KO (Kumar et al., 2002). Récemment, l'utilisation de plusieurs systèmes de KO inductibles a permis de montrer son rôle dans la réplication asexuée du parasite et plus particulièrement dans les phases précoces de sortie (« egress ») du globule rouge. Ainsi, lors de l'egress, il était notamment observé que l'IMC ne se formait pas chez les parasites *P. falciparum* n'exprimant pas PfPP1c (Guttery et al., 2014; Paul et al., 2020). De plus, il a de plus récemment été démontré que PP1 jouait un rôle essentiel au cours de la méiose chez le parasite (Zeeshan et al., 2021).

### c. Les régulateurs de PP1 chez *Plasmodium*

Des études de génomique comparative associées à plusieurs analyses globales d'interactome réalisées chez *Plasmodium* (De Witte et al., 2022; Hollin et al., 2019) ont permis d'identifier de nombreux partenaires potentiels de la PP1c parasitaire. Ainsi, plusieurs régulateurs conservés chez la plupart des eucaryotes (LRR1, Inhibiteur 2, Inhibiteur 3, eiF2β), ou spécifiques du parasite (RCC-PIP, GEXP15, pTKL) ont pu être caractérisés au laboratoire (Daher et al., 2006; Fréville et al., 2012, 2013; Hollin et al., 2019; Lenne et al., 2018; Tellier et al., 2016, Gnagnon et al., 2019). Je vais à présent énoncer ces différents régulateurs de PP1c, classés selon leur fonction activatrice ou inhibitrice de la phosphatase, sur la base de tests réalisés à la fois *in vitro* et/ou dans le modèle d'ovocytes de Xénope. En effet, ce modèle peut être utilisé en laboratoire pour démontrer l'interaction et le rôle de régulateurs de la PP1c parasitaire. Ceci est rendu possible par le fait que la PP1c de Xénope présente 80% d'identité avec la PP1c de *Plasmodium* (Daher et al., 2006; Fréville et al., 2013; Tellier et al., 2016). Dans ce modèle, les ovocytes immatures sont bloqués en prophase I sous l'effet notamment de phosphatases telles que PP1c. La micro-injection d'un régulateur de PP1c influence donc le déclenchement de la GVBD (Germinal Vesicle BreakDown) correspondant à la transition G2/M et caractérisée par l'apparition d'une tâche blanche sur l'ovocyte. Un inhibiteur de PP1c déclenche l'apparition de GVBD, alors qu'un activateur bloque la GVBD induite par la progestérone.

#### i. Les inhibiteurs de PP1c chez *Plasmodium*

##### ► LRR1

Le premier régulateur de PP1 identifié chez *Plasmodium* a été LRR1 (Daher et al., 2006). Cet inhibiteur est l'orthologue de SDS22 chez l'homme et la levure où il régule la division cellulaire (Ohkura and Yanagida, 1991). Il a été ainsi désigné car il appartient à la famille des protéines leucine-rich repeat. Le complexe LRR1-PP1c est présent chez le parasite et l'essentialité de cette interaction chez *P. falciparum* a été démontrée par le traitement de parasites avec des peptides correspondant à des fractions de LRR1. Ces peptides, disposant d'une séquence pénétrante de 12 acides aminés VKKKKIKAEIKI leur permettant de traverser les membranes ("Enhanced serum proteolysis resistance of cell-penetrating peptides") peuvent ainsi accéder et se fixer à PP1c, altérant la croissance et la survie de *P. falciparum* *in vitro* (Pierrot et al., 2018).

Chez *P. berghei*, il a récemment été démontré que PbLRR1 était également un inhibiteur de PP1c, exprimé tout au long du stade intra-érythrocytaire jusqu'au stade zygote chez le moustique. Contrairement à ce qui a été décrit chez *P. falciparum*, LRR1 n'est pas essentiel pour le développement intra-érythrocytaire de *P. berghei*. En revanche, sa délétion entraîne un défaut dans le développement

des oocystes chez le moustique. De manière intéressante, un lien existe entre LRR1 et un autre régulateur de PP1c - I3 - puisque ce dernier est hypo-phosphorylé lorsque PbLRR1 n'est plus exprimé : LRR1 jouerait donc un rôle sur les protéines intervenant dans la sporogonie, via la régulation de PP1c (Fréville et al., 2022b).

### ► Inhibiteur 2 (I2)

PfI2 interagit avec PP1c et exerce une activité inhibitrice sur la phosphatase. Cette protéine présente un motif de type RVxF ainsi qu'un motif FxxR/KxR/K s'associant au site RVxF pour une interaction de forte affinité avec PP1c. PfI2 présente également un motif HYNE qui occupe le site catalytique de PP1c afin d'inhiber son activité (Fréville et al., 2014). L'essentialité de l'interaction PfI2-PfPP1c a été démontrée, comme pour PfLRR1, à l'aide de courts peptides correspondant aux motifs d'interaction de PfI2 et se fixant sur les sites d'interaction de PfPP1c. Ces peptides ont altéré la croissance parasitaire lors du stade érythrocytaire *in vitro* montrant ainsi l'essentialité de l'interaction. L'étude de localisation chez le parasite a indiqué une expression diffuse dans la cellule avec une concentration dans le noyau au cours des derniers stades érythrocytaires (Fréville et al., 2013).

### ► eIF2 $\beta$

Chez les eucaryotes, la protéine eIF2 $\beta$  est une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eIF2 qui comprend les sous-unités alpha, beta et gamma (Kimball, 1999). Ce processus d'initiation de traduction est contrôlé par la phosphorylation réversible de certaines sous-unités.

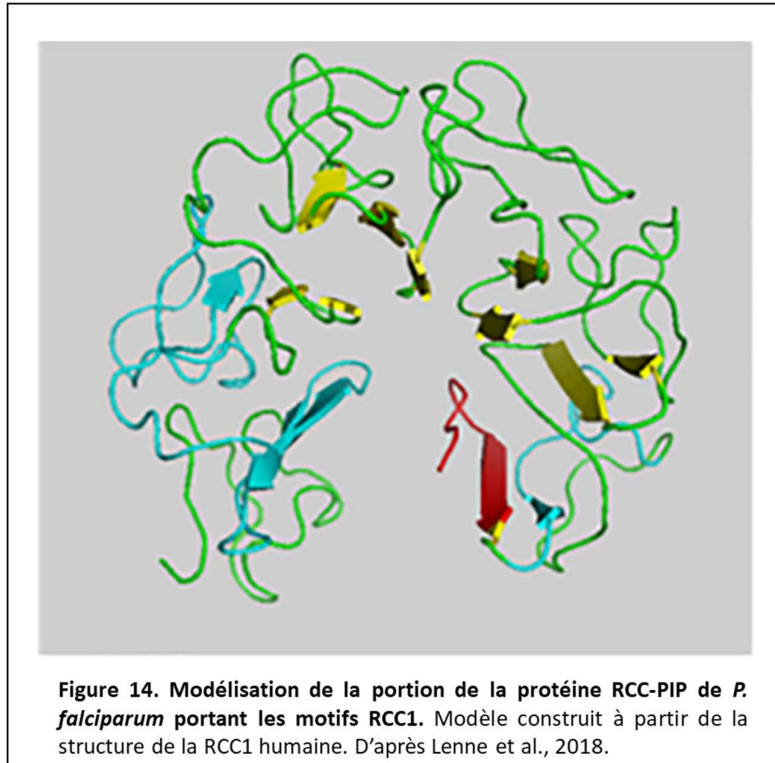
Chez l'homme, eIF2 $\beta$  se lie à PP1c, mais n'affecte pas son activité. Cette protéine fait partie du complexe eIF2 qui intervient dans le contrôle de la synthèse protéique (Wakula et al., 2006). Dans une région de 140 a.a. en N-Terminal, sont retrouvés le domaine de liaison à eIF5 (Asano et al., 1999) et deux sites de phosphorylation, essentiels pour l'activité de eIF2 $\beta$  dans le contrôle de la synthèse protéique (Llorens et al., 2006).

Chez *P. falciparum*, PfeIF2 $\beta$  possède deux motifs d'interaction à PfPP1c qui sont tous deux indispensables : un motif RVxF et un motif FKK (Tellier et al., 2016). Cette protéine est plus courte que son homologue humain avec la perte de 111 acides aminés en N-terminal. Le fractionnement cellulaire a montré une localisation ubiquitaire chez le parasite avec une expression plus marquée pendant le stade intra-érythrocytaire « anneau ». De plus, il n'a pas été possible d'obtenir de KO viables pour ce gène, ce qui suggérerait une fonction essentielle au cours du cycle érythrocytaire (Tellier et al., 2016). Enfin, des expériences en modèle hétérologue avec des ovocytes de Xénope ont démontré la capacité de cette protéine à induire l'apparition de GVBD, suggérant ainsi un rôle inhibiteur de PfeIF2 $\beta$  vis-à-vis de XePP1c.

### ► RCC-PIP

Cette protéine, spécifique de *Plasmodium*, est ainsi nommée car elle interagit avec plusieurs protéines (PP1 et CDPK7) et comporte des modules RCC1 (ou RCC1 repeats) lui octroyant sa dénomination de « regulator of chromosome condensation-PP1-interacting protein » (Lenne et al., 2018). Ses modules RCC1 sont composés d'une répétition de 4 brins beta formant ainsi un réseau circulaire lorsque plusieurs modules sont présents (Stevens and Paoli, 2007) comme montré en figure 14. Chez l'homme, la protéine RCC1 est composée de 7 séquences de 4 brins beta anti-parallèles lui permettant d'interagir

avec les histones H2A and H2B, avec des nucléosomes, et avec Ran-GTP. Chez le parasite elle possède deux motifs RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation) et un RCC1 signature 2 en N-terminal de la protéine. Elle interagit avec PfPP1 *in vitro* et *in vivo* : des expériences utilisant des ovocytes de Xénope ont démontré la capacité de PfRCC-PIP à interagir *in vivo* avec XePP1c et à déclencher l'apparition de GVBD en présence de doses suboptimales de progestérone. Chez le parasite, l'impossibilité d'obtenir un KO viable par génétique inverse suggère l'essentialité de cette protéine lors de son développement intra-érythrocytaire. PfRCC-PIP se lie également à la kinase CDPK7 soulignant ainsi un rôle de ce régulateur dans les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation chez le parasite (Lenne et al., 2018).



## ii. Des activateurs de PP1c chez *Plasmodium*

### ► Inhibiteur 3 (I3)

Il a été montré que l'inhibiteur 3 de *P. falciparum* (PfI3) activait PfPP1c *in vitro*. Cette protéine n'est par ailleurs pas capable de compenser des levures déficientes en I3 (Ypi1) (Fréville et al., 2012) suggérant que PfI3 n'exercerait pas la même activité fonctionnelle que Ypi1. Notons que chez l'homme et la levure, I3 est décrit pour être un inhibiteur de PP1c.

Chez *P. falciparum*, cette protéine serait principalement localisée dans le noyau parasitaire avec une expression tout au long du stade érythrocytaire et l'interaction avec PfPP1c se produit *via* le motif RVxF de PfI3. Il a également été démontré par génétique inverse que ce régulateur serait essentiel pour la survie du parasite au cours du stade intra-érythrocytaire puisqu' il n'a pas été possible d'obtenir des parasites viables KO pour PfI3 (Fréville et al., 2012).

### ► pTKL

Cette protéine Pseudo-tyrosine kinase-like active PP1c et se lie à la phosphatase via ses deux motifs RVxF. Ce régulateur est ainsi nommé car il fixe l'ATP mais ne présente pas d'activité catalytique. Par ailleurs, il serait dispensable au cours du cycle intra-érythrocytaire chez *P. berghei* (Gnangnon et al., 2019).

### ► GEXP15

PfGEXP15 (Gametocyte EXported Protein 15) est une protéine spécifique de *Plasmodium* qui intervient au cours des stades sexués et asexués du parasite (Hollin et al., 2019). Elle est exportée dans le cytoplasme du globule rouge 14h post-invasion lors du stade anneau et elle constitue l'un des premiers marqueurs d'invasion intra-érythrocytaire (Tibúrcio et al., 2015). GEXP15 interagit *in vitro* avec PP1c à travers son motif RVxF et exerce un rôle activateur sur la phosphatase. Il est à noter que l'infection par des parasites *P. berghei* KO pour GEXP15 n'entraîne pas de neuropaludisme chez des souris C57BL/6, ni une parasitémie létale chez des souris BALB/c. Les parasites déficients ne produisent ni oocystes, ni sporozoïtes chez le moustique. Ces éléments statueraient pour un rôle essentiel de PbGEXP15 lors des stades asexués et sexués. Des analyses en immunoprécipitation et spectrométrie de masse ont démontré que PbGEXP15 appartenait au même complexe que PP1c, pendant les stades schizonte et gamétocyte, et que cette protéine interviendrait dans des voies reliées au spliceosome et au protéasome (Hollin et al., 2019).

Récemment, la génération d'une lignée de *P. falciparum* transgénique exprimant PfGEXP15-GFP a permis de confirmer la localisation prédominante de GEXP15 dans le noyau au cours des stades intra-érythrocytaires tardifs (Mansour et al., 2023). Par ailleurs, l'analyse en immunoprécipitation et spectrométrie de masse a dévoilé l'association de PfGEXP15 avec 7 protéines ribosomales et 3 protéines de liaison à l'ARN. Enfin, il a été démontré grâce à une analyse *in silico* que l'interaction aux complexes ribosomiaux se faisait via le domaine GYF de GEXP15 (Mansour et al., 2023). Ce domaine GYF, dont la séquence consensus est GP[YF]xxxx[MV]xxWxxx[GN]YF, avait déjà été décrit comme jouant un rôle dans des interactions protéiques chez les mammifères notamment entre CD2 Cytoplasmic Tail-Binding Protein 2 (CD2BP2) et le récepteur CD2 (Nishizawa et al., 1998).

Actuellement, 4 inhibiteurs de l'activité de PP1c ont été identifiés chez *Plasmodium*, dont trois sont conservés parmi les eucaryotes : LRR1, I2, eIF2 $\beta$ , alors que RCC-PIP est spécifique du parasite.

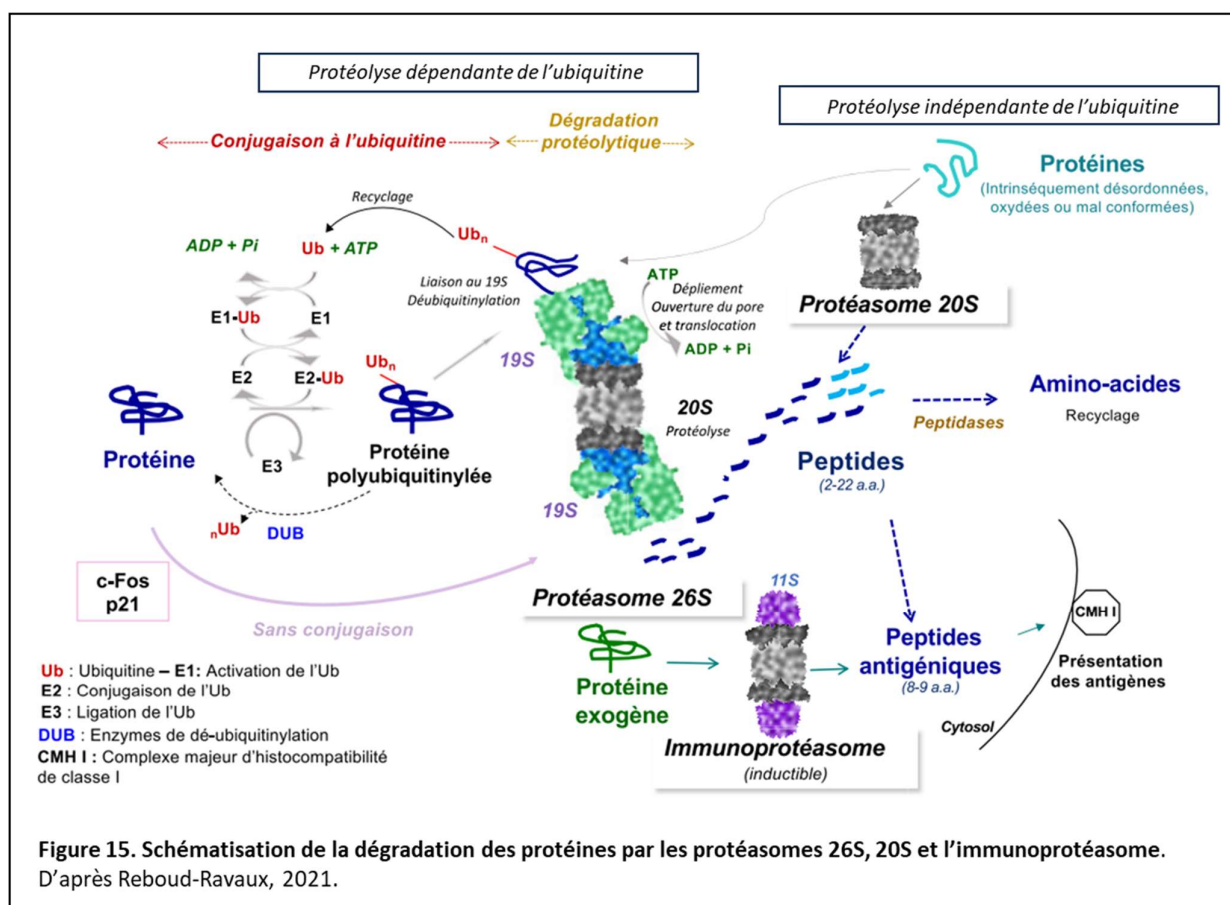
Il existe par ailleurs trois activateurs de PP1c, dont un est conservé entre l'homme et *Plasmodium* (I3), et deux activateurs sont spécifiques à *Plasmodium* : GEXP15 et pTKL.

Au cours de ma thèse j'ai pu identifier et caractériser un nouvel activateur de PP1c chez le parasite *P. berghei*. Il s'agit de la sous-unité régulatrice AAA-ATPase Rpt3, qui fait partie des sous-unités putatives du protéasome 26S. Dans la prochaine partie de cette introduction je vais donc présenter le rôle de ce complexe 26S et les différentes protéines qui le composent.

### III. La dégradation ciblée des protéines par le protéasome chez *Plasmodium*

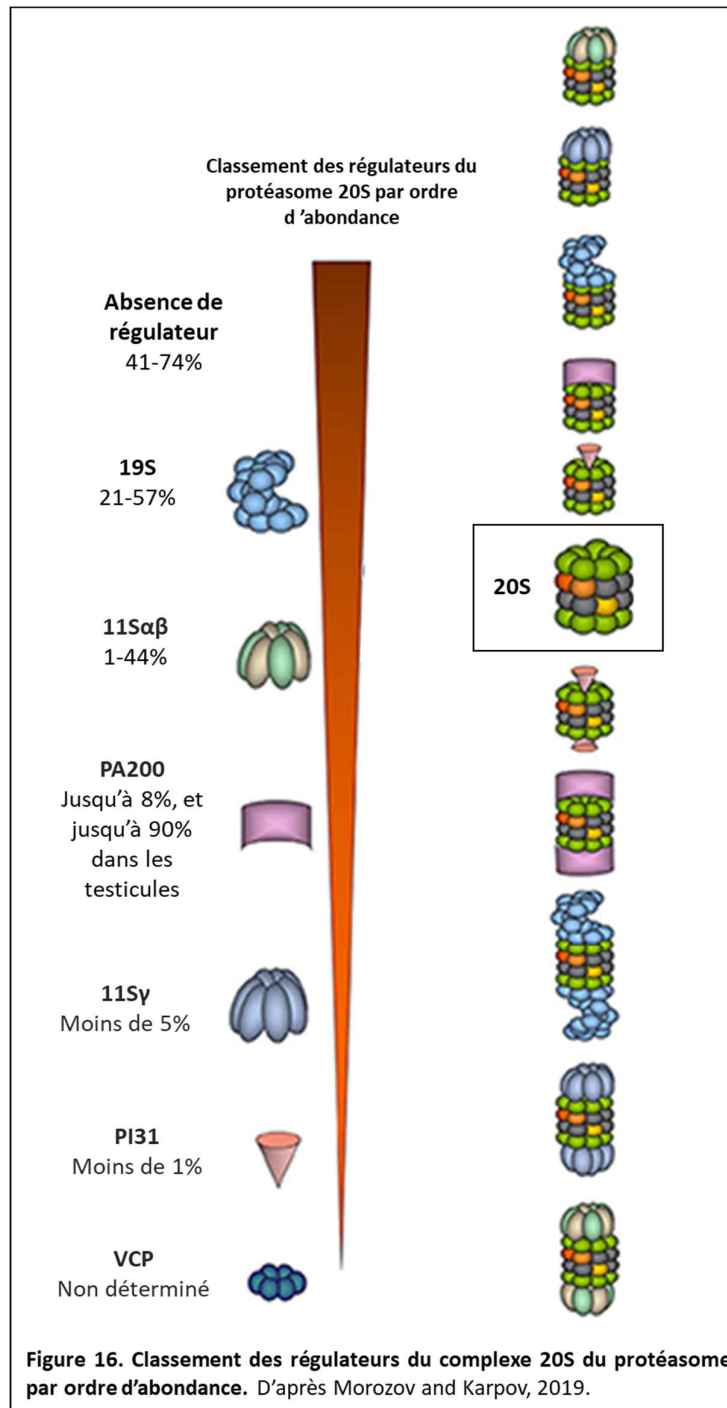
#### A. Généralités sur le protéasome

Si le prix Nobel de Chimie a été attribué à Aaron Ciechanover, Avram Hershko, et Irwin Rose en 2004 pour la découverte de la voie de l'ubiquitinylation et de son implication dans l'homéostasie protéique des cellules eucaryotes, Rudolph Schoenheimer avait déjà démontré dans les années 1940 que les protéines étaient dégradées en acides aminés pouvant intégrer à nouveau la synthèse protéique (Schoenheimer, 1946). Ces découvertes sont importantes car le protéasome 26S dégraderait 80 à 90% des protéines dans les cellules de mammifères (Gronostajski et al., 1985). Le reste de la dégradation protéique serait pris en charge par l'intégration des protéines dans des autophagosomes fusionnant ensuite avec les lysosomes (Lee and Goldberg, 1998; Nakatogawa et al., 2009). Un autre complexe, l'immunoprotéasome est exprimé dans les cellules immunitaires et se substitue au protéasome constitutif 26S suite à son induction par le TNF- $\alpha$  et l'INF- $\gamma$  (figure 15 - Reboud-Ravaux, 2021).



Il est à noter que d'autres protéasomes existent, mais ils sont exprimés de façon minoritaire dans la cellule (en figure 16). Nous remarquons ainsi que le protéasome 20S peut s'associer à de multiples régulateurs avec, par ordre d'abondance au niveau cellulaire : le 19S, le 11S $\alpha\beta$  (un activateur

cytoplasmique), le PA200 et le 11S $\gamma$  (tous deux principalement nucléaires), l'inhibiteur PI31 et le régulateur VCP dans des proportions non encore établies (Morozov and Karpov, 2019).



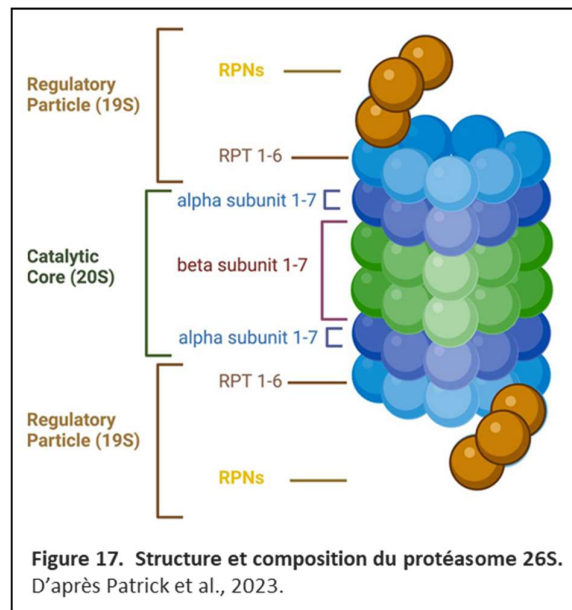
Dans la suite de ce manuscrit j'aborderai de façon plus approfondie le complexe 26S car la protéine Rpt3, objet de cette thèse, fait partie de ce complexe.

Le complexe enzymatique 26S a été nommé « protéasome » en 1988 à cause de son rôle dans la dégradation des protéines intracellulaires (Arrigo et al., 1988). Il est présent chez tous les eucaryotes



(Pickart and Cohen, 2004) et son poids moléculaire est de 2500 kDa. Il est composé du protéasome 20S, qui est le cœur protéolytique de l'enzyme, associé à une ou deux copies du complexe régulateur 19S (figure 17 - Patrick et al., 2023). Son rôle est de dégrader, par protéolyse, les protéines mal repliées, dénaturées ou obsolètes de manière ciblée, ce qui fait intervenir l'Ubiquitine (Ub) et l'ATP. Il est constitutivement présent dans le cytosol de la cellule et peut être associé au réticulum endoplasmique. Le protéasome 26S peut également être localisé dans le noyau, sous forme libre ou d'agrégats (Enenkel et al., 2022; Guo, 2022; Wójcik and DeMartino, 2003).

L'implication du protéasome a été démontrée dans la transduction de signaux, les réponses cellulaires aux stress, ainsi que dans le contrôle de la division cellulaire à travers la dégradation des cyclines (Hershko, 2005; Richter-Ruoff and Wolf, 1993; Sudakin et al., 1995). Son rôle dans la régulation de la transcription se fait *via* la dégradation de la protéine p53, ce qui a un effet sur la transcription de p21, une protéine inhibitrice des CDK (Maki et al., 1996). Le protéasome joue également un rôle dans la dégradation de la  $\beta$ -caténine (Aberle et al., 1997) qui intervient dans la voie de signalisation Wnt, une voie qui régule différents mécanismes dont la migration cellulaire et la polarité cellulaire (Komiya and Habas, 2008).



### 1. Le corps catalytique du protéasome 26S : le complexe 20S

Le complexe 20S aussi appelé « core particle » (CP) de 700 kDa (Coux et al., 1996) est retrouvé chez tous les eucaryotes mais également chez des bactéries de l'ordre Actinomycètes telles que celles appartenant au genre *Frankia* (Pouch et al., 2000). Le complexe 20S de ces bactéries n'étant pourtant pas apte à déplier les protéines, il agit en coopération avec le protéasome bactérien PAN (proteasome-activating nucleotidase) comme cela a déjà été décrit chez les bactéries *Methanococcus jannaschii* (Zwickl et al., 1999).

Ce corps catalytique est formé de 28 protéines : deux anneaux de 7 sous-unités protéiques homologues  $\alpha$ , et deux anneaux de sous-unités homologues  $\beta$ . Les anneaux externes sont composés des sous-unités  $\alpha$ , et les anneaux internes composés des sous-unités  $\beta$ . Un compartiment central détient l'activité



protéolytique (Kunjappu and Hochstrasser, 2014), portée par certaines sous-unités  $\beta$  qui présentent des sites actifs permettant la dégradation protéique : la sous-unité  $\beta 1$  présente une activité caspase-like, la sous-unité  $\beta 2$  une activité trypsine-like, et la sous-unité  $\beta 5$  une activité chymotrypsine-like.

## 2. La sélection des substrats et la régulation du 20S par le complexe 19S

Le complexe PA700, plus communément appelé 19S ou RP (Regulatory Particle), d'environ 900 kDa, a été caractérisé par Chu-Ping et collaborateurs (Chu-Ping et al., 1994). Son rôle est de reconnaître puis de déplier les substrats poly-ubiquitylés et de permettre leur translocation vers le 20S. Il est composé de 19 sous-unités protéiques comprenant 6 ATPases Rpt (Regulatory Particle ATPase) Rpt 1 à Rpt 6, et 13 sous-unités non-ATPases Rpn (Regulatory Particle non-ATPase). Cet ensemble de protéines est formé d'une base qui se lie directement au complexe 20S (Sharon et al., 2006), et d'un couvercle situé sur la face externe du complexe 19S. La base se compose des 6 sous-unités AAA-ATPase (Rpt1-6), et des sous-unités non-ATPase Rpn1, Rpn2, Rpn10, et Rpn13. Les 9 sous-unités non-ATPase restantes forment le « couvercle ».

Des précurseurs de certaines sous-unités régulatrices ont été découverts chez les archaebactéries (Zwickl et al., 1999) mais le processus détaillé par lequel le protéasome reconnaît et « digère » les protéines substrats a été décrit en 2018 (de la Peña et al., 2018). Ces auteurs ont déterminé que l'anneau hétéro-hexamérique des ATPases Rpt1 à 6 jouait un rôle essentiel, ils lui attribuèrent le qualificatif de « moteur », car les propriétés de liaison et d'hydrolyse d'ATP de ces protéines leur permet d'opérer la translocation du substrat vers l'intérieur du corps catalytique 20S. Il est à noter que la reconnaissance des substrats ne nécessite pas d'ATP, seul le dépliement et le passage de substrats dans le pore formé par le complexe 19S requiert la liaison et l'hydrolyse d'ATP.

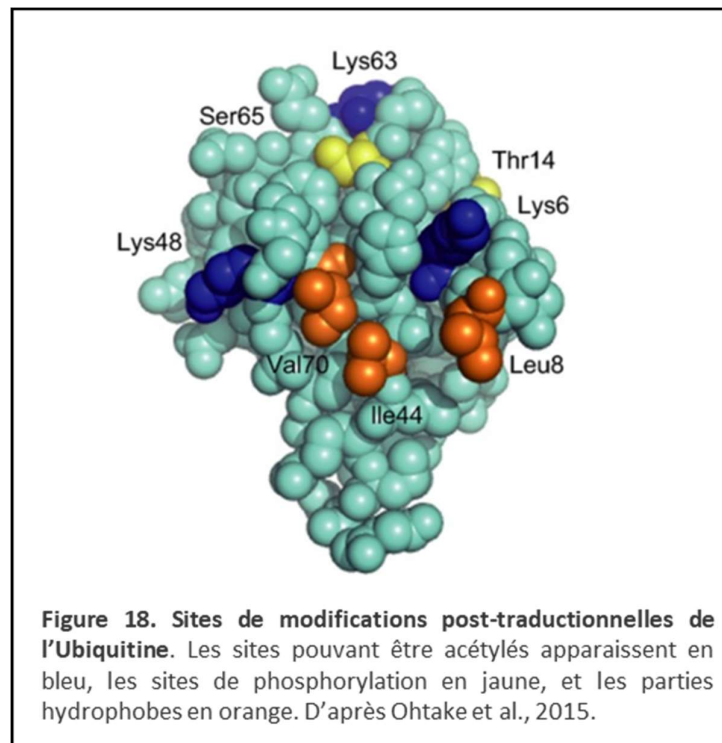
## 3. Intervention de l'Ubiquitine et importance des déubiquitinases

Le système UPS (Ubiquitin Proteasome System) correspond au système de dégradation protéique par le protéasome 26S comme illustré en figure 15. L'intervention de différentes enzymes et de l'ubiquitine sont indispensables pour accomplir ce processus de dégradation sélective. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés, qui se fixe par une liaison covalente sur le groupe  $\epsilon$ -amine des résidus lysine, elle est donc transférée via son extrémité C-terminale sur la protéine à dégrader, ou sur d'autres molécules d'ubiquitine déjà présentes sur la protéine cible.

Les molécules d'ubiquitine peuvent être conjuguées par leur méthionine (M1) ou par l'un de leurs résidus lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63). Les chaînes d'Ub possédant un seul type de liaison sont dites « homotypiques » alors que celles possédant plusieurs types de liaison sont « hétérotypiques ».

L'enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme) active les molécules d'ubiquitine grâce à la consommation d'ATP puis elle les transfère vers l'enzyme E2 (ubiquitin-conjugating enzyme). C'est grâce à ce processus que les protéines à dégrader fixent de manière covalente 1 à 7 molécules d'Ub (Akutsu et al., 2016).

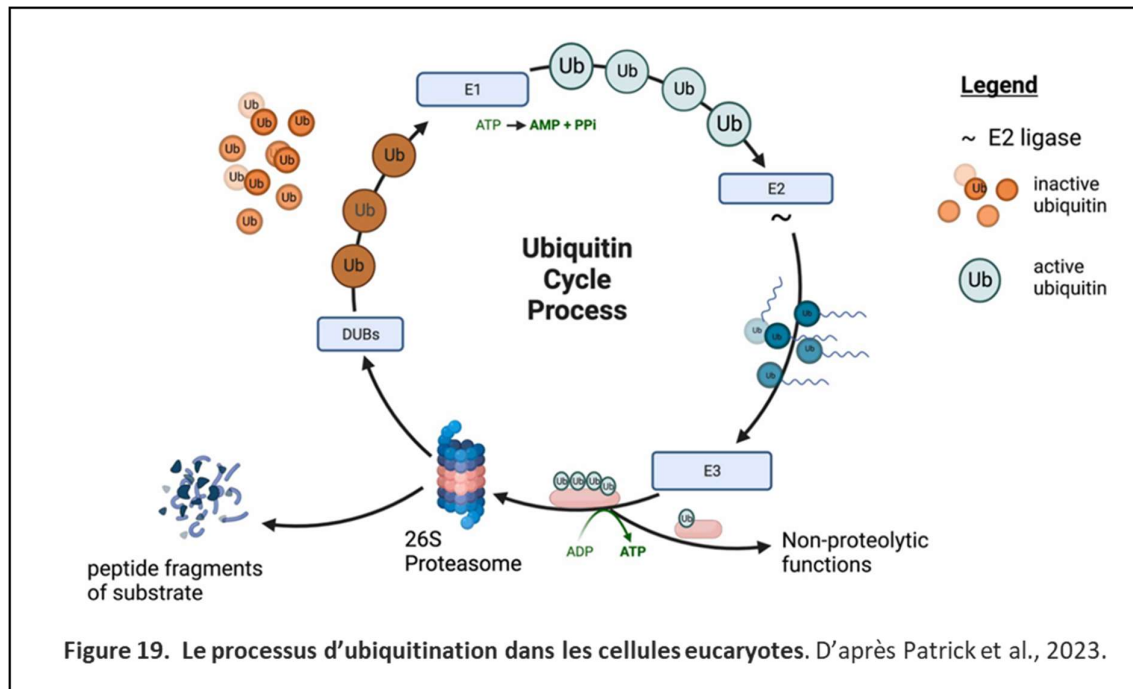
Des modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu après la fixation de l'Ub sur sa protéine cible. Ainsi, l'Ub peut être acétylée sur 6 de ses 7 résidus lysine (Ohtake et al., 2015), ou phosphorylée sur un total de 7 acides aminés comprenant des sérines, thréonines ou tyrosines (Kane et al., 2014; Sharma et al., 2021) (figure 18). L'acétylation s'effectue majoritairement sur des substrats mono-ubiquitylés alors que la phosphorylation intervient sur des chaînes de poly-ubiquitine.



Enfin, les protéines E3 ligases permettent le transfert final de la protéine poly-ubiquitinée vers le protéasome 26S, entraînant ainsi sa dégradation (figure 19).

La complexité du système Ubiquitine-protéasome est élevée chez les mammifères, car si l'on prend en compte la variété de protéines intervenant dans ce système, environ 5 000 protéines seraient impliquées, parmi lesquelles 2 enzymes E1, 40 enzymes E2 et 600 enzymes E3 (Clague et al., 2015).

Une fois le substrat engagé dans le protéasome, la chaîne d'ubiquitine est retirée grâce aux enzymes DUBs (déubiquitinases). Chez l'homme, il existe 5 familles de déubiquitinases : elles sont regroupées selon leurs configurations structurales, totalisant une centaine de protéines. Ces DUBs agissent en protégeant les substrats de la dégradation, par le retrait de l'ubiquitine de certaines protéines voués à la dégradation par le protéasome (Nijman et al., 2005; Sharma et al., 2021). Chez certains organismes, comme *Plasmodium*, malgré la détection de domaines conservés putatifs de DUBs, aucune protéine DUB n'a encore pu être caractérisée biochimiquement ou fonctionnellement (Kumar et al., 2022).

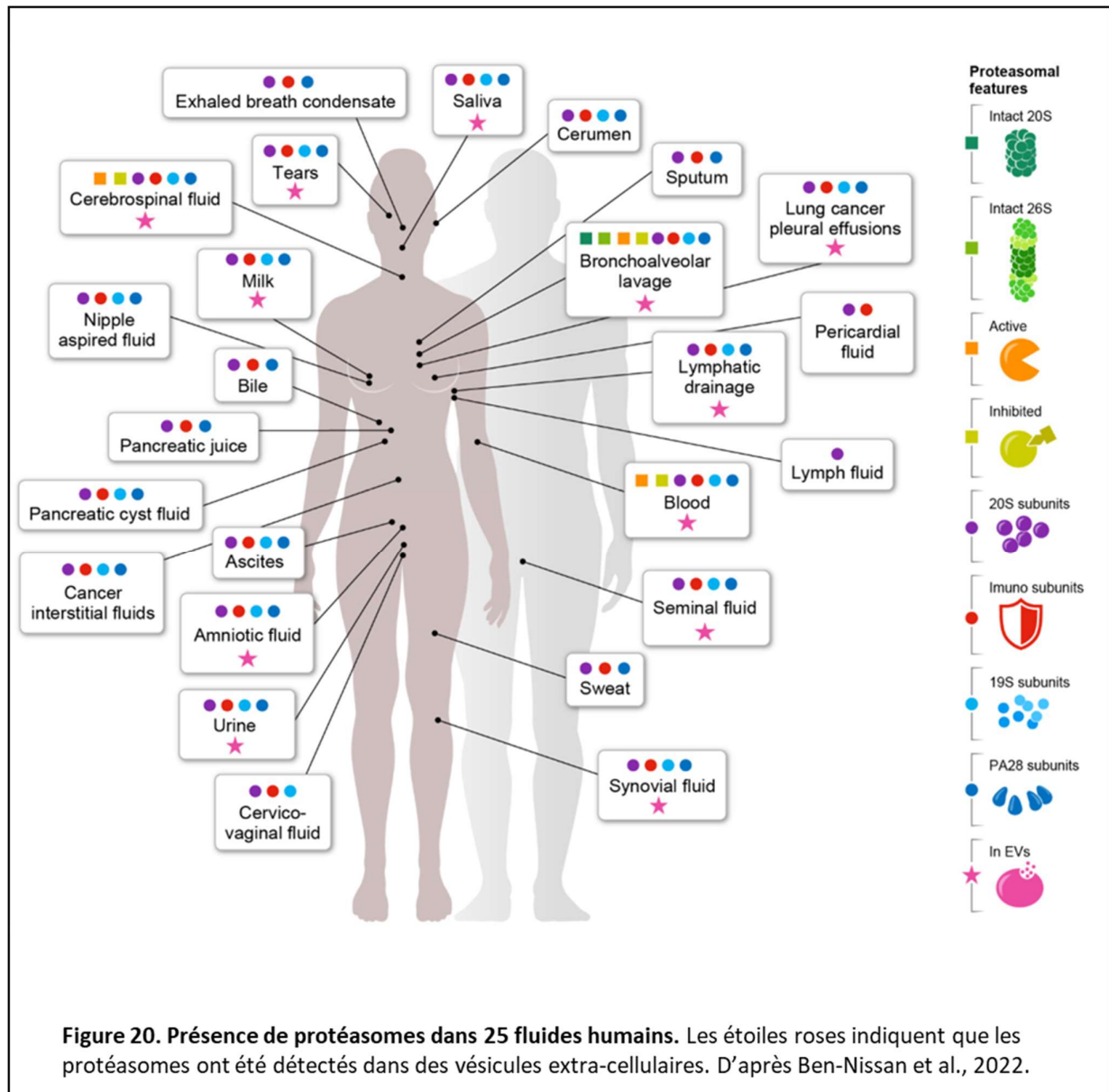


#### 4. Localisation du protéasome 26S

La localisation des protéasomes 26S varie selon le stade de la croissance cellulaire, et selon le type cellulaire. Chez l'homme, sa localisation est à la fois cytoplasmique et nucléaire : dans le cytoplasme, le protéasome est principalement concentré près du centrosome (Sharma et al., 2021) mais ce complexe peut également être retrouvé au niveau de membrane cellulaire, de la membrane nucléaire, il peut être associé à la chromatine, au cytosquelette, à des organites cellulaires ou dépourvus de membrane (Guo, 2022).

Chez la levure *S. cerevisiae*, les protéasomes sont majoritairement situés dans le noyau. Leur transfert vers le cytosol s'opère dans des granules appelés les PSG (proteasome storage granules) lorsque les cellules sont privées de source de carbone et entrent en quiescence (Laporte et al., 2008). Chez cet organisme, à la suite de l'exposition de la cellule à un stress, les protéasomes sont exportés d'un compartiment à un autre. Au retour à l'état basal, les protéines importines constitutives du NPC (nuclear pore complex) reconnaissent des signaux associés aux protéines du protéasome, et les transfèrent vers le noyau (Wendler and Enenkel, 2019). Le processus de mitose fermée nécessite en effet chez la levure un transport de protéines actif à travers le noyau.

Si le protéasome est majoritairement étudié dans sa localisation intracellulaire, ce complexe peut également être retrouvé en dehors des cellules, comme cela a été décrit il y a 30 ans : le protéasome accompagne la digestion de membranes (Saitoh et al., 1993). Dans ce cas, les protéasomes sont le plus souvent sous la forme 20S, ils sont appelés c-protéasomes (circulating proteasomes) (Kulichkova et al., 2017). La localisation de ces protéasomes est très variable : les protéasomes sont présents sous différentes configurations dans nombre de sécrétions et fluides chez l'homme (estimés à environ 25, incluant des fluides dits « pathologiques ») (figure 20). Les protéasomes peuvent être retrouvés de manière libre dans ces fluides, ou encapsulés dans des vésicules extra-cellulaires dont le diamètre est variable (30 nm à 500 nm) (Ben-Nissan et al., 2022).



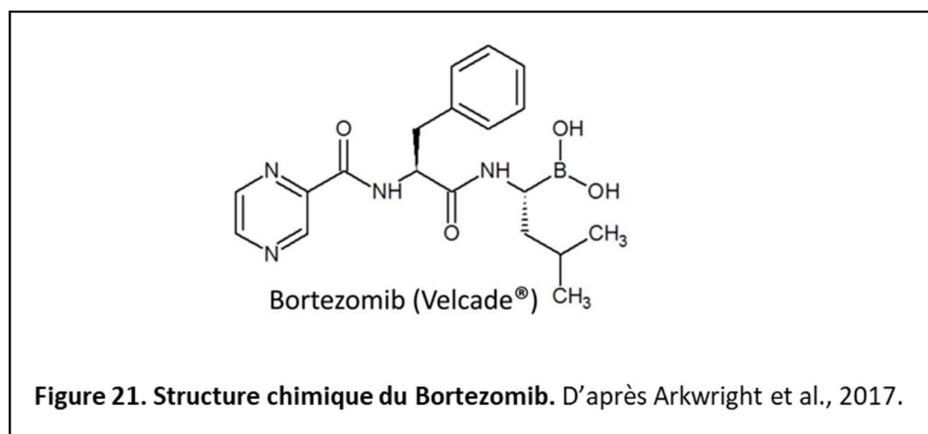
Chez l'homme, l'implication du système Ubiquitine-Protéasome a été démontrée dans des dérégulations du cycle cellulaire entraînant différentes pathologies telles que des maladies neurodégénératives, auto-immunes (Schwartz and Ciechanover, 1999) et des cancers (Shen et al., 2013). Nous pouvons ainsi citer : la leucémie, le cancer colorectal, œsophagique, cervical, l'ostéosarcome, le cancer du poumon ou du foie.

L'identification de certaines protéines du système UPS dont l'expression est altérée dans certaines pathologies a permis le développement de composés thérapeutiques ciblant ces différents composants : actuellement, l'implication de 51 enzymes, toutes appartenant au système UPS a été démontrée dans différents types de cancers : il s'agit majoritairement de protéines E3 ligases, et de déubiquitines et, minoritairement, de certaines E1 et E2 (Sharma et al., 2021). Par exemple, dans le cancer colorectal, l'enzyme DUB USP5 déubiquitine la protéine FoxM1, or sa destruction est nécessaire pour palier à la

suractivation de la voie Wnt/beta-caténine qui cause une croissance tumorale accompagnée d'angiogénèse (Sharma et al., 2021).

Parmi des composés à l'efficacité prouvée, ciblant des composants de l'UPS, le disulfiram (DSF) associé au cuivre (Cu) permet le traitement du cancer du sein triple-négatif et agirait par l'inhibition de protéines E3 ligases (Chu et al., 2023; Sharma et al., 2021).

Une meilleure connaissance du système UPS et du protéasome 26S, essentiel dans la survie des cellules cancéreuses a permis des avancées de taille dans les traitements de certains cancers. Par exemple, l'inhibiteur de protéasome Velcade® (Bortezomib) est utilisé pour le traitement du myélome multiple (depuis son autorisation par la FDA 2003). Ce composé (figure 21) inhibe le protéasome 20S par l'interaction non-covalente entre son atome de Bore et les groupes hydroxyle des résidus thréonine appartenant aux sous-unités  $\beta 5$  et  $\beta 1$  du protéasome 20S. Ceci a pour conséquence d'inhiber l'activité catalytique de ces sous-unités, provoquant l'accumulation de protéines ubiquitinées, la perturbation de la réponse UPR, l'inhibition de la voie NF $\kappa$ B, et la stabilisation de protéines suppresseur de tumeurs, conduisant ainsi à la mort cellulaire (Arkwright et al., 2017; Chen et al., 2011; Yu et al., 2004).



## 5. Régulation du protéasome par phosphorylation/déphosphorylation

Le protéasome 26S est un complexe dynamique régulé par des modifications post-traductionnelles qui modulent de nombreux aspects fonctionnels tels que l'activité catalytique, la localisation cellulaire, l'assemblage et désassemblage du complexe, les interactions avec des partenaires et la reconnaissance des substrats (Scruggs et al., 2012). Il existe une grande variété de MPT intervenant dans la régulation du protéasome. Parmi elles, nous pouvons citer la méthylation, l'acétylation, la nitrosylation, l'ubiquitination, la carbonylation et la N-myristoylation. Ces MPT peuvent avoir un effet activateur ou inhibiteur sur l'activité du complexe (Kors et al., 2019).

Parmi les MPT du protéasome, la phosphorylation réversible est l'une des plus étudiées (revue de (Guo et al., 2017). Grâce à des analyses en Spectrométrie de masse de grande ampleur, plus de 400 phosphosites ont été identifiés sur le protéasome humain 26S. Des kinases impliquées dans sa phosphorylation ont déjà pu être identifiées, telles que PKA, PKG et CK2. Par exemple, la phosphorylation par la kinase PKA de protéasomes 20S (isolés à partir de cellules cardiaques de souris) au niveau des sous-unité  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ , et  $\beta 7$  sur des résidus sérine, ou au niveau de  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 7$  sur des thréonines, accroît l'activité peptidase de ces complexes 20S *in vitro* (Zong et al., 2006).

Le rôle des phosphatases dans la régulation du complexe 26S est moins bien connu. Différentes phosphatases telles que la Protéine phosphatase 1 (PP1) (Zhang et al., 2007a), la Protéine phosphatase 2A (PP2A) (Zong et al., 2006) et la protéine UBLCP1 (Ubiquitin-like domain containing CTD phosphatase-1) (Guo et al., 2011) seraient impliquées dans la réduction de l'activité peptidase du protéasome *in vitro*. De plus, les phosphatases PP2A et la Calcineurine (sérine/thréonine phosphatase  $Ca^{2+}$ -dépendante) ont déjà été retrouvées complexées au protéasome 20S (Li et al., 2011; Zhang and Wei, 2011; Zong et al., 2006). Cependant, le rôle de ces différentes phosphatases dans la régulation du protéasome est encore mal déterminé.

L'intervention de PP1 dans le fonctionnement du protéasome 26S humain a été démontrée de manière indirecte : dans des conditions physiologiques, où la sous-unité du 19S Rpt2 ne pourrait pas être *O*-GlcNAcétylee (ajout d'un groupe N-Acétyleglucosamine sur des résidus sérine/thréonine), l'activation du protéasome par la kinase PKA se ferait *via* la phosphorylation de Rpt6, une autre sous-unité du 19S. L'inactivation du protéasome par PP1c  $\gamma$  pourrait contrebalancer ce phénomène, qui n'a pas encore été élucidé en totalité (Zhang et al., 2007b). Quant à la phosphatase UBLCP1, elle intervient dans la régulation négative du protéasome 26S en induisant la dissociation des complexes 19S et 20S (Guo et al., 2011).

## **B. Le protéasome 26S chez *Plasmodium***

Les parasites du genre *Plasmodium* expriment le protéasome 26S et possèdent également des complexes protéolytiques issus de son origine bactério-algale : un homologue du protéasome procaryote ClpQ situé dans la mitochondrie parasitaire (Ramamamy et al., 2007), et un complexe ClpP, de nature caséinolytique, situé dans l'apicoplaste.

### **1. Conservation du protéasome 26S**

Chez *Plasmodium*, le protéasome 26S a été purifié et caractérisé, tout comme ses interactants physiologiques (Muralidharan et al., 2011; Wang et al., 2015). On retrouve ainsi dans le génome du parasite tous les composants des complexes 19S et 20S. Comme chez les eucaryotes, l'accès des protéines au 20S est régulé par le complexe 19S (Xie et al., 2019). De plus, les composants  $\alpha$  et  $\beta$  du corps catalytique sont exprimés tout au long du cycle érythrocytaire chez les trophozoïtes, schizontes et gamétocytes, avec une localisation ubiquitaire dans le noyau et dans le cytoplasme (Aminake et al., 2011). Différents composants putatifs du 19S possèdent des domaines de reconnaissance des substrats : la sous-unité Rpn10 possède 2 domaines putatif UIM, et la sous-unité Rpn13 un domaine putatif pru. Une étude des partenaires du protéasome 26S parasitaire a permis de suggérer la conservation de plusieurs mécanismes impliqués dans le système UPS (Wang et al., 2015). Ainsi, 2 protéines connues pour exercer la fonction de déubiquitineuse chez les eucaryotes, ont été retrouvées associées au protéasome parasitaire : PfUCH54 et PfUSP14. Les auteurs ont également retrouvé des protéines constitutivement associées au protéasome chez les eucaryotes telles que les protéines PA28, Rpn4, Rad23 et Dsk2 ainsi que d'autres protéines chaperonnes connues pour leur association avec ce complexe telles que la Hsp70 (connue pour orienter des substrats agrégés vers le protéasome) et Hsp90 (intervenant dans l'assemblage des composants du protéasome), TCP-1 (une chaperonne intervenant dans le repliement de protéines cytosoliques) et une homologue de CDC48, qui, chez les eucaryotes joue un rôle important dans la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD – Endoplasmic reticulum associated degradation) (Wang et al., 2015).

Puis, en 2016, la structure du protéasome 20S (associé à un inhibiteur covalent WLW-vs) a été dévoilée chez *Plasmodium falciparum*, par Cryo-EM (cryo-electron microscopy) élucidant la structure de ce complexe à une résolution de 3.6 Å (Li et al., 2016a). Cette avancée a permis d'établir les bases moléculaires de la spécificité du protéasome 20S parasitaire vis-à-vis du complexe 20S humain puisque dans le cadre de cette analyse, les auteurs ont pu, entre autres, confirmer que WLW-vs se fixait de manière covalente à la sous-unité  $\beta 2$  parasitaire, alors que la superposition avec la structure 3D du protéasome humain ne permettait pas de retrouver la même interaction avec cet inhibiteur.

L'analyse du protéasome parasitaire par cryo-EM a également permis de compléter une analyse précédente dans laquelle des inhibiteurs du protéasome parasitaire avaient été identifiés, inhibant efficacement l'activité de la sous-unité  $\beta 5$  du complexe 20S, alors que ces composés inhibaient très faiblement le protéasome humain (Li et al., 2014).

Enfin, plusieurs études ont pu ensuite démontrer l'essentialité du complexe 26S chez le parasite par l'utilisation de différents inhibiteurs du protéasome qui permettaient de bloquer la croissance parasitaire à tous les stades (Krishnan and Williamson, 2018; Xie et al., 2019).

## 2. Effets des inhibiteurs de protéasome sur *Plasmodium*

De manière générale, la plupart des inhibiteurs de protéasome sont de courts peptides « capés » en N-terminal et possédant un groupe électrophile en C-terminal qui interagit de manière réversible ou irréversible avec le N-terminal de la thréonine catalytique au sein du site actif du protéasome. La spécificité de ces peptides pour la thréonine du site actif provient majoritairement de la séquence en acides aminés de ces inhibiteurs (Groll and Huber, 2004).

Ces inhibiteurs bloquent le développement de *Plasmodium* au cours des stades intra-hépatocytaire, intra-érythrocytaire, gamétocyte, oocyste et sporozoïte (Czesny et al., 2009; Gantt et al., 1998; Kirkman et al., 2018; Tschan et al., 2013) et agissent spécifiquement en inhibant les sous-unités catalytiques  $\beta 5$  ou  $\beta 2$ , certains ciblant les deux à la fois, comme dans le cas de certains vinyl sulfones.

Les inhibiteurs peuvent être classés en deux catégories : les inhibiteurs covalents, et les inhibiteurs non-covalents.

Les inhibiteurs covalents, tels que les vinyl sulfones, les epoxyketones, et les boronates, forment des liaisons covalentes avec les thréonines catalytiques des sous-unités  $\beta$ . La liaison formée est irréversible dans le cas des vinyl sulfones et des epoxyketones, ou alors elle est lentement réversible comme dans le cas des boronates (Bortezomib).

Les inhibiteurs non-covalents présentent une moindre affinité vis-à-vis du protéasome et peuvent ainsi nécessiter une durée d'administration plus longue pour compenser la courte durée d'interaction. Parmi ces inhibiteurs, nous retrouvons les AsnEDAs (asparagine éthylènediamines) et les inhibiteurs peptidiques réversibles (tableau IV).



Nom	Classe chimique	covalent/ non-covalent	reversible/ irreversible	Selectivité	cible au sein du 20S
WLL	vinyl sulfone	covalent	irreversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$ and $\beta 2$
WLW	vinyl sulfone	covalent	irreversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 2$
EY 4-78	vinyl sulfone	covalent	irreversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$ and $\beta 2$
J-50	epoxyketone	covalent	irreversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
J-71	epoxyketone	covalent	irreversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
J-78	epoxyketone	covalent	irreversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
J-80	epoxyketone	covalent	irreversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
Epoxomicin	epoxyketone	covalent	irreversible	hôte + <i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
MMV1579506	boronate	covalent	reversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
MPI-12	boronate	covalent	reversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
Bortezomib	boronate	covalent	reversible	hôte + <i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
PK21004	AsnEDA	non-covalent	reversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
WHZ-04	AsnEDA	non-covalent	reversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
TDI-4258	AsnEDA	non-covalent	reversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
TDI-8304	peptide macrocyclique	non-covalent	reversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
Compound 4	peptide N,C-capped	non-covalent	reversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$
Compound 6	peptide N,C-capped	non-covalent	reversible	<i>Plasmodium</i>	$\beta 5$

**Tableau IV. Liste des inhibiteurs de protéasome de *P. falciparum* indiquant leur classe chimique, le type de liaison et leur cible.** Adapté de Deni et al., 2023.

Il est à noter que des mutations dans certaines sous-unités du protéasome peuvent jouer un rôle délétère entraînant une résistance vis-à-vis de ces inhibiteurs : une étude a démontré, par l'utilisation des souches de *Plasmodium* mutées sur des sous-unités du complexe 19S : Rpt4 (mutation E380-STOPcodon), Rpt5 (mutation G319S), et Rpn6 (mutation E266K), que ces mutations modulaient la susceptibilité du parasite aux inhibiteurs des sous-unités  $\beta$  (Deni et al., 2023).

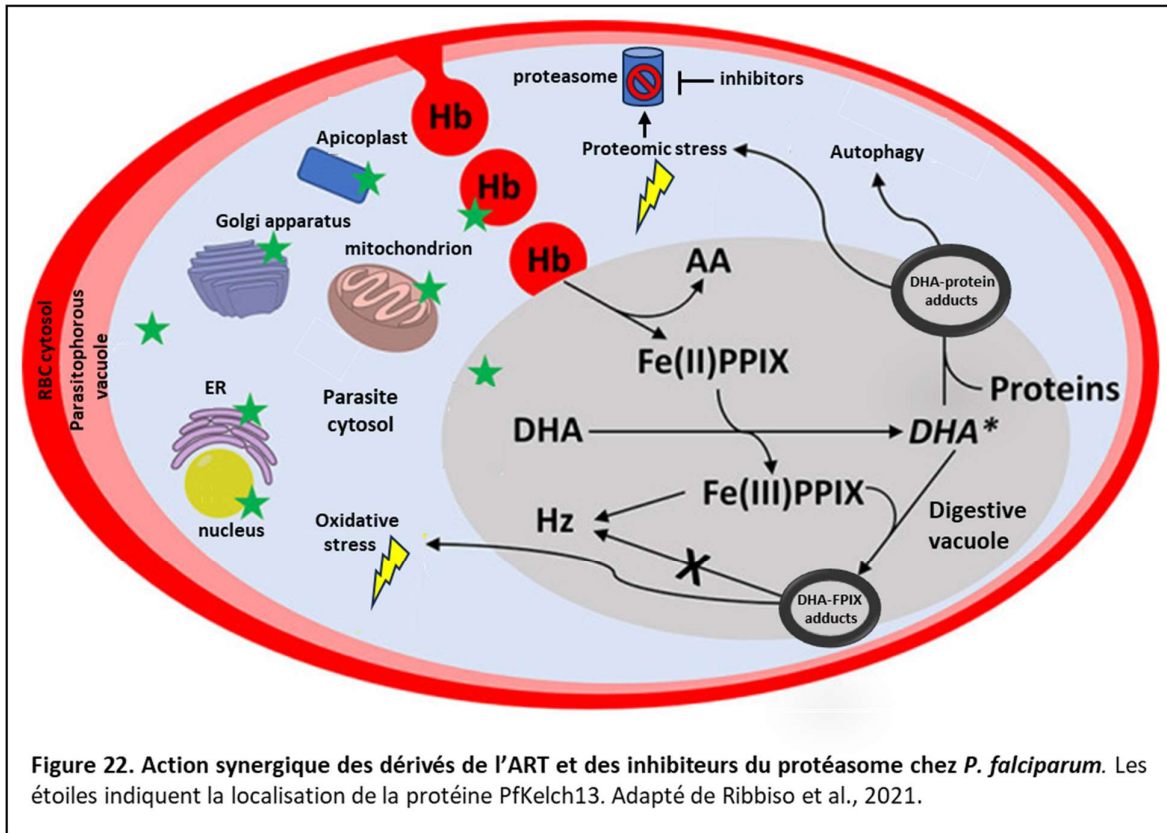
Néanmoins, le bien-fondé de l'utilisation de ces inhibiteurs a été démontré par des études *in vitro* et *in vivo* (Dogovski et al., 2015; Li et al., 2016b) où il a été observé que des inhibiteurs de protéasome pouvaient agir en synergie avec la dihydroartémisinine (DHA), amplifiant l'effet létal sur *Plasmodium*. Il est très intéressant de mentionner également que ces inhibiteurs agiraient aussi sur des souches résistantes à l'artémisinine.

### 3. Synergie entre l'ART et des inhibiteurs de protéasome

L'action conjointe de l'ART et des inhibiteurs de protéasome est présentée de manière détaillée en figure 22 : l'hémoglobine est prise en charge par les plasmepsines et les falcipaines au sein de la vacuole digestive, où elle sera « digérée » en acides aminés ou courts peptides utilisables par le parasite. Ce processus libère de la FPIX (ferriprotoporphyrin IX). C'est avec la Fe(II)PPIX (ferriprotoporphyrin IX réduite) que la DHA est activée au sein de la vacuole digestive. Les radicaux de DHA interagissent avec différentes protéines ce qui conduit à une surcharge de protéines endommagées dirigées vers le protéasome, FPIX ne peut plus participer à la détoxification de l'hème provoquant un stress oxydant important (Ribbiso et al., 2021). En parallèle, le protéasome, dont le fonctionnement est altéré par les

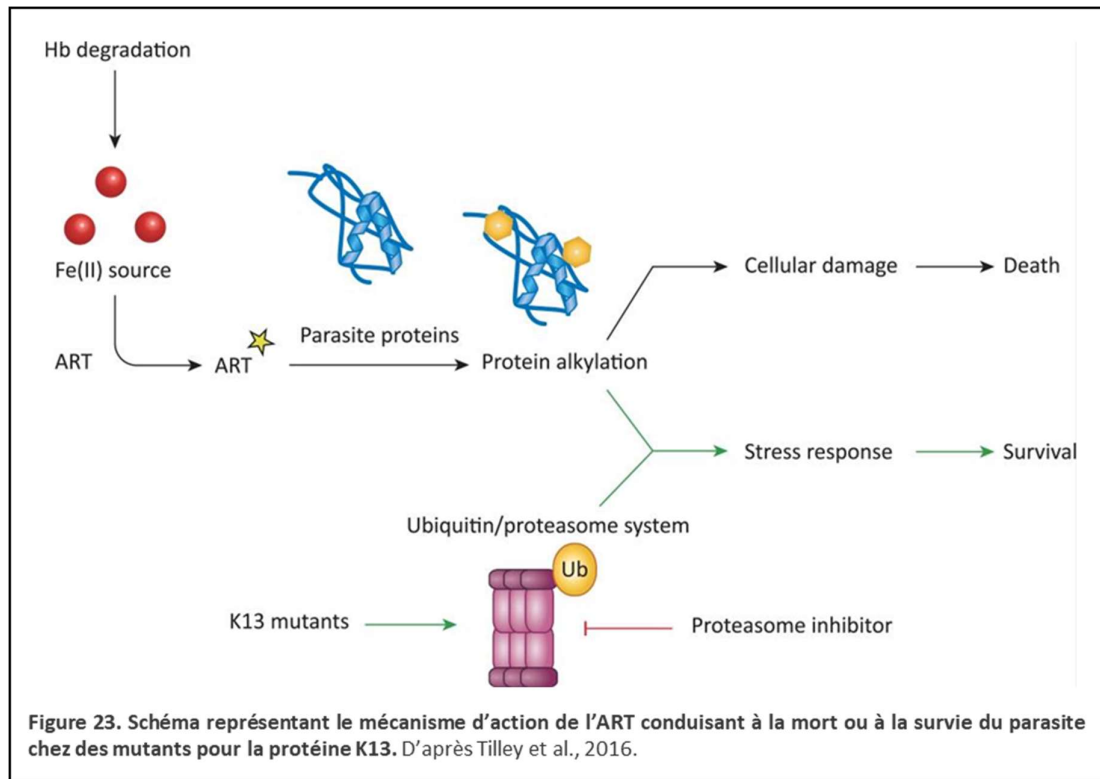


inhibiteurs fixés sur les sous-unités catalytiques du 20S, ne peut pas dégrader les protéines alkylées et endommagées, entraînant ainsi la mort du parasite.



Il est à noter que les parasites mutants pour la protéine Kelch 13 (K13), une protéine intervenant dans l'endocytose de l'Hb, diminuent l'endocytose parasitaire. Parallèlement, la réponse cellulaire au stress est augmentée, ce dernier aspect implique des niveaux plus faibles de protéines ubiquitinées, permettant ainsi au parasite de survivre en présence d'ART (Dogovski et al., 2015).

Néanmoins, le traitement avec des inhibiteurs de protéasome diminue la réponse parasitaire au stress, alors qu'il y a une accumulation de protéines ubiquitinées faisant suite au traitement par ART. L'impossibilité de dégrader les protéines ubiquitinées entraîne ainsi la mort du parasite muté K13 (Tilley et al., 2016) (figure 23).



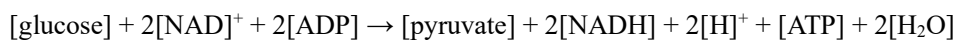
Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'interaction entre la protéine Rpt3 appartenant au complexe 19S et la phosphatase PP1 chez le parasite, ce qui m'amène à développer les caractéristiques et les fonctions de Rpt3 chez différents organismes.

## C. La protéine Rpt3 et son rôle

### 1. Rpt3 et ses interactants

Rpt3 est l'une des six AAA-ATPases constituant la base du complexe 19S. Les AAA-ATPases sont des protéines qui couplent l'énergie chimique produite suite à l'hydrolyse de l'ATP, à un changement de conformation résultant en une force mécanique exercée sur un substrat (Erzberger and Berger, 2006). La Rpt3 humaine est plus communément appelée PSMC4 ou Tat-Binding protein 7 (TBP7) et elle existe sous deux isoformes : l'un de 418 acides aminés (47.4 kDa) et l'autre de 387 acides aminés (43.5 kDa). Chez le parasite, un seul isoforme a été décrit chez *P. falciparum* (PF3D7\_0413600, 392 acides aminés, 44.6 kDa) et chez *P. berghei* (PBANKA\_0715600, 395 acides aminés, 45.1 kDa).

Les ATPases requièrent de l'ATP pour exercer leurs fonctions, or il a été décrit que le parasite était entièrement dépendant de la glycolyse pour sa source d'énergie (Oyelade et al., 2016). Celle-ci est 100 fois plus intense que celle du globule rouge (Langsley and Ramdani, 2014). Ainsi, lors du stade érythrocytaire de *Plasmodium*, l'ATP proviendrait de façon bien moindre de la phosphorylation oxydative (Nina et al., 2011) et serait principalement dérivé de la voie glycolytique permettant de convertir le glucose en pyruvate et en ATP à travers la réaction suivante :



Selon la base de données Uniprot, 8 protéines interagissent directement avec la PSMC4 humaine (référence Uniprot P43686) : il s'agit de PSMD10, NEK7, CALR, PSMC5 (Rpt6), PSMC1 (Rpt2), PSMC6 (Rpt4), DLST et P00441 que je vais présenter ci-après :

**PSMD10** : autrement appelée protéine p28, elle est aussi nommée Gankyrine. Elle possède une série d'hélices alpha et joue le rôle de chaperonne lors de l'assemblage du protéasome 26S (Wang et al., 2007). Elle interagit également avec CDK4 ainsi qu'avec l'ubiquitine ligase E3 MDM2. Elle possède un rôle anti-apoptotique et elle activerait la voie NONO/AR/HMGB1 entraînant une résistance au traitement dans le cancer de la prostate (Peng et al., 2023).

**NEK7** est une protéine kinase intervenant notamment lors de la mitose (Yissachar et al., 2006).

**CALR** est une protéine chaperonne de type lectine, interagissant avec les glycoprotéines et activant le repliement, l'assemblage d'oligomères et le contrôle qualité dans le réticulum endoplasmique. Cette protéine lie l'ion calcium et interviendrait dans l'homéostasie du calcium chez les ovocytes (Nauseef et al., 1995).

**PRS8** (PSMC5 ou Rpt6), **PRS4** (PSMC1 ou Rpt2) et **PRS10** (PSMC6 ou Rpt4) font partie de la base du complexe régulateur du 19S.

**DLST** ou Dihydroliipoamide succinyltransferase, cette protéine fait partie du complexe 2-oxoglutarate déhydrogénase, principalement actif dans les mitochondries et permettant de catalyser la conversion du 2-oxoglutarate en succinyl-CoA et CO<sub>2</sub> (Remacha et al., 2019).

**P00441** ou Superoxide dismutase, est une protéine qui fixe des ions Cu-Zn et qui détruit les radicaux libres produits dans la cellule (Lin et al., 2013).

A ce jour, aucun homologue de ces protéines chez le parasite, lorsqu'il existe, n'a été décrit comme interagissant directement avec la Rpt3 parasitaire.

## 2. Rôle de Rpt3 au sein et en dehors du protéasome

L'ATPase Rpt3, au sein du protéasome et grâce à son motif HbYX (acides aminés hydrophobe-tyrosine-X) situé en extrémité C-ter, interagit avec des lysines présentes dans des poches formées par les s/u alpha de l'anneau externe du 20S, ce qui permet l'ouverture du pore de l'ensemble catalytique 20S (Smith et al., 2007).

Rpt3 n'est pas la seule Rpt à posséder un motif HbYX. Chez l'homme, 4 des 6 ATPases possèdent ce motif en C-terminal : Rpt1, Rpt2, Rpt3 et Rpt5. Chez la levure, trois isoformes de Rpt3 permettent l'interaction *in vitro* avec des protéasomes 20S purifiés, et ce, au niveau des sous-unités  $\alpha 1$  à  $\alpha 6$ , permettant ainsi au substrat d'accéder au corps catalytique (Park et al., 2013). En outre, chez cet organisme, différentes chaperonnes peuvent altérer l'interaction entre les sous-unités Rpt et le complexe 20S, il s'agit des protéines Hsm3, Nas6 et Rpn14.

Rpt3 pourrait être impliquée dans d'autres fonctions au sein de la cellule, que celles reliées au complexe du protéasome. Ainsi, la PSMC4 humaine, tout comme les protéines ENH isoform 1b (PDLIM5) et importin-5 (produit du gène ipo5) seraient impliquées dans la formation d'extensions cellulaires chez les fibroblastes humains (HGF - Human gingival fibroblasts). Ces extensions s'insèrent dans des matrices de collagène en 2D (Yuda et al., 2018) et les auteurs ont détecté que le duo de protéines ipo5

et PSMC4 serait nécessaire à l'organisation, l'alignement et à la dégradation du collagène. Les protéines PDLIM5 et PSMC4 colocalisent avec les filaments d'actine et sont 10 fois plus concentrées dans les extrémités des extensions en comparaison du corps cellulaire.

Une étude conduite chez la souris a également permis de montrer le rôle de Rpt3 dans l'embryogénèse. (Sakao et al., 2000). Les auteurs ont tenté de générer des souris déficientes pour PSMC3 (Rpt5) et PSMC4 (Rpt3). Ils ont alors observé que lors de l'embryogénèse, les souris *Psmc3-* ou *Psmc4-* ne réussissent pas à compléter leur développement blastocytaire. Ces résultats montrent qu'en plus d'être essentiels, les fonctions de ces gènes ne peuvent pas être compensées *in vivo* chez ce mammifère.

### 3. Les modifications post-traductionnelles de Rpt3

A ce jour, la Rpt3 humaine (Uniprot Ref P43686) et d'après la base de données Uniprot (<https://www.uniprot.org>), présente trois sites de phosphorylation, possédant l'étiquette « combined sources » - gage d'une description expérimentale: 21-Phosphosérine (Mayya et al., 2009), 25-Phosphothréonine (Bian et al., 2014) et 28 Phosphosérine (Daub et al., 2008; Dephoure et al., 2008; Wang et al., 2007).

Une équipe a également déterminé par différentes méthodes (études biochimiques, CRISPR/Cas9 et ARN interférence) que la phosphorylation de Rpt3 au niveau de la thréonine-25 était dépendante de la kinase DYRK2 (dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2) et que cette modification, chez des cellules humaines cancéreuses (HaCaT) ou non cancéreuses (MDA-MB-231) activait la translocation et la dégradation des substrats au sein du protéasome 26S (Banerjee et al., 2018; Guo et al., 2016).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les différents composants du complexe 26S ont été identifiés (Yang et al., 2004). La protéine Rpt3 (référence Uniprot Q9SEI4) posséderait 13 sites de phosphorylation d'après la base de données PhosPhAt (<https://phosphat.uni-hohenheim.de/phosphat.html?code=AT5G58290.1>). Cette protéine interagirait avec différents partenaires répertoriés sur le site <http://plants.proteincomplexes.org/> parmi lesquels nous retrouvons 2 sérines/thréonine phosphatases : FYPP1 (référence Uniprot Q9SX52) et FYPP3 (référence Uniprot Q9LHE7), qui sont des sérine/thréonine- phosphatases jouant un rôle dans le phototropisme de l'hypocotyle (Haga and Sakai, 2018) et dans le contrôle photopériodique (Kim et al., 2002) respectivement. De plus, 6 kinases font partie de l'interactome de Rpt3 chez *A. thaliana* : FLN2 (pfKB family carbohydrate kinase), UKL1 et UKL2 (uridine kinases) et PRS1, PRS2 et PRS5 (ribose phosphate pyrophosphokinases).

Chez le *Plasmodium falciparum*, une étude de phosphoprotéome réalisée par spectrométrie de masse lors du stade schizonte tardif, a permis d'identifier, 650 protéines parasitaires présentant des résidus phosphorylés. Parmi celles-ci, les auteurs ont retrouvé des protéines du protéasome parasite :  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 5$ , Rpn 2 et Rpn 7, suggérant, par son absence, que PfRpt3 ne serait pas phosphorylée pendant ce stade (Solyakov et al., 2011). De plus, une étude récente du phosphoprotéome, réalisée après un knock-down de PP1c lors du stade intra-érythrocytaire de *P. falciparum*, a démontré qu'il n'y avait pas de variation de la phosphorylation de PfRpt3 ([PF3D7\\_0413600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3413600/)), suggérant que la Rpt3 parasite ne serait pas un substrat de PP1 au cours de ce stade (Paul et al., 2020).

Il est à noter que dans des cellules cancéreuses humaines (cellules de neuroblastome), Rpt3 est également la protéine la plus sujette à la carbonylation, une modification qui implique la fixation irréversible de groupes carbonyle ce qui, dans le cas de Rpt3, altère la fonction ATPase de la protéine. Cette carbonylation est causée par la présence de ROS dans le milieu cellulaire (Ishii et al., 2005).

## CADRE ET OBJECTIFS

Les phénomènes de phosphorylation réversible des protéines jouent un rôle essentiel dans l'adaptation de *Plasmodium* aux différents environnements qu'il rencontre au cours de son cycle. Ces processus sont sous contrôle permanent et toute hyper/hypo phosphorylation ou déphosphorylation affectent la (sur)vie des cellules. Ainsi, la protéine phosphatase de type 1 (PP1), phosphatase majeure du parasite et essentielle à sa survie (Kumar et al., 2002; Paul et al., 2020; Yokoyama et al., 1998), doit en permanence être associée à un ou plusieurs régulateurs afin de contrôler sa localisation, sa spécificité et son niveau d'activité.

Dans le but d'approfondir les connaissances sur la régulation de PP1 chez *P. falciparum* (PfPP1) et son impact sur la biologie du parasite, notre équipe étudie les partenaires de cette enzyme. Par une approche de génomique comparative, 4 régulateurs conservés de la sous-unité catalytique PfPP1c ont été identifiés : LRR1, I2, I3 et eif2B (Daher et al., 2006; Fréville et al., 2012, 2013, 2022b; Tellier et al., 2016). Au-delà de la capacité de ces protéines à interagir avec PP1c et en contrôler la fonction *in vitro*, l'équipe a montré par génétique inverse que leur rôle semblait essentiel pour la survie du parasite aux stades érythrocytaires. De plus, LRR1 est également impliquée dans le développement des oocystes chez *P. berghei* (Fréville et al., 2022b). Par la suite, dans le but d'identifier d'autres régulateurs et notamment ceux qui seraient spécifiques au parasite, l'équipe a adopté une stratégie plus globale et des études de l'interactome de PP1c ont été réalisées en parallèle chez *P. falciparum* et chez *P. berghei* (De Witte et al., 2022; Hollin et al., 2019, 2016). Une première analyse par immunoprécipitation combinée à la spectrométrie de masse (IP/MS) en utilisant PbPP1c étiquetée HA comme appât a ainsi permis d'identifier 178 partenaires potentiels de la phosphatase au stade schizonte (Hollin et al., 2019). Cette étude a été confirmée et approfondie par l'analyse comparative des interactomes de PbPP1c aux stades schizonte et gamétoocyte (De Witte et al., 2022). L'ensemble de ces analyses a permis d'identifier et de caractériser deux régulateurs de PP1c spécifiques de *Plasmodium* (Hollin et al., 2019; Lenne et al., 2018; Mansour et al., 2023). En outre, la comparaison des données obtenues dans ces différentes études d'interactome, combinée à une analyse d'enrichissement en termes d'ontologie de gène (Gene Ontology enrichment) a permis d'identifier certains complexes parmi les potentiels interactants de PbPP1c. Cela inclut notamment le complexe spliceosome avec plusieurs small nuclear ribonucleoproteins, ainsi que le complexe protéasome 19S. Ainsi, dans l'étude de Hollin et al. (Hollin et al., 2019), nous observons, parmi les 178 partenaires identifiés au stade schizonte, la présence des 6 ATPases appartenant au protéasome 19S (Hollin et al., 2019).

Le protéasome, complexe enzymatique multiprotéique essentiel pour la dégradation des protéines, a été caractérisé chez *Plasmodium*. De nombreuses études ont démontré l'essentialité de ce complexe pour le parasite. Ainsi, différents inhibiteurs du protéasome bloquent la croissance parasitaire à tous les stades (Bridgford et al., 2018; Dogovski et al., 2015; Krishnan and Williamson, 2018). Comme chez les eucaryotes, le protéasome 26S du parasite est composé d'un complexe catalytique 20S associé au complexe régulateur 19S, lui-même constitué de 19 protéines distinctes formant la "base" et le "couvercle" du 19S. La capacité du protéasome 26S à dégrader les protéines ubiquitylées est régulée notamment par des mécanismes post traductionnels, parmi lesquels les phénomènes de phosphorylation semblent être les plus importants. Toutefois, si différentes kinases ont été identifiées comme capables de phosphoryler certaines sous-unités du protéasome, peu de choses sont connues quant aux phosphatases impliquées dans les réactions inverses (Guo et al., 2017).

De façon intéressante, les 6 protéines identifiées dans l'interactome de PbPP1c sont les 6 ATPases (Regulatory Particle ATPase, Rpt1 à Rpt6) appartenant à la base du 19S, qui s'assemblent entre-elles par le biais d'interactions coiled coil. L'anneau hexamérique ainsi formé assure l'interface entre les complexes 19S et 20S. Identifier les 6 Rpt dans l'interactome de PbPP1c implique que l'une au moins de ces protéines interagirait avec la phosphatase. Un élément en faveur d'une interaction directe avec PP1c serait la présence de certains motifs d'interaction dans les séquences protéiques des Rpt parasitaires. En effet, il est connu que les régulateurs de PP1 présentent des séquences consensus conservées indispensables à leur interaction avec la phosphatase. C'est le cas notamment du motif 'RVxF' dont la séquence consensus [RK]X<sub>0-1</sub>[VI]{P}[FW] est retrouvée dans plus de 80% des régulateurs de PP1. Une analyse bioinformatique a donc été réalisée et a permis d'observer la présence de motifs RVxF chez PbRpt1, PbRpt3, PbRpt5 et PbRpt6 (Tableau V). En outre, PbRpt1 et PbRpt6 possèdent également des motifs 'FXXFXF' (consensus Fxx[RK]x[RK]), dont le rôle dans l'interaction a également été décrit (Ayllón et al., 2002; Fréville et al., 2014; Lee et al., 2018).

nom	<i>P. berghei</i>				<i>P. falciparum</i>			Autres données obtenues au laboratoire
	n° d'accension (PlasmoDB)	MW (kDa)	motifs d'interaction avec PP1 <sup>a</sup>		Essentialité chez Pb (RMgm database) <sup>b</sup>	Essentialité chez Pf (Zhang et al. 2018) <sup>c</sup>	Phosphosites (PlasmoDB)	
			RVXF	FXXFXF				
Rpt1	PBANKA_1410000	46,8	2	1	Essentiel	Dispensable	Ser 25	Parasites PbKO non obtenus
Rpt2	PBANKA_1206600	49,7	-	-	Essentiel	Lent	-	
Rpt3	PBANKA_0715600	45,2	2	-	KO phénotype lent	Essentiel	-	Parasites PbKO obtenus Protéine recombinante
Rpt4	PBANKA_1404900	44,7	-	-	Essentiel	Essentiel	Ser 50	PfPP1-HA interactome (Y2H) Parasites PbKO non obtenus
Rpt5	PBANKA_0917900	50,9	1	-	Essentiel	Essentiel	Ser 30, 298, 301, 433 Thre 413, 434	
Rpt6	PBANKA_1461800	48,0	1	1	-	Dispensable	Ser 14, 22	

<sup>a</sup> Nombre de motifs de type RVXF ([RK]x0-1[VI]{P}[FW]) ou FXXFXF (Fxx[RK]x[RK]) observés dans la séquence

<sup>b</sup> Essentiel correspond à l'impossibilité d'obtenir des parasites KO donc à une vraisemblable essentialité du gène

<sup>c</sup> Essentiel correspond à un MIS (Mutagenesis Index Score) < 0,5; Lent correspond à 0,5 < MIS < 0,8; Dispensable correspond à 0,8 < MIS < 1

**Tableau V. Données préliminaires sur les 6 Rpt de *P. berghei* identifiées dans l'interactome de PbPP1c.** Ces données ont été extraites de PlasmoDB, d'analyses bio-informatiques ou d'expériences préliminaires réalisées dans notre équipe.

En parallèle, l'exploration de la banque PlasmoDB a permis d'extraire les données quant à l'essentialité prédite des 6 Rpt chez *P. berghei* et chez *P. falciparum* (Bushell et al., 2017; Zhang et al., 2018) ainsi que la présence potentielle de phosphosites chez *P. falciparum* (Tableau V). Sur la base de l'ensemble de ces données, PbRpt3 était un candidat de choix en tant qu'interactant de PP1c, d'une part parce que cette protéine présente deux motifs de type RVxF, et d'autre part parce que Rpt3 avait déjà été identifiée comme étant essentielle pour la survie de *P. falciparum*. De plus, son phénotype « lent » chez *P. berghei* permettait de concevoir une étude de Knock-out (KO) afin d'en évaluer les répercussions phénotypiques. Nous avons donc entrepris la caractérisation de Rpt3 chez *P. berghei* dans le but de tester son interaction avec PP1c et d'identifier son rôle chez le parasite.

Plus spécifiquement, les objectifs de cette thèse étaient de :

- Réaliser l'analyse *in silico* de PbRpt3 et de construire son modèle 3D ;
- Démontrer et analyser l'effet de l'interaction entre PbRpt3 et PP1c, et étudier la contribution des motifs RVxF dans cette interaction et fonction ;
- Etudier l'essentialité de PbRpt3 à travers la génération de parasites KO pour PbRpt3 ;
- Analyser la localisation de la protéine PbRpt3 chez le parasite lors de son développement intra-érythrocytaire ;
- Etudier le réseau d'interactions de PbRpt3 chez *P. berghei* et confirmer son appartenance au complexe 19S du protéasome.

## **RESULTATS**



## I. Caractérisation moléculaire de la protéine PbRpt3 : Analyse *in silico*

L'analyse *in silico* de la séquence PbRpt3 (PBANKA\_0715600) s'est déroulée en trois étapes ;

- La recherche d'informations concernant le gène codant pour PbRpt3, la séquence de la protéine PbRpt3, la présence de motifs et domaines d'intérêt, ainsi que de motifs d'interaction connus entre PbRpt3 et PP1c.
- La comparaison entre la séquence de PbRpt3 à celle d'autres espèces de *Plasmodium*, ainsi qu'à celle des protéines homologues chez d'autres organismes.
- La modélisation 3D de la protéine PbRpt3 afin d'étudier la position des motifs d'interaction putatifs entre PbRpt3 et PP1, ainsi que la présence d'ions associés à cette protéine.

### A. Analyse détaillée de la séquence PBANKA\_0715600 et de la protéine PbRpt3

L'étude préliminaire, rendue possible grâce à base de données PlasmoDB a révélé que PBANKA\_0715600 correspond à un gène de 1516 pb comportant un intron de 328 pb. Après épissage de l'intron, l'ADNc (ADN complémentaire) de 1188 pb code pour une protéine PbRpt3 de 395 acides aminés (~45kDa).

Afin de vérifier cette organisation génique, ainsi que la séquence disponible sur PlasmoDB, nous avons réalisé différentes PCR avec les amorces listées en tableau XVI de la partie Matériel et Méthodes et illustrées en figure 24A. Le séquençage des produits PCR obtenus à partir d'amplifications réalisées sur l'ADNc ou l'ADNg (ADN génomique) de *P. berghei*, a confirmé la présence d'une séquence codant pour PbRpt3 et l'emplacement exact de l'intron et des exons. Le témoin GAPDH a été utilisé en tant que contrôle positif de PCR sur les ADNc et ADNg (figure 24B).

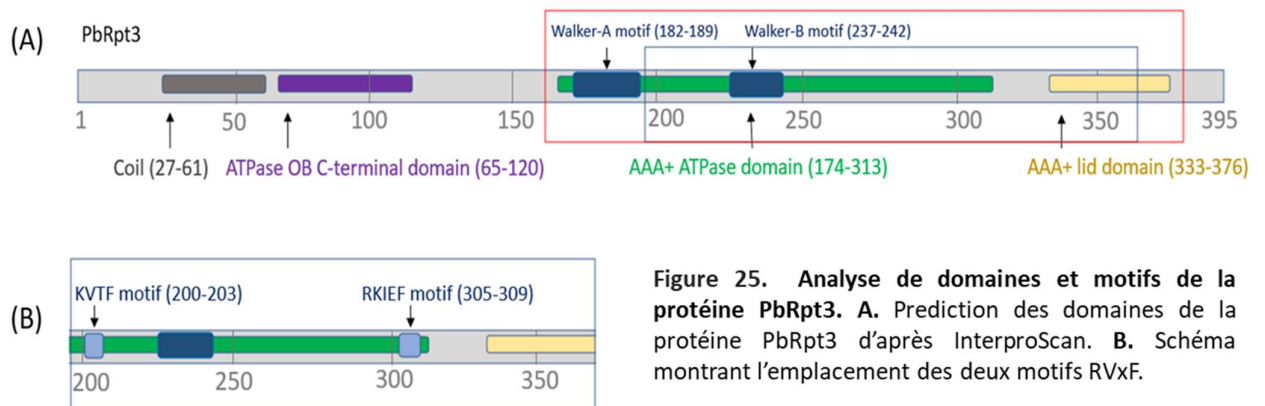
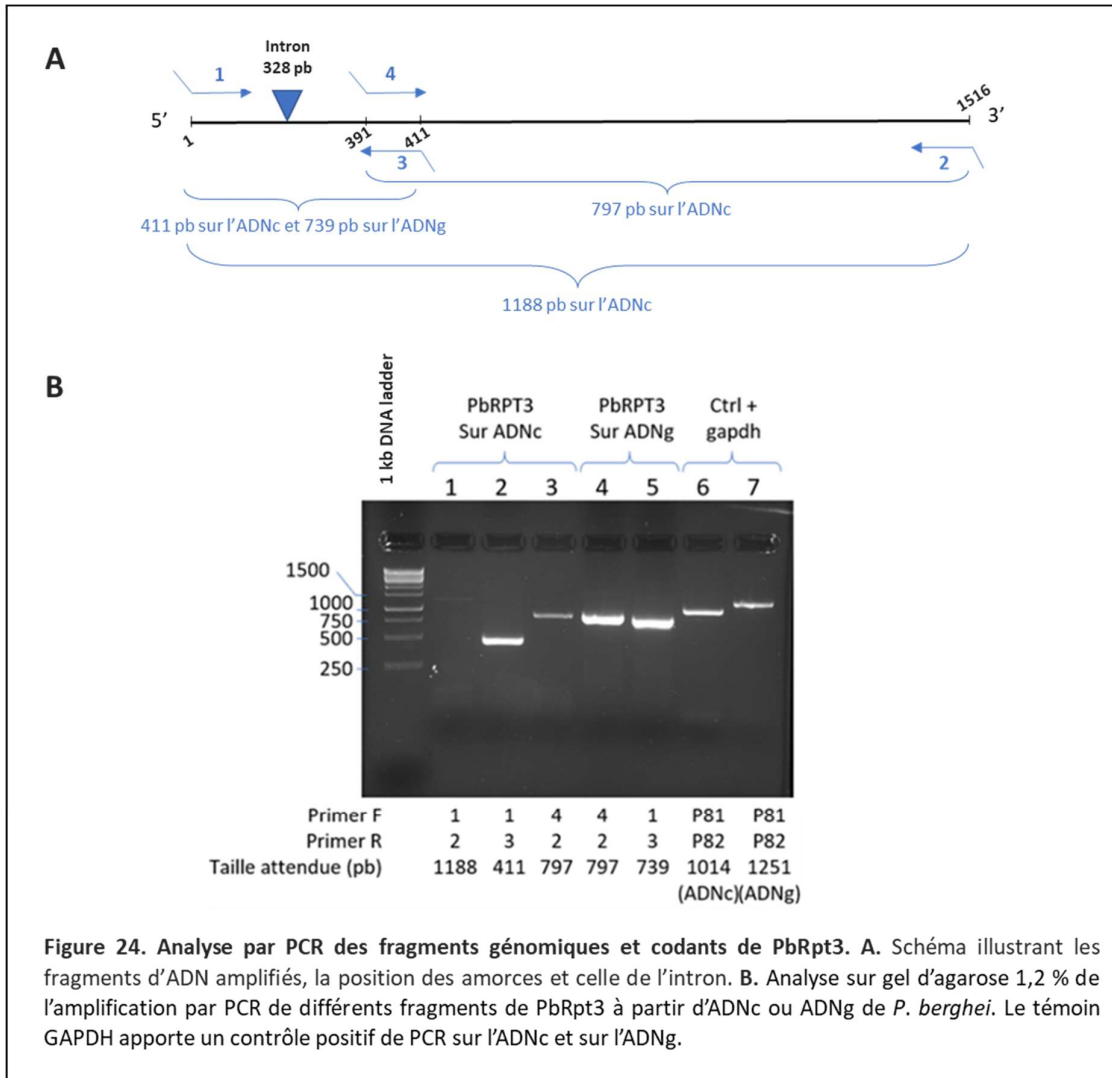
La séquence de 395 acides aminés déduite du séquençage a montré une identité de 100% avec la séquence indiquée sur PlasmoDB pour PBANKA\_0715600.

Par la suite, nous avons pu déterminer, par l'utilisation d'Interproscan, les différents domaines prédits de PbRpt3. Ainsi, nous observons la présence d'un motif structurel protéique de type « coil » décrit pour être impliqué dans l'interaction « coiled coil » (super-hélice) entre les différentes protéines Rpt du complexe 19S (Inobe and Genmei, 2015), un domaine ATPase OB C-terminal (Oligonucleotide/oligosaccharide binding) qui est un domaine impliqué dans la fixation du substrat), et un domaine AAA+ ATPase et AAA+ lid. Ces deux derniers domaines sont impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP.

PbRpt3 étant une ATPase, nous avons recherché la présence de motifs Walker A et B (figures 25 et 26), motifs de liaison à l'ATP, présents dans les Rpt humaines (Yedidi et al., 2017). Nous avons ainsi pu identifier ces deux motifs dans PbRpt3. Le motif Walker A de consensus G-x(4)-GK-[TS] et de séquence GPPGTGKT se situe en position 182, à la limite N-ter du domaine AAA-ATPase. Le motif Walker B de consensus hhhDE et de séquence IIFIDE, également présent au sein du domaine AAA-ATPase, débute quant à lui au résidu 237 (Figure 25A).

La recherche de motifs RVxF avec la séquence consensus [R/K]-X(0-1)-[V/I]-{P}-[F/W] ({P} étant n'importe quel acide aminé sauf une proline) a confirmé la présence de deux motifs de ce type, en positions 200 et 305 (Figure 25B). Il s'agit de KVTF en position 200 et de RKIEF en position 305. La présence de deux motifs de type RVxF pourrait expliquer la détection de PbRpt3 dans l'interactome de PbPP1c (De Witte et al., 2022; Hollin et al., 2019), cette protéine pouvant potentiellement interagir

directement avec PP1c. A noter que nous n'avons retrouvé aucun autre motif d'interaction avec PP1c connu, tels que les motifs FKK, SILK, MyPhone ou HYNE.



MRKMENVSKYLKEEDYYIKLKIILKKQLDILNIQEYYIKEEHKNLKRELIRSKNEIKRIQS  
VPLIIGQFLDIIDNNYGIVSSTAGSNYYVRILSTLNKEDLKPSVSVALHRHSHSIVNILP  
SESDSSIQLLQVSRPNVKYTDLGGLDTQKQEMREAVELPLKSPELYEKIGIEPPMGILI  
YGPPGTGKTMLVKAVANETKVTFIGVVGSEFVQKYLGEQPRMVRDVFRLARENSPSIIFI  
DEVDIAIATKRFDAQTGADREVQRILLELLNQMDGFDKSTNVKVI MATNRADTLDPALLRP  
GRLDRKIEFPLPDRKQKRLIFQTIISKMNISDVNIENFVVRTDKISAADIAAIAQESGM  
QAIRKNRYIITASDFEQGYRTHVRKQLRDYEFYNI

Figure 26. Séquence en acides aminés de la protéine PbRpt3 (PBANKA\_0715600). Les deux motifs RVxF sont soulignés en bleu, les motifs Walker A et Walker B sont surlignés en jaune.

Les informations obtenues grâce à InterproScan et la séquence issue de PlasmoDB, ont ainsi permis de confirmer la présence, chez Rpt3 de *P. berghei*, des mêmes domaines fonctionnels correspondant aux Rpt3 des eucaryotes, à savoir un domaine en hélice, des sites de liaison à l'ATP et une région permettant l'hydrolyse de l'ATP.

## B. Comparaison des séquences Rpt3 de *Plasmodium berghei* et d'autres organismes

Des alignements ont été réalisés grâce au logiciel **Clustal**, et les résultats ont été regroupés dans le tableau VI. Nous pouvons noter que le pourcentage d'identité au niveau des séquences d'acides aminés entre les Rpt3 de *Plasmodium*, l'homme et la levure se situe entre 66% et 68%. Cette identité importante pourrait suggérer un maintien de la fonction de cette protéine Rpt3 chez le parasite, en tant que composant fonctionnel du protéasome 26S.

	ScRpt3	HsRpt3	PbRpt3	PfRpt3
ScRpt3_Saccharomyces_cerevisiae_AJU66576.1	100.00	68.42	66.50	67.01
HsRpt3_Homo_sapiens_PSMC4	68.42	100.00	67.01	66.75
PbRpt3_Plasmodium_berghei_PBANKA_0715600	66.50	67.01	100.00	95.41
PfRpt3_Plasmodium_falciparum_PF3D7_0413600	67.01	66.75	95.41	100.00

Tableau VI. Matrice d'identité réalisée par Clustal 2.1 de protéines Rpt3 appartenant à différents organismes. Les pourcentages d'identité entre les différentes séquences sont indiqués. Les pourcentages d'identité entre la Rpt3 de *P. berghei* et les Rpt3 de *H. sapiens* et *P. falciparum* sont encadrés.

Chez *P. berghei*, la séquence PbRpt3 est plus longue que celle de *P. falciparum*, elle possède 3 acides aminés de plus en N-terminal (Méthionine – Arginine – Lysine) comme montré dans l'alignement présenté en partie B2 figure 27. De plus, il est intéressant de noter que seul un acide aminé diffère entre Rpt3 de *P. falciparum* et Rpt3 de *P. adleri* (infectant les gorilles) ou *P. reichenowi* (infectant les chimpanzés). Il s'agit de la Sérine en 5<sup>e</sup> position, remplacée par une Asparagine chez les espèces infectant ces deux primates non-humains.

### 1. Conservation des motifs RVxF

La recherche de motifs RVxF de Rpt3 chez les différentes espèces de *Plasmodium* montre que le premier motif est conservé et identique parmi les espèces de *Plasmodium* infectant les rongeurs (*P. berghei*, *P.*

*chabaudi*, *P. yoelii*), *Plasmodium knowlesi* (infectant l'humain et des primates) ainsi que chez *Plasmodium relictum* et *Plasmodium gallinaceum* infectant les oiseaux. Le deuxième motif (RKIEF) est conservé chez *P. falciparum* ainsi que chez toutes les espèces de *Plasmodium* infectant l'homme (tableau VII). Ce motif est également présent dans les orthologues de Rpt3 chez les mammifères (*Homo sapiens*, *Mus musculus*), la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et les plantes (*Arabidopsis thaliana*).

Organisme	Référence PlasmoDB	1 <sup>er</sup> motif RVxF	2 <sup>ème</sup> motif RVxF
<i>Plasmodium berghei</i>	PlasmoDB PBANKA_0715600	KVTF	RKIEF
<i>Plasmodium falciparum</i>	PlasmoDB PF3D7_0413600	QVTF	RKIEF
<i>Plasmodium vivax</i>	PlasmoDB PVP01_0520100	QVTF	RKIEF
<i>Plasmodium ovale</i>	PlasmoDB PocGH01_05025700	QVTF	RKIEF
<i>Plasmodium malariae</i>	PlasmoDB PmUG01_05030100	QVTF	RKIEF
<i>Plasmodium knowlesi</i>	PlasmoDB PKNH_0505200	KVTF	RKIEF
<i>Homo sapiens</i>	Uniprot PRS6B	TAAF	RKIEF
<i>Mus musculus</i>	Uniprot P54775	TAAF	RKIEF
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Uniprot Q9SEI4	TAAF	RKIEF
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Genebank AJU66576.1	KA AF	RKIEF
<i>Plasmodium chabaudi</i>	PlasmoDB PCHAS_0724700	KVTF	RKIEF
<i>Plasmodium yoelii yoelii</i> 17X	PlasmoDB PY17X_0715800	KVTF	RKIEF
<i>Plasmodium relictum</i>	PlasmoDB PRELSG_050880	KVTF	RKIEF
<i>Plasmodium gallinaceum</i>	PlasmoDB PGAL8A_00087000	KVTF	RKIEF

Couleurs utilisées
infecte les rongeurs
infecte les humains
infecte les oiseaux

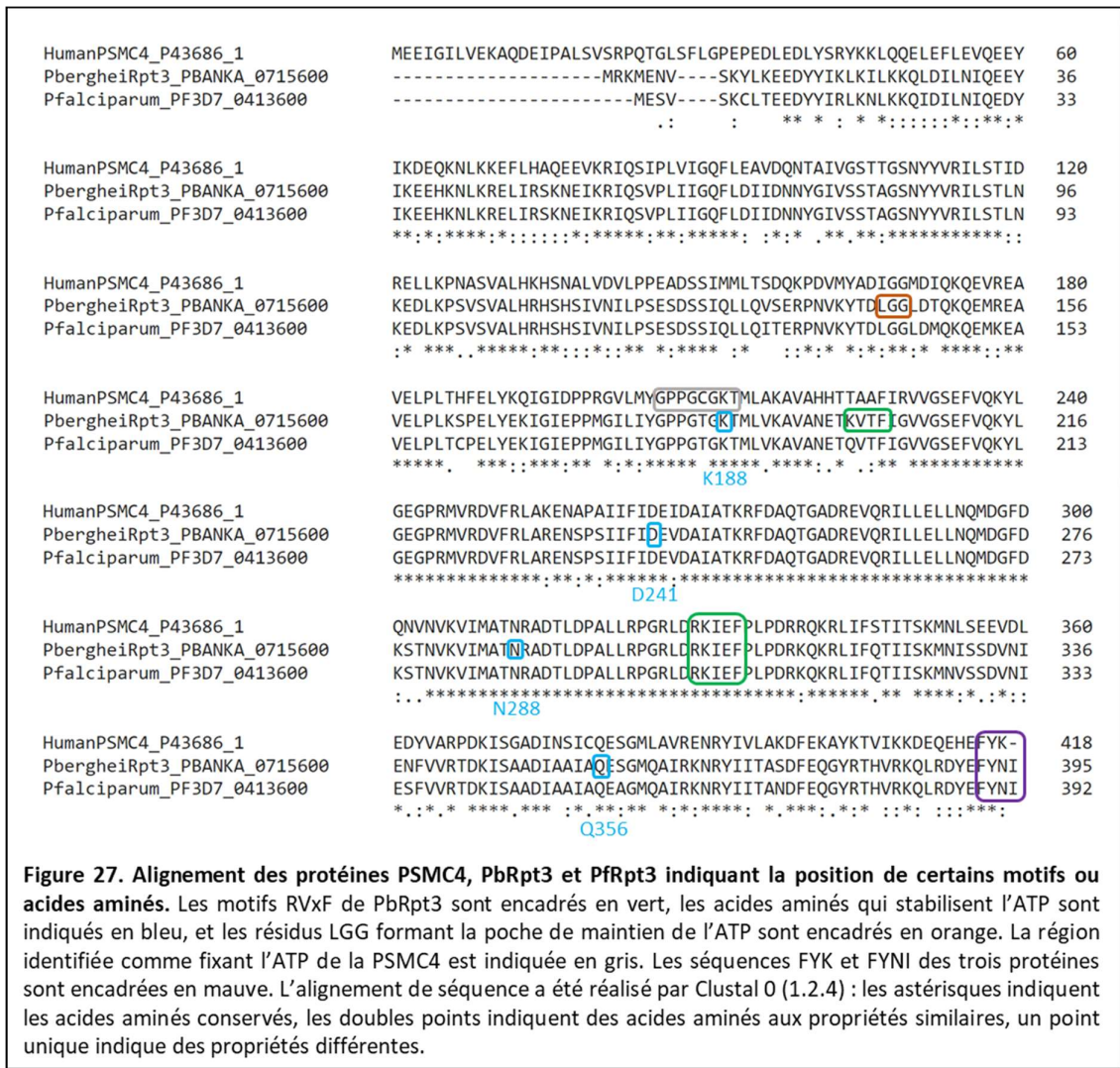
**Tableau VII. Conservation des motifs KVTF et RKIEF de la protéine Rpt3 chez différents organismes.** Les séquences respectant la séquence consensus du motif RVxF sont indiquées en vert.

## 2. L'extrémité C-terminale de Rpt3 : FYK Vs FYNI

Notre étude *in silico* a également permis d'observer que la séquence C-terminale FYK, connue pour être impliquée dans la fixation 19S-20S chez l'homme (Kumar et al., 2010), n'est pas conservée chez PbRpt3. En effet, chez toutes les espèces de *Plasmodium*, la séquence C-terminale de Rpt3 correspond à FYNI (tableau VIII).

Organisme	taille de Rpt3	Acides aminés en C-ter
<i>Plasmodium berghei</i>	395 aa	FYNI
<i>Plasmodium falciparum</i>	392aa	
<i>Homo sapiens</i>	419 aa	FYK
<i>S. cerevisiae</i>	434 aa	
<i>Mus musculus</i>	418 aa	
<i>Toxoplasma gondii</i>	409 aa	FYSF
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	415 aa	FYR
<i>Vitrella brassicaformis</i>	537 aa	FYVM

**Tableau VIII. Acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine Rpt3 de différents organismes.**

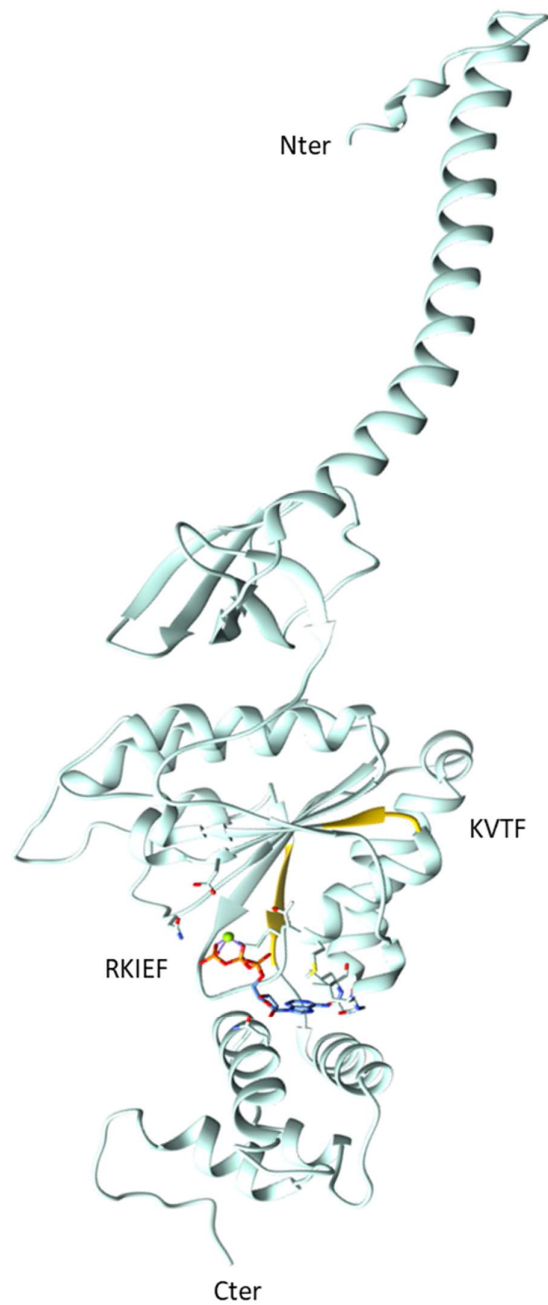


### C. Construction du modèle 3D

En collaboration avec le Dr. Amaury Farce (Institut de Recherche Translationnelle sur l'Inflammation, Lille), nous avons construit un modèle 3D de la protéine PbRpt3 basé sur la structure en cryo-EM (cryo-electron microscopy) de l'isoforme 1 de la PSMC4 humaine (418 acides aminés). En effet, les deux protéines présentent une identité de 67% (tableau VI) et une conservation des domaines prédits comme évoqué précédemment.

La qualité du modèle a été vérifiée à l'aide du diagramme de Ramachandran (Annexes 1, figure Supplémentaire 1) et l'analyse du modèle 3D (figure 28) nous permet d'associer les différents domaines de PbRpt3 prédits par Interproscan (cf paragraphe I.A, figure 25) à des domaines structurels. Ainsi, nous retrouvons en N-terminal une longue hélice  $\alpha$  correspondant à la région 'coil'. Le domaine OB-C-terminal (acides aminés 64 à 119) inclue quant à lui cinq brins  $\beta$  parmi lesquels s'intercale une très courte hélice  $\alpha$  située entre le 3ème et le 4ème brin  $\beta$ . Enfin, le domaine ATPase comprend un sous-domaine  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  portant les motifs impliqués dans la liaison et dans l'hydrolyse de l'ATP, et le domaine AAA-lid est formé de 4 hélices  $\alpha$  situées entre les résidus 320 et 360.



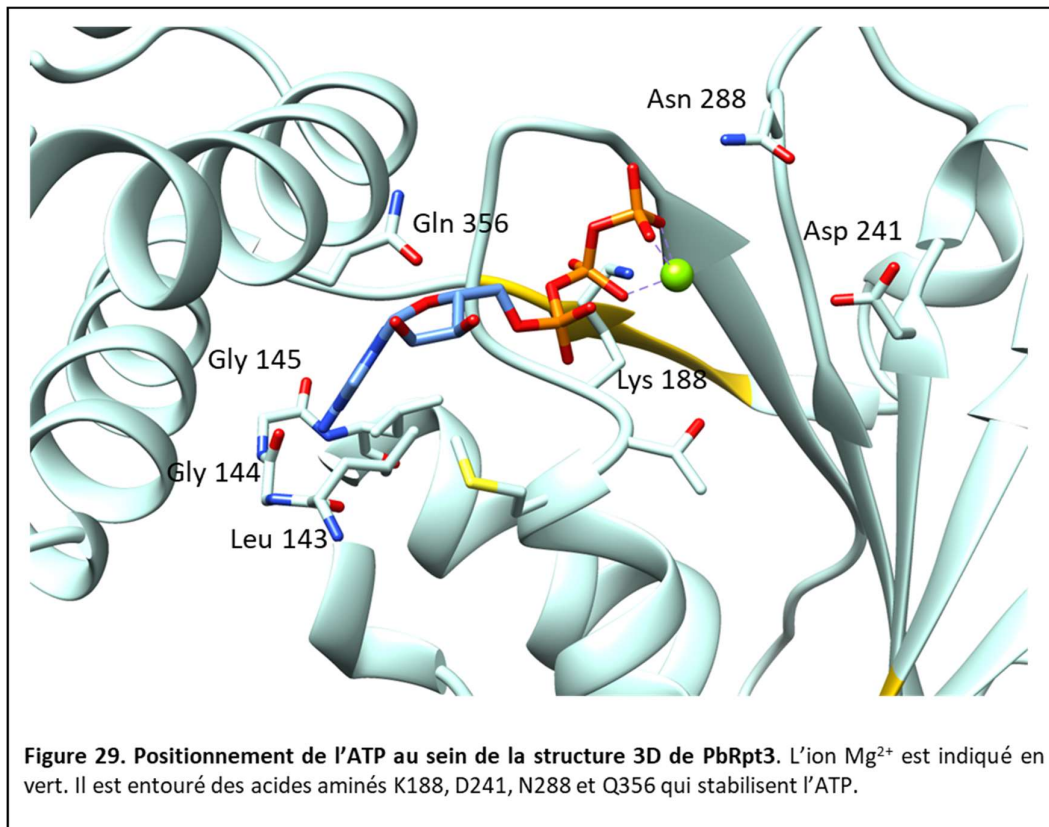


**Figure 28. Structure 3D prédite de PbRpt3.** Image générée à partir du fichier PDB 6MSB P auth D par le logiciel Sybyl 6.9.2 (Tripos) et annotée avec Chimera, faisant ressortir les deux motifs RVXF en jaune et la molécule d'ATP en bleu et rouge.

## 1. Stabilisation de la protéine PbRpt3 grâce à la fixation d'une molécule d'ATP et d'un ion Mg<sup>2+</sup>

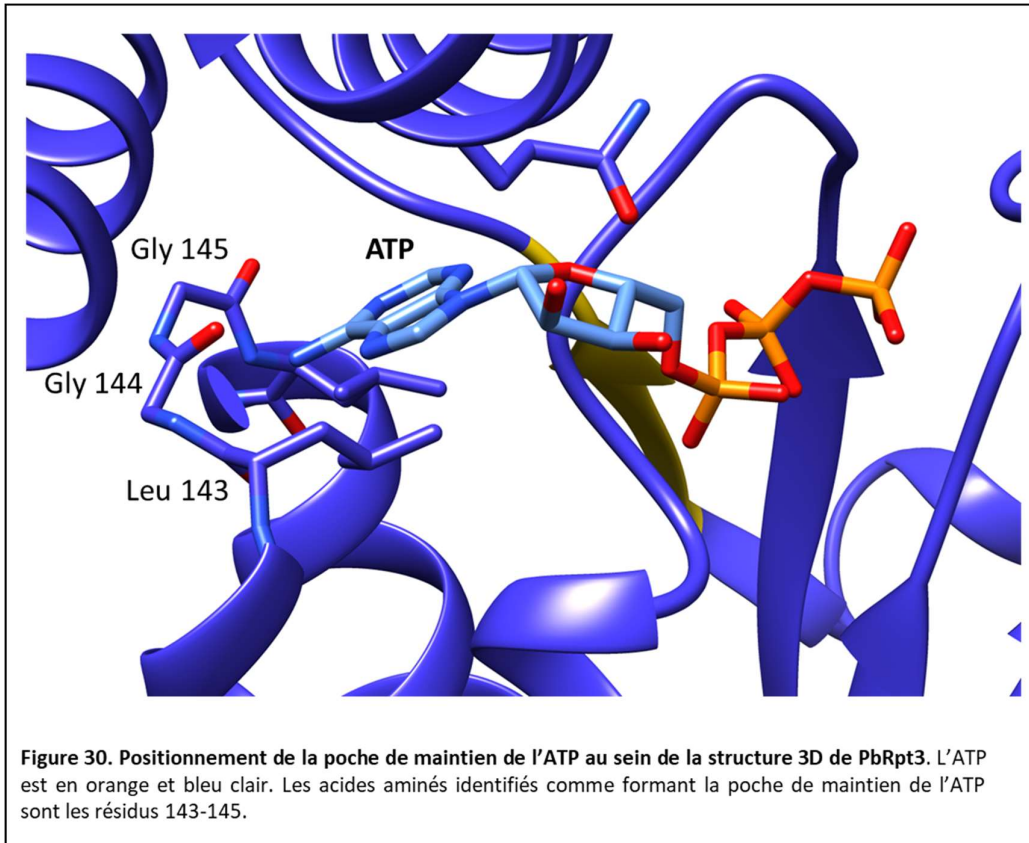
Grâce au modèle obtenu, nous avons étudié de façon plus approfondie la fixation possible d'une molécule d'ATP au niveau du site actif de PbRpt3. De plus, ce modèle 3D prédit la présence d'un ion Mg<sup>2+</sup> (comme pour la protéine humaine PSMC4 (Dong et al., 2019)) qui serait impliqué dans la stabilité de la structure protéique.

Le motif Walker A est situé entre un brin  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ , et le motif Walker B forme un brin  $\beta$ . En analysant la structure de la protéine avec le positionnement de l'ATP, nous avons pu identifier les acides aminés portant les liaisons hydrogènes responsables du maintien de l'ATP : il s'agit des acides aminés K188 (situé dans le domaine Walker A) et Q356 (figure 29.) L'acide aminé N288 contribue également à maintenir l'ATP grâce aux liaisons hydrogènes. Il apparaît également que l'ATP, ainsi que l'acide aminé D241 situé dans le domaine Walker B joueraient un rôle dans le maintien de l'ion Mg<sup>2+</sup>. En résumé, les quatre acides aminés : K188, D241, N288 et Q356 joueraient un rôle central dans la stabilité de la protéine et le maintien de l'ATP et de l'ion Mg<sup>2+</sup>. Cette analyse nous a donc permis d'envisager des mutations de ces acides aminés dans le but d'interférer avec la capacité de PbRpt3 à lier l'ATP.



Une autre partie de la protéine contribuerait à stabiliser l'ATP en formant une poche de maintien au niveau de la séquence 143-LGG-145 (figure 30). Cependant, nos modélisations ont montré que la mutation de ces trois acides aminés par des alanines, n'altèreraient pas suffisamment le squelette de cette poche de maintien de l'ATP. Des mutations sur cette séquence de 3 a.a. ne permettraient donc pas d'observer un changement vis-à-vis du maintien de l'ATP.





## 2. Accessibilité des motifs RVxF de PbRpt3

Le modèle 3D prédit de PbRpt3 a fait ressortir que les deux motifs RVxF: 200-KVTF-203 et 305-RKIEF-309 étaient situés de part et d'autre de la protéine au sein du domaine AAA-ATPase (figure 28). Leur localisation sur des faces exposées de la protéine rendrait possible leur interaction avec la phosphatase PP1c. Néanmoins l'analyse du modèle 3D a permis de démontrer l'impossibilité pour une seule protéine PP1c de se fixer aux deux motifs en même temps. En effet, le repliement de la phosphatase parasitaire PfPPP1 a déjà été modélisé (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q8ILV1?csm=9CE0B7C29FEFEFC6>), et sa conformation compacte (Khalife et al., 2021), ne permettrait pas une interaction avec les deux motifs en même temps. Il serait néanmoins possible de retrouver un ratio d'interaction de 1 molécule de PbRpt3 pour 2 molécules de PP1c.

Afin de confirmer que le modèle 3D de PbRpt3 s'intègre bien au sein de la structure 3D du complexe 26S d'une part, et vérifier l'accès des motifs RVxF lorsque la protéine est intégrée dans le protéasome d'autre part, nous avons procédé au remplacement de la PSMC4 humaine par la structure 3D de PbRpt3 au sein de la structure obtenue par Cryo-EM du protéasome humain (référence RCSB PDB, ID 6MSB) (figure 31A). La visualisation de cette intégration grâce au logiciel Chimera nous a permis de remarquer la présence dans l'environnement immédiat des motifs RVxF de PbRpt3, la présence des chaînes suivantes comme montré en figure 31B :

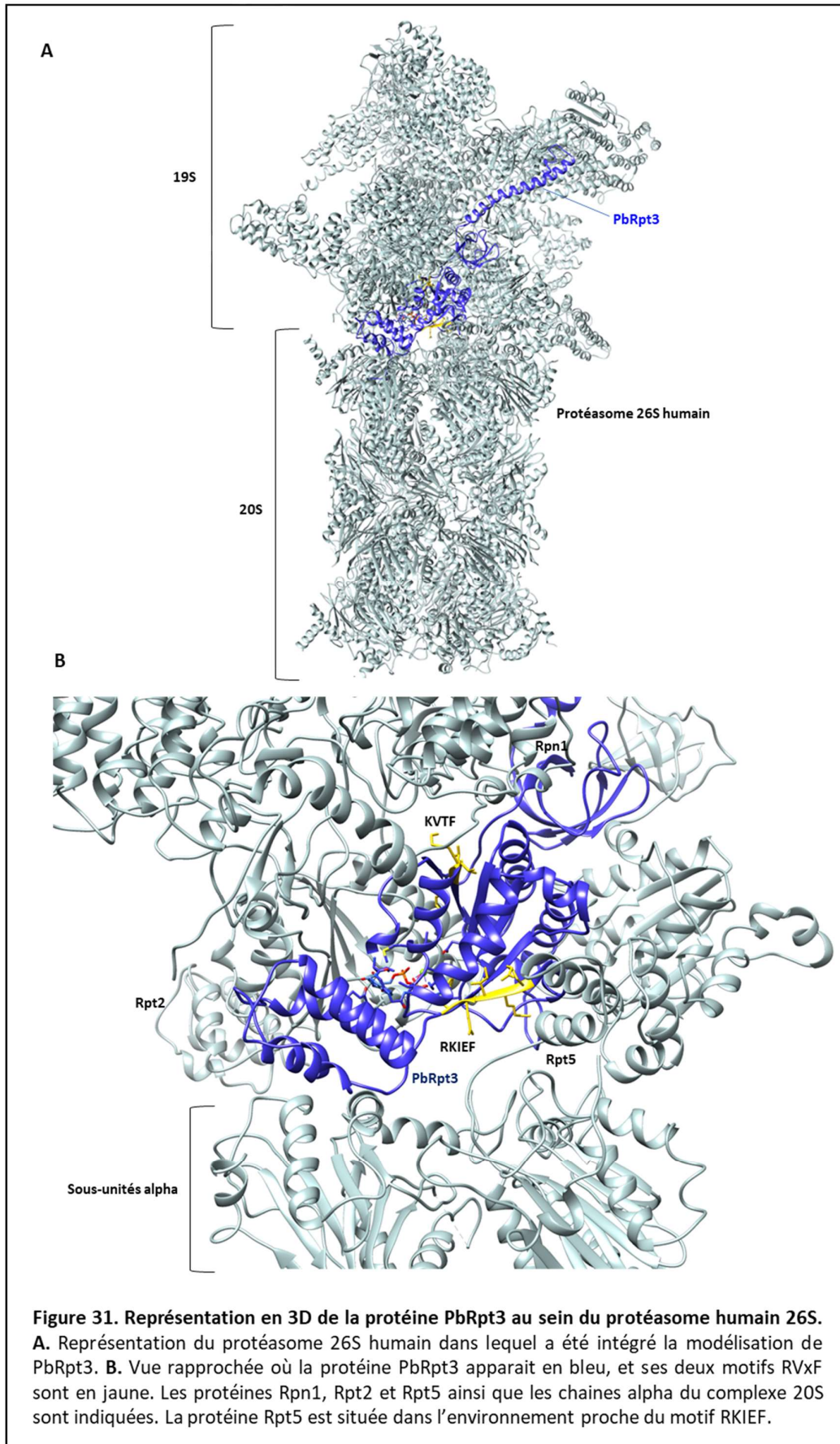
- Chaîne B PSMC1 (Rpt2),
- Chaîne F PSMC3 (Rpt5),
- Chaines K et L (sous unités alpha)

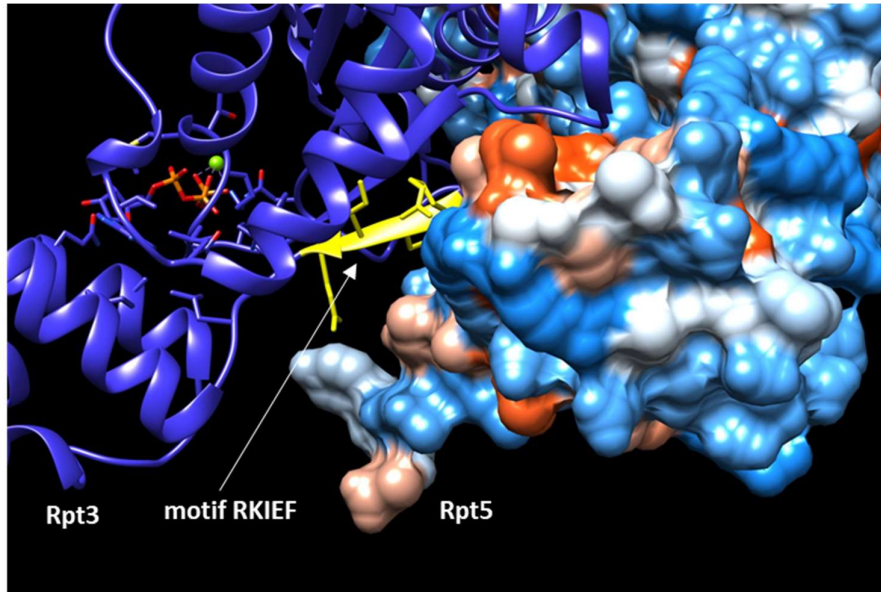
- Chaîne f PSMD2 (Rpn1).

Au sein de cette modélisation, la protéine Rpt2 semble participer à la stabilité de l'ATP de PbRpt3 et cette dernière contribuerait à la stabilité de l'ATP de Rpt5 (figure 31B). Nous notons également dans cette configuration, que les motifs KVTF et RKIEF de PbRpt3 ne sont pas suffisamment accessibles pour une interaction avec PP1c.

Nous remarquons également que lors de l'intégration de Rpt3 dans le complexe 19S, après avoir ôté toutes les chaînes alpha du complexe 20S, seul le motif RKIEF pourrait se rendre accessible pour une interaction avec PP1c. Néanmoins nous remarquons en figure 32 que ce motif se trouve exposé à la protéine Rpt5 qui serait à même de bloquer l'accès pour une interaction avec PP1c.

Par conséquent et d'après ces différentes modélisations, nous pouvons suggérer qu'une interaction entre PbRpt3 et PP1c au sein du protéasome 26S ou 19S peut être considérée comme fortement improbable.





**Figure 32. Modélisation de l'encombrement autour du motif RKIEF de la protéine PbRpt3 positionnée au sein du protéasome 19S.** Le motif RKIEF est indiqué en jaune, la protéine PbRpt3 est en bleu marine et la protéine Rpt5 se situe à droite de l'image.

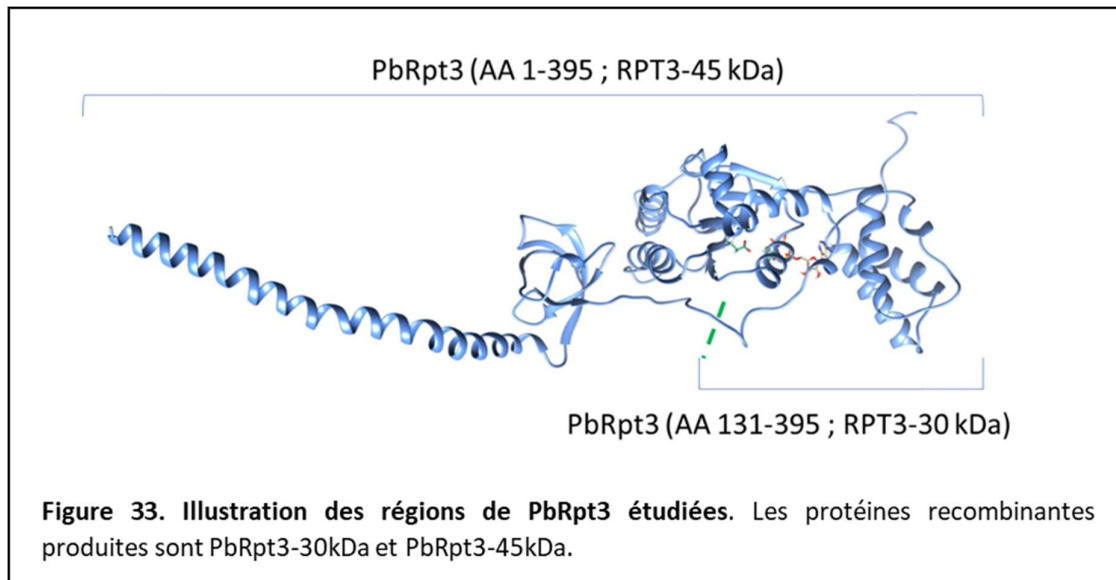
## II. Production de la protéine PbRpt3 sous forme recombinante

Dans un premier temps, afin d'étudier l'interaction entre PbRpt3 et PP1c *in vitro*, nous avons produit, sous forme recombinante, les deux protéines suivantes étiquetées 6-Histidine : PbRpt3 et PfPP1c. PfPP1c-6His est produite en routine au laboratoire, puis biotinylée (Fréville et al., 2012).

Basé sur notre modèle 3D, le choix a été fait d'exprimer la protéine PbRpt3 sous deux formes recombinantes :

- D'une part la protéine entière (acides aminés 1-395 ; 45 kDa),
- Et d'autre part, la région C-ter dans laquelle se situent les motifs RVxF (acides aminés 131-395 ; 30kDa) (figure 33).

Le fragment codant pour la région N-ter (région coil ; acides aminés 1-137) a également été amplifié, séquencé et cloné. Il n'a pas été utilisé dans le cadre de cette étude mais il reste intéressant pour étudier *in vitro* l'interaction entre PbRpt3 et les autres protéines du complexe 19S du protéasome une fois qu'elles seront produites.



#### **A. Clonage de PbRpt3 en vecteur d'expression pETDuet-1 et induction de l'expression des protéines en *E. coli* BL21-DE3**

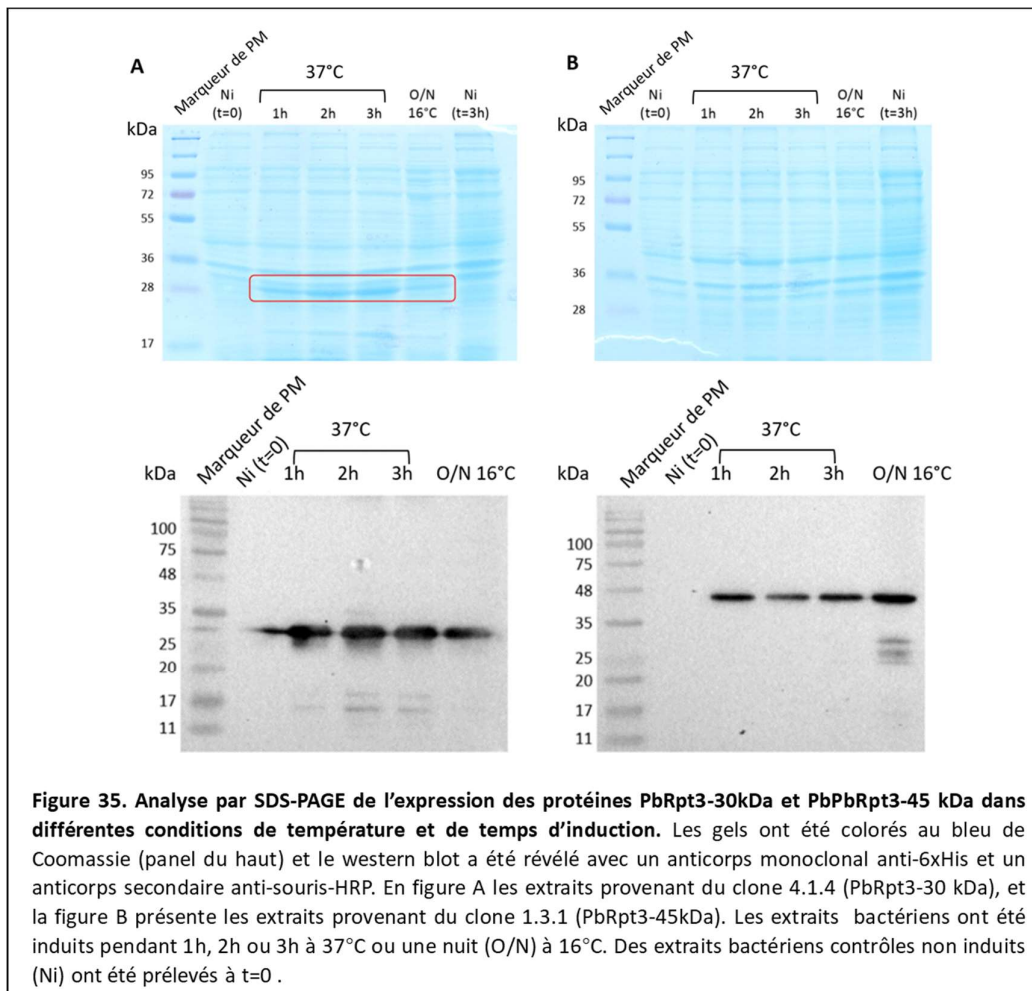
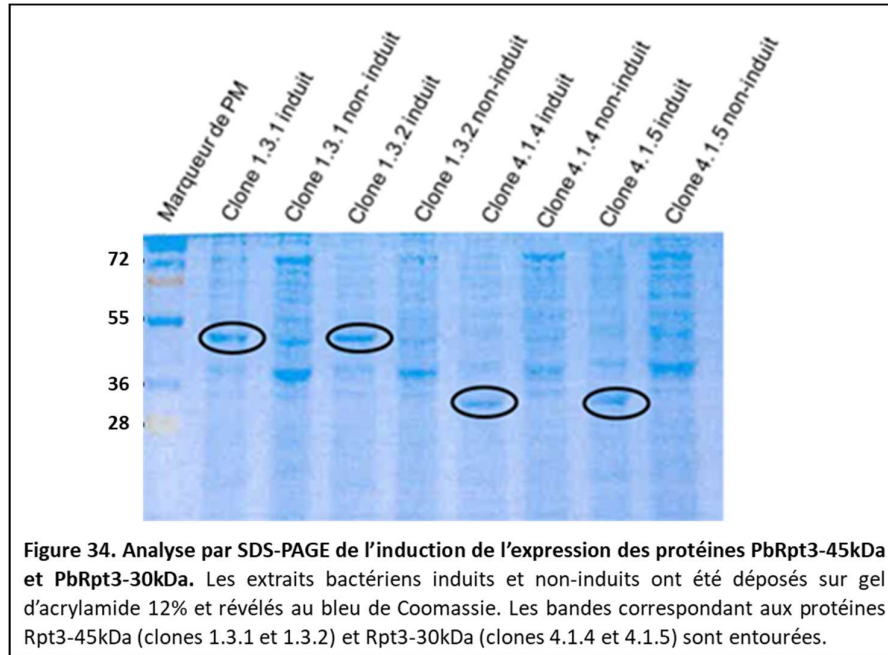
Les ADNc codant pour les protéines PbRpt3-45kDa et PbRpt3-30kDa et ont été amplifiés par PCR à partir de l'ARN rétrotranscrit (ADNc) de *P. berghei* grâce aux amorces listées en tableau XVI. Les fragments obtenus (figure 24B) ont été clonés dans le vecteur pETDuet-1 et séquencés.

Les protéines recombinantes PbRpt3-45kDa et Rpt3-30kDa ont été produites en *E. coli*. Dans un premier temps, nous avons induit l'expression des protéines recombinantes à partir de deux clones de la souche BL21-DE3 pour chaque construction. L'analyse en SDS-PAGE des culots bactériens induits a permis de sélectionner les clones 1.3.1 et 4.1.4 pour la suite de notre étude (figure 34).

Une cinétique d'induction (1 à 3h à 37°C, ou une nuit à 16°C) a été réalisée avec les clones sélectionnés. Pour la protéine Rpt3-45kDa, cette expérience ne nous a pas permis d'observer une différence nette entre les conditions induit/non-induit (Figure 35B – panel haut), mais nous avons pu observer que l'induction semble optimale après 2-3 h d'induction à 37°C pour la protéine Rpt3-30kDa (Figure 35A – panel haut).

L'analyse en western blot révélé avec des Anticorps anti-6xHis montre clairement l'expression des deux protéines recombinantes (Figures 35 A et B panel bas). Bien que cette analyse ne soit pas quantitative, elle nous a permis de choisir pour la suite de nos expériences d'induire l'expression de la protéine Rpt3-45kDa pendant 2-3h à 37°C et Rpt3-30kDa pendant la nuit à 16°C.

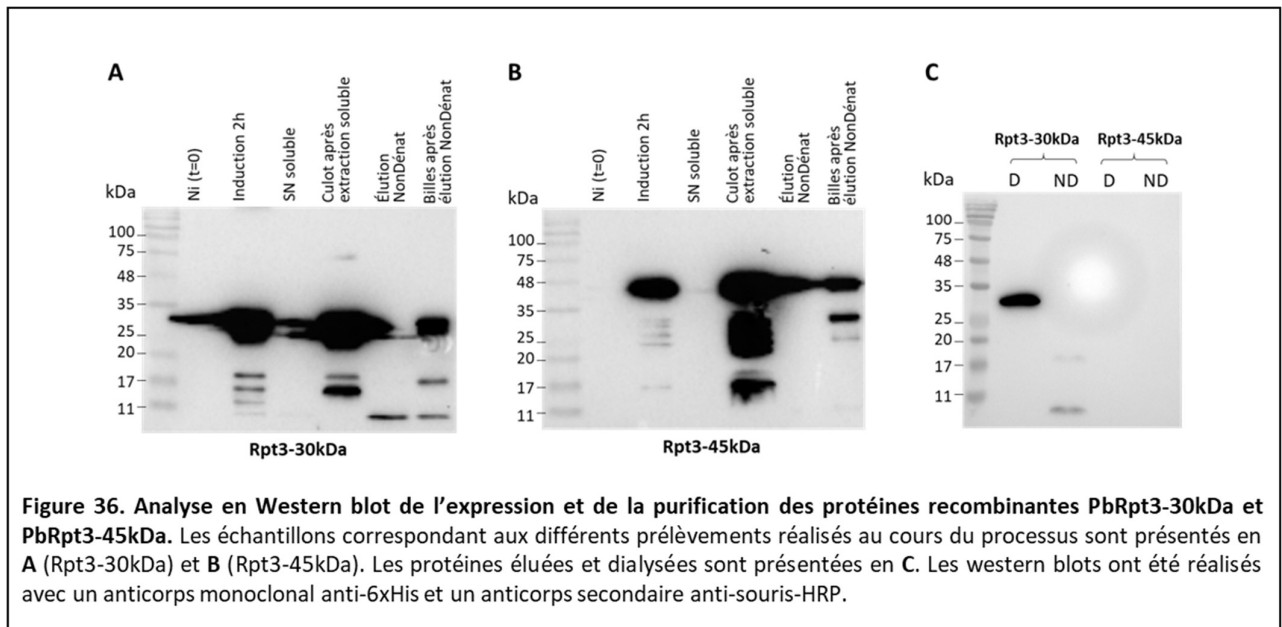




## B. Production et purification de Rpt3-30kDa et Rpt3-45kDa en BL21-DE3 : conditions non-dénaturantes versus dénaturantes

Afin de préciser les conditions d'extraction des protéines recombinantes Rpt3-30kDa et Rpt3-45kDa, nous avons ensuite cherché à déterminer si elles étaient produites sous forme soluble ou dans les corps d'inclusion de la bactérie. Ainsi, après induction pendant 2h à 37°C, les protéines ont été purifiées à partir de cultures bactériennes (500 mL) en conditions non dénaturantes versus dénaturantes (en présence de guanidine 6M). Différents échantillons ont été prélevés tout au long du processus d'extraction et de purification sur billes Ni-NTA pour contrôler la qualité des différentes étapes en Western blot anti-6xHis (Figure 36). Les résultats obtenus montrent que l'expression des deux protéines est bien induite, et que l'extraction en conditions non-dénaturantes ne semble pas suffisante pour extraire les protéines Rpt3-30kDa et Rpt3-45kDa (Figures 36 A et B).

Dans cette étude préliminaire, seule la protéine Rpt3-30kDa extraite en conditions dénaturantes est obtenue (Figure 36 C).



Par la suite, différents lots de protéines recombinantes, ont été obtenus en faisant varier les conditions d'induction et de purification (tableau IX ; Figure 37).

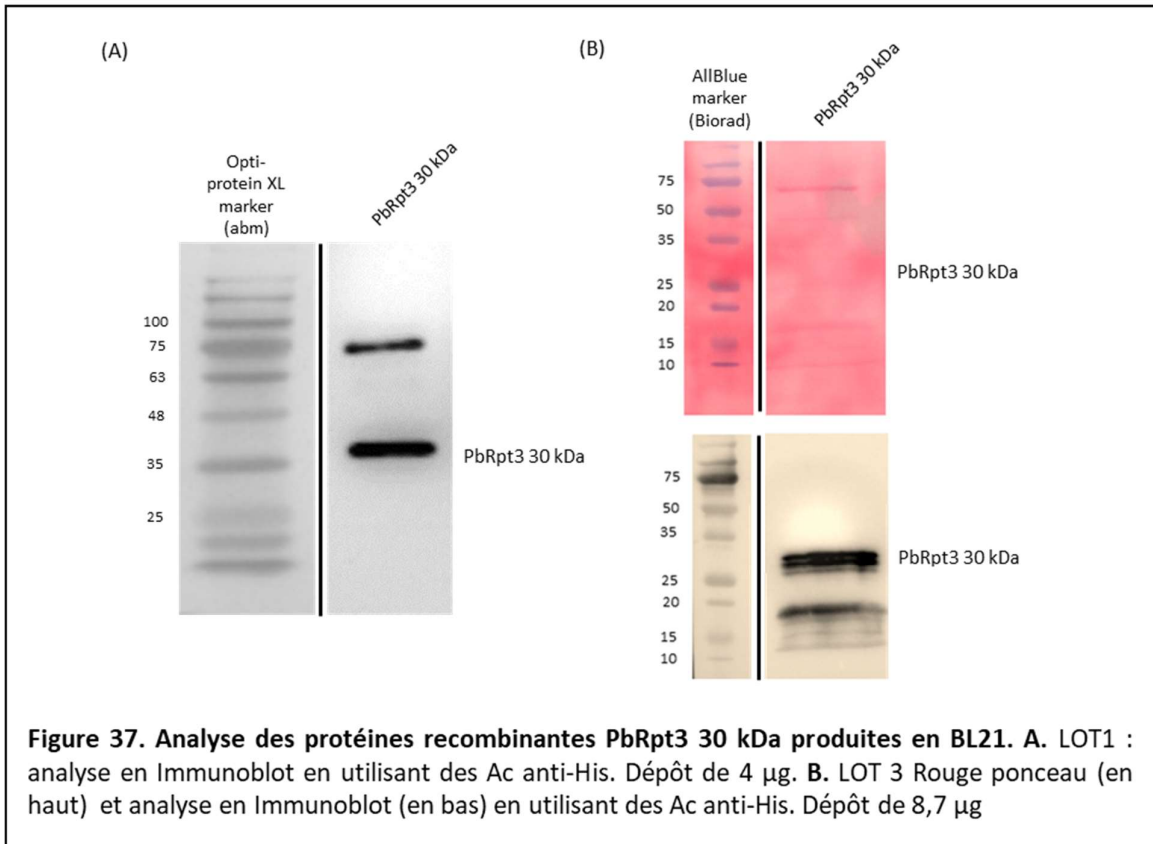
Lot	Taille de la protéine	Solubilisation	Concentration après purification	Volume de culture, Conditions d'induction	Mode d'extraction	Purification	Qté totale en µg
LOT 1	30 kDa	Dénaturante	200 µg/ml	500 ml, Induction à DO 0,562 O/N à 16°C	Lyse soluble puis lyse du culot en milieu dénaturant	en batch	400
LOT 2	30 kDa	Non-dénaturante	355 µg/ml	500 ml, Induction à DO 1,049 O/N à 16°C	Lyse soluble	en batch	532,5
LOT 3	30 kDa	Non-dénaturante	438,5 µg/ml	500 ml, Induction à DO 1,3 O/N à 16°C	Lyse soluble	en batch	657,75
LOT 5	45 kDa	Dénaturante	330 µg/ml	500 ml, Induction à DO 0,9 O/N à 16°C	Lyse soluble puis lyse du culot en milieu dénaturant	en batch	495
LOT 6	45 kDa	Dénaturante	400 µg/ml	1 L, Induction à DO 1 3h à 37 °C	Lyse Dénaturante directe sur le culot bactérien	en batch	600
LOT 7	45 kDa	Dénaturante	360 µg/ml	4 L, Induction à DO 0,8 3h à 37 °C	Lyse Dénaturante directe sur le culot bactérien	en batch	360
LOT 8	45 kDa	Dénaturante	342 µg/ml	3 L, Induction à DO 0,8 2h à 37 °C	Lyse soluble puis Protocole extraction des corps d'inclusion	chromatographie	3420
LOT 9	45 kDa	Dénaturante	138 µg/ml	3 L, Induction à DO 0,950 2h à 37 °C	Lyse soluble puis Protocole extraction des corps d'inclusion	chromatographie	1725

**Tableau IX. Conditions de production, de purification et de dialyse des différents lots de protéines recombinantes PbRpt3-30kDa et PbRpt3-45 kDa.** Ces lots ont été produits à partir des clones *E. coli* BL21-DE3. En dernière colonne sont indiquées les quantités totales obtenues.



Chaque lot produit a été analysé en SDS-PAGE et western blot. L'ensemble des mises au point réalisées ne nous a pas permis d'obtenir des conditions de production et de purification optimales :

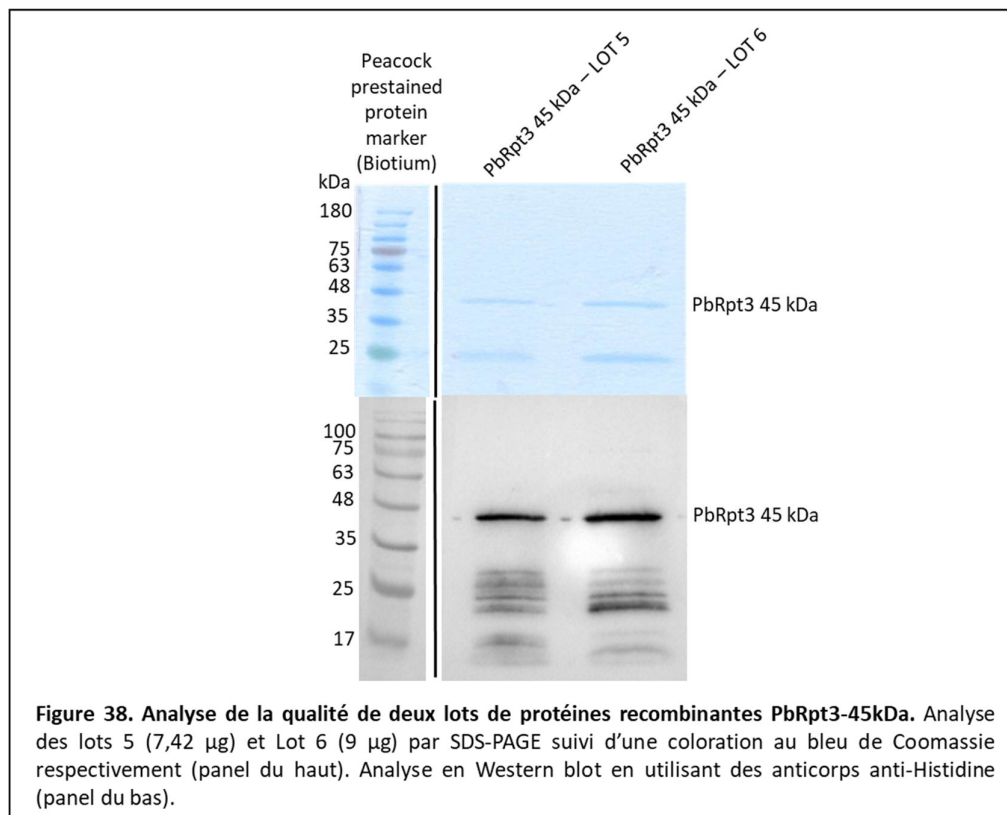
- Pour la PbRpt3 de 30 kDa nous observons une dégradation importante (figure 37 B, lot 1 produit en conditions dénaturantes), ou la présence d'une protéine purifiée qui semble se dimériser (figure 37 A, lot 3 produit en conditions non-dénaturantes). D'autres essais ont été réalisés pour produire cette protéine et sont présentés dans le point 3 de cette partie.



Concernant la protéine PbRpt3-45 kDa, tous les lots produits en BL21-DE3 ont été obtenus en conditions dénaturantes. Au préalable, nous avons fait varier les conditions d'induction, les méthodes d'extraction et de purification. Ainsi, trois protocoles ont été testés :

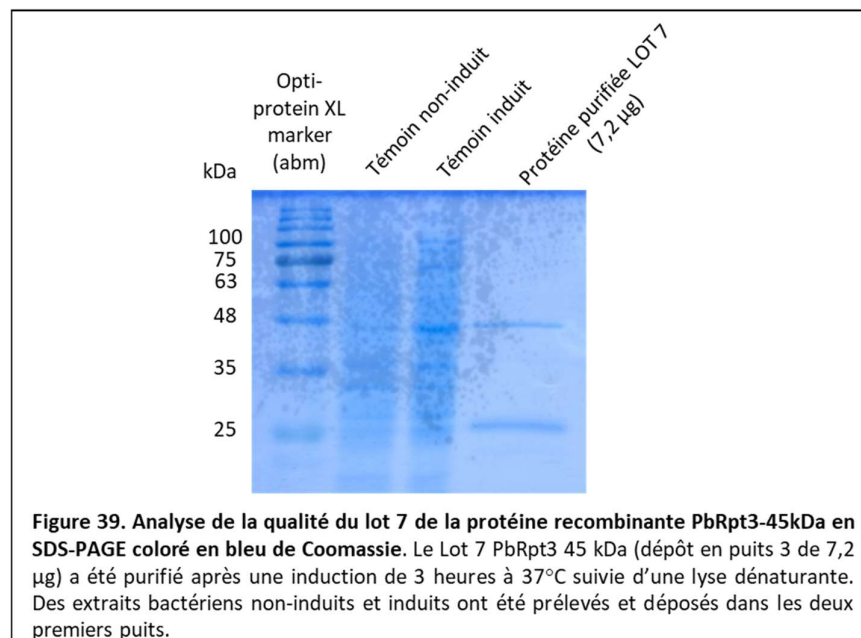
1. Un protocole avec une extraction progressive, c'est-à-dire une lyse bactérienne douce en conditions solubles, la congélation du culot insoluble correspondant aux corps d'inclusion puis une lyse de ce culot en conditions dénaturantes, avec une extraction en batch (lot 5) ;
2. Une extraction directe, c'est-à-dire une lyse du culot bactérien directement en conditions dénaturantes (lots 6 et 7) ;
3. Enfin, un protocole de lyse douce en milieu soluble, suivi de l'isolation et la purification progressive des corps d'inclusion avec notamment l'utilisation du détergent non-ionique Nonidet-P40 (NP-40) utilisé dans les tampons de lyse pour rompre les liaisons hydrophobes. Ce nouveau protocole a été adapté de la publication « Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies » (Rodríguez-Carmona et al., 2010).

Lors de la production des lots 5 et 6, la protéine semble subir une importante dégradation, et ce quelle que soit la méthode utilisée pour la lyse des bactéries (figure 38).



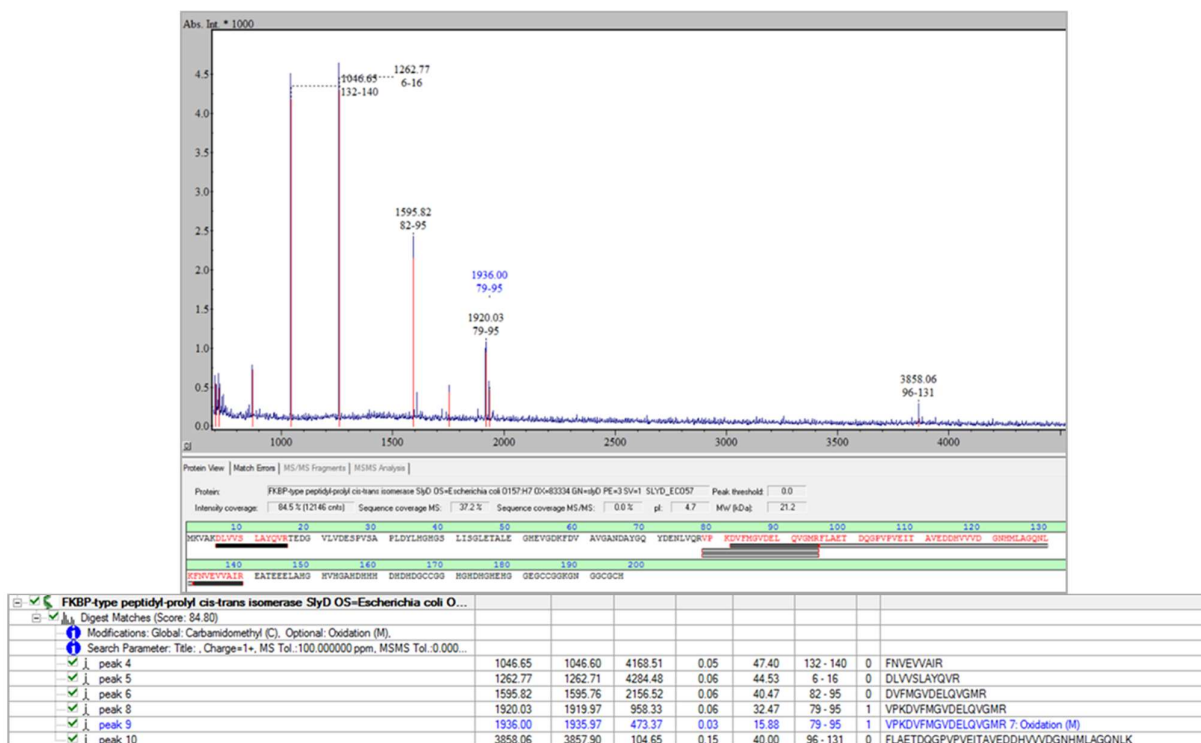
**Figure 38. Analyse de la qualité de deux lots de protéines recombinantes PbRpt3-45kDa.** Analyse des lots 5 (7,42 µg) et Lot 6 (9 µg) par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie respectivement (panel du haut). Analyse en Western blot en utilisant des anticorps anti-Histidine (panel du bas).

Par ailleurs, lors de la purification en batch, comme le montre le gel en bleu de Coomassie pour le lot 7 (figure 39), nous avons observé l'apparition d'une bande à environ 20 kDa, dont l'intensité était parfois supérieure à la bande correspondant à PbRpt3-45 kDa.



**Figure 39. Analyse de la qualité du lot 7 de la protéine recombinante PbRpt3-45kDa en SDS-PAGE coloré en bleu de Coomassie.** Le Lot 7 PbRpt3 45 kDa (dépôt en puits 3 de 7,2 µg) a été purifié après une induction de 3 heures à 37°C suivie d'une lyse dénaturante. Des extraits bactériens non-induits et induits ont été prélevés et déposés dans les deux premiers puits.

L'étude par spectrométrie de masse de cette bande a révélé qu'il s'agissait d'une protéine de *E. coli* : la Rotamase (figure 40). Cette protéine possède trois Histidine et peut se fixer aux billes de Nickel lors de la purification en batch.



**Figure 40. Résultats de l'analyse en spectrométrie de masse des bandes correspondant à la migration en gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de la protéine purifiée PbRpt3 45kDa. A.** Spectres de spectrométrie de masse suite à l'extraction des deux bandes de la figure précédente. Les peptides sont attribués dans la figure suivante. **B.** Identification des peptides correspondant à la Rotamase de *E. coli* pour la bande de 22 kDa.

Afin de tenter de résoudre ce problème de contamination par la Rotamase, la stratégie a été de s'orienter vers une purification par chromatographie. Cependant cette approche n'a pas permis d'éliminer la présence de la protéine contaminante Rotamase et ce malgré une élution par gradient de concentration croissante d'Imidazole.

Le protocole de lyse douce en milieu soluble, suivi de l'isolation et la purification progressive des corps d'inclusion en présence de NP-40 nous a permis d'obtenir une quantité importante de protéine par chromatographie. Cependant, nous avons observé une précipitation de la presque totalité de la protéine lors de la phase de renaturation réalisée après la purification (lot 8). Cette renaturation est réalisée en bains de dialyse successifs contenant des concentrations décroissantes d'Urée (4M, 2M, 1M puis absence d'Urée). L'Urée est un agent chaotrope destiné à perturber les liaisons hydrogène et hydrophobe permettant une renaturation progressive de la protéine. L'ajout de NaCl à 500mM dans tous les tampons n'a pas permis de solutionner ce problème de précipitation (lot 9).

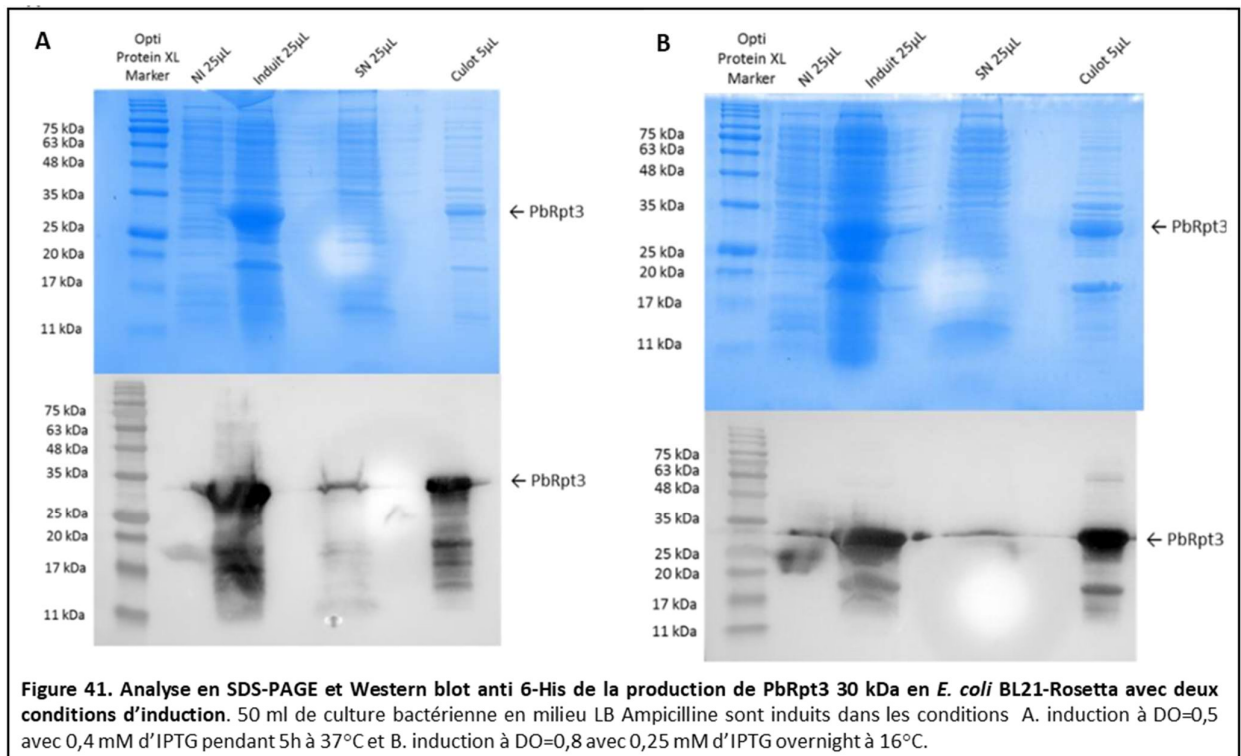
Face à ces différents problèmes : la dégradation de la protéine 30 kDa, la présence d'un contaminant bactérien et la précipitation de la protéine de 45 kDa, nous avons choisi de nous tourner vers d'autres souches bactériennes, et de nous concentrer sur la purification de la protéine de 30 kDa.

## C. Une nouvelle stratégie de production avec différentes souches de bactéries *E. coli*

### 1. Tests avec la souche *E. coli* Rosetta DE3 pRARE

Une analyse de la littérature a révélé que Nakamura et al (Nakamura et al., 2007) ont réussi à produire en bactérie la partie C-terminale (a.a. 348–428) de la protéine Rpt3 de levure *S. cerevisiae*, fusionnée à Nas6, une oncoprotéine du foie connue pour interagir avec la partie C-terminale de la Rpt3 chez l'homme lorsque celle-ci est associée, ou non, au protéasome (Dawson et al., 2002). Rpt3-Nas6 a été produite sous forme recombinante en *E. coli* Rosetta DE3. La souche Rosetta™ est dérivée des bactéries BL21 et permet d'exprimer des protéines eucaryotes dont les codons sont rarement utilisés en *E. coli*. Les ARNt produits par cette souche comprennent ainsi AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA produits sur un plasmide pRARE qui est chloramphénicol-résistant. Nous avons donc choisi de tester cette souche Rosetta DE3 afin de produire la PbRpt3-30kDa. Deux conditions d'induction ont été testées sur 50 ml de culture bactérienne :

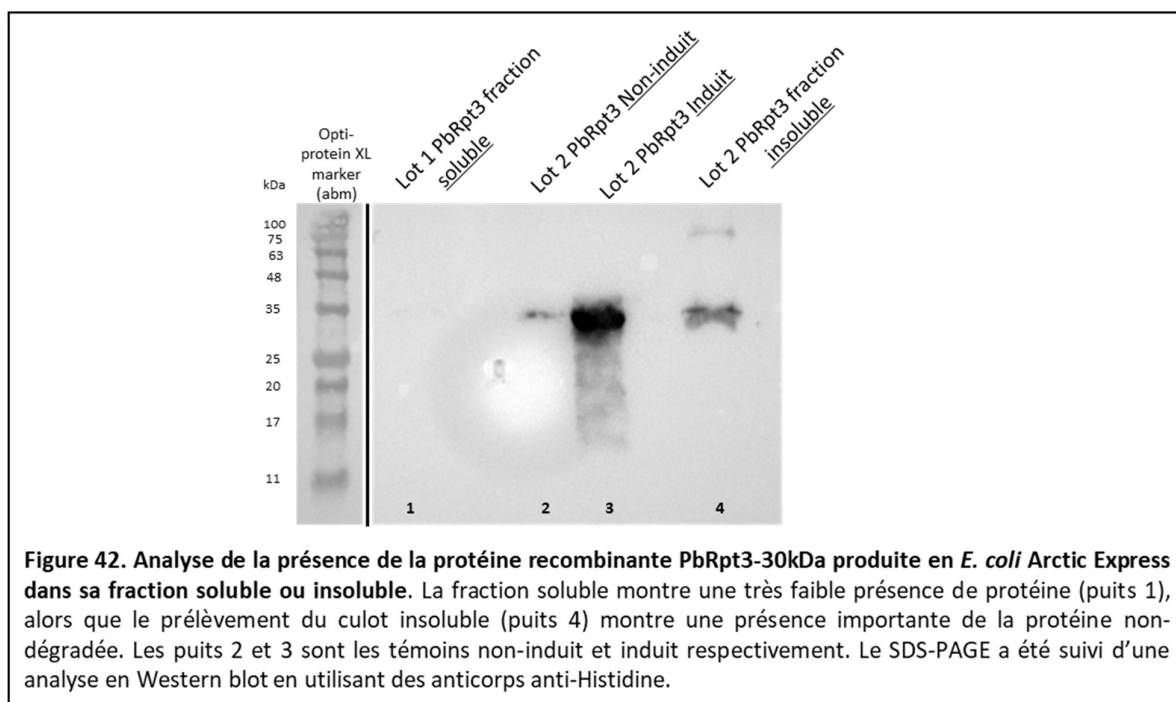
- une induction à 0.5 de DO avec 0.4 mM d'IPTG pendant 5h à 37°C.
- une induction à 0.8 de DO avec 0.25 mM d'IPTG pendant 12 heures à 16°C.



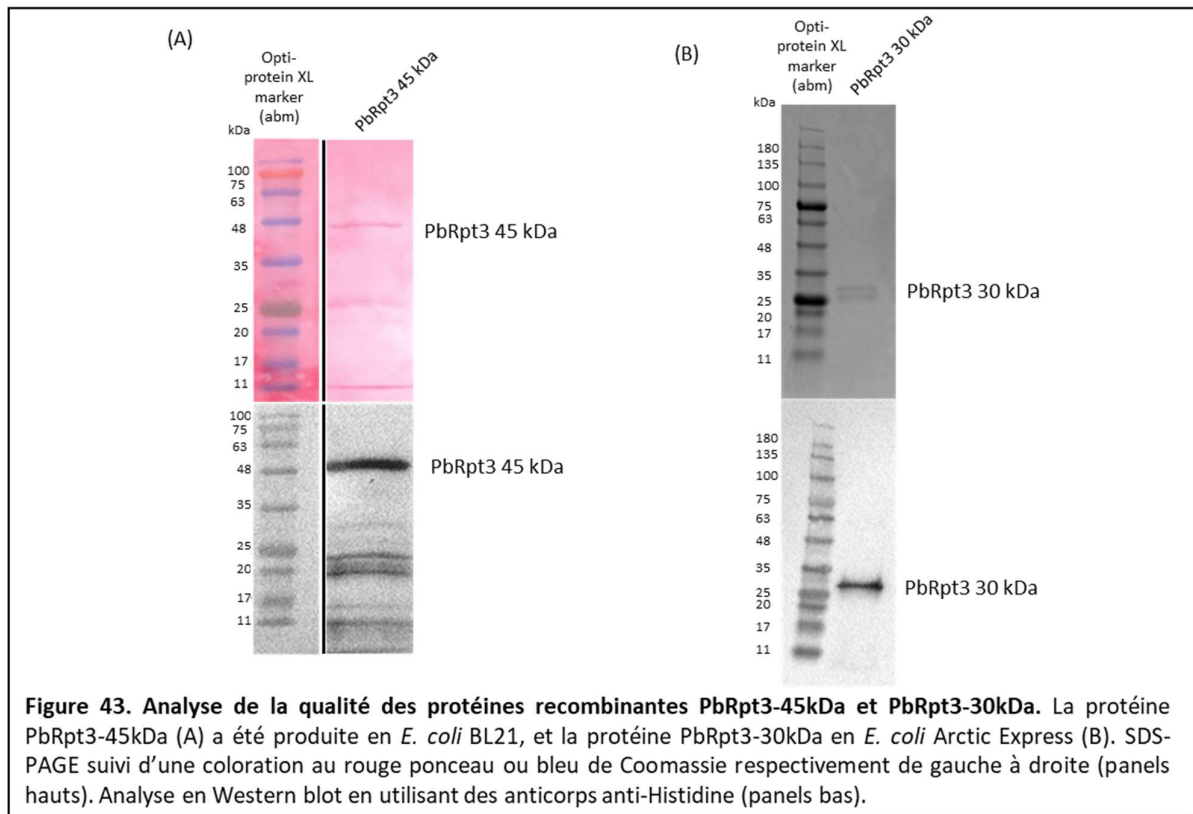
L'analyse en SDS-PAGE et western blot montre une induction efficace pour chaque condition testée (Figure 41). La présence de la protéine PbRpt3 de 30 kDa est détectée dans le surnageant bactérien après induction, mais en faibles quantités comparé au culot bactérien. De plus, nous observons une dégradation de la protéine qui semble être moins importante lorsque l'induction est réalisée pendant 12 heures à 16°C (figure 41B) en comparaison d'une induction sur un laps de temps plus court à 37°C (figure 41A). Ces tests ne semblant pas améliorer significativement ni la solubilité ni la qualité des protéines obtenues, nous avons utilisé une troisième souche de bactéries.

## 2. Production avec la souche de bactéries *E. coli* Arctic Express

Des essais ont été entrepris avec la souche bactérienne Arctic Express de *E. coli*. Cette souche exprime des protéines chaperonnes Cpn10 et Cpn60 de la bactérie *Oleispira antarctica*. Nous avons donc utilisé cette souche bactérienne afin de tenter d'exprimer PbRp3-30 kDa. Pour cela, l'induction se fait sur une durée plus longue (24 heures) à 10°C. Ces tests nous ont permis d'observer que, comme pour les Rosetta-DE3, la protéine se retrouvait majoritairement dans les corps d'inclusion, ce qui impliquait alors de réaliser une extraction en conditions dénaturantes. Mais le progrès avec cette souche en comparaison de la souche Rosetta est l'absence de dégradation de PbRpt3 comme montré en figure 42.



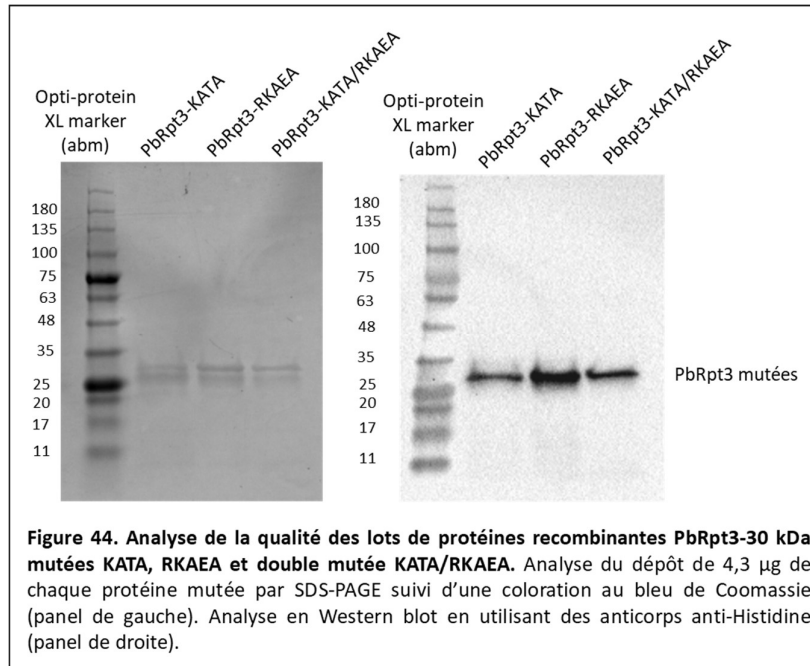
A l'issue de ces différents essais de production des protéines PbRp3-45kDa (BL21-DE3) et PbRpt3-30 kDa (BL21-DE3, Rosetta-DE3 et Arctic Express) nous avons choisi de poursuivre nos études avec les lots produits en BL21-DE3 pour la PbRp3-45 kDa (lots 6 et 7) et avec les lots produits en Arctic Express pour la PbRpt3-30kDa. Ce sont ces différents lots, dont nous présentons les analyses en Western blot en figures 43A et B, qui nous ont permis de tester l'interaction *in vitro* avec PP1c.



#### D. Production des protéines PbRpt3 mutées

Afin d'évaluer la contribution des motifs RVxF de PbRpt3 dans l'interaction avec PP1c, nous avons produit, sous forme recombinante, les protéines PbRpt3-30kDa mutées pour l'un et/ou l'autre de ces motifs. En effet, différentes études ont déjà démontré que l'interaction entre PP1c et ses protéines partenaires pouvait être altérée par la mutation des motifs RVxF des protéines interactantes, notamment *via* la substitution des acides aminés V/I ou F par des résidus alanine (non-polaires et hydrophobes) (Egloff et al., 1997; Wakula et al., 2003). Ainsi, les motifs 200-KVTF-203 et 305-RKIEF-309 de PbRpt3 (figure 44) ont mutés en KATA et RKAEA respectivement. Une protéine PbRpt3 comportant la double mutation KATA/RKAEA a également été produite.

Les différents plasmides pETDuet-PbRpt3-30kDa comportant les mutations correspondant aux motifs KATA, RKAEA et KATA/RKAEA ont été obtenus par mutagenèse dirigée puis séquencés, Deux lots de chacune des protéines correspondantes ont été produits en *E. coli* Arctic Express (figure 44), et testés pour leur interaction avec PfPP1c *in vitro*.



### III. Etude de l'interaction entre PbRpt3 et PP1c *in vitro* et chez l'ovocyte de Xénope ; rôle fonctionnel de cette interaction

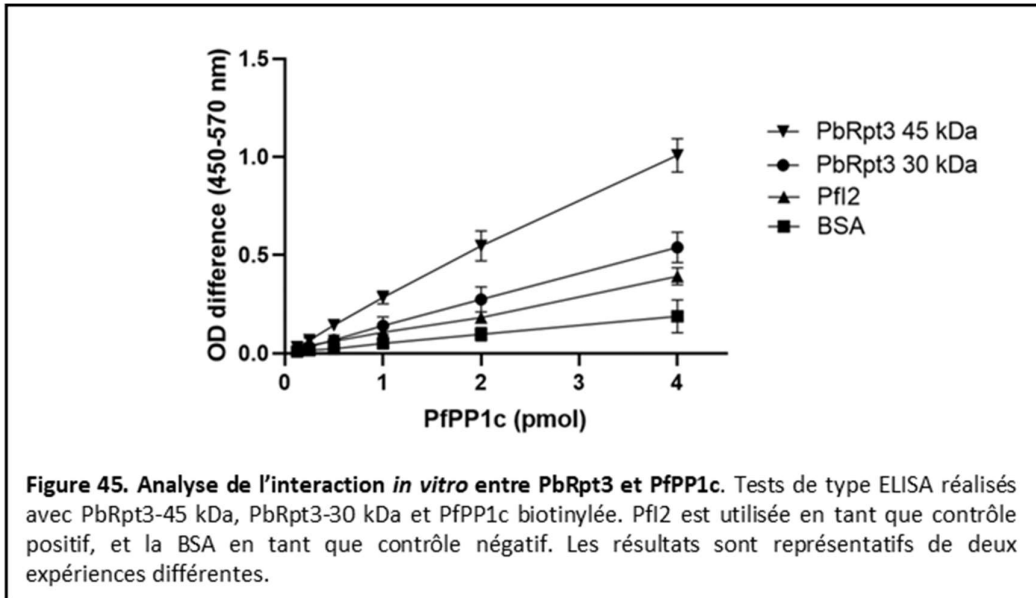
#### A. Résultats des expériences *in vitro*

##### 1. Interaction *in vitro* entre PbRpt3 et PfPP1c

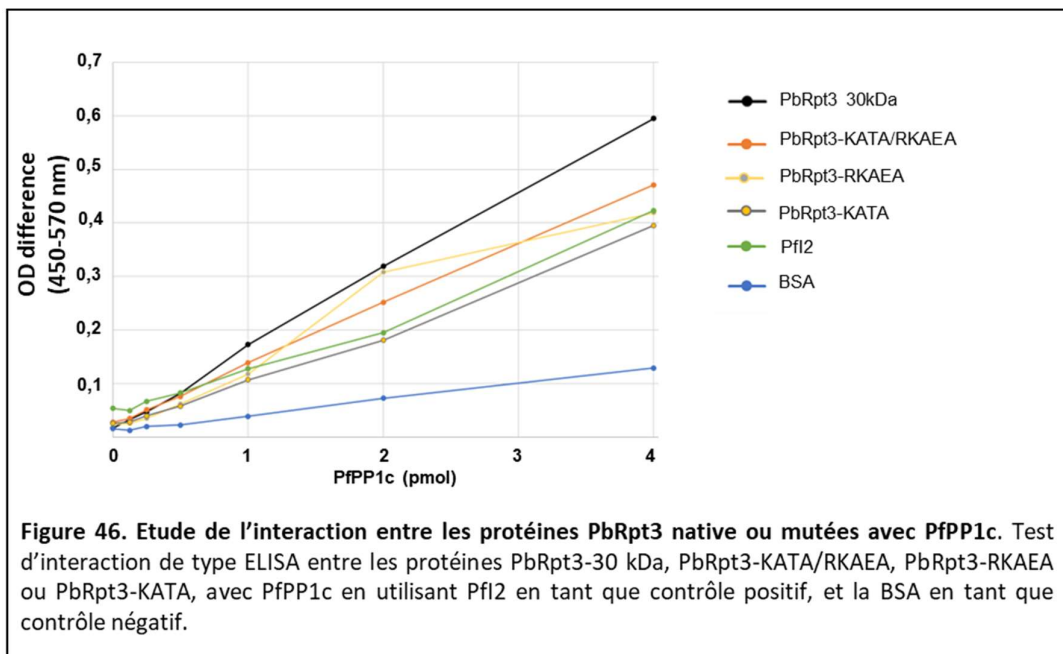
PbRpt3 a été identifiée comme partenaire potentiel de PP1c chez *P. berghei* dans plusieurs études d'interactome de la phosphatase (De Witte et al., 2022; Hollin et al., 2019). Afin de vérifier si ces deux protéines interagissent directement, nous avons réalisé des tests de type ELISA avec les protéines recombinantes PbRpt3-45kDa et PbRpt3-30 kDa, et PfPP1c. Dans ces essais PfI2 a été utilisée en tant que contrôle positif (Fréville et al., 2013).

Comme illustré en figure 45, nous observons une augmentation dose-dépendante de la Densité Optique (DO) lorsque PbRpt3 est incubée avec des quantités croissantes de PfPP1c biotinylée. Ceci indique que PbRpt3-45 kDa interagit directement avec PfPP1c. De même, nous avons constaté que la protéine tronquée PbRpt3-30 kDa (a.a. 131-395) interagissait également avec PfPP1c de manière dose-dépendante (figure 45). PbRpt3-30 kDa ne possède pas le domaine hélice ni le domaine ATPase OB-C-terminal. Le fait qu'elle interagisse avec PfPP1c suggère donc que les domaines d'interaction avec la phosphatase seraient localisés dans la région des a.a. 131-395 où sont notamment situés les deux motifs RVxF.





Afin d'évaluer le rôle des deux motifs RVxF de PbRpt3, nous avons réalisé le même test d'interaction avec les trois protéines PbRpt3 mutées (KATA, RKAEA et KATA/RKAEA). Nous observons une diminution du signal lorsque les protéines mutées sont incubées en présence de PfPP1c par rapport à la protéine PbRpt3 non mutée (figure 46). Cependant, cette diminution n'est pas significative. Ce résultat, indiquant une interaction résiduelle malgré la mutation des deux motifs RVxF de PbRpt3 sera commenté en discussion et pourrait être à relier avec les conditions des tests *in vitro*, l'utilisation d'une protéine tronquée, et/ou la présence d'autres régions de PbRpt3 impliquées dans l'interaction.





## 2. Rôle fonctionnel de PbRpt3 sur l'activité de PP1c *in vitro*

Après avoir démontré que PbRpt3 et PfPP1c interagissaient *in vitro*, il était important de vérifier si cette interaction avait un effet sur l'activité de la phosphatase. Ces expériences ont été réalisées en utilisant le substrat p-Nitrophénylphosphate (pNPP) qui, lorsqu'il est déphosphorylé entraîne la formation d'un composé coloré mesurable par la variation de DO. Des expériences préliminaires ont permis de démontrer que la présence de PbRpt3 seule ne permettait pas de déphosphoryler le substrat synthétique (figure 47).

Ensuite, l'effet de PbRpt3 sur l'activité de PfPP1c a été analysé après préincubation de la phosphatase avec des quantités croissantes de PbRpt3-45kDa ou PbRpt3-30kDa. Les résultats obtenus montrent une augmentation dose-dépendante de l'activité de la phosphatase (Figure 48), atteignant respectivement plus de 200% et 400% de l'activité lorsque 600 pmol de PbRpt3-45kDa et PbRpt3-30kDa sont utilisées. Comme attendu, l'incubation avec l'inhibiteur de PP1c, Pfi2 (Fréville et al., 2013) a permis, *a contrario*, d'observer une diminution de l'activité de PfPP1c (~60% de l'activité de PfPP1c avec 600 pmol de Pfi2).

Si les valeurs d'activité de PP1c en présence de PbRpt3-45 kDa ou PbRpt3-30 kDa sont difficilement comparables du fait de la moindre pureté de la protéine de 45 kDa, ces résultats démontrent que PbRpt3 active PfPP1c *in vitro*, et que la région de PbRpt3 131-395 est suffisante pour cette activité.

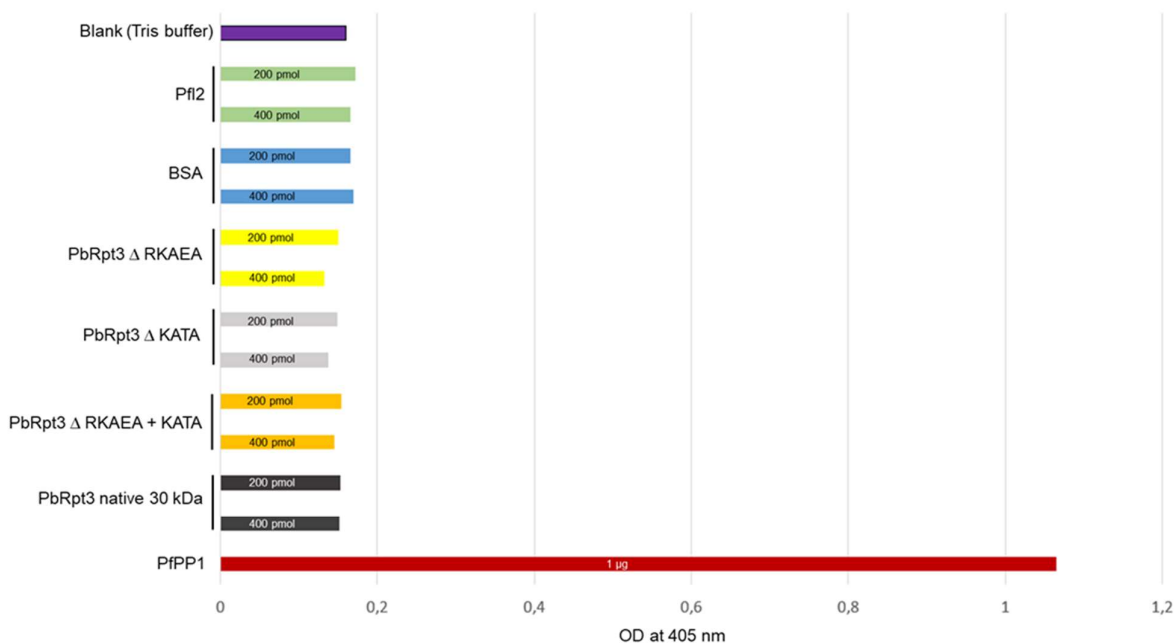
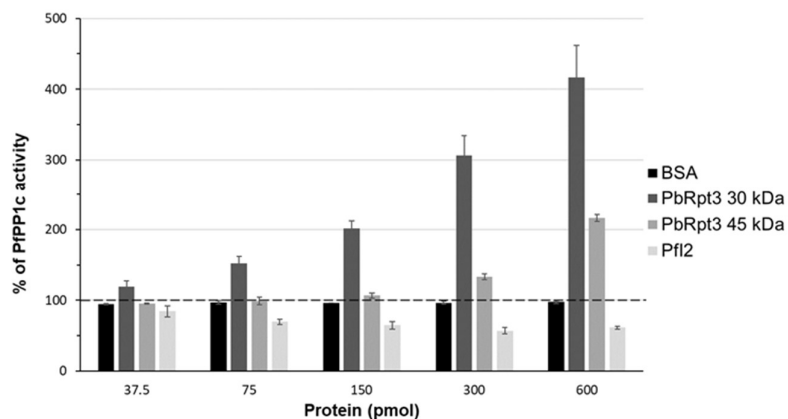


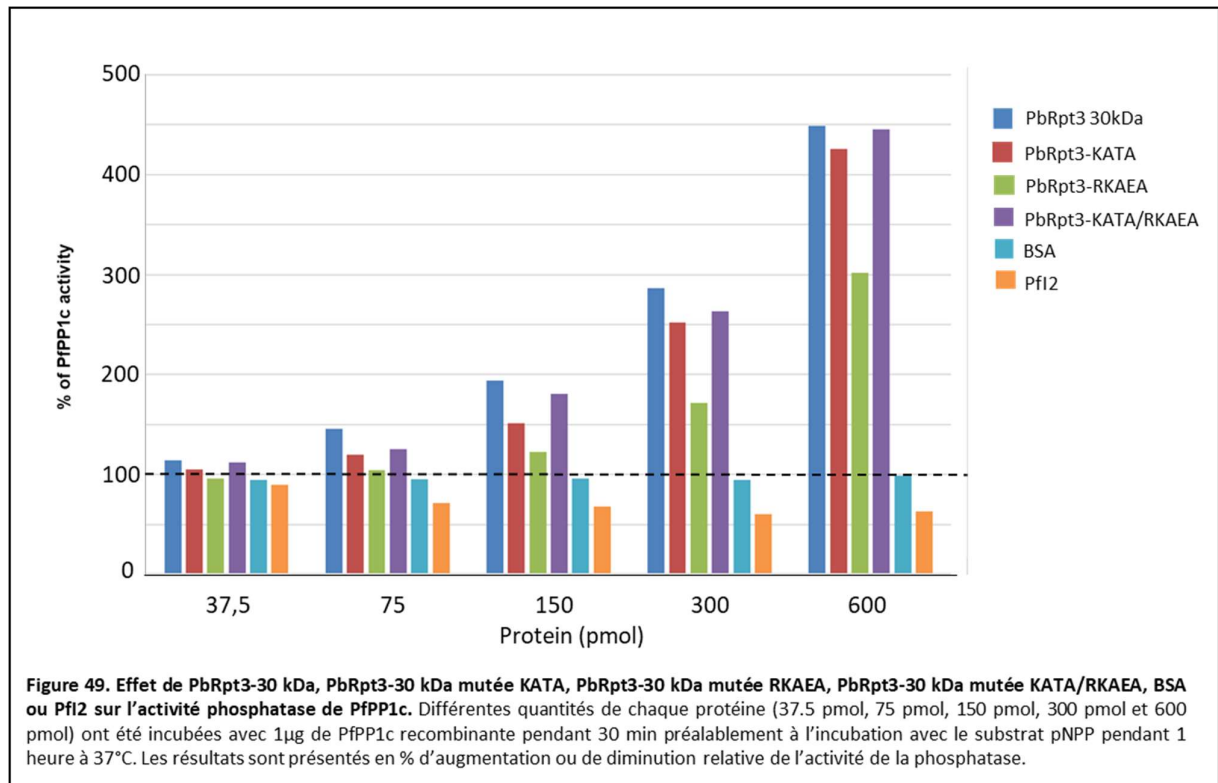
Figure 47. Etude de l'activité phosphatase de PRpt3-30 kDa, des différentes protéines mutées sur les motifs RVxF, ainsi que des protéines contrôle BSA, Pfi2 et PfPP1c grâce à un test pNPP. Différentes quantités de chaque protéine (200 ou 400 pmol), ou 1 μg de PfPP1c recombinante ont été incubées avec le substrat pNPP pendant 1 heure à 37°C. Les résultats sont présentés en valeurs de Densité Optique à 450 nm.



**Figure 48.** Effet de PbRpt3-45 kDa, PbRpt3-30 kDa, BSA ou Pfl2 sur l'activité phosphatase de PfPP1c. Différentes quantités de chaque protéine (37.5 pmol, 75 pmol, 150 pmol, 300 pmol et 600 pmol) ont été incubées avec 1 $\mu$ g de PfPP1c recombinante pendant 30 min préalablement à l'incubation avec le substrat pNPP pendant 1 heure à 37°C. Les résultats sont présentés en % d'augmentation ou de diminution relative de l'activité de la phosphatase et correspondent à la moyenne  $\pm$  S.D. de deux expériences indépendantes réalisées en duplicat.

Ensuite, un test pNPP a été réalisé avec les trois protéines mutées PbRpt3-30 kDa KATA, RKAEA et double mutée KATA/RKAEA, en comparaison avec la protéine non mutée (figure 49). Les résultats obtenus ne montrent aucune différence de signal lorsque les protéines PbRpt3-KATA et PbRpt3-KATA/RKAEA sont utilisées. Par contre, une diminution de l'activité phosphatase est observée lorsque le motif RKIEF est muté. Dans l'ensemble, ces résultats ne semblent pas très cohérents et pourraient s'expliquer par l'interaction résiduelle entre les protéines mutée et PfPP1c observée dans ces tests *in vitro* de type ELISA.

Par la suite, afin de confirmer l'interaction entre PbRpt3 et PP1c et son impact sur l'activité de la phosphatase, et d'explorer de façon plus approfondie le rôle des motifs RVxF de PbRpt3, nous nous sommes tournés vers le modèle hétérologue d'ovocytes de Xénope.



## B. Interaction PbRpt3-PP1c et activité fonctionnelle chez l'ovocyte de Xénope

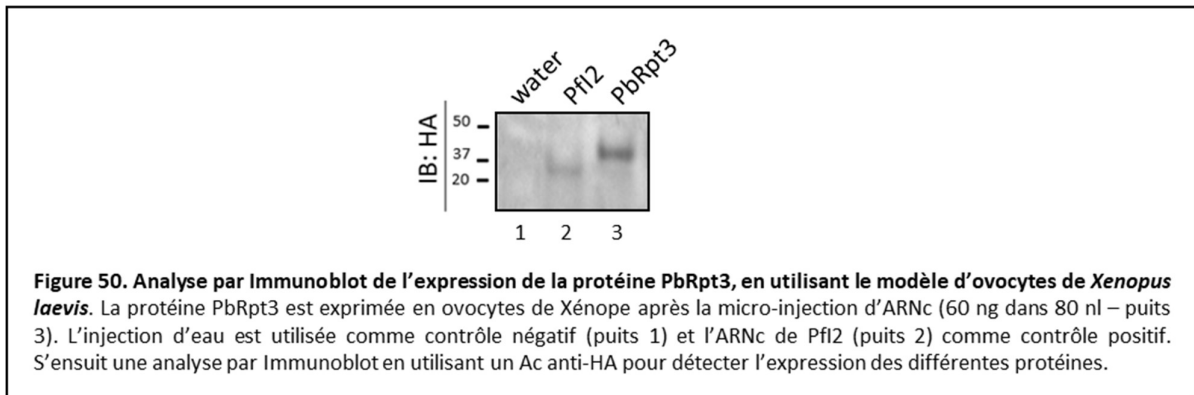
Le modèle d'ovocytes de Xénope permet d'étudier l'interaction et le rôle de régulateurs de PP1c dans un contexte cellulaire *in vivo*. En effet, dans ce modèle, les ovocytes immatures sont bloqués en prophase I, notamment sous l'effet de PP1c. Ainsi, l'inhibition de PP1c par des anticorps anti-PP1c ou par un inhibiteur de la phosphatase va déclencher l'entrée en méiose des ovocytes (Fréville et al., 2013; Lenne et al., 2018; Swain et al., 2003; Tellier et al., 2016). Ce passage de la phase G2/M vers la métaphase II est caractérisé par l'apparition d'une tache blanche au pôle animal de l'ovocyte : c'est la GVBD (Germinal Vesicle BreakDown). A l'inverse, un activateur de PP1c entrainera une inhibition de la maturation induite par la progestérone (PG) (Lenne et al, 2018). L'utilisation de ce modèle pour étudier les interactions de partenaires de PbPP1c avec la phosphatase, ainsi que leur impact sur son activité enzymatique, est pertinente du fait que la PP1c de *Xenopus laevis* (XePP1c) présente plus de 80% d'identité avec PbPP1c (Lenne et al, 2018).

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec les docteurs Katia Cailliau et Alain Martoriati (Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle).

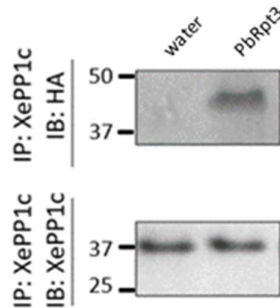
## 1. PbRpt3 interagit avec XePP1c et présente une activité fonctionnelle en ovocytes de Xénope.

Afin de confirmer les résultats *in vitro* qui démontraient une activation de PP1c par la protéine recombinante PbRpt3 de 30 et de 45 kDa, nous avons micro-injecté, dans des ovocytes de Xénope, l'ARNc (1188 pb) codant pour la protéine PbRpt3 étiquetée HA (protéine entière de 45 kDa). Afin d'assurer une traduction optimale chez cet organisme, la séquence de PbRpt3 a été recodonisée. En parallèle et en guise de contrôle, nous avons micro-injecté l'ARNc codant pour Pfl2-HA. L'interaction de Pfl2 avec XePP1c et son effet inhibiteur de XePP1c avaient déjà été démontrés précédemment (Fréville et al., 2013).

En premier lieu, un immunoblot réalisé sur des extraits d'ovocytes avec des Ac anti-HA a permis de confirmer la traduction de PbRpt3 chez les ovocytes (figure 50).

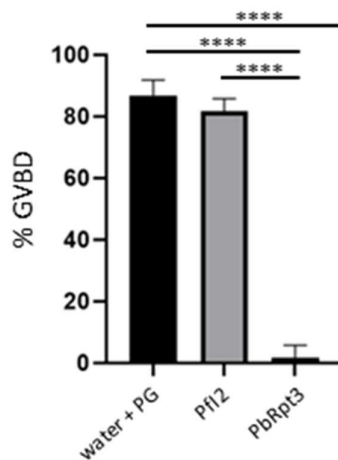


Des immunoprécipitations sur des extraits préparés à partir d'ovocytes après micro-injection de l'ARNc codant PbRpt3 ont ensuite été réalisées avec un anticorps monoclonal anti-XePP1c. L'analyse réalisée en immunoblot a montré que les protéines PbRpt3-HA et XePP1c appartiennent au même complexe (figure 51).



**Figure 51. Analyse de l'interaction entre PbRpt3 et PP1c dans le modèle d'ovocytes de Xénope.** Interaction de PbRpt3 avec la PP1c de *Xenopus* (XePP1c). Les extraits d'ovocytes ont été obtenus après micro-injection d'eau (80 nl, puits 1) ou l'ARNc de PbRpt3 (60 ng dans 80nl, puits 2), suivi par un traitement à la progestérone (PG) (10  $\mu$ M, 15 heures post micro-injection). L'immunoprécipitation a été réalisée avec un Ac monoclonal anti-XePP1c. L'analyse en immunoblot a été réalisée en utilisant un Ac monoclonal anti-HA (en haut) ou anti-XePP1c (en bas).

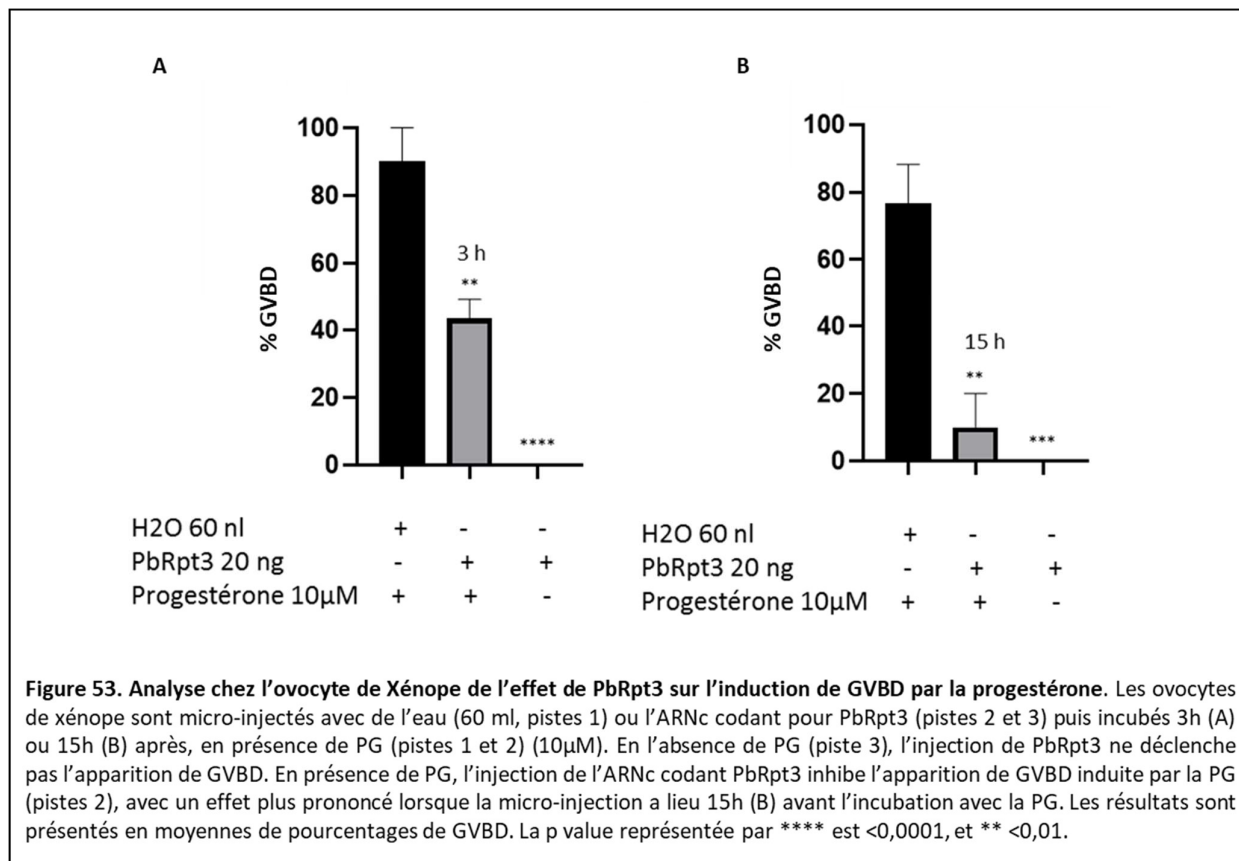
Au niveau fonctionnel, après micro-injection de l'ARNc codant PbRpt3 (figure 52, piste 3), nous n'observons pas de GVBD. A l'inverse, l'incubation des ovocytes en présence de PG, ou la micro-injection de l'ARNc codant Pfl2 permettent la transition G2/M et l'apparition de GVBD (Figure 52, pistes 1 et 2). Cette observation confirme l'effet inhibiteur de Pfl2 sur XePP1c et indique que PbRpt3 ne serait, quant à elle, pas une protéine inhibitrice de PP1c.



**Figure 52. Analyse de l'apparition de GVBD chez les ovocytes de Xénope après micro-injection de Pfl2 et PbRpt3.** La micro-injection d'eau (60 nl, piste 1) est suivie d'un traitement par la PG, ce qui induit l'apparition de GVBD. La micro-injection de l'ARNc de l'inhibiteur de PP1c, Pfl2 (20 ng dans 60 nl, piste 2) induit l'apparition de GVBD. La micro-injection de l'ARNc de PbRpt3 (20 ng dans 60 nl, piste 3) ne suffit pas à induire l'apparition de GVBD. Les résultats sont présentés en moyennes de pourcentages de GVBD et la p value est  $<0,0001$  pour chaque test.

Afin de tester si PbRpt3 exerce un rôle activateur sur la phosphatase, nous avons micro-injecté l'ARNc de PbRpt3 3h ou 15h avant traitement par la PG. Nous observons une diminution significative du pourcentage de GVBD, diminution qui est d'autant plus marquée lorsque la micro-injection est réalisée 15h avant l'incubation en présence de PG. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de protéine traduite 3h après la micro-injection ne serait pas suffisante pour observer l'effet maximal

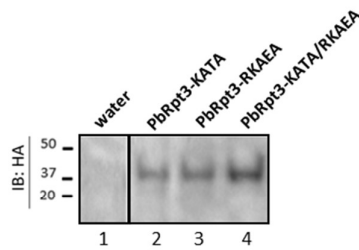
(figure 53). Quoi qu'il en soit, ces résultats montrent que PbRpt3 présenterait un rôle activateur de la phosphatase XePP1c dans les ovocytes, confirmant ainsi nos résultats obtenus *in vitro*. Ces expériences nous permettent également de déterminer la cinétique optimale de micro-injection des ARNc pour la suite de notre étude.



## 2. Contribution des motifs RVxF de PbRpt3 à l'interaction avec PP1c, et à son activité fonctionnelle en ovocytes de Xénope.

Afin d'explorer la contribution des motifs RVxF de PbRpt3 dans l'effet observé en ovocytes de Xénope, nous avons muté les acides aminés 200-KVTF-203 en 200-KATA-203, puis les acides aminés 305-RKIEF-309 en 305-RKAEA-309 et produit les ARNc correspondants. Nous avons également réalisé la double mutation PbRpt3-KATA/RKAEA (Matériel et Méthodes – figure 71).

Comme précédemment, la traduction de chaque ARNc dans les ovocytes a été vérifiée par immunoblot en utilisant un Ac anti-HA (figure 54) puis nous avons testé la capacité de chaque protéine PbRpt3-KATA, PbRpt3-RKAEA et PbRpt3 KATA/RKAEA à interagir avec XePP1c et à inhiber l'apparition de GVBD induite par la PG.

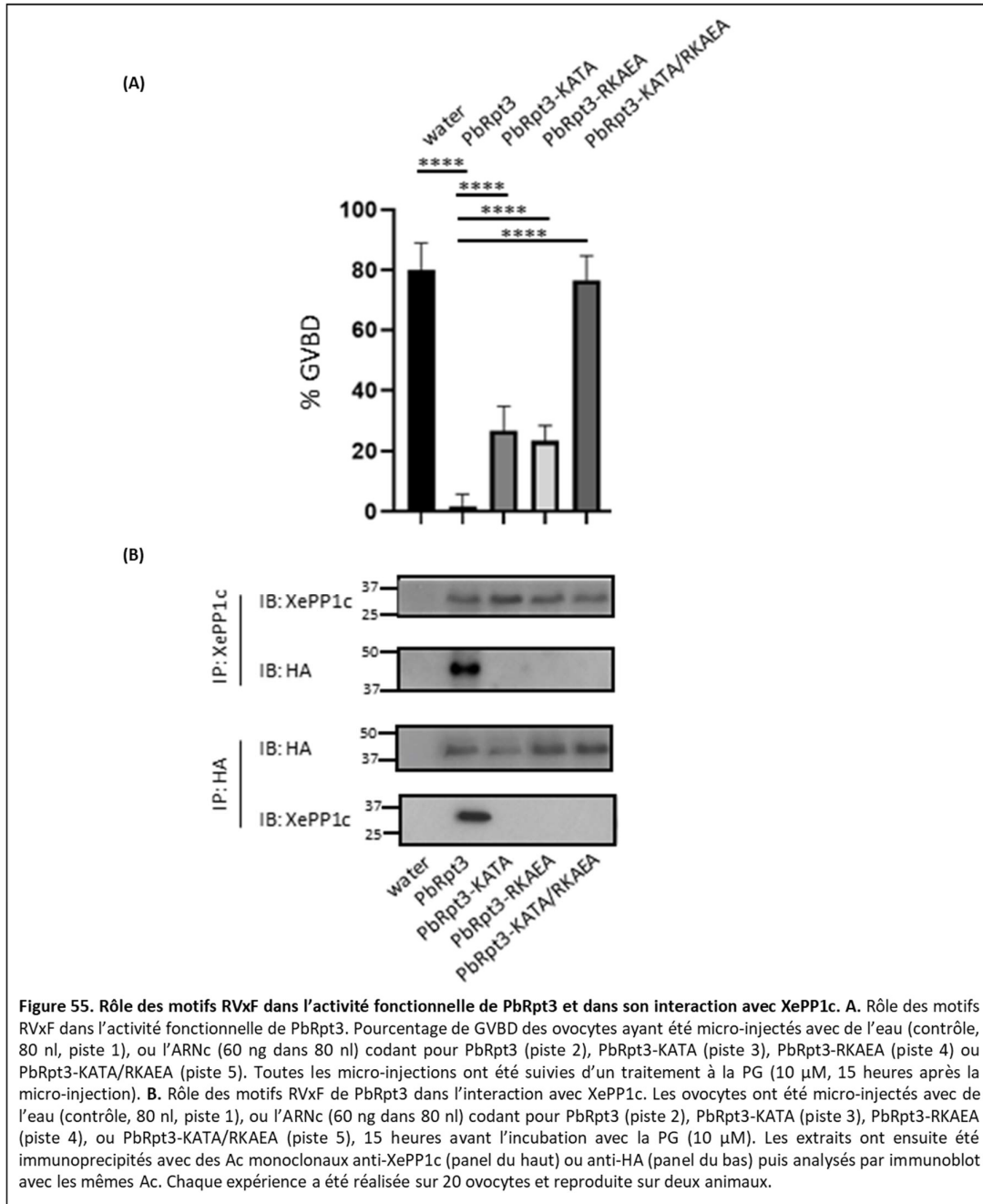


**Figure 54. Analyse par Immunoblot de l'expression des protéines PbRpt3 mutées pour les motifs RVxF, en utilisant le modèle d'ovocytes de *Xenopus laevis*.** Les protéines PbRpt3 mutantes sont exprimées en ovocytes de Xénope après la micro-injection d'ARNc (60 ng dans 80 nl). L'injection d'eau est utilisée comme contrôle négatif (puits 1). Les ARNc des protéines recombinantes suivantes sont injectés : PbRpt3-KATA (puits 2), PbRpt3-RKAEA (puits 3), PbRpt3-KATA/RKAEA (puits 4). Comme précédemment, les injections sont suivies du traitement à la progestérone et l'analyse est réalisée par Immunoblot avec un Ac anti-HA pour détecter l'expression des différentes protéines.

Lors de la micro-injection des ARNc PbRpt3-KATA ou PbRpt3-RKAEA, nous avons observé une diminution de l'apparition de GVBD induite par la PG. Cependant, cette diminution est significativement moins importante que celle observée après micro-injection de l'ARNc PbRpt3 non-muté (Figure 55A, pistes 3 et 4). Nous observons ainsi des valeurs de GVBD de 80% pour le contrôle PG, 1.7% pour PbRpt3, 26.6% pour PbRpt3-KATA, et 23.3% pour PbRpt3-RKAEA.

La co-immunoprécipitation et analyse en immunoblot réalisées sur les lysats préparés à partir de ces ovocytes a permis de démontrer que le complexe PbRpt3-XePP1c n'était pas détecté lorsque les ARNc des simple-mutants étaient injectés (figure 55B). Ceci semble indiquer que l'effet fonctionnel "partiel" observé avec les simple-mutants serait lié à une interaction transitoire ou résiduelle entre PbRpt3 et XePP1c, non détectée par immunoblot.

Lorsque l'ARNc codant pour PbRpt3 mutée pour les deux motifs RVxF (PbRpt3-KATA/RKAEA) est micro-injecté dans les ovocytes 15h avant l'incubation en PG, aucun effet sur l'apparition de GVBD induite par la PG n'est observé (figure 55A, piste 5). La protéine doublement mutée n'est donc pas capable d'inhiber la maturation induite par la PG. Par ailleurs, la protéine mutante PbRpt3-KATA/RKAEA n'a pas été immunoprécipitée avec XePP1c (Figure 55B, piste 5), malgré la traduction de la protéine (Figure 55, piste 6). L'ensemble de ces résultats indique donc que la protéine PbRpt3 interagit directement avec XePP1c, et que cette interaction, ainsi que l'effet fonctionnel sur l'apparition de GVBD, nécessitent la présence des deux motifs RVxF.

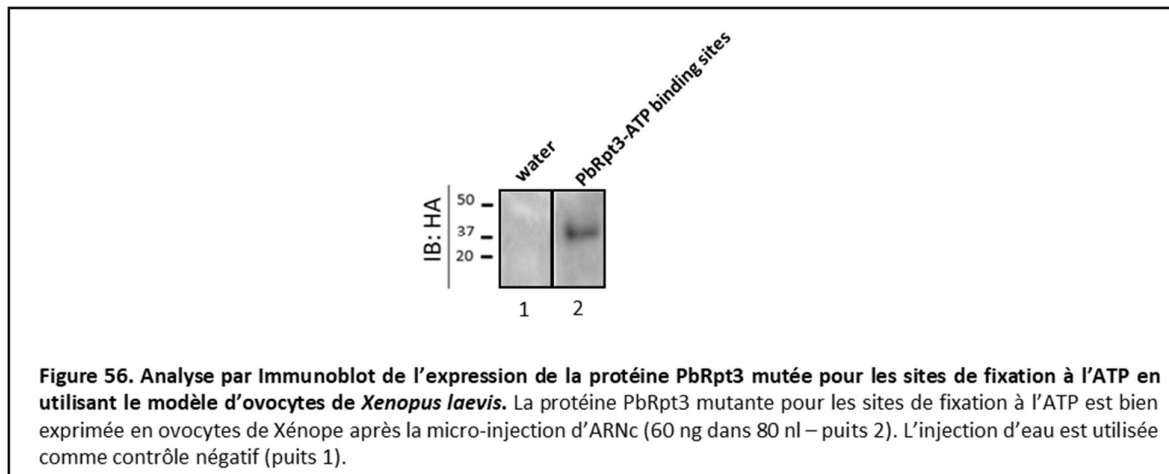


### 3. Rôle fonctionnel de PbRpt3 chez l'ovocyte de Xénope : contribution de sa capacité à lier l'ATP

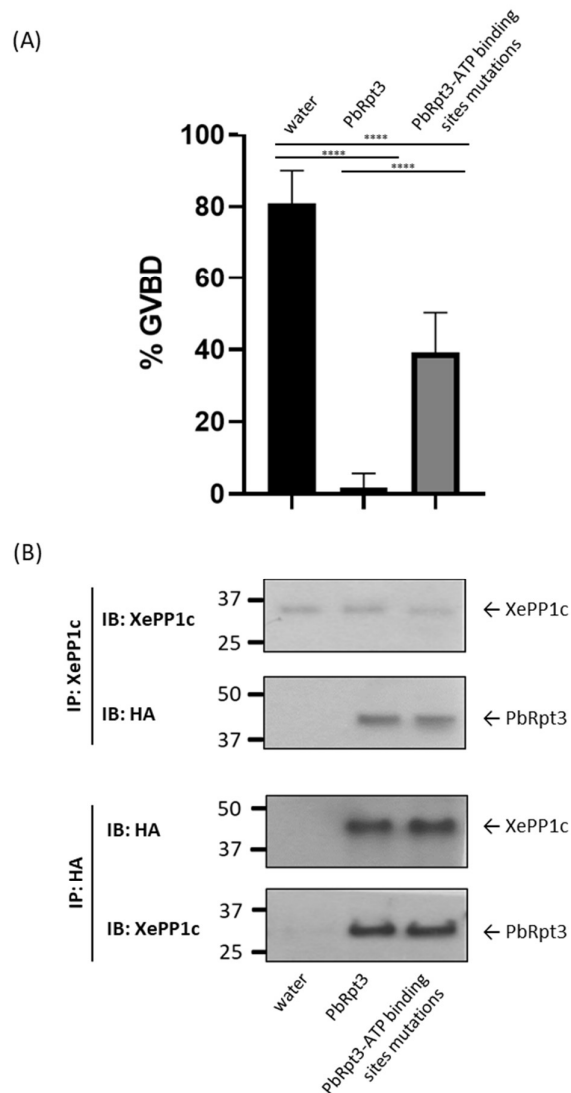
D'après les domaines prédits de PbRpt3 étudiés plus haut, cette protéine serait une AAA-ATPase. Grâce à l'étude de sa structure 3D prédite, nous avons identifié à l'aide du Dr. Farce, 4 acides aminés, K188, D241, N288, et Q356, comme étant potentiellement impliqués dans la stabilité de la molécule d'ATP ainsi que dans la fixation de l'ion  $Mg^{2+}$  (cf paragraphe A.3 de cette partie Résultats). La mutation de ces acides aminés pourrait donc avoir un impact sur l'activité enzymatique de la protéine dont le rôle est de permettre la fixation puis l'hydrolyse de l'ATP en ADP et Phosphate (Matériel et Méthodes -figure 71).



Nous avons donc exploré si la capacité de PbRpt3 à lier l'ATP pourrait être impliquée dans son activité fonctionnelle envers PP1c dans le modèle d'ovocytes de Xénope. Pour cela, l'ARNc muté pour les codons correspondant aux 4 acides aminés mentionnés ci-dessus a été produit et micro injecté en ovocytes de Xénope. Après avoir vérifié que la protéine est bien exprimée dans les ovocytes de Xénope (Figure 56), sa capacité à inhiber l'apparition de GVBD induite par la PG a été analysée.



Les résultats obtenus montrent que la mutation des 4 acides aminés K188, D241, N288, et Q356 abolit partiellement l'effet de PbRpt3 sur la maturation induite par la PG. Ainsi, nous observons que la micro-injection de l'ARNc de PbRpt3 muté pour ces 4 acides aminés entraîne une moyenne de GVBD de 39.2 %, ce qui est significativement plus élevé comparé au pourcentage observé dans le cas de PbRpt3 non-mutée (1.7%). Cette moyenne de GVBD reste cependant plus faible en comparaison avec la valeur observée en présence de PG (80.8%). En revanche, il est intéressant de noter que lors des expériences d'immunoprécipitation, la protéine mutée pour les sites de fixation à l'ATP, conserve sa capacité à interagir avec la XePP1c (figure 57, piste 3). L'effet observé avec cette protéine mutée serait donc lié à une altération de sa capacité à fixer l'ATP, et non pas une altération de sa capacité à interagir avec XePP1c.



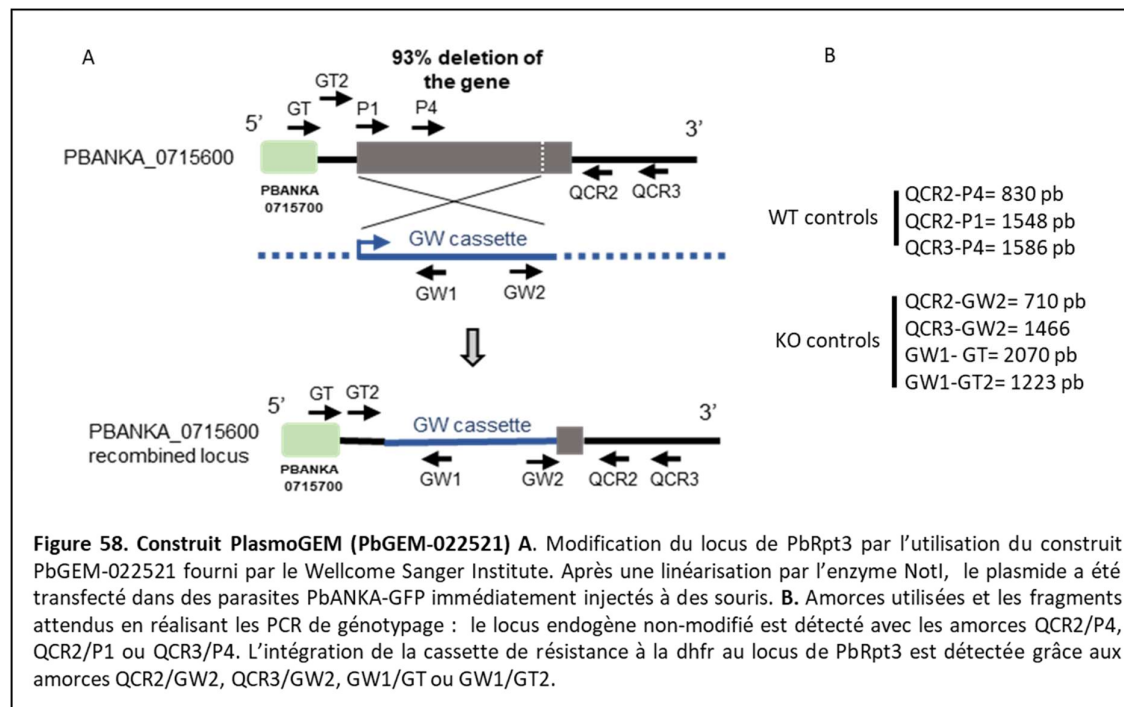
**Figure 57. Rôle des sites prédits de fixation de l'ATP dans l'activité fonctionnelle de PbRpt3 en ovocytes de Xénope.**  
**A.** Pourcentage d'apparition de GVBD des ovocytes suite à la micro-injection d'eau (contrôle, 80 nl, piste 1), de l'ARNc de PbRpt3 (60 ng dans 80 nl, piste 2) et de l'ARNc de PbRpt3 muté pour les 4 sites de fixation ATP (60 ng dans 80 nl, piste 3). Suite aux micro-injections, un traitement à la PG a été réalisé (10  $\mu$ M, 15 heures post micro-injection). Cette expérience a été réalisée sur 40 ovocytes (deux animaux différents) et répétée sur un total de 100 ovocytes avec 3 lots différents d'ARN micro-injecté. Les valeurs indiquées sont les moyennes des pourcentages de GVBD et la p value est  $<0,0001$  pour chaque test. **B.** Analyse de l'interaction entre XePP1c et PbRpt3 par immunoprécipitation. 20 ovocytes ont été micro-injectés avec de l'eau (80 nl, piste 1), l'ARNc de PbRpt3 (60 ng dans 80 nl, piste 2) et l'ARNc de PbRpt3 muté pour les 4 sites de fixation ATP (60 ng dans 80 nl, piste 3), 15 heures avant l'incubation par la PG (10  $\mu$ M). Les extraits ont été immunoprecipités avec l'Ac monoclonal anti-XePP1c (panel du haut) ou anti-HA (panel du bas) ce qui a été suivi d'un immunoblot en utilisant les mêmes Ac. Chaque expérience a été réalisée sur des ovocytes provenant de deux animaux différents.

#### IV. Etude de l'essentialité de PbRpt3 au cours du développement intra-érythrocytaire de *P. berghei*

Nos résultats obtenus *in vitro*, et dans le modèle d'ovocytes de Xénope, ont démontré une interaction directe entre PbRpt3 et PP1c, ainsi qu'un rôle régulateur de l'AAA-ATPase sur l'activité de PP1c, partiellement lié à sa capacité à lier l'ATP.

Afin de mieux comprendre le rôle de Rpt3 chez le parasite, nous avons réalisé des expériences de génétique inverse chez *P. berghei*. En effet, en 2017, une analyse fonctionnelle à haut débit réalisée chez *P. berghei* avait démontré que des mutants déficients pour PbRpt3 présentaient un phénotype de croissance lent ('slow' growing rate phenotype) chez la souris, alors que 4 des 5 autres Rpt avaient été décrites comme étant essentielles durant le cycle érythrocytaire du parasite (Bushell et al., 2017). Dans cette étude, des construits avaient été générés de manière à effectuer des KO sur plus de la moitié des gènes de *P. berghei*. Après transfection de ces construits par groupes de 90 à 120, la croissance des différentes populations de parasites a été suivie par séquençage, chaque construit étant doté d'un code barre ADN, et le niveau d'essentialité des gènes (essentiel, taux de croissance lent, normal ou accéléré) en avait été déduit.

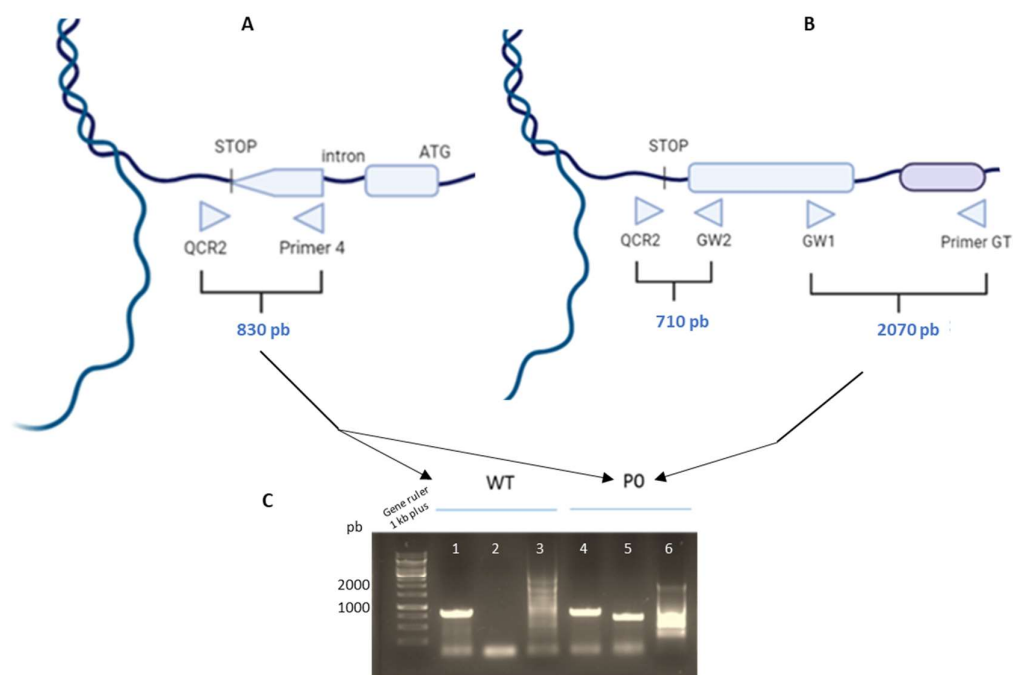
Cette étude de grande échelle avait impliqué plusieurs mutants par analyse de phénotype, nous avons donc souhaité générer des lignées de parasites KO (knock-out) pour PbRpt3 afin de confirmer l'effet observé. Pour cela, nous avons utilisé le plasmide mis à disposition par les auteurs de cette étude (PbGEM-022521). Ce plasmide présente l'avantage de posséder de longs 'bras' homologues aux régions qui flanquent le gène codant pour PbRpt3 (PBANKA\_0715600) favorisant la recombinaison homologue, et donc l'intégration de la cassette de résistance. A noter que cette construction doit permettre une délétion de 93 % du gène PBANKA\_0715600 (figure 58A), la partie non délétée codant potentiellement pour les 28 derniers acides aminés de la protéine.



Les transfections avec le construit PlasmogEM ont été réalisées dans deux souches différentes de *P. berghei* ANKA : pG230 et PbGFP. Après sélection par la pyriméthamine, les parasites résistants ont été

génotypés par PCR à l'aide des amorces présentées en figure 58 B (séquences en tableau XVI) permettant de différencier les parasites wild-type (WT) des parasites possédant le construit PlasmogEM.

Les résultats de ce génotypage montrent la présence de l'intégration de la construction au locus de PbRpt3 (figure 59), aussi bien côté 5' du gène (amorces GW1-GT, 2070 pb, piste 6), que côté 3' (amorces QCR2-GW2, 710 pb, piste 5). Cependant, nous observons également la présence du gène PbRpt3 natif malgré une sélection à la Pyriméthamine (figure 59, amorces QCR2-P4, 830 pb, piste 4).



**Figure 59. Analyse par génotypage des parasites *P. berghei* obtenus après transfection avec le construit PlasmogEM.**

A. Schéma montrant la position des amorces et l'amplification d'un fragment à la taille de 830 pb révélant la présence du gène PbRpt3 WT. B. Schéma montrant la présence du construit et l'amplification des fragments de taille 710 pb et 2070 pb révélant la présence de l'intégration du construit PlasmogEM. C. Genotypage par PCR des parasites wild-type (WT) et transfectés avec le construit PlasmogEM PbGEM-022521 (PO). La présence du gène endogène est détectée par la présence de bandes à 830 pb (pistes 1 et 4) et la présence du construit, par la présence de bandes à 710 et 2070 pb (pistes 5 et 6).

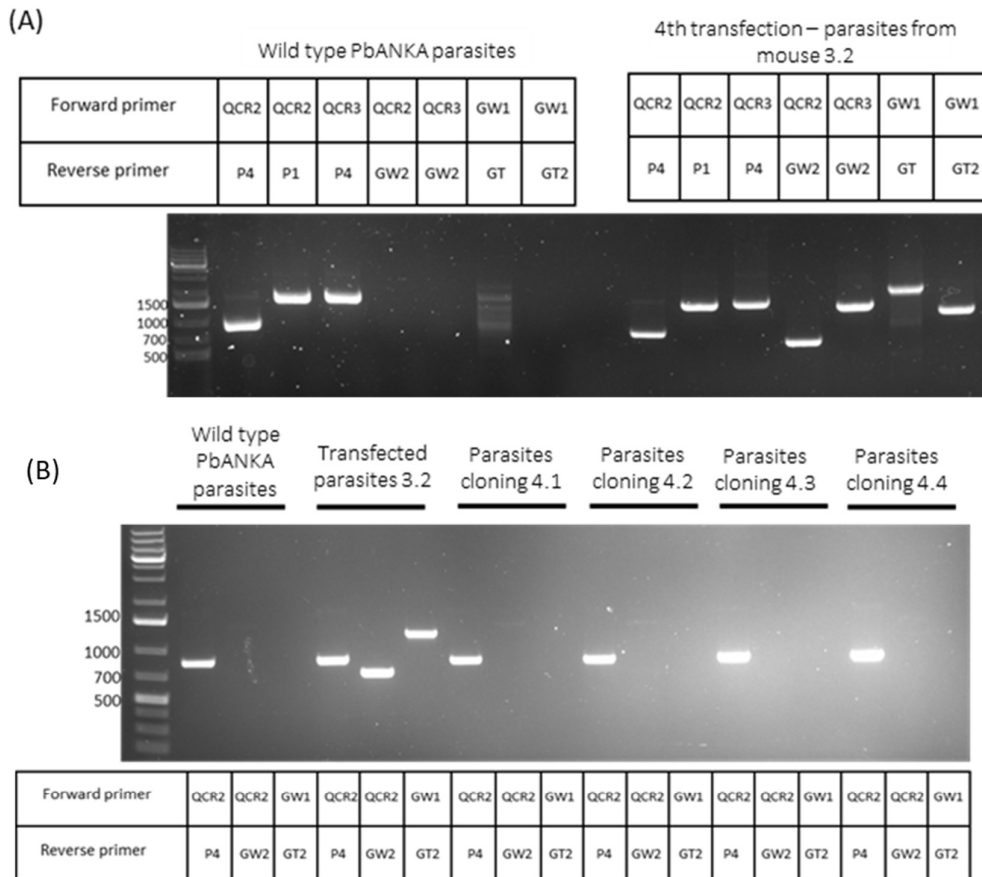
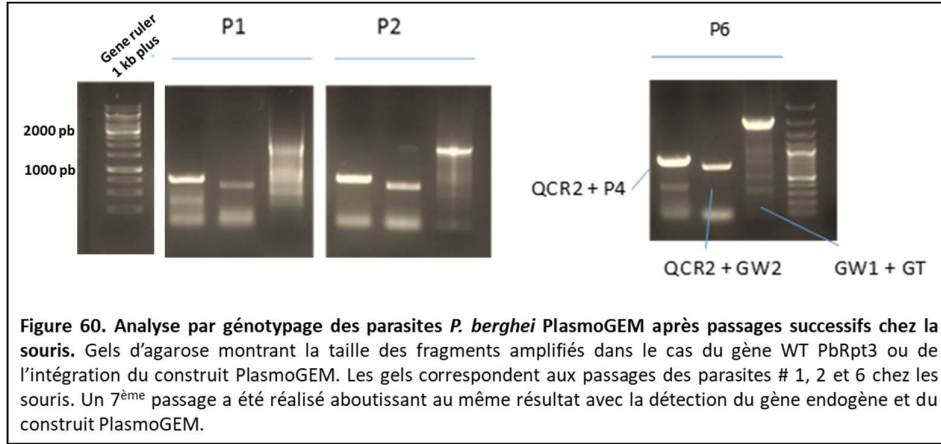
Nous avons réalisé, au total, 4 transfactions différentes qui ont toutes permis d'obtenir des parasites résistants à la pyriméthamine 7 à 9 jours après la transfection. Pour 2 transfactions, le génotypage a montré une absence d'intégration de la cassette de résistance au locus d'intérêt, ou une intégration uniquement en 5'. Pour 2 autres transfactions, l'intégration a été détectée en 5' et en 3', mais parallèlement nous retrouvions également la présence du gène endogène PbRpt3 (comme illustré en figure 59).

Afin d'éliminer les parasites portant toujours le gène WT-PbRpt3, des passages successifs de ces parasites chez la souris ont été réalisés sous pyriméthamine. Cependant, malgré 7 passages chez des souris différentes, cette approche n'a pas permis d'enrichir la population en parasites transgéniques (figure 60).

Cela nous a donc conduits à tenter de cloner les parasites ayant intégré la cassette de résistance.

Les clonages ont été réalisés par dilution limite chez la souris. Ainsi, 5 clonages ont été réalisés, soit à partir de parasites résistants à P0 (juste après transfection et sélection), soit après plusieurs passages sous pyriméthamine et en utilisant différentes quantités de parasites, injectés par voie intraveineuse chez la souris. En fonction de la quantité de parasites injectés par souris, nous n'avons obtenu aucun parasite

chez les souris receveuses (3 expériences avec un total de 26 souris receveuses), ou alors nous avons observé un génotype mixte comprenant le gène WT, et le génotype intégré (pour 1 expérience, 2/10 souris ont présenté des parasites). Dans la cinquième expérience (20 parasites/souris, 10 souris receveuses), 2/10 souris ont montré des parasites sanguins. Mais après passage puis génotypage, tous les parasites obtenus présentaient uniquement un génotype WT (Figure 61).

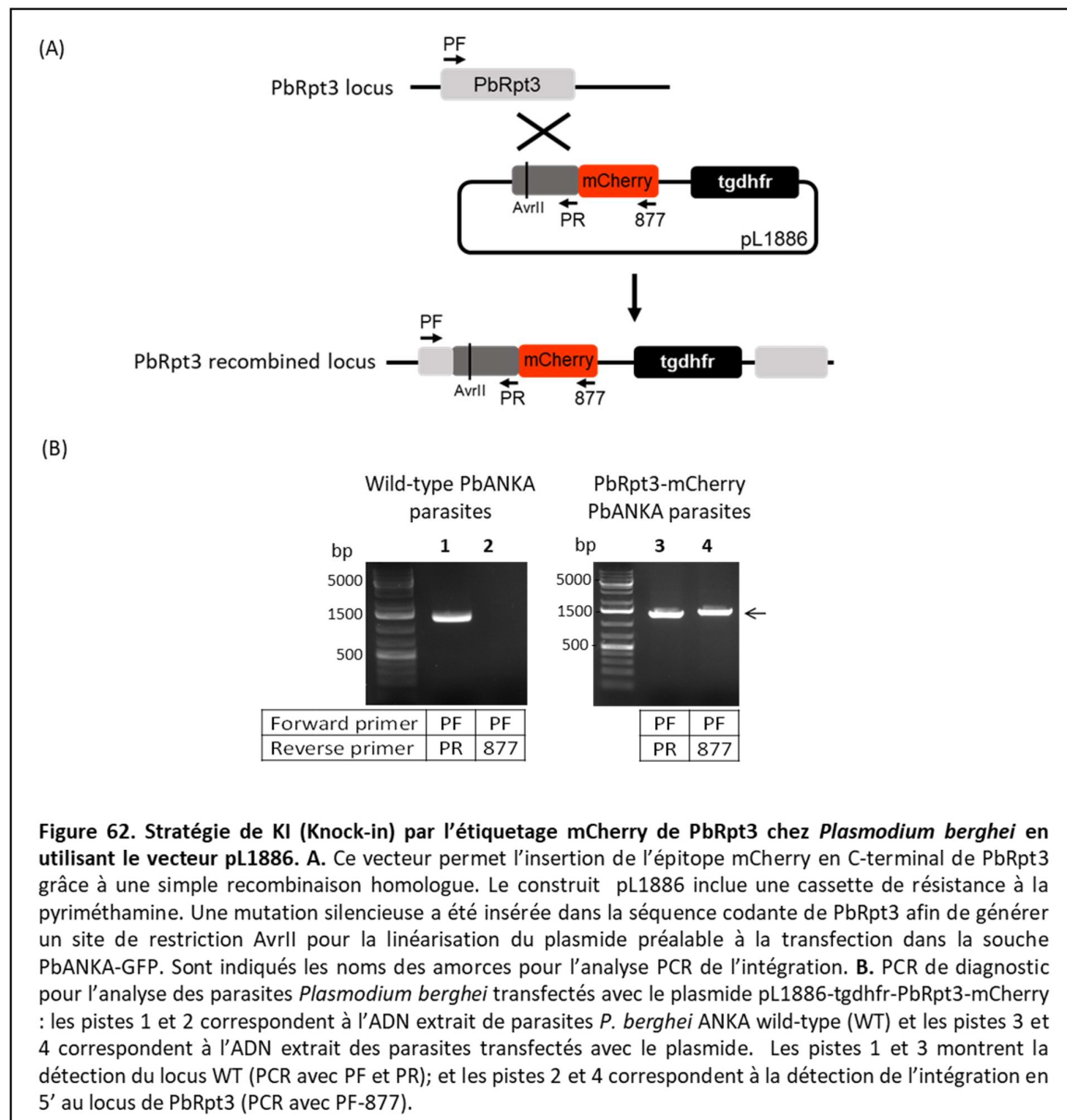


**Figure 61. Analyse par génotypage des parasites *P. berghei* PlasmoGEM après clonage par dilution limite.** A. PCR réalisées sur de l'ADN extrait de parasites WT, ou de parasites obtenus à partir de la 4<sup>ème</sup> transfection (souris 3.2). B. PCR réalisées sur l'ADN de parasites WT, de parasites issus de la 4<sup>ème</sup> transfection (souris 3.2) ou suite au clonage réalisé par dilution limite chez les souris 4.1 à 4.4.

En résumé, toutes les tentatives de sélection ou de clonage de parasites ayant intégré la cassette de résistance à la dhfr au locus PbRpt3 ont échoué ou n'ont permis de cloner que des parasites wild-type. Ces résultats sont donc en faveur de l'essentialité de PbRpt3 pendant le cycle érythrocytaire de *P. berghei*.

## V. Etude de la localisation de PbRpt3 chez *P. berghei*

Afin de déterminer la localisation de la protéine PbRpt3 chez le parasite lors de son cycle intra-érythrocytaire nous avons généré des parasites exprimant la protéine PbRpt3 étiquetée mCherry grâce à une stratégie de simple recombinaison homologue (Figure 62 A). Après transfection et sélection des parasites, l'intégration de l'étiquette mCherry a été vérifiée par PCR (Figure 62 B, amorces en tableau XVI).

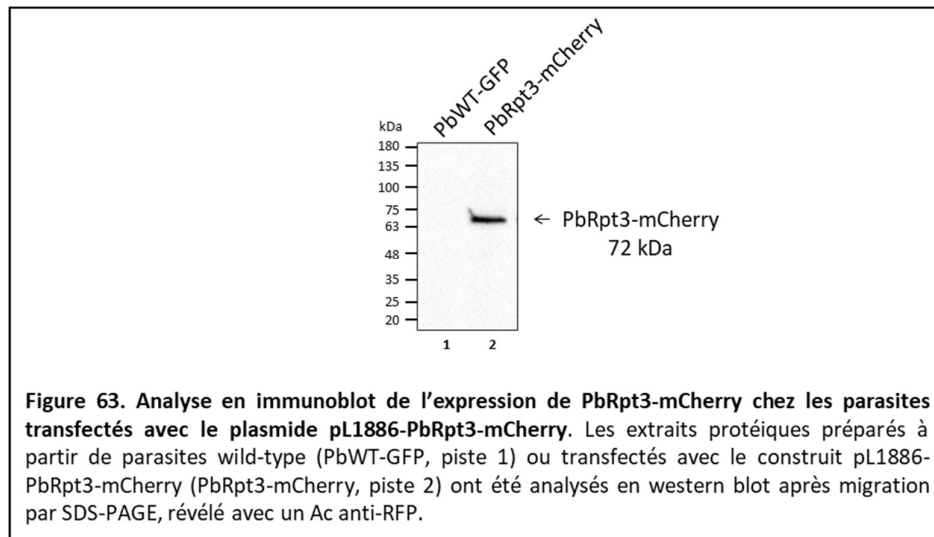


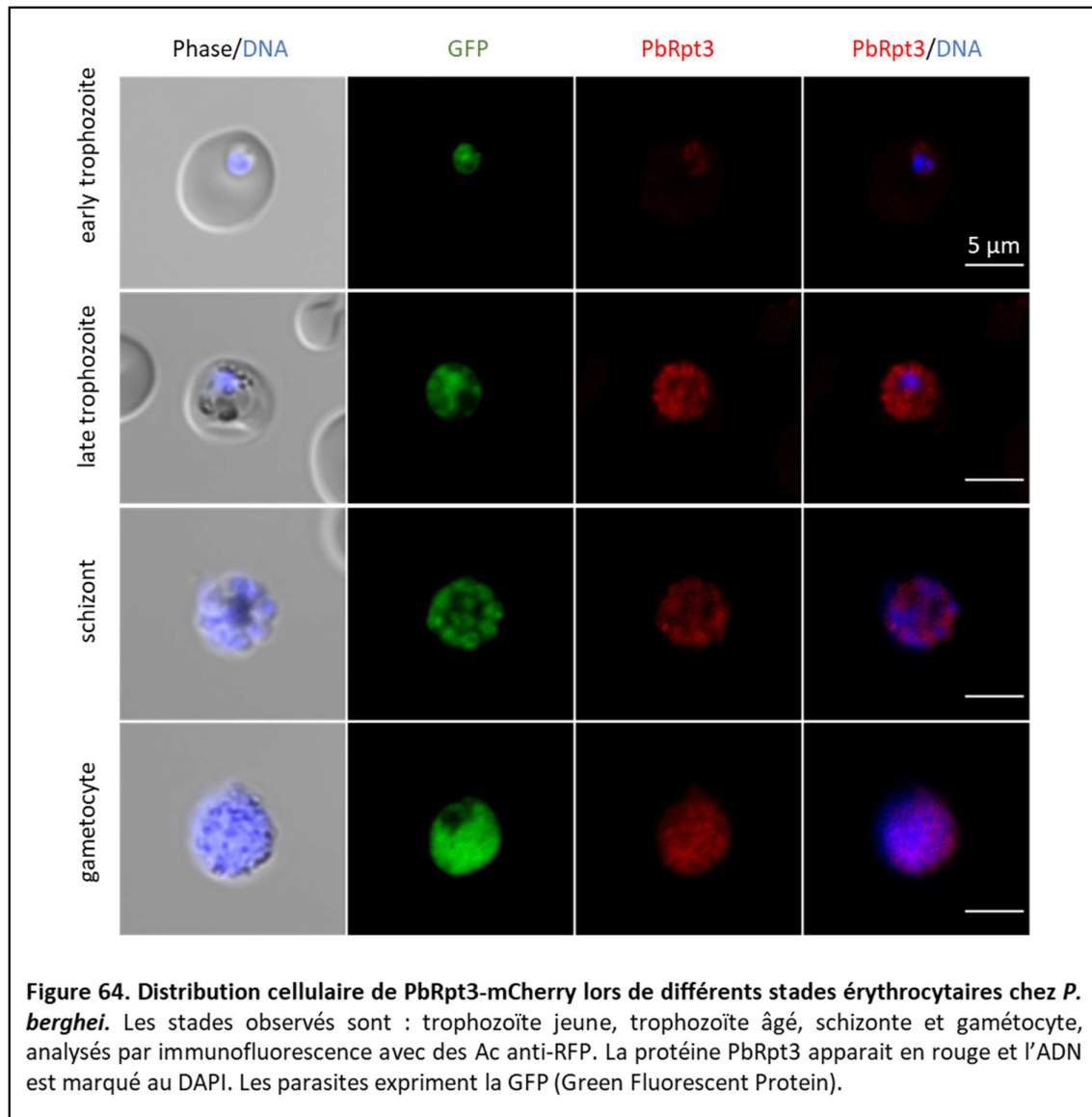
Les parasites exprimant PbRpt3-mCherry ont ensuite été enrichis par tri cellulaire (Annexe 1, figure Supplémentaire 2).

L'analyse en immunoblot d'extraits protéiques préparés à partir de ces parasites enrichis montre l'expression de la protéine étiquetée à la taille attendue (figure 63).

Grâce à ces parasites, nous avons ensuite analysé la localisation de PbRpt3 par immunofluorescence sur différents stades érythrocytaires de *P. berghei* (figure 64). Nous observons une faible expression de PbRpt3 au stade trophozoïte jeune. Cette expression est visiblement plus importante chez les trophozoïtes âgés. Au stade schizonte, le signal correspondant à PbRpt3-mCherry apparaît moins intense. *A contrario*, les gamétocytes semblent, quant à eux, exprimer fortement PbRpt3-mCherry.

En ce qui concerne la distribution cellulaire de PbRpt3-mCherry, nous observons qu'elle est principalement cytoplasmique chez les trophozoïtes jeunes et chez les schizontes, alors que chez les trophozoïtes âgés, cette localisation semble être concentrée sous forme de petits agrégats. Chez les gamétocytes, le signal d'immunofluorescence se superpose au signal apporté par la coloration au DAPI, indiquant ainsi que PbRpt3 serait majoritairement concentrée dans le noyau pendant ce stade. Aucun signal n'a été détecté à l'intérieur du globule rouge ce qui indique que la protéine ne serait pas exportée aux stades étudiés.





## VI. Analyse de l'interactome de PbRpt3 chez *P. berghei*

Dans le but d'identifier les différents mécanismes cellulaires impliquant la protéine PbRpt3 chez *Plasmodium*, nous avons analysé l'interactome de cette ATP-ase par IP/MS. Sur la base de notre étude montrant une expression importante de la protéine aux stades trophozoïtes âgés/schizontes, ces expériences ont été réalisées à partir d'extraits solubles préparés à partir d'une population mixte de schizontes (allant du trophozoïte âgé au schizonte segmenté) exprimant PbRpt3-mCherry ou wild-type. Les protéines immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps anti-RFP à partir de 4 réplicats biologiques WT versus PbRpt3-mCherry ont été analysées par spectrométrie de masse par la plateforme protéomique 3P5-Necker, Université Paris Descartes par la Dr. Chiara Guerrero et Inès Metatla.



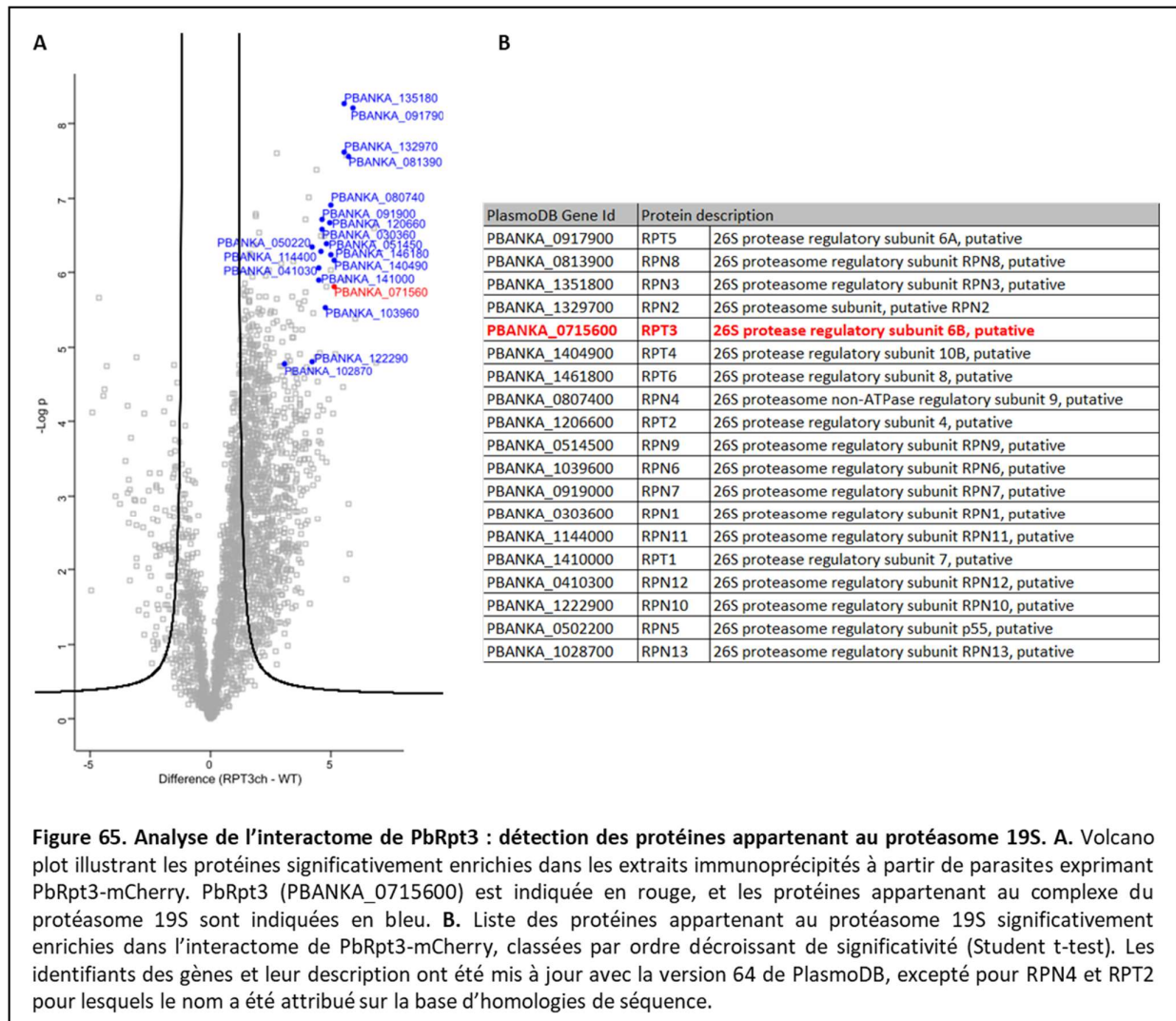
Cette analyse a conduit à l'identification de 2713 protéines parmi lesquelles 623 étaient significativement enrichies dans l'immunoprécipitation PbRpt3-mCherry (T test q-value < 0.01). La détection de la protéine PbRpt3 comme appât a confirmé la qualité de l'IP/MS.

#### **A. Détection du complexe protéasome 19S**

Parmi les 623 protéines significativement enrichies dans l'IP/MS de PbRpt3, nous observons la présence de la totalité des protéines Rpt (Rpt1 à Rpt6) ainsi que toutes les Rpn (Rpn 1 à 13) (Figure 65). En revanche, nous avons noté l'absence des sous-unités alpha ou beta, appartenant au complexe 20S du protéasome.

Afin d'identifier les mécanismes ou voies dans lesquels PbRpt3 pourrait intervenir, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement en termes d'ontologie de gène (GO - Gene Ontology enrichment) en utilisant le logiciel PlasmoDB (Release 63, May 2023). Cette analyse GO a permis de faire ressortir un enrichissement de termes correspondant à certains processus biologiques, composants cellulaires ou fonctions moléculaires (tableau X).

Au total, 39 protéines différentes sont impliquées dans les voies enrichies de cette analyse (Tableau XI). Parmi elles, nous retrouvons PbRpt3 ainsi que 19 protéines appartenant à la voie Ubiquitine-Protéasome, dont les 5 Rpt ainsi que les 13 Rpn (Rpn 1 à 13). Notons que les deux protéines Rad23 and Dsk2 intervenant dans la voie UPS et déjà identifiées dans une précédente analyse comme étant rattachées au protéasome (Wang et al., 2015) n'ont pas été identifiées dans notre analyse.



**Figure 65. Analyse de l'interactome de PbRpt3 : détection des protéines appartenant au protéasome 19S.** A. Volcano plot illustrant les protéines significativement enrichies dans les extraits immunoprécipités à partir de parasites exprimant PbRpt3-mCherry. PbRpt3 (PBANKA\_0715600) est indiquée en rouge, et les protéines appartenant au complexe du protéasome 19S sont indiquées en bleu. B. Liste des protéines appartenant au protéasome 19S significativement enrichies dans l'interactome de PbRpt3-mCherry, classées par ordre décroissant de significativité (Student t-test). Les identifiants des gènes et leur description ont été mis à jour avec la version 64 de PlasmoDB, excepté pour RPN4 et RPT2 pour lesquels le nom a été attribué sur la base d'homologies de séquence.

GO ID	GO Term	Genes in the background with this term	Genes in PbRpt3 interactome with this term	Percent of background genes in PbRpt3 interactome	Fold enrichment	Odds ratio	P-value	Benjamini False Discovery Rate	Bonferroni adjusted p-value
<b>Biological Processes</b>									
GO:0070682	proteasome regulatory particle assembly	7	7	100.0	7.89	infinity	5.05e-07	2.13e-04	2.13e-04
GO:0043248	proteasome assembly	10	8	80.0	6.31	28.03	2.24e-06	4.75e-04	9.50e-04
<b>Cellular components</b>									
GO:0005838	proteasome regulatory particle	13	13	100.0	7.89	infinity	1.87e-12	4.73e-10	4.73e-10
GO:0022624	proteasome accessory complex	14	13	92.9	7.33	92.12	2.32e-11	2.93e-09	5.86e-09
GO:0000502	proteasome complex	39	19	48.7	3.84	6.78	3.81e-08	3.20e-06	9.61e-06
GO:1905369	endopeptidase complex	43	19	44.2	3.49	5.64	2.71e-07	1.40e-05	6.82e-05
GO:1905368	peptidase complex	47	20	42.6	3.36	5.29	2.78e-07	1.40e-05	7.01e-05
GO:0008540	proteasome regulatory particle, base subcomplex	7	7	100.0	7.89	infinity	5.05e-07	2.12e-05	1.27e-04
GO:0140535	intracellular protein-containing complex	109	29	26.6	2.1	2.6	5.18e-05	1.86e-03	1.30e-02
<b>Molecular functions</b>									
GO:0005543	phospholipid binding	11	7	63.6	5.02	12.23	1.05e-04	3.17e-02	3.17e-02

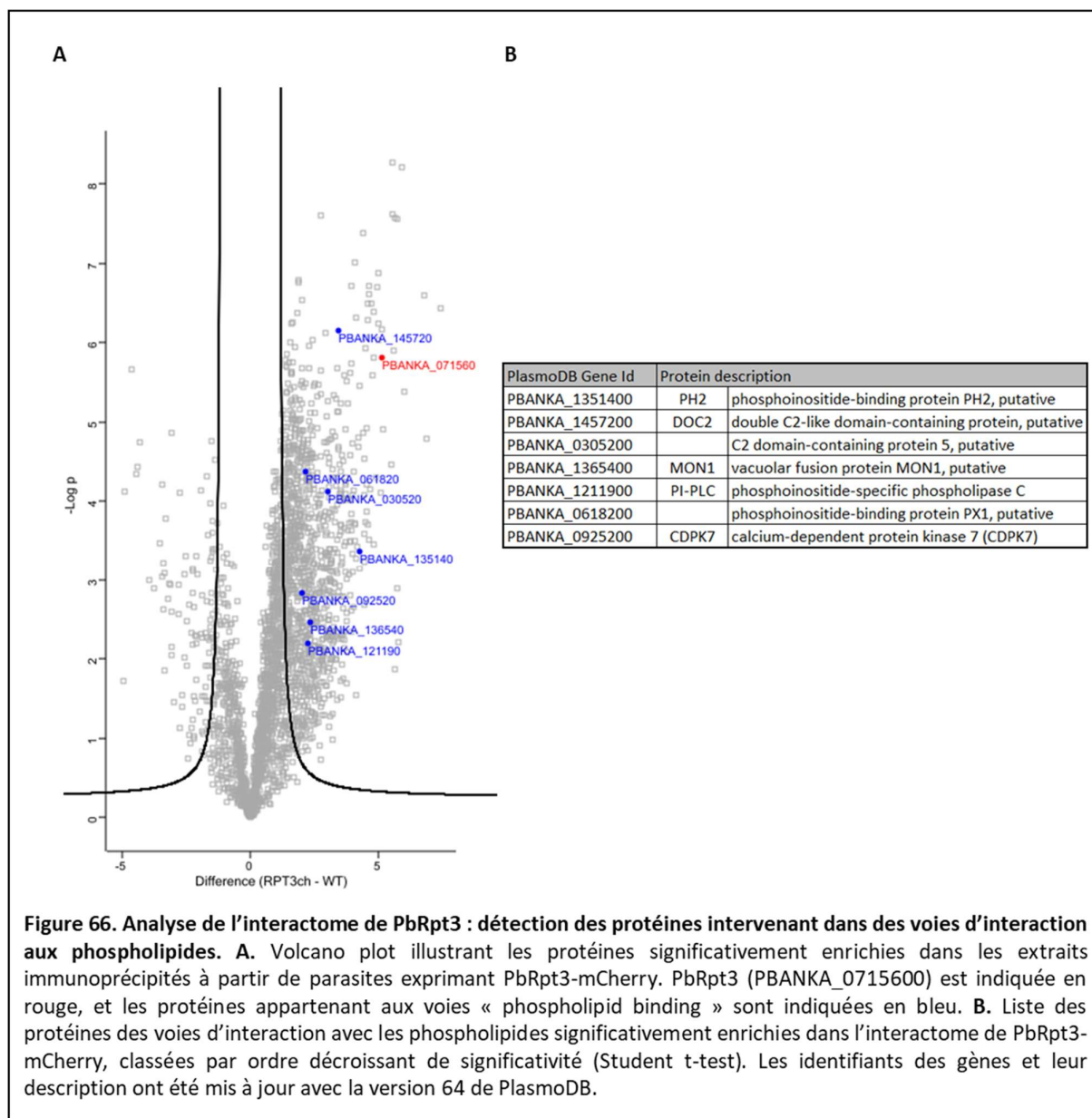
**Tableau X. Analyse des processus biologiques, composants cellulaires et fonctions moléculaires enrichis dans l'interactome de PbRpt3.** 10 termes de GO sont significativement enrichis et intègrent 39 protéines différentes de *P. berghei*.

ID	Description	Short name	Biological Processes	Cellular components	Molecular function							
PBANKA_1127500	glutaryl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B, putative	GATB										
PBANKA_1037000	trafficking protein particle complex subunit 1, putative	BET5										
PBANKA_0616500	translation machinery-associated protein, putative		X									
PBANKA_0917900	26S protease subunit regulatory subunit 6a, putative RPT5	RPT5	X	X	X							
PBANKA_0813900	26S proteasome regulatory subunit, putative Rpn8	RPN8		X								
PBANKA_1351800	26S proteasome regulatory subunit RPN3, putative	RPN3		X								
PBANKA_1329700	26S proteasome subunit, putative Rpn2	RPN2		X								
<b>PBANKA_0715600</b>	<b>26S protease regulatory subunit 6B, putative RPT3</b>	<b>RPT3</b>	X	X	X							
PBANKA_1404900	26S protease regulatory subunit 10B, putative RPT4	RPT4	X	X	X							
PBANKA_1461800	26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT6, putative	RPT6	X	X	X							
PBANKA_0807400	putative RPN4	RPN4	X	X	X							
PBANKA_1206600	26S protease regulatory subunit 4, putative RPT2	RPT2	X	X	X							
PBANKA_0514500	26S proteasome regulatory subunit RPN9, putative	RPN9		X								
PBANKA_1039600	26S proteasome regulatory subunit RPN6, putative	RPN6		X								
PBANKA_0919000	26S proteasome regulatory subunit RPN7, putative	RPN7		X								
PBANKA_0303600	26S proteasome regulatory subunit RPN1, putative	RPN1		X								
PBANKA_1144000	26S proteasome regulatory subunit RPN11, putative	RPN11		X								
PBANKA_1410000	26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT1, putative	RPT1		X								
PBANKA_0410300	26S proteasome regulatory subunit RPN12, putative	RPN12		X								
PBANKA_1351400	phosphoinositide-binding protein PH2, putative	PH2			X							
PBANKA_1222900	26S proteasome regulatory subunit RPN10, putative	RPN10		X								
PBANKA_0502200	26S proteasome regulatory subunit p55, putative RPN5	RPN5		X								
PBANKA_1457200	double C2-like domain-containing protein, putative	DOC2			X							
PBANKA_1028700	26S proteasome regulatory subunit RPN13, putative	RPN13		X								
PBANKA_1145300	conserved Plasmodium protein, unknown function		X									
PBANKA_0212200	anaphase-promoting complex subunit 1, putative											
PBANKA_0305200	C2 domain-containing protein 5, putative											
PBANKA_1235400	CDC73 domain-containing protein, putative											
PBANKA_0929500	histone acetyltransferase, putative (MYST)	MYST										
PBANKA_1415400	conserved Plasmodium protein, unknown function											
PBANKA_1201700	ARD1, putative	ARD1										
PBANKA_0829800	transcription initiation factor TF IID subunit 7, putative	TAF7										
PBANKA_1365400	vacuolar fusion protein MON1, putative	MON1										
PBANKA_1346200	signal peptidase catalytic subunit SEC11, putative	SEC11		X								
PBANKA_1211900	phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC)	PI-PLC										
PBANKA_0943200	casein kinase II beta chain, putative											
PBANKA_0618200	phosphoinositide-binding protein, putative				X							
PBANKA_0925200	calcium-dependent protein kinase 7 (CDPK7)	CDPK7			X							
PBANKA_1344000	putative											
Total of proteins for every GO term			7	8	13	13	19	19	20	7	29	7

Tableau XI. Liste des protéines partenaires potentielles de PbRpt3 appartenant aux termes de GO enrichis.

## B. Identification de protéines impliquées dans l'interaction avec des phospholipides

En plus des voies reliées au protéasome 26S, l'analyse GO a révélé un enrichissement de protéines appartenant à la voie "complexe de protéines intracellulaires" (Cellular components, GO:0140535) ainsi qu'à la voie de liaison aux phospholipides (Molecular function, GO:0005543) (Figure 66, tableau B).



**Figure 66. Analyse de l'interactome de Pbrpt3 : détection des protéines intervenant dans des voies d'interaction aux phospholipides.** A. Volcano plot illustrant les protéines significativement enrichies dans les extraits immunoprécipités à partir de parasites exprimant Pbrpt3-mCherry. Pbrpt3 (PBANKA\_0715600) est indiquée en rouge, et les protéines appartenant aux voies « phospholipid binding » sont indiquées en bleu. B. Liste des protéines des voies d'interaction avec les phospholipides significativement enrichies dans l'interactome de Pbrpt3-mCherry, classées par ordre décroissant de significativité (Student t-test). Les identifiants des gènes et leur description ont été mis à jour avec la version 64 de PlasmoDB.

La voie de liaison des phospholipides intègre les 7 protéines suivantes :

- ▶ La protéine PH2 (Phosphoinositide-binding protein - PBANKA\_1351400) qui interviendrait dans la fusion entre la membrane des micronèmes et la membrane cytoplasmique chez *Plasmodium*.
- ▶ La PI-PLC (phosphoinositide-specific phospholipase C - PBANKA\_1211900) qui hydrolyse des phospholipides associés à la membrane.



► Les protéines C2 domain-containing protein 5 (PBANKA\_0305200), et DOC2 (aussi appelée double C2-like domain-containing protein - PBANKA\_1457200) : possédant un ou plusieurs domaines C2 de liaison à la membrane.

► MON1 (PBANKA\_1365400), une protéine de fusion à la vacuole.

► CDPK7 (PBANKA\_0925200), une kinase intervenant dans la régulation de la biosynthèse des lipides.

► La protéine phosphoinositide-binding protein (PBANKA\_0618200) intervenant dans des réorganisations cellulaires chez les eucaryotes.

De plus, une recherche manuelle a permis de retrouver 5 phospholipases ne faisant pas partie de la recherche GO, et qui apparaissent parmi les 623 interactantes potentielles de PbRpt3 :

► Phospholipase A2 ou PATPL1 (PBANKA\_0306200 ou patatin-like phospholipase 1, putative),

► Lysophospholipase putative (PBANKA\_0201300),

► Phospholipase putative PLA1 (PBANKA\_1423100),

► Patatin-like phospholipase putative (PBANKA\_0824900),

► Patatin-like phospholipase putative (PBANKA\_1134300).

Quant à la totalité des 39 protéines appartenant aux termes GO mentionnés plus haut, elles ont été recriblées à l'aide du logiciel STRING (v.11.5, July 2023) afin de mettre en évidence d'éventuels réseaux d'interactions entre-elles (figure 67). Cela a notamment permis de faire ressortir la protéine PX1 ou phosphoinositide-binding protein 1 (PBANKA\_0618200), qui apparait être potentiellement liée avec la CDPK7. La présence de cette protéine conforte notre hypothèse de l'intervention potentielle de PbRpt3, seule ou complexée, dans des mécanismes impliquant l'interaction avec les membranes.

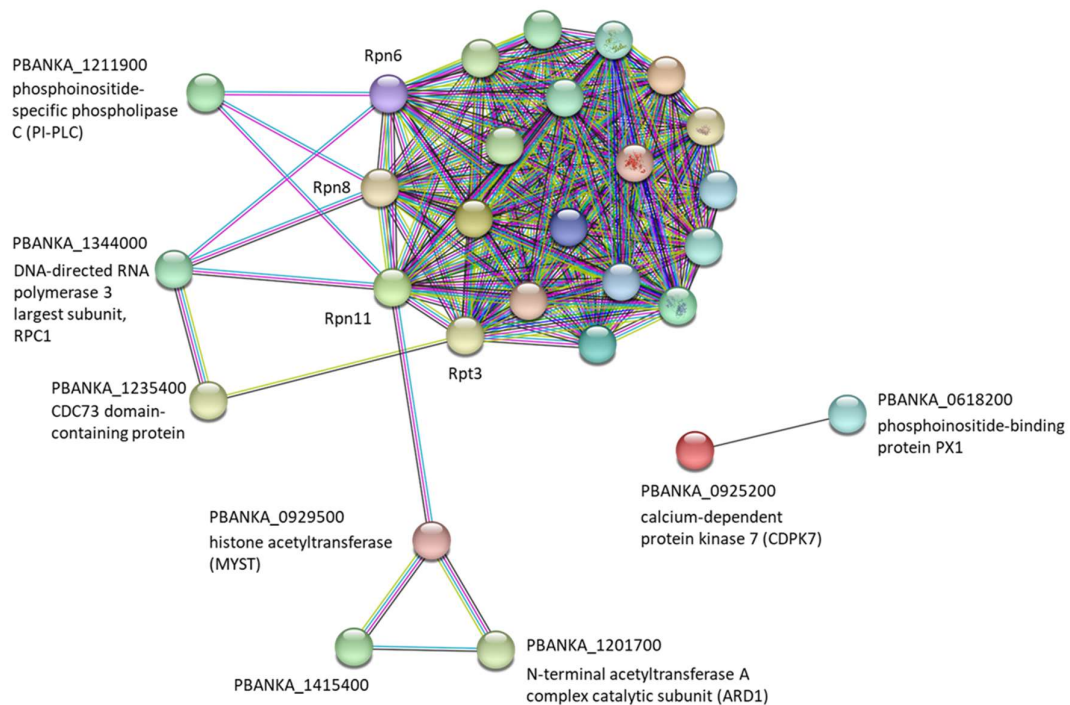


Figure 67. Analyse STRING des 39 protéines appartenant à l'analyse GO de l'interactome de PbRpt3.

### C. Identification de protéines impliquées dans la régulation des gènes

L'analyse STRING, combinée à une recherche manuelle parmi les 623 protéines significativement enrichies dans l'interactome de PbRpt3, a également permis d'identifier des protéines potentiellement impliquées dans la régulation de la transcription (tableau XII). Cela concerne notamment des enzymes modifiant les histones (deux histone acétyltransférases et une histone déacétylase). La détection de l'ensemble de ces protéines dans l'interactome de PbRpt3 indique que cette dernière pourrait être liée à la régulation de l'expression des gènes chez le parasite.

Nom	Référence PlasmoDB	Fonction	Source	Rang
Histone H3 variant, putative	PBANKA_1117100	Histone	interactome	203
CDC73 domain-containing protein, putative	PBANKA_1235400	composant du complexe Paf1/ARN polymérase II	STRING + interactome	243
MYST (histone acetyltransferase MYST, putative)	PBANKA_0929500	histone acétyltransférase	STRING + interactome	337
ARD1 (N-terminal acetyltransferase A complex catalytic subunit ARD1, putative)	PBANKA_1201700	acétyltransférase	STRING + interactome	366
TAF7 (transcription initiation factor TFIID subunit 7, putative)	PBANKA_0829800	facteur de transcription	GO analysis + interactome	395
HAT1 (histone acetyltransferase 1)	PBANKA_0718400	histone acétyltransférase	interactome	459
ELP3 (elongator complex protein 3, putative)	PBANKA_1442500	facteur d'élongation	interactome	460
HDA1 (histone deacetylase, putative)	PBANKA_1335400	Histone déacétylase	interactome	556
RCP1 (DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1, putative)	PBANKA_1344000	RNA polymérase	STRING + interactome	614

**Tableau XII. Protéines putatives de régulation de l'expression des gènes détectées dans l'interactome de PbRpt3.** Dans la colonne de droite sont retrouvés les rangs de chaque protéine dans le tableau d'interactome de 623 partenaires de PbRpt3.

### D. Identification de protéines impliquées dans l'egress

De manière intéressante, une recherche parmi les 623 protéines de l'interactome de PbRpt3 a également permis d'identifier plusieurs protéines dont le rôle a déjà été décrit au cours de l'egress du parasite du globule rouge et sont listées en tableau XIII. Le rang intéressant dans l'interactome, de certaines de ces protéines et leur implication dans des voies faisant intervenir PP1c, seront présentés dans la partie Discussion.

Nom	Référence PlasmoDB	Dénomination / Fonction putative	Source	Rang
PLA-1	PBANKA_1423100	phospholipase	GO analysis	45
GCalpha	PBANKA_0910300	guanylyl cyclase alpha, putative	Interactome	62
SEA-1	PBANKA_0506000	schizont egress antigen-1	Interactome	107
ICM1	PBANKA_1446100	Amino acid transporter	Interactome	114
FLP	PBANKA_1224400	ferlin-like protein	Interactome	471
GEXP12	PBANKA_1226100	gametocyte-exported protein 12	Interactome	602

**Tableau XIII. Protéines détectées dans l'interactome de PbRpt3 et dont un rôle a déjà été décrit chez Plasmodium lors de la sortie (egress) du parasite des globules rouges.** La colonne de droite indique le rang de chaque protéine dans le tableau des 623 partenaires de PbRpt3.

Au cours de ma Thèse, j'ai décrit la sous-unité régulatrice Rpt3 du protéasome AAA-ATPase de *Plasmodium berghei* et démontré qu'elle interagissait *in vitro* avec la PP1c parasitaire. Il a également été montré que PbRpt3 régulait l'activité de la phosphatase à la fois *in vitro* et dans un modèle hétérologue d'ovocytes de Xénope. En utilisant des approches de mutagenèse, nous avons pu observer que les motifs RVxF de PbRpt3 étaient impliqués dans l'interaction et l'activation de la phosphatase puis, le modèle 3D de PbRpt3, combiné à l'approche en ovocyte de Xénope, a conduit à établir un rôle possible de la fonction ATPase de PbRpt3 dans son rôle d'activation de PP1c. Dans le parasite, des études de génétique inverse ont suggéré un rôle essentiel de PbRpt3 puisque aucune lignée knock-out viable n'a pu être obtenue. De plus, une étude de Knock-in réalisée sur différents stades intra-érythrocytaires a permis de localiser et analyser l'expression de PbRpt3 lors de ces stades. Enfin, des tests d'immunoprécipitation suivis d'analyses de spectrométrie de masse ont permis de confirmer que PbRpt3 appartenait au complexe 19S du protéasome, et a également révélé une interaction potentielle avec des protéines intervenant dans la dynamique de la membrane phospholipidique. Différents aspects de mon travail de Thèse seront approfondis dans la prochaine partie de Discussion et Perspectives.

## **DISCUSSION & PERSPECTIVES**



L'objectif de ma thèse était initialement de déterminer si nous retrouvions une interaction directe *in vitro* et *in vivo*, entre les deux protéines PP1c et PbRpt3, co-immunoprecipitées au cours d'une étude antérieure réalisée par notre laboratoire, et portant sur l'interactome de PP1 chez *Plasmodium berghei* (Hollin et al., 2019). Dans le cas d'une interaction directe avérée, il s'agissait ensuite d'en démontrer la fonctionnalité et d'étudier les régions et motifs de PbRpt3 impliqués ainsi que l'éventuelle contribution de son activité ATPase. En parallèle, afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine, et de son éventuelle interaction avec PP1c, dans le développement du parasite, nous avons souhaité étudier sa localisation, son interactome, et son essentialité. Cette discussion sera structurée en six parties, chacune apportant des réflexions et des perspectives de développement sur chacun des points.

## I. Analyse *in silico* de PbRpt3 et production des protéines recombinantes

### A. L'analyse *in silico*

La fonction des protéines découle de la présence d'un ou plusieurs domaines ainsi que de leur régulation. L'analyse *in silico* de PbRpt3 a permis, en premier lieu, d'identifier les différents domaines de cette protéine. L'étude *in silico* a été effectuée avec le logiciel Interproscan et une première modélisation 3D a été réalisée grâce aux logiciels Phyre2, RazMol et EzMol. Ces logiciels sont accessibles et simples d'utilisation. En analysant la structure protéique 3D proposée par Phyre2 et visualisée par RazMol/EzMol, nous avons pu positionner les différents domaines de PbRpt3 et délimiter une région protéique d'intérêt à produire sous forme recombinante. Cependant, le modèle élaboré par Phyre2, basé sur la Rpt3 de *S. cerevisiae* (PDB4B4T) n'apportait pas entière satisfaction car il ne présentait pas un taux de confiance suffisant, notamment pour la modélisation des 18 premiers acides aminés en N-terminal, ne permettant donc pas d'assurer la réalité biologique de ce modèle.

Nous avons donc entrepris de réaliser une analyse Bio-informatique plus fine, avec l'accompagnement du Dr. Amaury Farce, afin de modéliser l'ATPase parasitaire en 3D à partir de la PSMC4 humaine. Cette modélisation a été réalisée avec deux matrices, la première : 5L4G d'une résolution de 3.9 Å datant de 2016, qui nous a permis de positionner l'ion  $Mg^{2+}$ . L'identification de cet ion nous a permis d'intégrer l'ajout du  $Mg^{2+}$  lors de la production et purification des protéines recombinantes. Puis, nous avons fait le choix de sélectionner une autre cristallographie (6MSB) plus récente (2019) et de meilleure résolution : 3 Å. Une fois le modèle 3D construit, nous avons superposé ce modèle à celui proposé par Alphafold en remarquant leur excellente superposition. Il était cohérent d'obtenir une telle superposition puisque les deux modèles sont élaborés à partir de la PSMC4 humaine. Cependant, élaborer un modèle par homologie comparative présente l'avantage de permettre d'opérer des ajustements structurels, notamment grâce à l'utilisation du logiciel Sybyl qui optimise la conformation spatiale de la structure 3D afin de minimiser son énergie potentielle. Ainsi, nous avons pu affiner le modèle par le positionnement d'un ion magnésium et d'une molécule d'ATP, ce qui permettait d'atteindre une stabilisation optimale du système. Il est à noter que la présence d'un ion et de l'ATP n'étaient indiquées ni dans le modèle proposé par Phyre2, ni dans celui issu de la modélisation Alphafold.

L'étude de notre modèle 3D a ensuite permis d'identifier des aspects intéressants sur lesquels faire évoluer notre travail. Ainsi, nous avons pu étudier la liaison de l'ATP par PbRpt3, mais également l'interaction entre PbRpt3 et ses partenaires au sein du protéasome, et potentiellement l'interaction avec PP1c.

## 1. Positionnement de l'ATP dans la structure prédite de PbRpt3

Une première retombée de notre modèle, a donc été, en tenant compte de la nature enzymatique de PbRpt3, de pouvoir prédire les acides aminés de PbRpt3 impliqués dans la fixation et la stabilisation de l'ATP. Cette analyse nous a permis de préjuger du rôle important des acides aminés K188, D241, N288 et Q356, mais également de la séquence 143-LGG-145 contribuant, d'après notre modèle, à la stabilisation de la molécule d'ATP au sein de la structure protéique. Il est à noter que l'un de ces acides aminés (K188) est conservée avec la lysine du motif GPPGCGKT de la PSMC4 humaine, dont il a été démontré qu'il fixait l'ATP (figure 27 – partie Résultats). Ainsi, nous avons pu anticiper que la mutation de ces quatre résidus K188, D241, N288 et Q356 devait permettre de déstabiliser la fixation de l'ATP et donc, potentiellement, de neutraliser l'activité ATPase de PbRpt3. En revanche, la mutation de la séquence LGG ne semblait pas modifier le squelette de la poche de maintien de l'ATP. Ces éléments ont été déterminants pour envisager l'étude de l'impact de l'activité ATPase sur les effets observés en ovocytes de Xénope dont les résultats seront discutés plus avant.

## 2. Intégration du modèle 3D de PbRpt3 au sein du complexe 19S et 26S

Le modèle 3D de PbRpt3 nous a également permis d'opérer une modélisation intégrant la Rpt3 parasitaire au sein du complexe 19S humain. L'objectif était d'une part de vérifier que la structure prédite de PbRpt3 pouvait potentiellement occuper une place au sein d'un anneau hexamérique de protéasome 19S, et d'autre part de tenter de prédire si, au sein d'un tel complexe, les motifs RVxF pouvaient être accessibles pour une possible interaction avec PP1c. Cette manipulation a permis de confirmer que PbRpt3 possédait toutes les caractéristiques structurales pour s'insérer dans un anneau hexamérique à proximité des partenaires du complexe protéasome (Rpt2, Rpt5 et Rpn1). Concernant l'accessibilité des motifs RVxF de PbRpt3, nous avons observé que le motif RKIEF est le plus exposé des deux dans la configuration du 19S. Cependant, une fois PbRpt3 positionnée à l'intérieur du protéasome 26S, l'interaction entre Rpt3 et PP1c est très peu plausible via ce motif car il devient inaccessible pour une protéine telle que PP1c. Cette affirmation ne peut être pertinente que dans la mesure où le positionnement des protéines environnantes serait identique au sein des deux protéasomes 26S humain et parasitaire. De plus, ces éléments sont à pondérer car les protéines du 19S qui jouxtent la PSMC4 humaine : Rpt2, Rpt5 et Rpn1 présentent une taille différente de celle des protéines parasitaires comme évoqué dans le tableau suivant (tableau XIV).

Nom	<i>H. sapiens</i>		<i>P. berghei</i>	
	Reference Uniprot	Taille (nombre d'a.a)	Reference PlasmoDB	Taille (nombre d'a.a)
Rpt2 ou PSMC1	P62191	2 isoformes : <b>440 / 367</b> a.a.	PBANKA_1206600	<b>447</b> a.a.
Rpt5 ou PSMC3	P17980	<b>439</b> a.a.	PBANKA_0917900	<b>451</b> a.a.
Rpn1 ou PSMD2	Q13200	3 isoformes : <b>908 / 749 / 778</b> a.a.	PBANKA_0303600	<b>993</b> a.a.

**Tableau XIV. Comparaison entre la taille en acides aminés des protéines avoisinant PSMC4 au sein du complexe 26S et les protéines homologues chez *P. berghei*.**

Si, malgré ces éléments, les protéines respectaient les mêmes configurations au sein des 2 complexes, il semble fortement improbable que PbRpt3 et PP1c interagissent au sein du protéasome. Notons tout de même qu'une nouvelle analyse récente du Dr. Amaury Farce (présentée en Annexe 1, figure supplémentaire 4) est en faveur d'une relative accessibilité du motif KVTF de PbRpt3 une fois PbRpt3 intégrée au sein du protéasome 26S humain. Il est donc à ce stade difficile de préjuger d'une interaction entre PP1c et PbRpt3 dans le complexe protéasome, mais notre étude tend à indiquer que l'un et l'autre des deux motifs RVxF de PbRpt3 pourraient être impliqués dans une interaction avec la phosphatase lorsqu'elle est intégrée au complexe 19S ou au complexe 26S.

Par contre, lorsque PbRpt3 n'est pas intégrée au 19S ou au 26S, notre modèle indique que l'interaction avec PP1c est tout à fait envisageable. Ainsi si une interaction s'effectue en dehors du 26S, nous pourrions suggérer un rôle de « séquestration » de PbRpt3 par PP1c l'empêchant ainsi de se lier au complexe 26S. Cette interaction pourrait, dans ce cas, être assimilée à un mécanisme de régulation du complexe 26S. Par ailleurs, nous pourrions supposer que PP1c, avec un ratio d'interaction de 2PP1c :1 PbRpt3 pourrait « protéger » Rpt3 des carbonylations qui sont des altérations liées au milieu oxydant, et dont les effets ont été observés sur la Rpt3 humaine dans des cellules cancéreuses SH-SY5Y de neuroblastome humain. Dans ces cellules l'exposition au ROS active la carbonylation. Or, cette oxydation inhibe l'activité ATPase de la Rpt3 humaine (Ishii et al., 2005).

Les recherches bibliographiques montrent également que Rpt3 peut jouer un rôle en dehors du protéasome, par exemple, dans des cellules tumorales HCT116 de cancer colorectal, une interaction entre la protéine de choc thermique Hsp TRAP-1 et Rpt3 a été décrite à la jonction entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Amoroso et al., 2012). Cette colocalisation a été démontrée par analyse biochimique mais également par microscopie confocale et électronique. Ces deux protéines interagissent directement, ce qui a été démontré par FRET. TRAP1 jouerait un rôle dans le contrôle qualité des protéines destinées à la mitochondrie, ainsi que dans la régulation de l'ubiquitination des protéines intracellulaires par l'interaction avec Rpt3. Dans ce contexte, empêcher ces deux protéines d'interagir accroît l'ubiquitination protéique et la mort cellulaire. Les auteurs ont donc avancé l'hypothèse de l'implication de ces deux protéines dans le contrôle de la qualité du repliement des protéines, et dans le contrôle de l'adressage des protéines destinées à la mitochondrie.

### 3. Etude de la séquence FYNI en C-terminal de PbRpt3

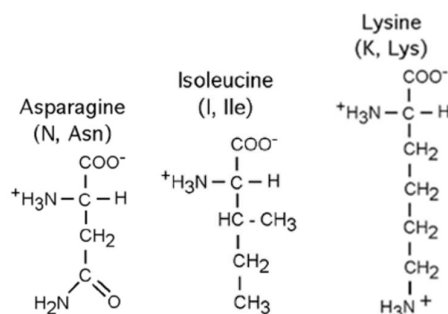
Une autre perspective dans l'analyse fonctionnelle de PbRpt3, apportée par l'étude *in silico* puis prolongée par l'étude de la structure 3D avec le Dr. Farce, est l'étude de la courte séquence en C-terminal des protéines Rpt3. En effet, les Rpt3 de *Plasmodium*, possèdent toutes, en leur extrémité Cter la séquence FYNI. Chez *Toxoplasma gondii*, un Apicomplexe parasite intracellulaire obligatoire, la séquence de l'homologue de PbRpt3 est similaire à celle chez *Plasmodium* : il s'agit de FYSF. En effet, la Sérine de FYSF possède un azote comme l'Asparagine N de FYNI, et la Phénylalanine terminale de FYSF est hydrophobe comme l'Isoleucine I de FYNI.

En revanche, cette séquence est différente chez la plupart des eucaryotes, de la levure à l'homme ainsi que chez la souris puisqu'il s'agit de FYK.

Or, il a déjà été démontré que cette courte séquence FYK était nécessaire pour la fixation du complexe 19S au complexe 20S (Kumar et al., 2010). De même, l'importance de ces trois acides aminés, dans la configuration « acide aminé hydrophobes-tyrosine-X » a déjà été décrite pour Rpt2 et Rpt5. Ces deux ATPases, tout comme Rpt3, appartiennent au complexe 19S et grâce à leur motif HbYX situé en extrémité C-ter, ces protéines se lient à des lysines au sein de poches formées par des sous-unités de

l'anneau externe du 20S. Ceci permet l'ouverture du pore de l'ensemble catalytique 20S (Rabl et al., 2008; Smith et al., 2007; Yu et al., 2010).

Une analyse des caractéristiques structurales des acides aminés composant la séquence FYNI de *Plasmodium* nous a permis de faire ressortir certaines différences avec la séquence en C-ter de la Rpt3 humaine FYK ainsi que leur impact potentiel dans la fixation au complexe 20S. L'analyse montre que la chaîne latérale de l'asparagine, est plus courte de deux atomes de carbone que la lysine, mais se termine par un azote, comme pour la lysine. Certes, l'affinité est moindre pour l'asparagine (de FYNI) dont l'azote n'est pas chargé contrairement à celui de la lysine, mais l'importance de cette perte d'affinité dépendra de l'interactant potentiel, et du niveau d'attraction à longue portée nécessaire pour qu'une interaction plus rapprochée se forme.



**Figure 68. Représentation des acides aminés qui diffèrent entre l'extrémité C-terminale de PbRpt3 (FYNI) ou de PSMC4 (FYK).**

L'isoleucine I du C-ter de PbRpt3 pourrait avoir pour rôle principal de limiter les conformations de l'asparagine N en empêchant son repliement, afin que l'azote reste disponible. L'isoleucine permettrait aussi de conserver une liaison hydrogène, certes de portée et énergie d'interaction plus faibles que l'interaction ionique de la lysine K. En résumé, la présence de FYNI par rapport à FYK nous fait supposer une interaction moins forte à ligands égaux, mais tout à fait possible et pouvant être compensée ou augmentée selon la nature de la protéine en présence de Rpt3.

Notre analyse de l'interactome de PbRpt3 au stade schizonte (présenté plus avant), ne nous a pas permis d'identifier de sous-unités du 20S. Cette observation, couplée à la présence de la séquence Cter FYNI présentant un potentiel d'interaction au 20S plus faible que FYK, permet de s'interroger si, au cours de son développement intra-cellulaire, le parasite, présent dans un environnement fortement oxydant avec des altérations protéiques importantes liées au milieu, n'aurait pas un intérêt à réduire l'affinité entre le 19S et le complexe du protéasome 20S.

Ainsi, qu'obtiendrions-nous avec des parasites mutants PbRpt3-FYK : l'affinité entre le 19S et le 20S parasitaires en serait-elle augmentée ? quelles en seraient les conséquences sur la viabilité du parasite et sur la localisation de la protéine PbRpt3 ainsi que des complexes 19S et 26S ? Après infection de souris avec ces parasites, trouverions-nous des protéasomes 19S parasitaires complexés aux 20S de souris ? Cette divergence aurait-elle pour seul objectif d'être sélectif envers son propre complexe 20S ?

Cette analyse pourrait être réalisée en étudiant l'impact du remplacement de FYNI par FYK chez le parasite. Cela pourrait être fait par la transfection d'un plasmide possédant d'une part la mutation de FYNI en FYK, et d'autre part cette séquence serait suivie du tag mCherry. S'ensuivrait le tri cellulaire, et des tentatives de clonage, puis si les parasites survivent, la sélection d'un clone en vue d'effectuer une IP/MS et analyser l'interactome aux différents stades érythrocytaires, comme réalisé dans notre étude.

#### 4. Analyse phylogénétique

Une analyse phylogénétique représente une autre composante de l'étude *in silico*. Cela consiste en la construction d'un arbre phylogénétique pouvant permettre de mieux comprendre la relation évolutive qui existe entre PbRpt3 et différents orthologues parmi une palette d'organismes plus étendue. Nous avons donc entrepris, avec le support du Dr. Alejandro Cabezas Cruz (ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale, 94700 Maisons-Alfort) une analyse et construit un premier arbre pour les homologues de Rp3 (Donnée non présentée dans la partie Résultats et intégrée en Annexe 1 – figure supplémentaire 3). Cet arbre a été élaboré à partir des séquences protéiques Rpt3 de 50 organismes. La méthode du bootstrap choisie est une méthode statistique qui vise à répondre à la question d'une possible relation évolutive entre les différentes protéines. Un ensemble de données est ainsi reconstruit par des tirages aléatoires et comparé avec les phylogénies déjà obtenues. Si la valeur de Bootstrap >60%, cela indique que l'hypothèse de relation évolutive a une grande probabilité d'être vraie, si elle est inférieure à cette valeur, une forte probabilité de ne pas être vraie.

Comme attendu, nous pouvons constater la proximité phylogénétique entre les Rpt3 de *Plasmodium* et celles de tous les autres Apicomplexes. De même, il existe une proximité évolutive entre PbRpt3 et les protéines homologues chez les algues. Ceci concorde avec des publications ayant démontré que les apicomplexes et les algues partageaient un ancêtre commun (Gajadhar et al., 1991; Janouskovec et al., 2010).

Pour PbRpt3, l'arbre phylogénétique fait ressortir la proximité avec la protéine de l'algue Chromeride *Vitrella brassicaformis* découverte en 2008. Cet organisme possède un ancêtre photosynthétique commun avec les Apicomplexes (Oborník et al., 2012) et son organite photosynthétique se trouve être fonctionnel contrairement aux Apicomplexes ayant perdu cette capacité. Cette proximité nous oriente à étudier avec plus d'intérêt le développement de l'algue *Vitrella brassicaformis*. En effet, au niveau de la gamétogénèse, *Plasmodium* et *Toxoplasma* ne sont pas homologues. Chez *Plasmodium*, le développement des gamétocytes ressemble plus au développement ancestral (zoosporangia) observée chez *V. brassicaformis* (Füssy et al., 2017).

Pour aller plus loin dans l'étude phylogénétique, il serait envisageable de construire un 'MirrorTree', en prenant comme matrice l'arbre construit à partir des protéines homologues de PbRpt3 et, en miroir, l'arbre construit à partir des protéines homologues de PbPP1. L'objectif est ainsi de déterminer s'il y a présence de congruence phylogénétique entre ces deux protéines. Si tel est le cas, cela suggérera une co-évolution des protéines pouvant résulter de contraintes imposées par l'interaction entre PbRpt3 et PbPP1 (Craig and Liao, 2007). Cette pression sélective, agissant simultanément sur les domaines d'interaction PP1-Rpt3, conforterait, si la congruence existe, l'hypothèse d'interaction directe entre PbRpt3 et PP1c chez le parasite.

De manière intéressante, une étude phylogénétique de plus grande ampleur, conduite sur 17 clades et englobant la plupart des eucaryotes ainsi que les archaeobactéries a permis de déterminer que tous les régulateurs de protéasome étaient déjà présents chez le dernier LECA (Latest eukaryote common ancestor) et que ces régulateurs avaient évolué de manière indépendante s'adaptant à la physiologie de l'espèce concernée (Fort et al., 2015). Ceci conforte que le rôle de PbRpt3 pourrait s'approcher ou s'éloigner du rôle des Rpt3 d'autres eucaryotes, qui dans l'état actuel des connaissances serait principalement rattaché, en conditions basales, à son activité au sein du complexe 26S du protéasome.

## B. La production des protéines recombinantes

La première étape pour explorer le rôle fonctionnel d'une protéine consiste, lorsque cela est possible, à produire une protéine recombinante, exprimée avec une étiquette, permettant ensuite son identification, lors de différents tests *in vitro* grâce à des Ac dirigés contre cette étiquette.

Dans le cas de PbRpt3, et à la suite de la détermination de la région de protéine à produire, nous avons cloné la séquence codant pour la protéine, en vecteur d'expression pETDuet puis confirmé sa séquence par séquençage. Nous avons tenté de produire PbRpt3 sous sa forme entière de 45 kDa puis sous une forme tronquée de 30 kDa en bactéries *Escherichia coli* BL21 DE3 avec différentes techniques de purification à partir des protéines solubles et des corps d'inclusion de la bactérie. Ces essais ne nous ont pas permis d'obtenir des quantités ni une pureté optimales. C'est la production de la protéine de 30 kDa, dans une nouvelle souche de bactérie *E. coli* BL21 Arctic Express qui a véritablement donné un tournant à la production des protéines recombinantes. Dans le cadre de ce projet, cette souche pourra être utilisée pour tenter d'améliorer la qualité et la pureté de la PbRpt3 de 45 kDa qui a uniquement été produite en BL21 et qui apparaissait fortement dégradée dans les différents lots produits.

La protéine recombinante tronquée PbRpt3 de 30kDa conserve toutefois la région AAA-ATPase et les deux motifs RVxF, elle est également exempte de la longue région hélice située en N-ter ce qui laissait présager une production plus aisée que celle de la protéine entière PbRpt3 45kDa.

Il est intéressant de noter que la protéine Rpt3 humaine PSMC4 est commercialisée par différentes entreprises biotechnologiques : produite en *E. coli*, elle présente une concentration avant lyophilisation guère plus élevée que celle obtenue lors de nos différentes productions. Elle est proposée à une concentration de 200 µg/ml, taguée poly-Histidine en N-terminal comme pour PbRpt3. Sa pureté est > 90% (lien internet : <https://www.abbexa.com/human-psmc4-protein>). Elle est aussi proposée avec un tag C-Myc/DDK et une concentration et pureté inférieures (de 50 µg/ml et une pureté > 80%) par Origene [https://www.origene.com/catalog/cdna-clones/expression-plasmids/rc203161/tbp7-psmc4-nm\\_153001-human-tagged-orf-clone](https://www.origene.com/catalog/cdna-clones/expression-plasmids/rc203161/tbp7-psmc4-nm_153001-human-tagged-orf-clone). Ces éléments suggèrent que cette protéine reste – étant donné sa faible concentration dans ces exemples - difficile à produire. Nous remarquons cependant que notre stratégie d'associer le tag en N-terminal est adaptée, puisque telle est la position du tag pour la protéine la plus fortement dosée. Pour la protéine Rpt3 proposée avec le tag Myc-DDK, ce tag est situé en C-ter, il s'agit par contre de l'isoforme 2, plus court en N-terminal de 31 acides aminés.

Des recherches sur les causes de la précipitation de la PbRpt3 de 45 kDa m'ont conduite vers différents articles, où il est fait mention des régions riches en Asparagine (N) et Lysine (K), caractéristiques des protéines de *Plasmodium* (Pizzi and Frontali, 2001). En effet, la région de 130 acides aminés que nous avons écartée pour produire la protéine de 30 kDa est composée de 17% de N ou K, ce pourcentage s'élevant à 40% sur une région de 56 a.a. En comparaison, la région de 130 acides aminés en N-terminal de la PSMC4 humaine est composée de N/K à 9% seulement. Or, il est connu que ces deux acides aminés causent l'agrégation et la précipitation de la protéine lors de l'expression en bactérie (Liu et al., 2014). Ainsi, dans le cas de l'ATPase Kinesin-5 de *P. falciparum*, les auteurs, pour produire cette protéine efficacement, ont supprimé une région « loop 6 » de 105 acides aminés présentant une composition en N/K de 29.2%. Ils avaient constaté, eux aussi, une très faible concentration, liée à une précipitation systématique, lorsque cette région était présente (Cook et al., 2021).

Pour conclure, nous pensons que le choix de produire la protéine de 30 kDa exempte de la longue région hélice particulièrement riche en N/K, a été judicieux puisqu'il a permis d'obtenir une protéine

relativement pure, et dont les quantités permettaient d'opérer les tests avec PfPP1c *in vitro*, présentés plus loin.

Enfin, il est à noter que les 6 protéines Rpt1 à Rpt6, en plus de présenter une structure 3D homologue, seraient toutes issues d'une protéine Rpt unique qui aurait permis l'émergence, en premier lieu, de Rpt1 et Rpt5, puis de Rpt2 et Rpt3, et enfin de Rpt4 et Rpt6 (Fort et al., 2015). Etant donnée la similitude et l'origine commune des différentes Rpt, il serait intéressant de produire les Rpt1, Rpt5 et Rpt6 de *Plasmodium berghei*, qui, comme Rpt3 possèdent un ou plusieurs motifs RVxF, et qui ont toutes été retrouvées dans l'interactome de PbPP1. Il serait ainsi possible d'observer la présence d'un complexe entre PP1 et une ou plusieurs Rpt, à différents moments du cycle cellulaire, éventuellement pour accomplir différentes fonctions.

## **II. Etude de l'interaction entre PbRpt3 et PP1c et régulation de l'activité de la phosphatase *in vitro* et en ovocytes de Xénope.**

### **A. Effet des protéines PbRpt3-45 kDa et PbRpt30-kDa sur l'interaction et l'activité de PP1c.**

Au cours de ce projet, nous avons démontré, grâce à des tests de type ELISA, que la protéine PbRpt3 interagissait avec PP1c et que cette interaction augmentait avec des concentrations croissantes de PP1c. La protéine tronquée de 30 kDa ne possède pas la région hélice ni la région OB-C terminal et elle interagit également avec PP1c. Ceci permet de confirmer que les régions essentielles pour l'interaction sont présentes dans la région de 30 kDa. Il est difficile de comparer le niveau d'interaction entre les deux protéines de 45 kDa et 30 kDa du fait qu'elles sont produites selon des protocoles différents et obtenues à des niveaux de pureté différents. Notons cependant que la région hélice contenue dans la protéine de 45 kDa pourrait contribuer à la reconnaissance du substrat comme cela a déjà été décrit chez les AAA-ATPases (Puchades et al., 2020).

Afin de tester la fonctionnalité de cette interaction, et plus particulièrement la possible régulation de l'activité de PP1c par PbRpt3, des tests de type pNPP ont été réalisés. Ces expériences ont permis d'observer qu'en présence des deux protéines de 45 kDa ou 30 kDa, l'activité de PP1c augmentait de pair avec des concentrations croissantes de PbRpt3. Cette activation semble très importante puisqu'elle atteint plus de 200% de l'activité de PP1c lorsque la protéine testée est PbRpt3-45 kDa, et plus de 400% avec la protéine de 30 kDa (dans ces deux cas avec 600 pmol de PbRpt3). En comparaison, avec l'inhibiteur I2, nous observons une diminution de l'activité phosphatase de référence, conduisant à une activité de 60% en présence de 600 pmol de PfI2 recombinante. Une étude antérieure de notre équipe a déterminé que des tests réalisés avec la protéine recombinante PbGEXP15 (à 100 pmol) entraînait une augmentation de 200% de l'activité de PP1c (Hollin et al., 2019).

Dans le but de confirmer l'interaction entre PbRpt3 et PP1c ainsi que la fonctionnalité de cette interaction dans un contexte cellulaire, nous nous sommes tournés vers le modèle de l'ovocyte de Xénope.

L'utilisation du modèle des ovocytes de Xénope est rendue possible grâce à la forte identité entre les séquences protéiques de PP1c de *P. berghei* et de *X. laevis* (> 80%). Au cours des expériences dans ce modèle, nos résultats ont montré que la microinjection d'ARNc de PbRpt3 provoquait une diminution significative du pourcentage de GVBD dépendante de la progestérone. Cette observation, couplée à la co-immunoprécipitation des deux protéines XePP1c et PbRpt3, nous permet de suggérer un rôle activateur de PbRpt3 vis-à-vis de la phosphatase XePP1c.

Il serait intéressant de poursuivre ces études afin d'explorer si les effets de PbRpt3 sur PP1c pourraient être liés à une activité de Rpt3 au sein du protéasome de Xénope : en effet, l'importante identité entre les deux protéines PbRpt3 et XeRpt3 (66.2% d'identité) permettrait d'imaginer une insertion possible de PbRpt3 au sein du protéasome de Xénope. Cette éventualité semble peu réaliste d'après notre modélisation 3D de PbRpt3 et son insertion au sein du complexe protéasome 26S, rendant les motifs RVxF peu, voire pas accessibles. Cependant, cette hypothèse pourrait être testée en réalisant une immunoprécipitation sur des extraits d'ovocytes grâce à un anticorps dirigé contre une protéine du complexe protéasome. Un anticorps dirigé contre la Rpt5 de Xénope est commercialisé et pourrait être utilisé dans le cadre de ces expériences. Une révélation réalisée avec des Ac anti-HA pour détecter PbRpt3-HA et avec des Ac anti-XePP1c permettrait alors de déterminer si ces protéines sont co-immunoprécipitées, et donc appartiennent au même complexe. Dans le cas contraire, cela conforterait l'hypothèse d'une interaction entre PbRpt3 et la XePP1c en dehors du protéasome.

### **B. Rôle des motifs RVxF dans l'interaction entre les deux protéines, et dans l'activation de PP1c par PbRpt3**

Grâce à une approche par mutagenèse dirigée, les protéines recombinantes de 30 kDa mutées PbRpt3-KATA, PbRpt3-RKAEA et mutée pour les deux motifs PbRpt3-KATA/RKAEA ont été produites et utilisées pour évaluer la contribution des deux motifs KVTF et RKIEF dans l'interaction et l'activité de PbRpt3 vis-à-vis de PP1c. Cependant, les résultats des tests *in vitro* (tests de type ELISA, test pNPP) n'ont pas été concluants pour les simples mutants ni pour le double mutant. En effet, nous n'avons pas observé de variation significative ni de l'interaction, ni de l'activation de la PP1c lorsque les motifs étaient mutés ensemble ou séparément, les trois protéines continuant à interagir et à activer PP1c à des niveaux aussi élevés que la PbRpt3-30 kDa non-mutée.

L'une des explications possibles, pourrait être l'intervention d'autres régions entourant le motif RVxF qui pourraient interagir avec des résidus chargés négativement se situant à proximité de la poche d'interaction des motifs RVxF de la PP1c comme cela a déjà été décrit (Egloff et al., 1997). Ces interactions seraient moins fortes que les interactions avec les motifs RVxF, mais elles seraient à même de réguler l'activité et la spécificité de PP1c envers ses substrats (O'Connell et al., 2012; Peti et al., 2013; Terrak et al., 2004). Ainsi, en conditions physiologiques, ces interactions ne seraient pas suffisamment stables pour que la protéine mutée soit immunoprécipitée avec PP1c, mais *in vitro*, elles pourraient se révéler suffisantes pour en observer les effets.

Afin de tester cette hypothèse, il pourrait être intéressant de produire des mutations sur ces régions, combinées aux mutations des deux motifs RVxF afin de tenter de déterminer quelle(s) zone(s) élargies autour des motifs, une fois mutées, produiraient un impact sur l'interaction. Préalablement à ces mutations, il sera nécessaire de vérifier, à l'aide du modèle 3D, que ces mutations n'altèrent pas la conformation de la protéine.

Il est important de noter également que les expériences ont été réalisées avec la protéine tronquée (PbRpt3-30kDa). L'utilisation d'une protéine recombinante de 45 kDa mutée sur les deux motifs RVxF



pourrait, dans un premier temps, permettre d'évaluer son interaction avec PP1c en comparaison avec la protéine non mutée de 45 kDa et en comparaison de celle de 30 kDa.

Ayant observé en ovocytes de Xénope une co-immunoprécipitation de PbRpt3 et XePP1c, et un effet sur la maturation dépendante de la PG, nous avons ensuite évalué l'effet des mutations mentionnées ci-dessus dans ce modèle. Ainsi, de façon intéressante, la micro-injection des ARNc codant pour les protéines recombinantes mutées PbRpt3-KATA, PbRpt3-RKAEA et PbRpt3-KATA/RKAEA a permis de montrer la contribution conjointe des deux motifs RVxF dans l'interaction et dans l'activation de PP1c par PbRpt3. En effet, les protéines mutantes pour un seul motif RVxF (PbRpt3-KATA et PbRpt3-RKAEA), provoquent une diminution partielle du pourcentage de GVBD-PG dépendante comparé à la diminution engendrée par la protéine non-mutée. La mutation simultanée des deux motifs abolit, quant à elle, la totalité de l'effet de PbRpt3.

De façon surprenante, nos expériences de co-immunoprécipitation n'ont pas permis de détecter le complexe PbRpt3-PP1c lorsque les simples mutants étaient micro-injectés. Ceci pourrait s'expliquer par des interactions transitoires qui seraient à même d'exercer une incidence sur la maturation induite par la PG, mais qui ne seraient pas suffisamment stables pour être détectées par ce biais. Une autre explication pourrait être la présence d'un ratio de 2 XePP1c : 1 PbRpt3 permettant d'observer un effet partiel qui serait difficilement détectable par immunoprécipitation.

Dans le cas du double mutant PbRpt3-KATA/RKAEA, le fait de ne pas détecter le complexe avec XePP1c par immunoprécipitation conforte l'hypothèse d'une interaction directe, via les motifs RVxF entre PbRpt3 et XePP1c. De plus, nos résultats suggèrent que les deux motifs RVxF seraient essentiels pour que PbRpt3 puisse exercer un effet activateur sur XePP1c.

Nous avons mentionné plus haut l'intérêt de compléter nos expériences en ovocytes de Xénope par une analyse en immunoprécipitation/immunoblot utilisant un anticorps anti-XeRpt5, ceci afin de déterminer si les interactions observées entre PbRpt3 et XePP1c pouvaient intervenir au sein du protéasome de Xénope. Cette approche pourrait se révéler également éclairante quant à la contribution des motifs RVxF de PbRpt3. Ainsi, des expériences réalisées avec les ARNc codant pour les protéines mutées PbRpt3-KATA, PbRpt3-RKAEA et PbRpt3-KATA/RKAEA et différentes combinaisons des anticorps anti-HA, anti-XePP1c et anti-XeRpt5 utilisés pour l'IP et pour l'immunoblot, pourraient permettre d'identifier quel(s) motif(s) RVxF de PbRpt3 serai(en)t impliqué(s) dans l'interaction avec XePP1c, ceci au sein ou en dehors du protéasome.

### **C. Rôle de l'activité ATPase : exploration en ovocytes de Xénope**

Les résultats obtenus en ovocytes de Xénope nous ont permis de suggérer que PbRpt3 active la phosphatase XePP1c et que ses deux motifs KVTF et RKIEF sont essentiels pour l'activation optimale de la phosphatase. Pour aller plus loin dans l'étude du mécanisme d'activation de PP1c par PbRpt3, et à la suite de la modélisation 3D présentée en 1<sup>ère</sup> partie, nous avons exploré le rôle de la capacité de PbRpt3 à lier l'ATP. Cette capacité étant indispensable pour l'activité enzymatique de l'ATPase, nous souhaitons, par ce biais, tester si l'effet observé sur la maturation des ovocytes de Xénope pouvait être lié à l'activité ATPase de PbRpt3.

Grâce à l'analyse de notre modèle 3D de PbRpt3, nous avons donc pu prédire les acides aminés interagissant potentiellement avec l'ATP de PbRpt3. Après mutations de ces a.a. nous avons donc répété

les expériences en ovocytes de Xénope, en utilisant l'ARNc codant pour la protéine mutée sur ses sites de fixation à l'ATP (PbRpt3-ATP sites). Les résultats obtenus avec cet ARNc muté entraînent un effet, non pas au niveau de la fixation à PP1c, puisque les protéines sont co-immunoprecipitées, mais au niveau de la maturation des ovocytes. Ainsi nous avons observé une abolition partielle de la capacité de PbRpt3 à inhiber la maturation dépendante de la PG. Cet effet partiel pourrait être expliqué :

- soit par une contribution « partielle » de l'activité ATPase de PbRpt3 dans l'activation de PP1c,
- soit par une capacité résiduelle de la protéine mutée à fixer l'ATP, probablement causée par la séquence 143-LGG-145 qui est impliquée dans la stabilisation de l'ATP comme cela a été décrit précédemment. La structure de cette séquence, assimilée à une « poche de maintien » de l'ATP, contribuerait ainsi à fixer l'ATP, ce qui pourrait entraîner une activité ATPase résiduelle, même en l'absence des liaisons hydrogène entre la molécule d'ATP et les 4 acides aminés mutés. Comme décrit plus haut, la mutation des 3 acides aminés 143-LGG-145 en alanine, ne permettrait pas d'altérer l'organisation du squelette de la protéine, indiquant ainsi une grande stabilité de cette poche de maintien de l'ATP.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude de l'intervention de la fonction enzymatique de PbRpt3 sur l'activation de PP1c par des expériences *in vitro*. En premier lieu l'activité ATPase des protéines PbRpt3-45kDa et 30kDa devrait être testée grâce à des tests d'activité ATPase (tel que le ATPase/GTPase Activity Assay Kit commercialisé par Sigma Aldrich). Ensuite, la production de la protéine mutée pour les 4 acides aminés de liaison à l'ATP (K188, D241, N288 et Q356) pourrait permettre de reproduire les tests d'interaction *in vitro* et les tests d'activité de PP1c. L'objectif sera ainsi de constater si la PbRpt3 mutée pour ces 4 acides aminés exerce le même effet partiel d'activation vis-à-vis de la phosphatase au cours des tests d'activité *in vitro*.

### III. Le système PlasmogEM utilisé pour l'extinction du gène codant pour PbRpt3

Après avoir étudié l'interaction entre la protéine PbRpt3 et PP1c *in vitro* et dans le modèle de l'ovocyte de Xénope, ainsi que le rôle de régulation de l'ATPase vis-à-vis de la phosphatase dans les deux systèmes, il était nécessaire d'explorer le rôle de PbRpt3 chez le parasite. Pour cela, nous avons entrepris des expériences de génétique inverse afin de tenter de générer des parasites *P. berghei* déficients pour PbRpt3.

Le construit PlasmogEM que nous avons utilisé (*Plasmodium* Genetic Modification) permet, après transfection et recombinaison, de remplacer 93% du gène PbRpt3 par une cassette présentant le gène de résistance à la dhfr. Utiliser ce construit n'exige pas de modification génétique complémentaire à mettre en place, puisque l'intégration de la cassette s'opère suite à la transfection chez le parasite, et l'intégration est vérifiée à l'aide d'une PCR en utilisant les amorces dont les séquences sont indiquées sur le site de PlasmogEM. De plus ce système s'annonçait comme relativement performant du fait de la longueur des 'bras' homologues à l'environnement génique de PbRpt3 de part et d'autre de la cassette à insérer.

Cependant, nos multiples tentatives nous ont permis d'aboutir à deux cas de figure lors des multiples tentatives de clonage : nous avons obtenu soit une population parasitaire semblant être mixte et associant la présence du construit au locus d'intérêt, ainsi que le gène wild-type, soit des parasites dépourvus de l'insertion de la cassette au locus d'intérêt malgré la pression avec la pyriméthamine. Cette dernière observation pourrait s'expliquer par une possible intégration de la cassette de résistance

à la dhfr dans le génome du parasite, en dehors du locus PbRpt3. Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'entreprendre un séquençage du génome entier des parasites clonés.

Nous avons donc tenté, sans succès, d'obtenir des clones de parasites viables déficients pour PbRpt3 grâce à la stratégie des plasmides PlasmogEM. L'échec de cette approche, et notamment l'impossibilité d'obtenir des clones déficients viables, est en faveur de l'essentialité de PbRpt3 pendant le cycle érythrocytaire de *P. berghei*. Ces résultats ne sont pourtant pas en adéquation avec ceux obtenus dans l'étude globale PlasmogEM où le phénotype du KO-PbRpt3 était décrit comme « slow » signifiant une croissance lente pour les parasites KO-PbRpt3 lors de ce même cycle érythrocytaire (Bushell et al., 2017),

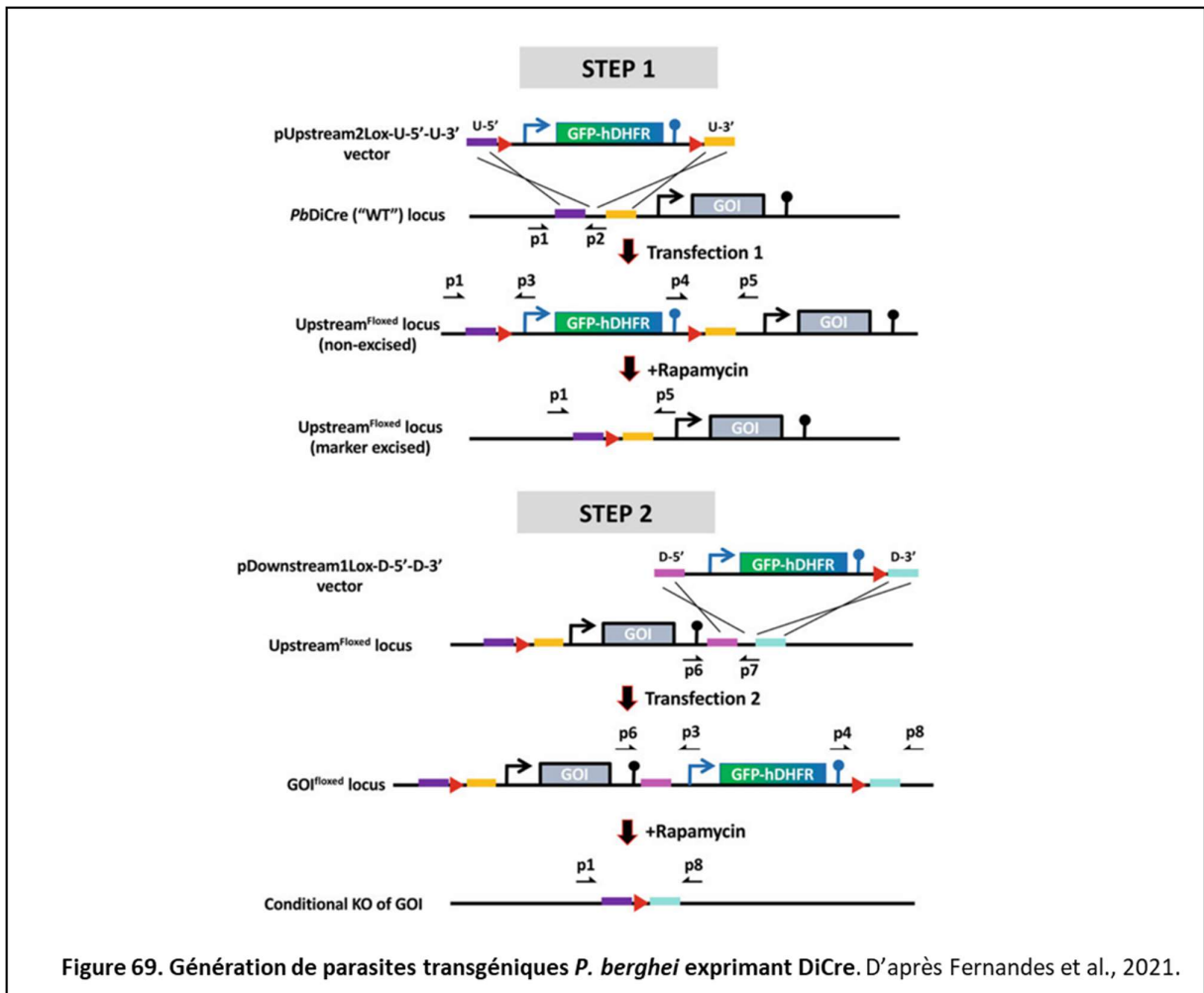
Nous devons néanmoins tempérer ces résultats, car lors de l'analyse globale de Bushell et al., les mutants n'étaient suivis que quelques jours seulement, et d'autre part ils étaient générés par la transfection simultanée de différents vecteurs n'apportant pas, potentiellement, une sélectivité suffisante pour chaque gène étudié, ce qui pourrait expliquer les écarts observés avec notre étude.

Chez *P. falciparum*, une étude de mutagenèse par saturation avait démontré que la majorité des gènes codant pour des protéines du protéasome 26S, incluant PfRpt3, étaient essentiels à la survie du parasite (Zhang et al., 2018). Une étude antérieure avait déjà démontré, par ailleurs, que l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des sous-unités catalytiques du protéasome parasitaire exerçaient un puissant effet létal sur le parasite (Dogovski et al., 2015; Krishnan and Williamson, 2018; Li et al., 2016b). Ceci nous permet d'avancer que l'essentialité de PbRpt3 pourrait ainsi être reliée à son rôle au sein du protéasome et/ou à sa capacité à interagir et réguler des protéines essentielles à *Plasmodium* telles que la protéine PP1c (Guttery et al., 2014; Paul et al., 2020).

Quoi qu'il en soit, il serait intéressant de confirmer nos résultats par l'utilisation d'autres systèmes de génétique inverse permettant d'étudier les effets de l'extinction d'un gène. Différents systèmes existent chez *Plasmodium*, et permettent l'extinction d'un gène, l'interférence avec l'ARN ou la dégradation de la protéine traduite. Cependant, ils ne peuvent pas tous être transposés à l'étude de la délétion du gène codant pour la protéine PbRpt3 lors du stade érythrocytaire. Ils seront donc présentés ci-après :

Le système Flp/FRT combine la nécessité de posséder une ligne parasitaire exprimant la recombinase Flp ainsi que l'insertion de sites FRT (Flippase Recognition Target) de part et d'autre de la séquence cible à exciser. Pour fonctionner, cette technique nécessite une température maximale de 30°C. Au-delà, l'enzyme Flp recombinase ne peut être active et ne peut opérer la délétion. La limite principale est donc celle de la température, qui restreint donc son utilisation aux stades parasitaires ayant lieu chez le moustique où la température est adaptée (20-25°C).

Le système inducible DiCre (figure 69) pourrait être utilisé car il a déjà fait ses preuves chez *P. berghei* (Fernandes et al., 2021, 2020; Kent et al., 2018; Loubens et al., 2023). Ce système permet d'exciser une séquence par l'action de deux polypeptides inactifs CRE59 et CRE60 qui se lient sous l'effet de la rapamycine et acquièrent leur activité recombinase, permettant l'excision ou l'inversion de la cible située entre deux sites *loxP* de 34 pb. Ces sites peuvent être intégrés dans l'une des UTRs, dans un intron existant, ou bien sous forme d'un intron artificiel (*loxPint*) Ce système permettrait d'exprimer des versions mutées de la protéine (Fernandes et al., 2021; Knuepfer et al., 2017), ce qui présenterait un intérêt dans le cas de l'étude de PbRpt3 avec la possibilité de muter les sites RVxF ou les sites de liaison à l'ATP.



Le système inductible *glmS* consiste en l'insertion en 3'UTR du gène à éteindre, de la séquence du ribozyme, un élément d'auto-clivage d'ARN provenant d'une bactérie Gram + et qui nécessite de glucosamine-6-phosphate pour exercer son activité catalytique. Ainsi, le clivage de *GlmS* est provoqué par l'ajout de glucosamine dans le milieu de culture, ce qui entraîne l'instabilité de l'ARNm et sa dégradation. Ce système a déjà été utilisé chez *P. berghei* (Aroonsri et al., 2016) mais présente l'inconvénient d'entraîner parfois une surexpression du gène par la stabilisation du transcrite.

Le système de Tet-off rend possible l'échange du promoteur endogène par un promoteur inductible. Cependant cela cause un biais important, qui est l'induction d'une variation d'expression du gène à moduler (Lesage et al., 2018). Ce système présente également une inertie dans sa mise en place, rendant complexe l'étude d'une protéine chez *Plasmodium berghei* dont la dégradation s'échelonne sur un temps plus long (Briquet et al., 2021).

Les TetR-aptamères sont ainsi nommés d'après les aptamères qui sont de courts fragments d'ARN pouvant fixer et interagir avec des ligands spécifiques. Dans le cas du système TetR-aptamère, les séquences aptamères sont intégrées en 5' UTR du gène à exciser (Goldfless et al., 2014)). Le répresseur TetR se lie à l'aptamère en empêchant la traduction de l'ARN et la synthèse protéique. La traduction ne pourra reprendre que sous l'effet d'un ajout d'ATc (anhydrotetracycline) causant la séparation de TetR de l'aptamère. Ce système a été amélioré par la fusion entre le répresseur TetR-DOZI (une protéine inhibant la traduction) ou avec la fusion TetR-CITH, une protéine effectrice de la traduction. Ces

modifications, combinées à l'ajout de 10 aptamères en 3'UTR améliore grandement l'efficacité du système TeR-aptamères, néanmoins la description de ces techniques n'a pas encore eu lieu chez *P. berghei* alors que son utilisation est plus répandue chez *P. falciparum* (Briquet et al., 2022).

Quant aux trois systèmes réversibles de KO par dégradation protéique, nous pouvons citer :

- le système FKBP-DD fusionné en N-terminal ou C-terminal d'une protéine à dégrader, et qui utilise un DD (domaine de déstabilisation) de la protéine FKBP12, inductible en l'absence de rapamycine) entraînant ainsi la dégradation par le protéasome.
- Le système DHFR-DD (ou DDD) qui a déjà été mis en place chez *P. falciparum* (Muralidharan et al., 2011) et qui pourrait l'être chez *P. berghei* (Briquet et al., 2022). Il s'agit d'employer une version mutée du DD de la DHFR (dihydrofolate reductase) de *E.coli*, stabilisé par le TMP (triméthoprim).
- Le système AID consiste en une étiquette AID intégrée au sein de la protéine à dégrader. Après l'ajout de IAA (indole-3-acide acétique), TIR1 se lie à l'étiquette AID provoquant le recrutement d'un complexe E3 entraînant l'ubiquitination (Philip and Waters, 2015). Notons que ce système a déjà été utilisé par notre équipe pour la dégradation conditionnelle de PbTKL (Gnangnon et al., 2019).

Ces trois systèmes entraînent une dégradation par le complexe du protéasome 26S puisqu'ils sont dépendant de l'ubiquitination. Ce système, nous l'aurons compris, ne peut être utilisé dans notre étude, dans la mesure où PbRpt3 est une protéine putative du protéasome 26S.

En résumé, les différents systèmes de KO évoqués plus haut présentent chacun un intérêt et des limites d'application et ne sont pas un choix vers lequel nous nous sommes orientés en première intention car disposant déjà d'un plasmide PlasmogEM. Néanmoins il pourrait être envisageable d'utiliser le système DiCre pour conforter notre étude de Knock-out de PbRpt3, ainsi que pour l'étude de la mutation des deux motifs RVxF et des sites de fixation à l'ATP.

#### **IV. Knock-in : étude de la localisation de la protéine PbRpt3**

##### **A. Localisation de PbRpt3 chez le parasite**

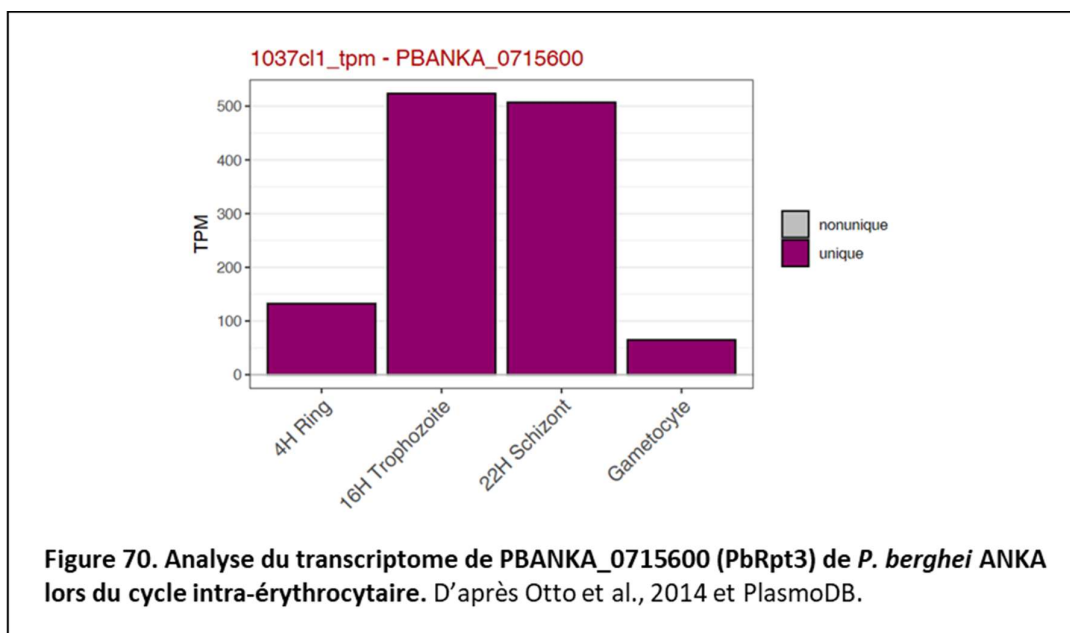
Il est désormais aisé d'obtenir des plasmides exprimant des séquences d'intérêt, auprès de différents fournisseurs comme cela a été réalisé au cours de ma Thèse : après différentes tentatives infructueuses pour réaliser le clonage de la séquence codante de PbRpt3 dans le plasmide pL1886 à l'aide du kit de clonage inFusion (utilisé pour intégrer la séquence codante pour PbRpt3 dans le plasmide pETDuet au début du projet), nous avons donc fait réaliser ce clonage par un sous-traitant.

Le plasmide pL1886-PbRpt3-mCherry a donc été transfecté chez le parasite afin d'étudier la localisation de l'ATPase PbRpt3 étiquetée mCherry, puis nous avons sélectionné par tri cellulaire les parasites exprimant le tag mCherry. Ces cellules ont ensuite été ré-injectées chez des souris saines en vue d'un « enrichissement » en parasites exprimant PbRpt3-mCherry afin de nous permettre de procéder à la préparation des différents stades : anneaux, trophozoïtes-schizontes et gamétocytes.

Les résultats font état d'un signal correspondant à la présence de PbRpt3-mCherry relativement faible lorsque l'on observe des trophozoïtes jeunes. Le signal en fluorescence apparaît plus prononcé chez les

trophozoïtes âgés alors que chez les schizontes il semble être plus faible. En revanche, ce signal est plus intense chez les gamétocytes.

Il est intéressant de noter que ce profil d'expression, pour chacun des stades, est cohérent avec les études de transcriptomique déjà décrites chez le parasite, qui montraient un niveau maximum de transcription de cette protéine lors des stades trophozoïte et schizonte (figure 70) (Otto et al., 2014). La présence moindre du transcrit de PbRpt3 chez le gamétocyte pourrait être due au fait que PbRpt3 a déjà été produite au cours des stades précédents, et que la protéine persiste dans la cellule avec un faible niveau de transcription *de novo*.



Notons aussi la localisation de PbRpt3 chez les trophozoïtes âgés, semblant être contenue sous forme d'agrégats lors de ce stade. Ces accumulations pourraient correspondre à des granules de stockage de protéasomes comme cela a déjà pu être décrit au cours du stade quiescent chez la levure (Laporte et al., 2008). Ces PSG (Proteasome storage granules) contiennent des Rpt ou Rpn dissociées du corps catalytique 20S. Cela pourrait être cohérent avec ce que nous avons observé chez *Plasmodium* puisque aucune sous-unité du complexe 20S n'a été retrouvée dans l'interactome de PbRpt3.

Il a aussi été démontré que des complexes du protéasome existaient dans des structures sous-nucléaires dans des cellules de mammifères (Guo, 2022). Cette localisation concentrerait uniquement des protéasomes assemblés en 26S. Dans le cas de *P. berghei*, notre étude d'interactome a été conduite sur le stade schizonte, et nous n'avons pas détecté PbRpt3 associée au 20S, suggérant ainsi une absence de localisation sous-nucléaire. Il serait néanmoins intéressant de répéter l'étude d'interactome au cours du stade gamétocyte afin d'observer si des sous-unités du 20S appartiennent à l'interactome de PbRpt3 pendant ce stade. Ceci pourrait suggérer une localisation sous-nucléaire, s'appariant ainsi avec nos résultats de localisation nucléaire de PbRpt3-mCherry lors du stade gamétocyte.

En conclusion, la distribution de PbRpt3 que nous observons chez le parasite est conforme à la localisation des protéasomes dans les cellules eucaryotes, ceux-ci étant principalement retrouvés dans le cytoplasme, associés aux centrosomes, au réseau du cytosquelette et à la surface externe du réticulum endoplasmique (Guo, 2022; Wójcik and DeMartino, 2003). Il y aurait une présence possible dans le noyau, comme nous l'observons chez les gamétocytes. Une variation de localisation de Rpt3 peut donc être liée au type cellulaire, au stade de croissance ou à une réponse cellulaire au stress.

Afin d'affiner cette localisation, nous pourrions envisager l'utilisation de la Microscopie électronique à transmission sur une population mixte de schizontes ainsi que chez les gamétocytes. L'objectif serait de tenter de visualiser la présence d'agrégats de PbRpt3, soit dans le cytoplasme, pouvant correspondre à des PSG pendant le stade trophozoïte âgé, ou dans le noyau pouvant correspondre à des assemblages sous-nucléaires pendant le stade gamétocyte. Pour cela, il serait nécessaire d'utiliser des anticorps permettant de reconnaître PbRpt3. Nous pourrions envisager, dans un premier temps, l'utilisation d'anticorps anti-RFP sur des parasites exprimant la protéine PbRpt3 étiquetée mCherry.

## **B. Localisation de PbRpt3 dans la cellule hôte ?**

*Plasmodium* effectue sa deuxième et grande phase de multiplication dans des cellules qui n'ont plus de noyau, de mitochondries, ni de ribosomes : les globules rouges. Dans ces cellules, la synthèse protéique est absente, et la plus grande partie de leur éviction protéique a déjà été réalisée lors de la différenciation des réticulocytes en érythrocytes, puisque l'érythrocyte est composé à 98% d'hémoglobine. Dans les érythrocytes humains, le protéasome semble exister majoritairement sous la forme 20S avec une faible détection de complexes 26S. Les composants du 19S seraient présents sous forme non-assemblée, et aucune activité protéolytique liée au 26S n'a pu être détectée dans ces protéasomes alors qu'une dégradation dépendante du 20S persiste (Neelam et al., 2011).

Dans ce contexte, et sur la base d'une conservation importante entre les protéines du parasite et celles de l'hôte, il pourrait être possible que des composants du protéasome parasitaire puissent interagir avec ceux de l'hôte. Dans notre cas, nous nous sommes questionnés sur la possible interaction de PbRpt3 avec des complexes 20S des érythrocytes des souris infectées. Cependant, nous n'avons pas observé d'export de la protéine PbRpt3-mCherry dans les globules rouges. Dans le même sens, l'analyse de l'interactome de PbRpt3 n'a pas permis de détecter la présence de sous-unités appartenant au complexe 20S de *Mus musculus*.

## **V. Etude de l'interactome de PbRpt3 : des pistes pour appréhender son rôle chez le parasite**

Ayant constaté que la protéine PbRpt3 présentait un rôle activateur de PP1c *in vitro* et en système hétérologue d'ovocytes de Xénope, que cette protéine semblait essentielle à la survie du parasite, et qu'elle était exprimée lors des stades érythrocytaires, nous avons utilisé une autre approche pour mieux comprendre son rôle chez le parasite. Ainsi, grâce à la génération de la lignée parasitaire exprimant PbRpt3-mCherry, nous avons réalisé une étude de son interactome afin d'identifier ses partenaires et potentiellement de révéler des voies dans lesquelles cette protéine serait impliquée. Nous avons choisi de réaliser cette étude sur une population mixte de schizontes (comprenant les stades trophozoïte âgé jusqu'au schizonte segmenté) car la protéine est exprimée et il est aisé d'en obtenir en quantités suffisantes pour une analyse en Immunoprécipitation et Spectrométrie de masse. Cette étude a été conduite sur 4 échantillons biologiques provenant de parasites exprimant la protéine WT ou étiquetée mCherry, et nous avons obtenu une liste de protéines partenaires potentielles. Cette liste de 623 protéines a été utilisée pour réaliser une analyse de GO (Gene Ontology) couplée à une analyse des réseaux d'interaction (STRING analysis), complétées par des recherches manuelles pour tenter d'identifier les voies faisant intervenir PbRpt3 chez le parasite.

## A. Présence du 19S, absence du 20S

L'étude de la liste des 623 partenaires potentiels de PbRpt3, réalisée manuellement et *via* une approche de GO et STRING, indique que nous retrouvons majoritairement des protéines du complexe 19S, des protéines appartenant aux voies d'hydrolyse et/ou de liaison aux phospholipides, ainsi que des protéines régulatrices de la transcription des gènes.

Ainsi, nous avons retrouvé la totalité des protéines du complexe 19S parasite comprenant les 6 Rpt (Rpt1 à 6) et les 13 Rpn (Rpn 1 à 13). De manière surprenante, les sous-unités du complexe catalytique 20S ne sont pas retrouvées complexées avec PbRpt3. Notons que cet interactome a été réalisé au stade schizonte, or il a déjà été démontré, chez *P. falciparum*, que le protéasome était fonctionnel lors des stades intra-érythrocytaires et que le complexe 20S était présent (Wang et al., 2015). Cependant, cette étude n'a pas été réalisée dans les mêmes conditions puisque la méthodologie (cross-linking) permettait d'observer des interactions transitoires. De plus, la protéine appât était formée du domaine Ubiquitin-like (UBL domain) de PfRAD23, un domaine décrit comme interagissant avec des protéines ubiquitinées destinées à la dégradation par le protéasome 26S. Au contraire, dans notre étude d'interactome, aucune des protéines RAD23 (PBANKA\_1210100) ni DSK2 (PBANKA\_0934200), une autre protéine possédant un domaine UBL et intervenant dans l'adressage des protéines vers le complexe 26S, n'ont été retrouvées comme étant significativement enrichies dans l'interactome de PbRpt3.

Le fait de ne pas retrouver les sous-unités du 20S en complexe avec PbRpt3 au stade schizonte pourrait être en cohérence avec ce qui a déjà été décrit, puisque seules 160 protéines seraient ubiquitinées pendant le stade schizonte, suggérant une moindre activité du protéasome sous sa configuration 26S. En revanche, 469 protéines seraient ubiquitinées chez les mérozoïtes, forme invasive extracellulaire (Green et al., 2020) et 519 protéines au cours des phases précoces de la gamétocytogénèse (Rashpa et al., 2023). En ce qui concerne les premiers stades de la gamétocytogénèse, il a été observé une dégradation massive par le complexe 26S allant de pair avec une ubiquitination de certaines protéines parasites exportées (Green et al., 2020). Ceci a conduit les auteurs à suggérer qu'une partie de l'ubiquitination des protéines parasites pourrait avoir lieu, non pas dans le cytoplasme parasite, mais dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ces observations peuvent être reliées aux nôtres, montrant une expression importante de PbRpt3-mCherry chez les gamétocytes précoces. Pour élucider le rôle de PbRpt3 chez les gamétocytes, il serait intéressant d'étudier l'interactome de PbRpt3 à ce stade, afin de vérifier si les sous-unités du complexe 20S sont retrouvées.

Ces éléments, une fois combinés, permettent de supposer qu'au cours du stade gamétocyte, PbRpt3 jouerait plutôt un rôle au sein du protéasome, alors que sa fonction pourrait être reliée à d'autres voies de régulation lors des stades trophozoïte et schizonte, potentiellement en association avec PP1c ou d'autres phosphatases/kinases. En effet, bien que PP1c soit absente de notre étude d'interactome (ce point sera discuté plus bas), notre analyse montre que PbRpt3 ferait partie de complexes intégrant d'autres phosphatases et kinases : parmi les 623 partenaires potentiels de PbRpt3, nous avons identifié 6 phosphatases et 20 kinases. Parmi ces kinases, figure la Caséine kinase 2 (CK2), dont il a été démontré qu'elle phosphorylait des sous-unités du protéasome 20S chez les eucaryotes (Castaño et al., 1996). Ces observations suggèrent donc que des mécanismes de phosphorylation pourraient être impliqués dans l'assemblage et/ou la régulation du protéasome chez *Plasmodium*.



## B. Comparaison entre l'interactome de la Rpt3 humaine PSMC4 et l'interactome de PbRpt3

Comme mentionné dans la partie Introduction de ce manuscrit, différentes protéines sont connues pour être des partenaires directs de la PSMC4 humaine. Il s'agit, outre ses partenaires au sein du complexe protéasome, des protéines PSMD10, NEK7, CALR ; DLST et SODC (ou P00441) (listées dans le tableau suivant). Afin de vérifier si PbRpt3 possédait les mêmes partenaires, nous avons dans un premier temps identifié par homologie comparatives les orthologues de ces protéines chez *P. berghei*. Ainsi, chaque protéine a été alignée avec le protéome de *P. berghei* grâce au logiciel pblast (NCBI). Ceci a permis de déterminer les protéines ayant la plus forte identité chez *P. berghei* et les résultats, sont listés dans le tableau XV suivant.

Partenaire de PSMC4	pblast / protéome de <i>P. berghei</i>			Protéine retrouvée dans l'interactome de PbRpt3
	protéine retrouvée	% identité	% recouvrement de séquence	
PSMD10	PBANKA_0506100	32%	78%	NON
NEK7	PBANKA_0616700	36%	74%	NON
CALR	Aucune			N/A
DLST	PBANKA_1419100	41%	89%	NON
SODC	Aucune			N/A

**Tableau XV. Analyse des interactants (directs) communs possibles entre la PSMC4 humaine et PbRpt3.** Cette comparaison est basée sur les partenaires potentiels de PbRpt3 retrouvés au stade schizonte.

Concernant la SODC, aucune homologie n'a été trouvée parmi le protéome de *P. berghei*. Cependant le parasite possède deux superoxyde dismutases (PBANKA\_1122400 ou PBANKA\_1422700), mais aucune d'entre elles n'est retrouvée dans l'interactome de PbRpt3. De même, aucune protéine homologue de NEK7 n'est retrouvée, ce qui pourrait être en lien avec l'expression lors de stades plus tardifs du parasite (au cours de la méiose post-fertilisation) de deux NIMA-related protein kinases Nek-2 et Nek-4a (Reininger et al., 2009). Enfin, aucun des autres partenaires dont il a été démontré qu'ils interagissaient directement avec la PSMC4 humaine : PSMD10, CALR et DLST ne sont retrouvés dans l'interactome de PbRpt3. Les seuls partenaires communs, connus à ce jour, entre les protéines PSMC4 et PbRpt3 seraient donc les composants du protéasome 19S : Rpt2, Rpt4 et Rpt6 qui ont été retrouvés parmi les 623 partenaires potentiels de PbRpt3. Ces éléments contribueraient à étayer l'hypothèse d'un rôle de PbRpt3 différent de celui de la PSMC4 humaine.

## C. PbRpt3 : un rôle dans des voies liées aux Phospholipides ?

Au cours de notre analyse de l'interactome de PbRpt3, nous avons identifié 7 protéines connues pour interagir avec des phospholipides membranaires ainsi que 5 phospholipases. Cette observation suggère le rôle de PbRpt3, en lien avec PP1c ou non, dans des mécanismes régulant la dynamique des membranes, cruciales pour le développement du parasite. Dans ce sens, la machinerie de synthèse des phospholipides est très active chez le parasite : dans les globules rouges infectés, les phospholipides augmentent de 500 à 700% en comparaison des globules rouges sains (Déchamps et al., 2010).

Ces phospholipides sont les principaux composants des membranes cellulaires avec la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) représentant la grande majorité des phospholipides chez *Plasmodium* (Vial et al., 2003). Leur biosynthèse se fait par la voie "Kennedy pathway" présente chez les eucaryotes et différente de la voie permettant la biosynthèse de la

phosphatidylsérine (PS), dérivée des procaryotes et se faisant *de novo*. La voie « Kennedy pathway » met en jeu différentes enzymes chez *Plasmodium berghei* : la choline kinase PBANKA\_104010, l'éthanolamine kinase PBANKA\_092370, la choline-phosphate cytidylyltransférase (CCT) PBANKA\_141510 et l'éthanolamine-phosphate cytidylyltransférase (ECT) PBANKA\_136050. Aucune de ces protéines ne compose l'interactome des 623 partenaires de PbRpt3.

La biosynthèse de la PS est permise par la PS synthase PBANKA\_1142700, elle aussi absente de l'interactome de PbRpt3 et, même si nous retrouvons de manière enrichie, la protéine CDPK7 (PBANKA\_0925200) une kinase calcium dépendante, impliquée dans la régulation de la biosynthèse des lipides chez *P. falciparum* (Maurya et al., 2022), au vu de ces éléments, nous pourrions supposer que PbRpt3 n'interviendrait pas majoritairement dans les voies de synthèse de ces phospholipides, mais préférentiellement dans des voies d'interaction/hydrolyse des phospholipides intervenant dans des étapes de préparation de l'egress.

Cette hypothèse s'appuie sur la présence dans l'interactome de PbRpt3 de différentes protéines d'hydrolyse et/ou de liaison aux phospholipides. Ainsi, nous retrouvons la PI-PLC (phosphoinositide-specific phospholipase C - PBANKA\_1211900) qui est une enzyme d'hydrolyse des phospholipides associés à la membrane et qui serait essentielle pour la maturation de *P. falciparum* lors de son cycle érythrocytaire (Burda et al., 2023), et la protéine PH2 qui jouerait un rôle dans la fusion entre la membrane des micronèmes et la membrane cytoplasmique chez *P. falciparum* (Ebrahimzadeh et al., 2019). De plus, les protéines C2 domain-containing protein 5, et DOC2 possèdent un ou plusieurs domaines C2, qui sont des domaines de liaison à la membrane. Ces domaines fixent l'ion calcium et créent une région électrostatique permettant la liaison aux lipides membranaires. De même, la protéine de fusion à la vacuole MON1, et la protéine phosphoinositide-binding protein PBANKA\_0618200 jouant un rôle important dans la motilité cellulaire, la réorganisation du cytosquelette, le cycle et le trafic cellulaire chez *Plasmodium* et chez les eucaryotes respectivement (Di Paolo and De Camilli, 2006) sont retrouvées dans l'interactome de PbRpt3 étayant ainsi notre hypothèse d'une intervention de PbRpt3 lors des phases préparatoires de l'egress.

Par ailleurs, 5 phospholipases ont été retrouvées, à l'issue d'une recherche manuelle, parmi les 623 protéines partenaires de PbRpt3. Or, comme la PI-PLC mentionnée plus haut, les phospholipases permettent la destruction membranaire par l'hydrolyse des chaînes acyl (phospholipases A1, A2 et B) ou des ponts phosphodiester du squelette glycérol des phospholipides membranaires (phospholipases C et D) (Ramaprasad et al., 2023). La présence de ces phospholipases dans l'interactome de PbRpt3 pourrait donc suggérer un rôle de cette ATPase en lien avec une régulation de l'hydrolyse des phospholipides.

#### **D. Interaction avec la phosphatase PbPP1c et rôle de PbRpt3 dans l'egress ?**

Ne pas avoir retrouvé la phosphatase PbPP1c significativement enrichie dans l'interactome de PbRpt3 est surprenant car PbRpt3 était retrouvée dans l'interactome initial de PP1c, chez les schizontes et chez les gamétocytes (Hollin 2019; De Witte et al., 2022). Néanmoins, notons que la PP1c est présente dans la liste des protéines immunoprécipitées avec PbRpt3-mCherry, mais en dessous du seuil de significativité. Il a déjà été observé que PP1c n'est pas toujours détectée dans les analyses d'IP/MS en utilisant ses partenaires comme appâts malgré une interaction directe *in vitro* et la détection du complexe chez le parasite (Mansour et al., 2023).

Chez l'homme, l'interaction entre Rpt3 et PP1c n'a jamais été démontrée, mais il pourrait y avoir un lien indirect via la synphilin-1. En effet, dans la maladie neurodégénérative de Parkinson il existe une

interaction entre les protéines Rpt3 et la synphiline-1, une protéine sujette à l'agrégation (Marx et al., 2007) et d'autre part, une interaction entre la Synphiline-1 et la PP1 a également été décrite, cette interaction régulerait négativement la formation de corps de Lewy et aurait un effet sur l'adressage de PP1 vers différents compartiments subcellulaires (Ferreira-Fernandes et al., 2015).

Chez *Plasmodium*, bien que nous n'ayons pu démontrer la réversibilité de la coimmunoprécipitation de l'ATPase Rpt3 et de la phosphatase PP1c, il est intéressant de noter que plusieurs protéines communes sont retrouvées dans les interactomes de ces deux protéines suggérant une participation conjointe dans plusieurs voies, notamment dans l'egress des globules rouges. Ainsi, parmi les 623 protéines de l'interactome, nous avons noté la présence de Guanylyl cyclase alpha (PBANKA\_0910300 – rang 62 de l'interactome). Cette protéine possède un domaine phospholipid transporteur (PLT). Il a déjà été démontré que ce domaine était un substrat de PfPP1c lors des stades érythrocytaires tardifs chez *P. falciparum* (Paul et al., 2020). La Guanylyl cyclase alpha synthétise les nucléotides cycliques cGMP qui activent la protéine kinase G (PKG), en amont du processus de sortie du globule rouge (egress). Ainsi, l'identification de la PbGCalpha dans l'interactome de PbRpt3, croisé avec le rôle fonctionnel de PbRpt3 dans l'activation de PP1c ici démontré, étayeraient l'hypothèse d'un rôle indirect de l'ATPase dans la régulation de la GCalpha en amont de la stimulation de la PKG et de la sortie du parasite du globule rouge.

Par ailleurs, la protéine PbSEA-1 ou Schizont Egress Antigen-1 (PBANKA\_0506000) est significativement enrichie dans l'interactome de PbRpt3 (rang 107). Or cette protéine présente 43% d'identité et 58% d'homologie avec la protéine de *P. falciparum* PfSEA-1 (PF3D7\_1021800) pour laquelle il a été démontré qu'il existait une variation de phosphorylation probablement liée à PP1 lors de l'egress (Paul et al., 2020). Le fait de retrouver cette protéine dans l'interactome de PbRpt3 alors qu'elle pourrait constituer un substrat de PP1c, permet d'envisager une possible intervention des trois protéines PbRpt3-PbSEA-1-PbPP1c dans le mécanisme de l'egress. De même, d'autres protéines retrouvées dans l'interactome de PbRpt3, connues pour participer également au mécanisme de l'egress chez *Plasmodium* ont été listées ci-dessous :

- ▶ La protéine phospholipase PBANKA\_1423100 interviendrait dans l'egress des merosomes (Srivastava and Mishra, 2022).
- ▶ La protéine PbICM1 (amino acid transporter - PBANKA\_1446100) a été retrouvée comme étant la protéine la plus enrichie avec PKG, lors des stades schizonte et gamétocyte dans des expériences d'immunoprécipitation et spectrométrie de masse en utilisant la protéine PKG comme appât (Balestra et al., 2021).
- ▶ La protéine ferlin-like protein (PBANKA\_1224400). Appartient à la famille des protéines ferlin, qui sont exprimées au cours des stades sexués et asexués. Chez *P. berghei*, il a été démontré que lorsque cette protéine n'était pas exprimée, les gamétocytes matures n'accomplissaient pas leur sortie du globule rouge infecté (Andreadaki et al., 2018).
- ▶ La protéine GEXP12 (PBANKA\_1226100) est présente dans les corps osmiophiles (OB - osmiophilic bodies) (Sassmannshausen et al., 2023) et serait reliée au phénomène d'egress des gamétocytes puisqu'il a été démontré que l'exocytose de ces OB provoque la rupture de la vacuole parasitophore préalable à la rupture de la membrane du globule rouge.

Si toutefois l'interaction directe entre PbRpt3 et PP1c pouvait être confirmée chez le parasite, la question de la fonctionnalité de cette interaction subsiste. Nos données *in vitro* et dans l'ovocyte sont

en faveur d'une régulation de l'activité de la phosphatase PP1c par Rpt3. Mais nous ne pouvons écarter l'hypothèse que l'ATPase puisse aussi être un substrat de PP1c. Certes, comme évoqué précédemment, lors du stade schizonte, une étude a démontré qu'il n'y avait pas de variation de la phosphorylation de PfRpt3 (PF3D7\_0413600) lors d'un KD de PfPP1c (Paul et al., 2020). Néanmoins, il est à noter que PbRpt3 et PfRpt3 présentent des sites de phosphorylation pouvant potentiellement être déphosphorylés par PP1c. Ainsi, dans notre laboratoire, une phosphorylation sur la thréonine 292 de PbRpt3 a été identifiée dans l'IP-MS de PP1c (Hollin et al., 2019). Cet acide aminé est extrêmement conservé au cours de l'évolution, et il s'agit de l'un des 10 aa répertoriés comme phosphosites de la Rpt3 humaine (T316) d'après le site phosphosite.org, cette phosphorylation n'ayant été rapporté que dans une seule référence (Rigbolt et al., 2011). Cet acide aminé correspond à la Thréonine 289 chez *P. falciparum* et à la Thréonine 306 de la Rpt3 de *T. gondii* (TGTT1\_229950). Ces éléments appuient l'hypothèse d'une phosphorylation réversible de PbRpt3 pouvant faire intervenir PbPP1c, mais qui pourrait avoir lieu en dehors du stade observé.

Notons que chez la Rpt3 humaine, selon la base de données Uniprot, 3 sites de phosphorylation (données compilant au minimum 5 références) sont retrouvés (Uniprot Ref P43686) qui sont les suivants : 21-Phosphosérine / 25 Phosphothréonine / 28 Phosphosérine.

## VI. Conclusion

Notre travail a permis de démontrer pour la première fois l'interaction directe entre Rpt3, un composant du complexe protéasome et la phosphatase PP1c. Cette interaction a pu être confirmée et démontrée comme fonctionnelle dans le modèle d'ovocytes de Xénope. En effet PbRpt3 exerce un rôle activateur sur l'activité de la phosphatase, et ceci est dépendant d'une part de l'interaction via les motifs RVxF de PbRpt3, et d'autre part de la capacité de cette dernière à lier l'ATP. Si nos observations de localisation de Rpt3 chez *P. berghei* sont compatibles avec la localisation de PP1c précédemment décrite, l'interaction fonctionnelle de ces deux protéines reste cependant à caractériser de façon plus approfondie chez le parasite. En outre, notre étude de l'interactome de PbRpt3 chez le parasite, combinée à l'analyse du modèle 3D de la protéine que nous avons pu construire, nous laisse penser que celle-ci pourrait exercer un rôle, en dehors du protéasome en lien avec la dynamique des membranes, lors d'étapes cruciales pour le parasite telles que l'egress. Cette hypothèse serait en cohérence avec l'essentialité de PbRpt3 lors du développement intra-érythrocytaire de *P. berghei*, suggérée par nos tentatives infructueuses de génération de parasites déficients pour cette protéine.

L'ensemble de ces éléments souligne donc l'intérêt de poursuivre ces études, qui pourraient être étendues au parasite *P. falciparum* infectant l'homme. En effet, l'essentialité de PfRpt3 a déjà été démontrée (Zhang et al., 2018). Sans perdre de vue que l'environnement de *P. falciparum* n'est pas identique à celui de *P. berghei* (ce dernier infecte préférentiellement les réticulocytes (Büngener, 1979) - contrairement aux érythrocytes matures pour *P. falciparum*) il est intéressant de noter que la protéine de *P. falciparum* ne possède qu'un seul des deux motifs RVxF présents chez PbRpt3. Sa fonction chez le parasite pourrait donc comporter quelques spécificités comparées à celles chez *P. berghei*. De plus, si l'interaction *in vitro* et *in vivo* entre PfRpt3 et PfPP1c est confirmée, cela pourrait ouvrir la possibilité d'entreprendre un projet de chimie médicinale, ciblant cette interaction tout en veillant sur la sélectivité indispensable à une telle démarche. Ainsi, nos expériences pourraient ouvrir la voie à une recherche sur la protéine Rpt3 de *P. falciparum*, pouvant déboucher sur un criblage de composés en vue de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.



## **MATERIEL ET METHODES**



## I. Ethique et Animaux

Les souris proviennent de l'élevage Charles River et ont été hébergées en Animalerie à l'Institut Pasteur de Lille (Biosecurité Niveau 2).

Les femelles matures de *Xenopus laevis* proviennent du CRB-Université de Rennes I, et ont été hébergées en animalerie au PHEXMAR, Université de Lille.

Tous ces animaux sont élevés conformément aux directives nationales françaises relatives à l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques, et conformément à la directive européenne 2010/63/UE. Les protocoles expérimentaux réalisés dans cette étude ont été examinés et approuvés par le « Comité d'Ethique CEEA-75 en Expérimentation Animale Nord-Pas de Calais-France » (numéro de projet pour les souris : 18905-2019020111166978v2 ; numéro de projet pour les Xénopes : F59-00913).

Souris : des souris mâles CD1 de 4 semaines élevés dans des cages filtrantes, choisis aléatoirement par groupes de 3-4 animaux, ont été infectées par le parasite *Plasmodium berghei*. Ces parasites étaient remis en suspension dans une solution saline (tamponnée au phosphate) et ont été injectés aux souris par voie intrapéritonéale. La pyriméthamine, phénylhydrazine ou sulfadiazine ont été administrées dans l'eau de boisson ou par injection intrapéritonéale. La parasitémie intra-érythrocytaire a été contrôlée régulièrement à l'aide de frottis sanguins effectués en prélevant une petite goutte de sang à la queue.

Xénopes : Après anesthésie réalisée par immersion dans une solution à 2 g/L de MS222 (tricaine méthane sulfonate), les lobes ovariens ont été prélevés chirurgicalement et conservés dans du milieu ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7,5) à 19 °C.

## II. Analyse de la séquence de PbRpt3 et modélisation moléculaire

La base de données PlasmoDB version 63 a été utilisée comme référence pour l'annotation et l'expression des gènes [<https://plasmodb.org>]. Le modèle a été construit après avoir réalisé un alignement de la séquence de *Plasmodium berghei* PbRpt3 [PBANKA\_0715600] avec la PSMC4 humaine de 418 acides aminés (fichier PDB 6MSB - chaîne D). Les deux séquences présentent 67% d'identité. Les structures de cryo-microscopie disponibles sur PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>) ont permis de construire le modèle 3D de PbRpt3 par homologie comparative. L'ion magnésium a été copié à partir de la structure de référence 6MSB, les charges partielles atomiques ont été calculées par la méthode Gasteiger-Hückel. La géométrie du squelette a été optimisée par 2000 étapes d'itérations de gradients conjugués, et déplacée jusqu'à ce que la valeur du gradient soit inférieure à 0,01 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> avec le champ de force MMFF94s (Halgren, 1999). La qualité du modèle a été vérifiée à l'aide du diagramme de Ramachandran (Annexe 1 - figure supplémentaire 1) et les calculs ont été effectués avec le logiciel SYBYL version 6.9.2 (Tripos Associates, St. Louis, Missouri). Les images ont été générées avec le logiciel Chimera version 1.15.

PbRpt3 a par ailleurs été substituée à PSMC4 dans le protéasome humain en remplaçant la chaîne D du fichier PDB 6MSB par PbRpt3, afin d'avoir une représentation de son environnement.

## III. Plasmides et mutagenèse dirigée

Les plasmides pGADT7 et pETDuet-1 proviennent respectivement de Clontech et Novagen. Le plasmide pL1886 a été gracieusement fourni par la Dr B. Franke-Fayard (Leiden University Medical Center, Pays-Bas).



Le plasmide PbGEM-022521 utilisé dans l'étude de génétique inverse chez *P. berghei* provient du Plasmogem-Wellcome Sanger Institute (Cambridge, UK).

Pour les expériences en ovocytes de Xénopes, l'ADNc de PbRpt3, optimisé pour le Xénope, a été synthétisé et inséré dans le plasmide pGADT7 par l'entreprise Genescript.

Les plasmides pGADT7-PbRpt3-HA muté 305-RKAEA-309 et pGADT7-PbRpt3-HA substitué par des alanines pour les acides aminés K188, D241, N288 et Q356, ont tous deux été optimisés pour *Xenopus laevis* et produits par l'entreprise Azenta.

Les mutations (non mentionnées ci-dessus) réalisées sur les plasmides pGAD-T7-PbRpt3 ou sur pETDuet-1-PbRpt3, ont été réalisées à l'aide du kit NEB Q5 Hot Start (New England Biolabs, M0493) et des amorces générées via l'outil NEBaseChanger (<https://nebasechanger.neb.com/>) répertoriées dans le tableau XVI. Cette stratégie a été utilisée :

- pour réaliser la mutation de 200-KVTF-203 en 200-KATA-203 sur pGADT7-PbRpt3, avec les amorces KA3 et KA4 ;
- pour l'obtention du double mutant, la mutation 305-RKAEA-309 a été réalisée sur pGADT7-PbRpt3 déjà muté KATA (amorces RK3 et RK4).

La même technique (NEB Q5 Hot Start) a été utilisée pour les mutations sur pETDuet-1-PbRpt3 :

- afin de muter 200-KVTF-203 en 200-KATA-203 sur pETDuet-1-PbRpt3, avec les amorces KA1 et KA2 ;
- pour la mutation de 305-RKIEF-309 en 305-RKAEA-309 sur pETDuet-1-PbRpt3 à l'aide des amorces RK1 et RK2 ;
- de même, pour obtenir le double mutant, la mutation 200-KVTF-203 en 200-KATA-203 a été réalisée sur le plasmide pETDuet-1-PbRpt3 déjà muté 305-RKIEF-309 (à l'aide des mêmes amorces que ci-dessus : KA1 et KA2).

Les réactions PCR ont été réalisées selon les recommandations du fabricant (New England Biolabs) avec des températures optimisées comme indiqué dans le tableau XVI. Après analyse, 1 µl de chaque produit PCR a été traité avec le mélange enzymatique KLD (kinase, ligase, DpnI). Après ce traitement par KLD, 5 µl de produit PCR ont été utilisés pour transformer des cellules compétentes (Takara, Stellar™ Competent Cells, cat # 636763). Les mutants ont été vérifiés par séquençage, et la totalité des amorces utilisées dans cette étude sont indiquées dans le tableau XVI.

Les séquences recodonisées de PbRpt3 pour une transcription optimisée en ovocytes de Xénope sont indiquées en figure 71.

nom de l'amorce	séquence	utilisation		Vecteur	
		in Fusion			
P1	TCATCACCACAGCCAGGATCCGATGAGAAAAATGGAAAAATGTTAG	cDNA de PbRpt3		pETDuet	
P2	GCATTATGCGGCCGCAAGCTTTCATATATATAAAAAATTCGTAATCTC				
P4	TCATCACCACAGCCAGGATCCACAAGTTAGTGAAAGACCAAAT	cDNA codant pour la protéine PbRpt3 tronquée de 30 kDa			
		mutations sur le plasmide pETDuet-PbRpt3		Vecteur	Tm - Q5 PCR
KA1	TGCTATAGGGGTTGTTGGATCAG	mutagenèse : PbRpt3 200KVTF203 => 200KATA203		pETDuet-PbRpt3	59°C
KA2	GTAGCTTTTGTTCATTGGCAACAG				
RK1	AGCTCCTTACCCGATAGAAAAC	mutagenèse : PbRpt3 305RKIEF309 => 305RKAEA309		pETDuet-PbRpt3 muté 305RKAEA309	
RK2	TCAGCTTTTCGATCAAGTCGACC				
KA1	TGCTATAGGGGTTGTTGGATCAG	mutagenèse : PbRpt3 PbRpt33 200KVTF203 => 200KATA203 sur le plasmide muté 305RKAEA309		pETDuet-PbRpt3 muté 305RKAEA309	
KA2	GTAGCTTTTGTTCATTGGCAACAG				
		mutations sur le plasmide pGADT7-PbRpt3		Vecteur	Tm - Q5 PCR
KA3	TGCTATTGGAGTGGTGGGATCTG	mutagenèse : PbRpt33 200KVTF203 => 200KATA203		pGADT7-PbRpt3	62°C
KA4	GTGCTTTTGTTCATTGGCCACTG				
RK3	AGCACCCTGCTGATAGGAAAC	mutagenèse : PbRpt33 305RKIEF309 => 305RKAEA309 sur le plasmide muté 200KATA203		pGADT7-PbRpt3 muté 200KATA203	60°C
RK4	TCTGCCTTCTATCCAGCCTTCC				
		transfections chez <i>P. berghei</i>			
		génotypes des parasites <i>P. berghei</i> transfectés - Knock-out		Vecteur	
QCR2	TGAAGTGCTCTTCCCTTGACCA	KO construit KO gem		PbGEM-022521	
QCR3	GGCTAGTCTTAGATGATGAAGGATCAG				
P1	TCATCACCACAGCCAGGATCCGATGAGAAAAATGGAAAAATGTTAG				
P4	TCATCACCACAGCCAGGATCCACAAGTTAGTGAAAGACCAAAT				
GW1	CATACTAGCCATTTTATGTG				
GW2	CTTTGGTGACAGATACTAC				
GT	GGACCCGGATTTATGGAAGCAGCA				
GT2	CATGTTCTGCAAGTACCCCAATAAC				
		génotypes des parasites <i>P. berghei</i> transfectés - Knock-in		Vecteur	
PF	GTATATGTGCGCATGGAATGCATATG	KI construit-mCherry		pL1886	
PR	GAGATTACGAATTTTATAATATA				
877	CTGCCCTCGATCTCGAACTC				

**Tableau XVI. Liste des amorces utilisées.**

```

atg aga aaa atg gaa aac gtg agc aaa tac ttg aag gaa gag gac tac tac ata aaa ctg
M R K M E N V S K Y L K E E D Y Y I K L 20
aag ata ctg aag aaa caa ctt gac atc ctg aat att cag gaa gag tat atc aaa gaa gag
K I L K K Q L D I L N I Q E E Y I K E E 40
cac aaa aat ctg aag agg gag ctg atc aga tct aag aac gaa atc aag aga att cag agc
H K N L K R E L I R S K N E I K R I Q S 60
gtg cca ctg att atc gga cag ttc ctg gat atc atc gat aac aac tac gga atc gtg tct
V P L I I G Q F L D I I D N N Y G I V S 80
agc aca gcc gga tct aat tat tac gtg aga att ctg agt act ctg aac aaa gag gat ctg
S T A G S N Y Y V R I L S T L N K E D L 100
aag cct tcc gtg agt gtg gct ctg cat aga cac tct cat agc att gtg aat atc ctg cca
K P S V S V A L H R H S H S I V N I L P 120
tcc gag agt gat tcc agt att cag ctg ctg cag gtg tct gaa agg cct aac gtg aaa tat
S E S D S S I Q L L Q V S E R P N V K Y 140
aca gat ctg gga gga ctg gat act cag aag cag gaa atg aga gag gct gtg gaa ctg cca
T D L G G L D T Q K Q E M R E A V E L P 160
ctg aaa agc cct gag ctg tat gaa aag att gga atc gag cca cct atg gga att ctg atc
L K S P E L Y E K I G I E P P M G I L I 180
tac gga cca cct gga aca gga aaa act atg ctg gtg aag gca gtg gcc aat gaa aca aaa
Y G P P G T G K T M L V K A V A N E T K 200
gtg act ttt att gga gtg gtg gga tct gag ttc gtg cag aag tac ctg gga gaa gga cca
V T F I G V V G S E F V Q K Y L G E G P 220
aga atg gtt agg gat gtg ttt aga ctg gca agg gag aac tct cct agc att atc ttc att
R M V R D V F R L A R E N S P S I I F I 240
gat gaa gtg gat gct atc gca aca aaa agg ttt gat gcc cag act gga gct gat agg gag
D E V D A I A T K R F D A Q T G A D R E 260
gtg cag aga att ctg ctg gaa ctg ctg aac cag atg gat gga ttt gat aaa agc aca aat
V Q R I L L E L L N Q M D G F D K S T N 280
gtg aag gtg atc atg gca aca aac aga gcc gat act ctg gac cca gcc ctg ctg agg cca
V K V I M A T N R A D T L D P A L L R P 300
gga agg ctg gat aga aag att gag ttc cca ctg cct gat agg aaa cag aag aga ctg atc
G R L D R K I E F P L P D R K Q K R L I 320
ttc cag aca atc atc tcc aag atg aac atc tct agc gat gtg aac atc gaa aac ttc gtt
F Q T I I S K M N I S S D V N I E N F V 340
gtg aga act gat aag att tcc gct gca gat att gcc gct atc gct cag gag agt gga atg
V R T D K I S A A D I A A I A Q E S G M 360
cag gca atc agg aag aac aga tac atc atc act gca agt gat ttc gaa caa ggt tac agg
Q A I R K N R Y I I T A S D F E Q G Y R 380
aca cac gtt agg aag caa ctt aga gac tac gaa ttt tac aac att tga
T H V R K Q L R D Y E F Y N I - 395

```

**Figure 71. Séquence de PbRpt3 recodonnée, optimisée pour la transcription en *Xenopus laevis*, et séquence protéique correspondante. En bleu :** nucléotides codant pour les motifs RVxF : les codons de KVTF AAAGTGACTTTT ont été substitués par les codons KATA AAAGCGACTGCT. Les codons RKIEF AGAAAGATTGAGTTC ont été substitués par les codons RKAEA AGAAAGGCAGAGGCA (pour le simple mutant), et par AGAAAGGCTGAGGCC (pour le double mutant). **En jaune :** les nucléotides codant pour les 4 acides aminés K188, D241, N288 et Q356 qui fixent et stabilisent l'ATP ont été substitués par GCA qui code pour l'alanine.

#### IV. Expression de protéines recombinantes

Les régions codantes de PbRpt3-45 kDa (a.a. 1-395) et PbRpt3-30 kDa (a.a. 131-395) ont été amplifiées par PCR avec les amorces P1-P2 et P2-P4 respectivement (tableau XVI) et clonées dans pETDuet-1 (Novagen) grâce au système de clonage In-Fusion HD (Clontech). Ces constructions ont été vérifiées par séquençage.

La préparation plasmidique pETDuet-1 a été préalablement digérée par BamHI-HindIII en vue de réaliser la fusion avec les produits PCR correspondant à l'amplification des régions d'intérêt. Les produits de fusion obtenus ont été utilisés pour transformer des bactéries compétentes Stellar. Suite aux transformations bactériennes, 6 clones (pour chaque fragment) ont été analysés. Après extraction et digestion de l'ADN plasmidique par BamHI et HindIII, deux clones par construction ont été sélectionnés (1.3, 1.6, 2.1, 2.2, 4.1 et 4.3) afin d'être séquencés.

Dans un premier temps, les mini-préparations plasmidiques (100 ng) correspondant aux clones 1.3 et 4.1 ont été utilisées pour transformer la souche *E. coli* BL21-DE3 (Life technologies). Nous avons choisi d'utiliser cette souche bactérienne, chimiquement optimisée pour la production de protéines recombinantes. En effet, l'expression de l'ARN polymérase du phage T7 est induite par l'ajout IPTG et entraîne la transcription du gène cible à partir du plasmide d'expression pETDuet-1 dans lequel le gène est cloné en aval du promoteur T7. De plus, la souche BL-21 est déficiente en protéases lon and OmpT ce qui diminue la dégradation des protéines exprimées.

La production en *E. coli* BL21-DE3 de la protéine PbRpt3 de 45 kDa a été faite en présence de 0,5 mM d'IPTG à 37°C pendant 3 heures. Après centrifugation à 3900 rpm pendant 15 min à 4°C, les culots bactériens ont été congelés à -20°C puis remis en suspension dans un tampon dénaturant à 4°C (6M Guanidine, 20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, Imidazole 20 mM, 3U de DNase I, et cocktail d'inhibiteurs de protéases 1 X de Roche (ref 4693116001) de pH 7.5. Cette suspension a été soniquée puis ultracentrifugée à 18000 rpm pendant 30 min à 4°C et le surnageant a été incubé une nuit à 4°C avec des billes d'agarose Ni-NTA (Qiagen) utilisées pour purifier les protéines recombinantes comme décrit précédemment (Fréville et al., 2013). Les suspensions de billes ont ensuite été centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes à 4°C et lavées 9 fois dans le tampon dénaturant. Les protéines ont été éluées avec 6 ml de tampon d'éluion (20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 6 M guanidine, 600 mM imidazole et 1X inhibiteur de protéase Roche) et dialysées dans différents tampons à 4°C. Premièrement en tampon de dialyse #1 (eau déionisée, Urée 4M, TrisHCl 20mM, NaCl 150mM, pH 7.5), puis en tampon #2 (Urée 1M, TrisHCl 20mM, NaCl 150mM, pH 7.5), et en tampon #3 (TrisHCl 20mM, NaCl 150mM, pH 7.5). Après dialyse, les protéines ont été concentrées sur Aquacide puis ultracentrifugées à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C. Les protéines ont été redialysées en tampon #4 (identique au tampon #3) puis conservées à -80°C.

Dans un deuxième temps, afin d'optimiser la production de protéines nous avons utilisé les préparations plasmidiques du clone 4.1 (plasmide codant pour la protéine tronquée de 30 kDa) afin de transformer une nouvelle souche bactérienne de BL21 : la souche *E. coli* ArcticExpress (DE3) chimiquement compétente (Agilent Technologies). Cette souche exprime des protéines chaperonnes appartenant à la bactérie *Oleispira antartica* qui favorisent la renaturation des protéines produites à des températures allant de 4–12°C. L'induction se fait en présence de 0,5 mM d'IPTG à 10°C pendant 24 heures. Après centrifugation à 3900 rpm pendant 30min à 4°C, les bactéries ont été congelées à -80°C pendant 12 heures puis remises en suspension dans un tampon non-dénaturant à 4°C (10 mM Tris, 500 mM NaCl, MgCl2 1mM, 3U de DNase I, et cocktail d'inhibiteurs de protéases 1 X de Roche, ref 4693116001, pH 7.9). Cette suspension a été soniquée et ultracentrifugée à 13000 rpm pendant 45 min à 4°C. Les culots correspondant aux corps d'inclusion bactériens ont été remis en suspension dans un tampon de

dénaturation (10 mM Tris, 500 mM NaCl, 6 M guanidine, 20 mM imidazole, MgCl<sub>2</sub> 1 mM et 1X inhibiteur de protéase, pH 7,9) et soniqués à nouveau. Après ultracentrifugation à 18000 rpm pendant 45 min à 4°C, le surnageant a été incubé pendant une nuit à 4°C avec des billes d'agarose Ni-NTA (Qiagen). Les suspensions de billes ont ensuite été centrifugées à 3900 rpm pendant 20 minutes à 4°C et lavées 4 fois dans du tampon dénaturant. Les protéines ont été éluées dans 12 ml de tampon d'éluion (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 6 M guanidine, 600 mM imidazole, 1 mM MgCl<sub>2</sub> et 1X inhibiteur de protéase Roche) et dialysées dans les tampons de dialyse #1 à #5 afin d'éliminer l'imidazole et la guanidine. Les tampons de dialyse ont été préparés avec 10% de glycérol, de l'eau déionisée, 500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.9. Les tampons de dialyse #1, #2 et #3 contiennent de la Guanidine à une concentration de 6M, 4M et 2M respectivement, et les tampons #4 à #5 sont identiques et sans Guanidine. Après dialyse en tampon #4, les protéines ont été ultracentrifugées à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C puis concentrées à 1,5 ml en utilisant des filtres pour centrifugeuse Amicon (Merck, Amicon Ultra-4). Les protéines ont ensuite été dialysées dans le tampon #5 pendant une nuit à 4°C, puis stockées à -80°C.

Le dosage de la concentration en protéines a été réalisée avec le kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Life Technologies) et la pureté des protéines a été vérifiée par SDS-PAGE et western blot en utilisant un anticorps primaire anti-His (1:1000, Qiagen) et un anticorps secondaire IgG anti-souris marquée HRP (dilution 1:20000, Rockland Immunochemicals). La détection par chimiluminescence a été faite par le substrat SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Life Technologies).

## V. Etude de l'interaction entre PbRpt3 et PP1c

Les séquences protéiques de PP1c de *P. falciparum* (PF3D7\_1414400) et de *P. berghei* (PBANKA\_1028300) partagent un taux d'identité très élevé (99%). Nous avons donc utilisé la protéine recombinante PfPP1c produite et purifiée en routine au laboratoire (Daher et al., 2006). Pour évaluer l'interaction entre PP1c et les protéines recombinantes PbRpt3-30kDa et PbRpt3-45kDa, un test ELISA est réalisé comme décrit précédemment (Fréville et al., 2012). Pour ce faire, des plaques Nunc-Immuno™ Microwell Maxisorp (Sigma-Aldrich) ont été utilisées et un « coating » a été réalisé pendant une nuit à 4°C avec un dépôt dans chaque puits, de 25pmol de PbRpt3-30kDa, de PbRpt3-45kDa, de Pfl2 en tant que contrôle positif ou de BSA en contrôle négatif. Ces protéines sont diluées en PBS. Après cinq lavages (PBS-Tween à 0,1%), les puits sont saturés avec 200 µl/puits de PBS additionné de 0,5% de gélatine pendant 1 heure à température ambiante. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 2 heures avec différentes quantités (0,125 pmol à 4 pmol) de PfPP1c marquée à la biotine-NHS (Calbiochem) dans du PBS-Tween 0,1 %.

La détection de l'interaction se fait par un marquage à la Streptavidine-HRP (1:150 000 dans 0,1% de PBS Tween) et son substrat triméthylbenzidine (Uptima) (100 µl/puits). La réaction est arrêtée à l'aide de HCl 2 N. Un lecteur de plaques ELISA (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific) a été utilisé pour mesurer la densité optique à 450 nm et à 570 nm. L'analyse a été réalisée par le calcul de la différence entre ces deux valeurs de D.O. Une analyse statistique a été réalisée (test U de Mann-Whitney – p-value  $p < 0,05$ ).

## VI. Etude de l'effet de PbRpt3 sur PP1c

Pour étudier le rôle de PbRpt3 sur l'activité de PfPP1c, le test du p-nitrophényl phosphate (pNPP) a été utilisé comme décrit précédemment (Daher et al., 2006). Différentes quantités de PbRpt3-30-kDa, de

PbRpt3-45kDa (de 37,5pmol à 600 pmol), ou de protéines contrôle (Pfl2 et BSA) ont été incubées (en plaque à fond plat pendant 30 minutes à 37 °C) avec 1 µg de PfPP1c. Après ajout du substrat pNPP, la plaque a été incubée pendant 1 heure à 37 °C. La variation de l'activité phosphatase de PfPP1c a été mesurée par densité optique à 405 nm. Les résultats sont présentés comme la moyenne de l'augmentation ou de la diminution de l'activité phosphatase de la PP1c par rapport à l'activité de la phosphatase (sans PbRpt3) en présence de son substrat pNPP (qui représente 100% de l'activité de PP1c).

## **VII. Analyse de la maturation chez les ovocytes de Xénope et immunoprécipitation des protéines synthétisées**

Les plasmides pGADT7-PbRpt3, pGADT7-PbRpt3-KATA, pGADT7-PbRpt3-RKAEA, pGADT7-PbRpt3-KATA/RKAEA et pGADT7-PbRpt3-mutantATP ont été linéarisés avec l'enzyme de restriction XhoI, puis utilisés comme matrice avec le kit T7 mMessage mMachine (Ambion) pour la synthèse *in vitro* de l'ARNc codant pour la protéine native ou mutée de 45 kDa.

Ces ARNc ont été microinjectés dans des ovocytes de Xénope (dans un volume de 80 nl, et une quantité de 60 ng). Le même volume d'eau a été micro-injecté comme contrôle négatif. L'ARNc de Pfl2 a été injecté comme contrôle positif (Fréville et al., 2013). Les micro-injections ont été suivies d'un traitement à la progestérone lorsque cela est indiqué (10 µM, 15 heures après la micro-injection) ainsi que dans l'expérience de la figure 51 (partie Résultats). Après 15 h, la GVBD (germinal vesicle breakdown) a été détectée par l'apparition d'une tache blanche au niveau du pôle animal de l'ovocyte (Daher et al., 2007). Les expériences ont été réalisées avec 10 ovocytes et répétées sur deux ou trois animaux.

Pour les expériences d'immunoprécipitation, 20 ovocytes ont été lysés dans 200 µl de tampon PY (50 mM de Hepes pH 7.4, 500 mM de NaCl, 0.05% de SDS, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µg/ml d'aprotinine, 10 µg/ml d'inhibiteur de trypsine de soja, 1 mg/ml de sérum-albumine bovine, 10 µg/ml de leupeptine, 1 mM de PMSF, 10 µg/ml de benzamide, 1 mM de vanadate de sodium) et centrifugés à 4°C pendant 15 min à 12000 g. Les surnageants ont été incubés avec des anticorps anti-XePP1 (Santa-Cruz Biotechnology au 1:200) en présence de billes de protéine A-sépharose (20 µl de solution de billes à 50 %, Sigma) pendant 1 heure à 4°C. Après centrifugation, les billes ont été lavées 3 fois dans du tampon PY, et les complexes protéiques ont été élués dans 25 µl de tampon Laemmli 2X (Biorad) et dénaturés à 90°C pendant 5 min. Pour l'électrophorèse, 15 µl de cet éluat sont déposés sur un gel SDS-PAGE 4-20% (mini protean TGX, BioRad), transféré sur membrane de nitrocellulose. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire anti-XePP1 (Santa-Cruz Biotechnology, 1:1500) ou avec l'anticorps anti-HA (1:1500, Invitrogen) pendant la nuit à 4°C. S'ensuit l'incubation par l'anticorps secondaire (anti-souris ou anti-lapin) dilué à 1:10000 (eBiosciences, Trueblot) et la détection en chimiluminescence réalisée par le système de détection ECL Select (Amersham) sur hyperfilm (MP, Amersham).

## **VIII. Isolation des stades parasitaires**

Les stades parasitaires ont été isolés comme décrit précédemment (Beetsma et al., 1998; Fréville et al., 2022b; Rodríguez et al., 2002).

Pour les expériences d'immunofluorescence, les parasites du stade trophozoïte ont été obtenus à partir de sang prélevé au cœur sur des souris euthanasiées et présentant une parasitémie < 5 %. Les schizontes matures ont été obtenus à partir de sang prélevé de la même manière, incubé pendant 20 heures en

milieu RPMI 1640 et préparé avec 25 mM de HEPES, 0,4% d'Albumax, 0,2 mM d'hypoxanthine et 20 µg/ml de gentamycine.

Pour l'expérience d'immunoprécipitation, une population mixte de schizontes (schizontes précoces, moyens et tardifs) a été préparée par une mise en culture de parasites pendant 15 heures (dans le même milieu) puis purifiée sur un gradient de Nycodenz à 60% (27,6% p/v de Nycodenz dans 5 mM Tris-HCl pH 7,20, 3 mM KCl, 0,3 mM EDTA). Les parasites ont ensuite été centrifugés pendant 20 min à 450 g.

Pour l'isolation des gamétocytes, 200 µl de phénylhydrazine (6 mg/ml) ont été injectés (par IP) à des souris 3 jours préalablement à l'infection par *Plasmodium berghei*. A partir du troisième jour post-infection et durant deux jours, les souris ont été traitées à la sulfadiazine (Sigma - 20 mg/l dans l'eau de boisson). Lors du cinquième jour post-infection, le sang est prélevé au cœur sur les souris euthanasiées. Pour chaque stade parasitaire préparé, la qualité des préparations a été vérifiée par examen microscopique sur des frottis colorés au Giemsa.

### IX. Génération de parasites transgéniques

Les parasites *P. berghei* ANKA-GFP ont été fournis par le Dr. Olivier Silvie (Université Pierre et Marie Curie, Paris, France). Les parasites pG230 ont été fournis par le Dr. N. Philip (The University of Edinburgh, Edinburgh, UK).

La lignée PbRpt3 KO a été générée par double recombinaison homologue d'un vecteur PlasmogEM (PbGEM-022521, Wellcome Sanger Institute) linéarisé par NotI et transfecté dans des parasites PbANKA-GFP. La lignée PbRpt3 étiquetée m-Cherry en C-terminal a été générée par simple recombinaison homologue : une région de 1228 pb de PbRpt3 (dont 289 pb en aval du codon START et sans le codon STOP) a été synthétisée et insérée dans le vecteur pL1886 par l'entreprise Genescript. Une mutation silencieuse a été insérée dans la séquence codante afin de générer un site de restriction AvrII. Suite à la linéarisation du plasmide, celui-ci a été transfecté dans la souche PbANKA-GFP comme décrit précédemment (Bushell et al., 2017; Janse et al., 2006; Manzoni et al., 2014).

Un gradient de Nycodenz a permis d'enrichir la préparation en schizontes, électroporés avec 10 µg de plasmides linéarisés. Ces schizontes ont été injectés par voie intraveineuse chez des souris saines. Les parasites positifs pour la transfection ont été sélectionnés par un traitement des souris à la pyriméthamine diluée dans l'eau de boisson (TCI - 70 mg/L).

Pour la génération des KO, 4 transfusions indépendantes ont été réalisées, sur un total de 6 souris. Les parasites transgéniques KO ont été clonés par dilution limite puis génotypés par PCR. Les amorces QCR2 - GW2 / GW1 - GT ont été utilisées pour détecter l'intégration de la cassette de résistance dhfr au locus PbRpt3 (côté 5'- et 3' respectivement), et les amorces QCR2 - P1 / QCR2 - P4 et QCR3 - P4 ont été utilisées pour détecter le gène PbRpt3 WT.

Les parasites PbRpt3-mCherry ont été enrichis par tri cellulaire sur un trieur FACSAria (Beckton Dickinson) et l'intégration de mCherry a été confirmée par PCR en utilisant les amorces PF-877 (tableau XVI). L'expression de la protéine PbRpt3-mCherry a été confirmée par western blot, la souche parentale étant utilisée comme contrôle. Les échantillons ont été repris dans du tampon Laemmli et dénaturés à 100°C pendant 3 minutes avant migration sur un gel de polyacrylamide SDS à 4-20%. Après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences), celle-ci a été incubée avec un anticorps primaire anti-RFP pAb (1:2000, MBL, PM005) produit chez le lapin et détecté par un anticorps secondaire anti-lapin HRP (1:20000, Sigma-Aldrich, A0545). La détection par chimiluminescence a été réalisée comme précédemment.

## X. Immunofluorescence

Des souris infectées par *Plasmodium berghei* PbRpt3-mCherry ont été euthanasiées et un prélèvement de sang (au cœur) a été réalisé afin de récupérer les parasites sanguins. Les parasites ont été fixés avec 4 % de paraformaldéhyde et 0,075 % de glutaraldéhyde pendant 10 min à 4°C, puis centrifugés à 2000 rpm pendant 2 min à température ambiante. Les étapes de sédimentation, de perméabilisation et de saturation ont été réalisées comme décrit précédemment (Hollin et al., 2019). Les parasites ont été incubés avec une dilution d'anticorps pAb anti-RFP (MBL, PM005) au 1:500 dans du PBS BSA 1%, pendant 1h à 37° C. Après un lavage au PBS, les lamelles ont été incubées avec l'anticorps anti-lapin IgG Cross-Adsorbed, Alexa Fluor 594 (Life Technologies, A11012) dilué au 1:1000 dans du PBS BSA 1%. Les noyaux parasitaires ont été colorés au DAPI (concentration de 1µg/ml dans du PBS BSA 1%), pendant 1 heure à 37°C. Les lamelles ont été montées dans du Mowiol (3µl), et les observations ont été réalisées par microscopie confocale (microscope Zeiss LSM880). Le traitement des images a été réalisé avec le logiciel ImageJ.

## XI. Préparation des échantillons et identification des peptides par NanoLC-MS/MS

Les parasites WT utilisés (contrôle), ou les parasites PbRpt3-mCherry ont été purifiés comme décrit précédemment. Les préparations contiennent une population mixte de schizontes. Ceux-ci ont été suspendus dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl, 0,5% Triton X100 et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche), pH 8.

10 cycles de congélation-décongélation ont été réalisés suivis d'une sonication (cycles on/off de 30") et d'une centrifugation (5 heures à 13 000 rpm et 4° C). Ce traitement a permis d'obtenir les fractions solubles. Les billes RFP-Trap1\_A (Chromotek) ont été équilibrées avec un tampon de dilution (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100 et cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche), pH 7,5). Les billes RFP-Trap1\_A (Chromotek) ont ensuite été incubées la nuit à 4° C (sur roue) avec les extraits parasitaires solubles puis lavées 10 fois avec du tampon de dilution. L'élution a été réalisée par ajout de tampon Laemmli 3 min à 100° C et les 8 échantillons (4 échantillons biologiques pour les schizontes PbWT-GFP après une culture de 15h, et 4 échantillons biologiques pour les schizontes PbRpt3-mCherry après une culture de 15h) ont été stockés à -20°C pour l'expérience de spectrométrie de masse. La présence de PbRpt3-mCherry dans l'IP a été vérifiée par analyse western blot (cf partie Résultats).

Les quatre réplicats biologiques de chaque échantillon ont été préparés puis analysés par spectrométrie de masse par l'équipe de la Dr. Chiara Guerrera (Proteomics platform Necker, Université Paris Cité - Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UAR3633, Paris 75015, France). L'identification et quantification des protéines ont été réalisés par NanoLC-MS/MS et les données brutes déposées auprès du consortium ProteomeXchange via [https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/\(PXD044616\)](https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/(PXD044616)). L'analyse des données a été faite par le logiciel DIA-NN (version 1.8.1) (Demichev et al., 2020) en effectuant les recherches dans la base de données UniProt/Swiss-Prot *Mus musculus* téléchargée de Uniprot le 09/01/2023 (17574 entrées) et dans la base de données *Plasmodium berghei* ANKA téléchargée de PlasmoDB téléchargée le 17/05/2023 (Release 63). Les analyses statistiques et bioinformatiques, y compris le volcano plot, ont été réalisés avec le logiciel Perseus (version 1.6.15) (Tyanova et al., 2016) disponible à l'adresse [www.perseus-framework.org](http://www.perseus-framework.org). Les données LFQ (Label-Free Quantification) ont été représentées en log2 et les protéines identifiées dans au moins 3 / 4 réplicats biologiques de PbRpt3-mCherry, et absentes des échantillons WT, ont été retenues comme partenaires potentiels de PbRpt3.





## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R., 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797–3804. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3797>
- Adams, Y., Kuhnrae, P., Higgins, M.K., Ghumra, A., Rowe, J.A., 2014. Rosetting *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes Bind to Human Brain Microvascular Endothelial Cells *in vitro*, Demonstrating a Dual Adhesion Phenotype Mediated by Distinct *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 Domains. *Infect. Immun.* 82, 949–959. <https://doi.org/10.1128/iai.01233-13>
- Adderley, J.D., John von Freyend, S., Jackson, S.A., Bird, M.J., Burns, A.L., Anar, B., Metcalf, T., Semblat, J.-P., Billker, O., Wilson, D.W., Doerig, C., 2020. Analysis of erythrocyte signalling pathways during *Plasmodium falciparum* infection identifies targets for host-directed antimalarial intervention. *Nat. Commun.* 11, 4015. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17829-7>
- Aggen, J.B., Nairn, A.C., Chamberlin, R., 2000. Regulation of protein phosphatase-1. *Chem. Biol.* 7, R13–R23. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00069-7)
- Aikawa, M., Hepler, P.K., Huff, C.G., Sprinz, H., 1966. The feeding mechanism of avian malarial parasites. *J. Cell Biol.* 28, 355–373. <https://doi.org/10.1083/jcb.28.2.355>
- Akhouri, R.R., Goel, S., Furusho, H., Skoglund, U., Wahlgren, M., 2016. Architecture of Human IgM in Complex with *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1. *Cell Rep.* 14, 723–736. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.067>
- Akutsu, M., Dikic, I., Bremm, A., 2016. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 875–880. <https://doi.org/10.1242/jcs.183954>
- Alam, M.M., Solyakov, L., Bottrill, A.R., Flueck, C., Siddiqui, F.A., Singh, S., Mistry, S., Viskaduraki, M., Lee, K., Hopp, C.S., Chitnis, C.E., Doerig, C., Moon, R.W., Green, J.L., Holder, A.A., Baker, D.A., Tobin, A.B., 2015. Phosphoproteomics reveals malaria parasite Protein Kinase G as a signalling hub regulating egress and invasion. *Nat. Commun.* 6, 7285. <https://doi.org/10.1038/ncomms8285>
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, Ilan, Friedberg, Iddo, Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T., 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699–711. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.018>
- Amato, R., Lim, P., Miotto, O., Amaratunga, C., Dek, D., Pearson, R.D., Almagro-Garcia, J., Neal, A.T., Sreng, S., Suon, S., Drury, E., Jyothi, D., Stalker, J., Kwiatkowski, D.P., Fairhurst, R.M., 2017. Genetic markers associated with dihydroartemisinin–piperaquine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype–phenotype association study. *Lancet Infect. Dis.* 17, 164–173. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30409-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30409-1)
- Aminake, M.N., Schoof, S., Sologub, L., Leubner, M., Kirschner, M., Arndt, H.-D., Pradel, G., 2011. Thiostrepton and Derivatives Exhibit Antimalarial and Gametocytocidal Activity by Dually Targeting Parasite Proteasome and Apicoplast. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1338–1348. <https://doi.org/10.1128/AAC.01096-10>
- Amoroso, M.R., Matassa, D.S., Laudiero, G., Egorova, A.V., Polishchuk, R.S., Maddalena, F., Piscazzi, A., Paladino, S., Sarnataro, D., Garbi, C., Landriscina, M., Esposito, F., 2012. TRAP1 and the proteasome regulatory particle TBP7/Rpt3 interact in the endoplasmic reticulum and control cellular ubiquitination of specific mitochondrial proteins. *Cell Death Differ.* 19, 592–604. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.128>
- Anamika, Srinivasan, N., Krupa, A., 2004. A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 58, 180–189. <https://doi.org/10.1002/prot.20278>
- Andreadaki, M., Hanssen, E., Deligianni, E., Claudet, C., Wengelnik, K., Mollard, V., McFadden, G.I., Abkarian, M., Braun-Breton, C., Siden-Kiamos, I., 2018. Sequential Membrane Rupture and Vesiculation during *Plasmodium berghei* Gametocyte Egress from the Red Blood Cell. *Sci. Rep.* 8, 3543. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21801-3>
- Anstey, N.M., Russell, B., Yeo, T.W., Price, R.N., 2009. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol.* 25, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.003>

- Antonova-Koch, Y., Meister, S., Abraham, M., Luth, M.R., Otilie, S., Lukens, A.K., Sakata-Kato, T., Vanaerschot, M., Owen, E., Jado, J.C., Maher, S.P., Calla, J., Plouffe, D., Zhong, Y., Chen, K., Chaumeau, V., Conway, A.J., McNamara, C.W., Ibanez, M., Gagaring, K., Serrano, F.N., Eribez, K., Taggard, C.M., Cheung, A.L., Lincoln, C., Ambachew, B., Rouillier, M., Siegel, D., Nosten, F., Kyle, D.E., Gamo, F.-J., Zhou, Y., Llinás, M., Fidock, D.A., Wirth, D.F., Burrows, J., Campo, B., Winzeler, E.A., 2018. Open-source discovery of chemical leads for next-generation chemoprotective antimalarials. *Science* 362, eaat9446. <https://doi.org/10.1126/science.aat9446>
- Arkwright, R., Pham, T.M., Zonder, J.A., Dou, Q.P., 2017. The Preclinical Discovery and Development of Bortezomib for the Treatment of Mantle Cell Lymphoma. *Expert Opin. Drug Discov.* 12, 225–235. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1268596>
- Aroonsri, A., Akinola, O., Posayapisit, N., Songsunthong, W., Uthaipibull, C., Kamchonwongpaisan, S., Gbotosho, G.O., Yuthavong, Y., Shaw, P.J., 2016. Identifying antimalarial compounds targeting dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) by chemogenomic profiling. *Int. J. Parasitol.* 46, 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.04.002>
- Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L., Welch, W.J., 1988. Identity of the 19S “prosome” particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 331, 192–194. <https://doi.org/10.1038/331192a0>
- Ayllón, V., Cayla, X., García, A., Fleischer, A., Rebollo, A., 2002. The anti-apoptotic molecules Bcl-xL and Bcl-w target protein phosphatase 1 alpha to Bad. *Eur. J. Immunol.* 32, 1847–1855. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200207\)32:7<1847::AID-IMMU1847>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200207)32:7<1847::AID-IMMU1847>3.0.CO;2-7)
- Balestra, A.C., Koussis, K., Klages, N., Howell, S.A., Flynn, H.R., Bantscheff, M., Pasquarello, C., Perrin, A.J., Brusini, L., Arboit, P., Sanz, O., Castaño, L.P.-B., Withers-Martinez, C., Hainard, A., Ghidelli-Disse, S., Snijders, A.P., Baker, D.A., Blackman, M.J., Brochet, M., 2021. Ca<sup>2+</sup> signals critical for egress and gametogenesis in malaria parasites depend on a multipass membrane protein that interacts with PKG. *Sci. Adv.* 7, eabe5396. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5396>
- Banerjee, S., Ji, C., Mayfield, J.E., Goel, A., Xiao, J., Dixon, J.E., Guo, X., 2018. Ancient drug curcumin impedes 26S proteasome activity by direct inhibition of dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 8155–8160. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806797115>
- Barrera, V., Haley, M.J., Strangward, P., Attree, E., Kamiza, S., Seydel, K.B., Taylor, T.E., Milner, D.A., Craig, A.G., Couper, K.N., 2019. Comparison of CD8+ T Cell Accumulation in the Brain During Human and Murine Cerebral Malaria. *Front. Immunol.* 10, 1747. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01747>
- Beetsma, A.L., van de Wiel, T.J., Sauerwein, R.W., Eling, W.M., 1998. *Plasmodium berghei* ANKA: purification of large numbers of infectious gametocytes. *Exp. Parasitol.* 88, 69–72. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4203>
- Ben-Nissan, G., Katzir, N., Füzesi-Levi, M.G., Sharon, M., 2022. Biology of the Extracellular Proteasome. *Biomolecules* 12, 619. <https://doi.org/10.3390/biom12050619>
- Berndt, N., Karim, R.M., Schönbrunn, E., 2017. Advances of small molecule targeting of kinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 39, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.06.015>
- Bhattacharyya, M.K., Hong, Z., Kongkasuriyachai, D., Kumar, N., 2002. *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Parasitol.* 32, 739–747. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00007-3)
- Bian, Y., Song, C., Cheng, K., Dong, M., Wang, F., Huang, J., Sun, D., Wang, L., Ye, M., Zou, H., 2014. An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J. Proteomics* 96, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.014>
- BioNTech Initiates Phase 1 Clinical Trial for Malaria Vaccine Program BNT165. <https://investors.biontech.de/news-releases/news-release-details/biontech-initiates-phase-1-clinical-trial-malaria-vaccine/>
- Bollen, M., 2001. Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem. Sci.* 26, 426–431. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01836-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01836-9)

- Bollen, M., Gerlich, D.W., Lesage, B., 2009. Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends Cell Biol.* 19, 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.06.005>
- Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M.J., Beullens, M., 2010. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem. Sci.* 35, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.002>
- Bridgford, J.L., Xie, S.C., Cobbold, S.A., Pasaje, C.F.A., Herrmann, S., Yang, T., Gillett, D.L., Dick, L.R., Ralph, S.A., Dogovski, C., Spillman, N.J., Tilley, L., 2018. Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat. Commun.* 9, 3801. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06221-1>
- Briquet, S., Gissot, M., Silvie, O., 2022. A toolbox for conditional control of gene expression in apicomplexan parasites. *Mol. Microbiol.* 117, 618–631. <https://doi.org/10.1111/mmi.14821>
- Büngener, W., 1979. [Malaria plasmodia in the mouse. Parasitization of mature and immature erythrocytes by *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium chabaudi* (author's trans)]. *Tropenmed. Parasitol.* 30, 198–205.
- Burda, P.-C., Ramaprasad, A., Bielfeld, S., Pietsch, E., Weitalla, A., Söhnchen, C., Singh, M.N., Strauss, J., Sait, A., Collinson, L.M., Schwudke, D., Blackman, M.J., Gilberger, T.-W., 2023. Global analysis of putative phospholipases in *Plasmodium falciparum* reveals an essential role of the phosphoinositide-specific phospholipase C in parasite maturation. *mBio* 0, e01413-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.01413-23>
- Bushell, E., Gomes, A.R., Sanderson, T., Anar, B., Girling, G., Herd, C., Metcalf, T., Modrzynska, K., Schwach, F., Martin, R.E., Mather, M.W., McFadden, G.I., Parts, L., Rutledge, G.G., Vaidya, A.B., Wengelnik, K., Rayner, J.C., Billker, O., 2017. Functional Profiling of a *Plasmodium* Genome Reveals an Abundance of Essential Genes. *Cell* 170, 260-272.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.030>
- Cao, X., Lemaire, S., Bollen, M., 2022. Protein phosphatase 1: life-course regulation by SDS22 and Inhibitor-3. *FEBS J.* 289, 3072–3085. <https://doi.org/10.1111/febs.16029>
- Carnevale, P., Robert, V. (Eds.), 2017. 4. Les principales espèces vectrices, in: *Les anophèles : Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*, Didactiques. IRD Éditions, Marseille, pp. 87–145. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.10390>
- Castaño, J.G., Mahillo, E., Arizti, P., Arribas, J., 1996. Phosphorylation of C8 and C9 Subunits of the Multicatalytic Proteinase by Casein Kinase II and Identification of the C8 Phosphorylation Sites by Direct Mutagenesis. *Biochemistry* 35, 3782–3789. <https://doi.org/10.1021/bi952540s>
- Ceulemans, H., Bollen, M., 2004. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev.* 84, 1–39. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2003>
- Chatterjee, J., Köhn, M., 2013. Targeting the untargetable: recent advances in the selective chemical modulation of protein phosphatase-1 activity. *Curr. Opin. Chem. Biol., Next generation therapeutics • Energy* 17, 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.008>
- Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., Dou, Q.P., 2011. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr. Cancer Drug Targets* 11, 239–253. <https://doi.org/10.2174/156800911794519752>
- Chen, M.J., Dixon, J.E., Manning, G., 2017. Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci. Signal.* 10, eaag1796. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag1796>
- Choy, M.S., Hieke, M., Kumar, G.S., Lewis, G.R., Gonzalez-DeWhitt, K.R., Kessler, R.P., Stein, B.J., Hessenberger, M., Nairn, A.C., Peti, W., Page, R., 2014. Understanding the antagonism of retinoblastoma protein dephosphorylation by PNUTS provides insights into the PP1 regulatory code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4097–4102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317395111>
- Choy, M.S., Moon, T.M., Ravindran, R., Bray, J.A., Robinson, L.C., Archuleta, T.L., Shi, W., Peti, W., Tatchell, K., Page, R., 2019. SDS22 selectively recognizes and traps metal-deficient inactive PP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 20472–20481. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908718116>

- Chu, M., An, X., Fu, C., Yu, H., Zhang, D., Li, Q., Man, X., Dai, X., Li, Z., 2023. Disulfiram/Copper Induce Ferroptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231. *Front. Biosci.-Landmark* 28, 186. <https://doi.org/10.31083/j.fb12808186>
- Chu-Ping, M., Vu, J.H., Proske, R.J., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N., 1994. Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 269, 3539–3547.
- Clague, M.J., Heride, C., Urbé, S., 2015. The demographics of the ubiquitin system. *Trends Cell Biol.* 25, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.03.002>
- Cohen, P.T.W., 2002. Protein phosphatase 1 – targeted in many directions. *J. Cell Sci.* 115, 241–256. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.2.241>
- Cook, A.D., Roberts, A.J., Atherton, J., Tewari, R., Topf, M., Moores, C.A., 2021. Cryo-EM structure of a microtubule-bound parasite kinesin motor and implications for its mechanism and inhibition. *J. Biol. Chem.* 297, 101063. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101063>
- Coulson, R.M.R., Hall, N., Ouzounis, C.A., 2004. Comparative Genomics of Transcriptional Control in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Res.* 14, 1548–1554. <https://doi.org/10.1101/gr.2218604>
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L., 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 801–847. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.004101>
- Craig, R.A., Liao, L., 2007. Phylogenetic tree information aids supervised learning for predicting protein-protein interaction based on distance matrices. *BMC Bioinformatics* 8, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-6>
- Crespo-Ortiz, M.P., Wei, M.Q., 2012. Antitumor Activity of Artemisinin and Its Derivatives: From a Well-Known Antimalarial Agent to a Potential Anticancer Drug. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 247597. <https://doi.org/10.1155/2012/247597>
- Czesny, B., Goshu, S., Cook, J.L., Williamson, K.C., 2009. The proteasome inhibitor epoxomicin has potent *Plasmodium falciparum* gametocytocidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4080–4085. <https://doi.org/10.1128/AAC.00088-09>
- Daher, W., Browaeys, E., Pierrot, C., Jouin, H., Dive, D., Meurice, E., Dissous, C., Capron, M., Tomavo, S., Doerig, C., Cailliau, K., Khalife, J., 2006. Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by PFLRR1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 60, 578–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05119.x>
- Daher, W., Oria, G., Fauquenoy, S., Cailliau, K., Browaeys, E., Tomavo, S., Khalife, J., 2007. A *Toxoplasma gondii* leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity. *Eukaryot. Cell* 6, 1606–1617. <https://doi.org/10.1128/EC.00260-07>
- Dattoo, M.S., Natama, H.M., Somé, A., Bellamy, D., Traoré, O., Rouamba, T., Tahita, M.C., Ido, N.F.A., Yameogo, P., Valia, D., Millogo, A., Ouedraogo, F., Soma, R., Sawadogo, S., Sorgho, F., Derra, K., Rouamba, E., Ramos-Lopez, F., Cairns, M., Provstgaard-Morys, S., Aboagye, J., Lawrie, A., Roberts, R., Valéa, I., Sorgho, H., Williams, N., Glenn, G., Fries, L., Reimer, J., Ewer, K.J., Shaligram, U., Hill, A.V.S., Tinto, H., 2022. Efficacy and immunogenicity of R21/Matrix-M vaccine against clinical malaria after 2 years' follow-up in children in Burkina Faso: a phase 1/2b randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 22, 1728–1736. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00442-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00442-X)
- Daub, H., Olsen, J.V., Bairlein, M., Gnad, F., Oppermann, F.S., Körner, R., Greff, Z., Kéri, G., Stemmann, O., Mann, M., 2008. Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol. Cell* 31, 438–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.007>
- Dawson, S., Apcher, S., Mee, M., Mayer, R.J., Higashitsuji, H., Baker, R., Uhle, S., Dubiel, W., Fujita, J., 2002. Gankyrin Is an Ankyrin-repeat Oncoprotein That Interacts with CDK4 Kinase and the S6 ATPase of the 26 S Proteasome. *J. Biol. Chem.* 277, 10893–10902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107313200>

- De la Peña, A.H., Goodall, E.A., Gates, S.N., Lander, G.C., Martin, A., 2018. Substrate-engaged 26S proteasome structures reveal mechanisms for ATP-hydrolysis-driven translocation. *Science* 362, eaav0725. <https://doi.org/10.1126/science.aav0725>
- De Witte, C., Aliouat, E.M., Chhuon, C., Guerrero, I.C., Pierrot, C., Khalife, J., 2022. Mapping PP1c and Its Inhibitor 2 Interactomes Reveals Conserved and Specific Networks in Asexual and Sexual Stages of *Plasmodium*. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1069. <https://doi.org/10.3390/ijms23031069>
- Déchamps, S., Wengelnic, K., Berry-Sterkers, L., Cerdan, R., Vial, H.J., Gannoun-Zaki, L., 2010. The Kennedy phospholipid biosynthesis pathways are refractory to genetic disruption in *Plasmodium berghei* and therefore appear essential in blood stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* 173, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.05.006>
- Demichev, V., Messner, C.B., Vernardis, S.I., Lilley, K.S., Ralser, M., 2020. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat. Methods* 17, 41–44. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0638-x>
- Deni, I., Stokes, B.H., Ward, K.E., Fairhurst, K.J., Pasaje, C.F.A., Yeo, T., Akbar, S., Park, H., Muir, R., Bick, D.S., Zhan, W., Zhang, H., Liu, Y.J., Ng, C.L., Kirkman, L.A., Almaliti, J., Gould, A.E., Duffey, M., O'Donoghue, A.J., Uhlemann, A.-C., Niles, J.C., da Fonseca, P.C.A., Gerwick, W.H., Lin, G., Bogoyo, M., Fidock, D.A., 2023. Mitigating the risk of antimalarial resistance via covalent dual-subunit inhibition of the *Plasmodium* proteasome. *Cell Chem. Biol.* 30, 470-485.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.03.002>
- Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., Gygi, S.P., 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10762–10767. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805139105>
- Deveuve, Q., Lesage, K., Mouveaux, T., Gissot, M., 2017. The *Toxoplasma gondii* inhibitor-2 regulates protein phosphatase 1 activity through multiple motifs. *Parasitol. Res.* 116, 2417–2426. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5543-6>
- Di Paolo, G., De Camilli, P., 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651–657. <https://doi.org/10.1038/nature05185>
- Dogovski, C., Xie, S.C., Burgio, G., Bridgford, J., Mok, S., McCaw, J.M., Chotivanich, K., Kenny, S., Gnädig, N., Straimer, J., Bozdech, Z., Fidock, D.A., Simpson, J.A., Dondorp, A.M., Foote, S., Klonis, N., Tilley, L., 2015. Targeting the cell stress response of *Plasmodium falciparum* to overcome artemisinin resistance. *PLoS Biol.* 13, e1002132. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002132>
- Dohadwala, M., da Cruz e Silva, E.F., Hall, F.L., Williams, R.T., Carbonaro-Hall, D.A., Nairn, A.C., Greengard, P., Berndt, N., 1994. Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6408–6412. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6408>
- Dombrádi, V., Kókai, E., Farkas, I., 2004. Protein phosphatase 1, in: Ariño, J. n., Alexander, D.R. (Eds.), *Protein Phosphatases, Topics in Current Genetics*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 21–44. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-40035-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-40035-6_2)
- Dong, S., Dong, Y., Simões, M.L., Dimopoulos, G., 2022. Mosquito transgenesis for malaria control. *Trends Parasitol.* 38, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.08.001>
- Dong, Y., Zhang, S., Wu, Z., Li, X., Wang, W.L., Zhu, Y., Stoilova-McPhie, S., Lu, Y., Finley, D., Mao, Y., 2019. Cryo-EM structures and dynamics of substrate-engaged human 26S proteasome. *Nature* 565, 49–55. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0736-4>
- Eappen, A.G., Li, T., Marquette, M., Chakravarty, S., Kc, N., Zanghi, G., Hoffman, B.U., Hettiarachchi, H., Patil, A., Abebe, Y., Tran, C., Yossef, A.A., McWilliams, I., Morrison, R.D., Rathakrishnan, A., Inbar, E., Aly, A.S.I., De La Vega, P., Belmonte, M., Sedegah, M., Wai, T., Campo, J.J., King, H., Kappe, S.H.I., Li, M., Billingsley, P.F., Sim, B.K.L., Hoffman, S.L., 2022. *In vitro* production of infectious *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 612, 534–539. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05466-7>

- Ebrahimzadeh, Z., Mukherjee, A., Crochetière, M.-È., Sergerie, A., Amiar, S., Thompson, L.A., Gagnon, D., Gaumont, D., Stahelin, R.V., Dacks, J.B., Richard, D., 2019. A pan-apicomplexan phosphoinositide-binding protein acts in malarial microneme exocytosis. *EMBO Rep.* 20, e47102. <https://doi.org/10.15252/embr.201847102>
- Egloff, M.P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T., Cohen, P., Barford, D., 1997. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J.* 16, 1876–1887. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1876>
- Enenkel, C., Kang, R.W., Wilfling, F., Ernst, O.P., 2022. Intracellular localization of the proteasome in response to stress conditions. *J. Biol. Chem.* 298, 102083. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102083>
- Enhanced serum proteolysis resistance of cell-penetrating peptides <https://oec.ovid.com/article/01436928-201502000-00007/HTML> (accessed 8.23.23).
- Erzberger, J.P., Berger, J.M., 2006. Evolutionary Relationships and Structural Mechanisms of Aaa+ Proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35, 93–114. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101933>
- Eto, M., 2009. Regulation of Cellular Protein Phosphatase-1 (PP1) by Phosphorylation of the CPI-17 Family, C-kinase-activated PP1 Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 284, 35273–35277. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.059972>
- Fardilha, M., Esteves, S.L.C., Korrodi-Gregório, L., da Cruz e Silva, O. a. B., da Cruz e Silva, F.F., 2010. The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interacting proteins to health and disease. *Curr. Med. Chem.* 17, 3996–4017. <https://doi.org/10.2174/092986710793205363>
- Fernandes, P., Briquet, S., Patarot, D., Loubens, M., Hoareau-Coudert, B., Silvie, O., 2020. The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of *Plasmodium berghei*. *PLOS ONE* 15, e0236616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616>
- Fernandes, P., Loubens, M., Silvie, O., Briquet, S., 2021. Conditional Gene Deletion in Mammalian and Mosquito Stages of *Plasmodium berghei* Using Dimerizable Cre Recombinase. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 2369, 101–120. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1681-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1681-9_7)
- Fernandez, A., Brautigan, D.L., Lamb, N.J.C., 1992. Protein Phosphatase Type I in Mammalian Cell Mitosis : Chromosomal Localization and Involvement in Mitotic Exit. *J. Cell Biol.* 116.
- Ferreira-Fernandes, E., Esteves, S.L.C., Korrodi-Gregório, L., Luers, G., Afreixo, V., Fardilha, M., da Cruz e Silva, O.A.B., 2015. Synphilin-1A is a Phosphoprotein Phosphatase 1-Interacting Protein and Affects PPP1 Sorting to Subcellular Compartments. *J. Mol. Neurosci.* 55, 385–395. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0343-2>
- Fort, P., Kajava, A.V., Delsuc, F., Coux, O., 2015. Evolution of proteasome regulators in eukaryotes. *Genome Biol. Evol.* 7, 1363–1379. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv068>
- Fréville, A., Cailliau-Maggio, K., Pierrot, C., Tellier, G., Kalamou, H., Lafitte, S., Martoriati, A., Pierce, R.J., Bodart, J.-F., Khalife, J., 2013. *Plasmodium falciparum* encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1: perspectives for novel anti-plasmodial therapy. *BMC Biol.* 11, 80. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-80>
- Fréville, A., Gnanngnon, B., Khelifa, A.S., Gissot, M., Khalife, J., Pierrot, C., 2022a. Deciphering the Role of Protein Phosphatases in Apicomplexa: The Future of Innovative Therapeutics? *Microorganisms* 10, 585. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030585>
- Fréville, A., Gnanngnon, B., Tremp, A.Z., De Witte, C., Cailliau, K., Martoriati, A., Aliouat, E.M., Fernandes, P., Chhuon, C., Silvie, O., Marion, S., Guerrero, I.C., Dessens, J.T., Pierrot, C., Khalife, J., 2022b. *Plasmodium berghei* leucine-rich repeat protein 1 downregulates protein phosphatase 1 activity and is required for efficient oocyst development. *Open Biol.* 12, 220015. <https://doi.org/10.1098/rsob.220015>
- Fréville, A., Landrieu, I., García-Gimeno, M.A., Vicogne, J., Montbarbon, M., Bertin, B., Verger, A., Kalamou, H., Sanz, P., Werkmeister, E., Pierrot, C., Khalife, J., 2012. *Plasmodium falciparum* Inhibitor-3 Homolog Increases Protein Phosphatase Type 1 Activity and Is Essential for Parasitic Survival\*. *J. Biol. Chem.* 287, 1306–1321. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.276865>

- Fréville, A., Tellier, G., Vandomme, A., Pierrot, C., Vicogne, J., Cantrelle, F.-X., Martoriati, A., Cailliau-Maggio, K., Khalife, J., Landrieu, I., 2014. Identification of a *Plasmodium falciparum* inhibitor-2 motif involved in the binding and regulation activity of protein phosphatase type 1. *FEBS J.* 281, 4519–4534. <https://doi.org/10.1111/febs.12960>
- Füssy, Z., Masařová, P., Krućinská, J., Esson, H.J., Oborník, M., 2017. Budding of the Alveolate Alga *Vitrella brassicaformis* Resembles Sexual and Asexual Processes in Apicomplexan Parasites. *Protist* 168, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.12.001>
- Gajadhar, A.A., Marquardt, W.C., Hall, R., Gunderson, J., Ariztia-Carmona, E.V., Sogin, M.L., 1991. Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptosporidium parvum* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates, and ciliates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45, 147–154. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90036-6)
- Gantt, S.M., Myung, J.M., Briones, M.R., Li, W.D., Corey, E.J., Omura, S., Nussenzweig, V., Sinnis, P., 1998. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2731–2738. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.10.2731>
- Gnangnon, B., Fréville, A., Cailliau, K., Leroy, C., De Witte, C., Tulasne, D., Martoriati, A., Jung, V., Guerrero, I.C., Marion, S., Khalife, J., Pierrot, C., 2019. *Plasmodium* pseudo-Tyrosine Kinase-like binds PP1 and SERA5 and is exported to host erythrocytes. *Sci. Rep.* 9, 8120. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44542-3>
- Goldberg, J., Huang, H.B., Kwon, Y.G., Greengard, P., Nairn, A.C., Kuriyan, J., 1995. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376, 745–753. <https://doi.org/10.1038/376745a0>
- Goldfless, S.J., Wagner, J.C., Niles, J.C., 2014. Versatile control of *Plasmodium falciparum* gene expression with an inducible protein–RNA interaction. *Nat. Commun.* 5, 5329. <https://doi.org/10.1038/ncomms6329>
- Gomes, P.S., Bhardwaj, J., Rivera-Correa, J., Freire-De-Lima, C.G., Morrot, A., 2016. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Front. Microbiol.* 7.
- Gonzales, S.J., Reyes, R.A., Braddock, A.E., Batugedara, G., Bol, S., Bunnik, E.M., 2020. Naturally Acquired Humoral Immunity Against *Plasmodium falciparum* Malaria. *Front. Immunol.* 11, 594653. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594653>
- Goodman, C.D., Siregar, J.E., Mollard, V., Vega-Rodríguez, J., Syafruddin, D., Matsuoka, H., Matsuzaki, M., Toyama, T., Sturm, A., Cozijnsen, A., Jacobs-Lorena, M., Kita, K., Marzuki, S., McFadden, G.I., 2016. Parasites resistant to the antimalarial atovaquone fail to transmit by mosquitoes. *Science* 352, 349–353. <https://doi.org/10.1126/science.aad9279>
- Gowda, N.M., Wu, X., Gowda, D.C., 2011. The Nucleosome (Histone-DNA Complex) Is the TLR9-Specific Immunostimulatory Component of *Plasmodium falciparum* That Activates DCs. *PLOS ONE* 6, e20398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020398>
- Grau, G.E., Mackenzie, C.D., Carr, R.A., Redard, M., Pizzolato, G., Allasia, C., Cataldo, C., Taylor, T.E., Molyneux, M.E., 2003. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* 187, 461–466. <https://doi.org/10.1086/367960>
- Green, J.L., Wu, Y., Encheva, V., Lasonder, E., Prommaban, A., Kunzelmann, S., Christodoulou, E., Grainger, M., Truongvan, N., Bothe, S., Sharma, V., Song, W., Pinzuti, I., Uthaipibull, C., Srichairatanakool, S., Birault, V., Langsley, G., Schindelin, H., Stieglitz, B., Snijders, A.P., Holder, A.A., 2020. Ubiquitin activation is essential for schizont maturation in *Plasmodium falciparum* blood-stage development. *PLOS Pathog.* 16, e1008640. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008640>
- Gregson, A., Plowe, C.V., 2005. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. *Pharmacol. Rev.* 57, 117–145. <https://doi.org/10.1124/pr.57.1.4>
- Groll, M., Huber, R., 2004. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1695, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.025>



- Gronostajski, R.M., Pardee, A.B., Goldberg, A.L., 1985. The ATP dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 260, 3344–3349. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83626-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83626-8)
- Guo, X., 2022. Localized Proteasomal Degradation: From the Nucleus to Cell Periphery. *Biomolecules* 12, 229. <https://doi.org/10.3390/biom12020229>
- Guo, X., Engel, J.L., Xiao, J., Tagliabracci, V.S., Wang, X., Huang, L., Dixon, J.E., 2011. UBLCP1 is a 26S proteasome phosphatase that regulates nuclear proteasome activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18649–18654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113170108>
- Guo, X., Huang, X., Chen, M.J., 2017. Reversible phosphorylation of the 26S proteasome. *Protein Cell* 8, 255–272. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0382-x>
- Guo, X., Wang, X., Wang, Z., Banerjee, S., Yang, J., Huang, L., Dixon, J.E., 2016. Site-specific proteasome phosphorylation controls cell proliferation and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 18, 202–212. <https://doi.org/10.1038/ncb3289>
- Guttery, D.S., Poulin, B., Ramaprasad, A., Wall, R.J., Ferguson, D.J.P., Brady, D., Patzewitz, E.-M., Whipple, S., Straschil, U., Wright, M.H., Mohamed, A.M.A.H., Radhakrishnan, A., Arold, S.T., Tate, E.W., Holder, A.A., Wickstead, B., Pain, A., Tewari, R., 2014. Genome-wide Functional Analysis of *Plasmodium* Protein Phosphatases Reveals Key Regulators of Parasite Development and Differentiation. *Cell Host Microbe* 16, 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.020>
- Haga, K., Sakai, T., 2018. Involvement of PP6-type protein phosphatase in hypocotyl phototropism in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Signal. Behav.* 13, e1536631. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1536631>
- Halgren, T.A., 1999. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem.* 20, 720–729. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199905\)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199905)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X)
- Hamilton, W.L., Amato, R., Van Der Pluijm, R.W., Jacob, C.G., Quang, H.H., Thuy-Nhien, N.T., Hien, T.T., Hongvanthong, B., Chindavongsa, K., Mayxay, M., Huy, R., Leang, R., Huch, C., Dysoley, L., Amaratunga, C., Suon, S., Fairhurst, R.M., Tripura, R., Peto, T.J., Sovann, Y., Jittamala, P., Hanboonkunupakarn, B., Pukrittayakamee, S., Chau, N.H., Imwong, M., Dhorda, M., Vongpromek, R., Chan, X.H.S., Maude, R.J., Pearson, R.D., Nguyen, T., Rockett, K., Drury, E., Gonçalves, S., White, N.J., Day, N.P., Kwiatkowski, D.P., Dondorp, A.M., Miotto, O., 2019. Evolution and expansion of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a genomic epidemiology study. *Lancet Infect. Dis.* 19, 943–951. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30392-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30392-5)
- Harbach, R.E., 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull. Entomol. Res.* 94, 537–553. <https://doi.org/10.1079/BER2004321>
- Haston, J.C., 2019. Guidance for Using Tafenoquine for Prevention and Antirelapse Therapy for Malaria – United States, 2019. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 68. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6846a4>
- Health Alert Network (HAN) - 00494 | Locally Acquired Malaria Cases Identified in the United States [WWW Document], 2023. URL <https://emergency.cdc.gov/han/2023/han00494.asp> (accessed 8.4.23).
- Heller, L.E., Roepe, P.D., 2019. Artemisinin-Based Antimalarial Drug Therapy: Molecular Pharmacology and Evolving Resistance. *Trop. Med. Infect. Dis.* 4, 89. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020089>
- Hendrickx, A., Beullens, M., Ceulemans, H., Den Abt, T., Van Eynde, A., Nicolaescu, E., Lesage, B., Bollen, M., 2009. Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem. Biol.* 16, 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.02.012>
- Heroes, E., Lesage, B., Görmann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L., Bollen, M., 2013. The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *FEBS J.* 280, 584–595. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08547.x>

- Hershko, A., 2005. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ.* 12, 1191–1197. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401702>
- Hodson, R., 2023. The challenges facing scientists in the elimination of malaria. *Nature* 618, S19–S19. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-02047-0>
- Hollin, T., De Witte, C., Fréville, A., Guerrero, I.C., Chhuon, C., Saliou, J.-M., Herbert, F., Pierrot, C., Khalife, J., 2019. Essential role of GEXP15, a specific Protein Phosphatase type 1 partner, in *Plasmodium berghei* in asexual erythrocytic proliferation and transmission. *PLoS Pathog.* 15, e1007973. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007973>
- Hollin, T., De Witte, C., Lenne, A., Pierrot, C., Khalife, J., 2016. Analysis of the interactome of the Ser/Thr Protein Phosphatase type 1 in *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* 17, 246. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2571-z>
- How 'reverse vaccinology' is identifying targets for a new malaria vaccine. <https://www.nature.com/articles/d42473-023-00093-w>
- Howes, R.E., Patil, A.P., Piel, F.B., Nyangiri, O.A., Kabaria, C.W., Gething, P.W., Zimmerman, P.A., Barnadas, C., Beall, C.M., Gebremedhin, A., Ménard, D., Williams, T.N., Weatherall, D.J., Hay, S.I., 2011. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat. Commun.* 2, 266. <https://doi.org/10.1038/ncomms1265>
- Inobe, T., Genmei, R., 2015. N-Terminal Coiled-Coil Structure of ATPase Subunits of 26S Proteasome Is Crucial for Proteasome Function. *PloS One* 10, e0134056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134056>
- Ishii, T., Sakurai, T., Usami, H., Uchida, K., 2005. Oxidative Modification of Proteasome: Identification of an Oxidation-Sensitive Subunit in 26 S Proteasome. *Biochemistry* 44, 13893–13901. <https://doi.org/10.1021/bi051336u>
- Janouskovec, J., Horák, A., Oborník, M., Lukes, J., Keeling, P.J., 2010. A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10949–10954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003335107>
- Janse, C.J., Ramesar, J., Waters, A.P., 2006. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat. Protoc.* 1, 346–356. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.53>
- Ji, C., Shen, H., Su, C., Li, Y., Chen, S., Sharp, T.H., Xiao, J., 2023. *Plasmodium falciparum* has evolved multiple mechanisms to hijack human immunoglobulin M. *Nat. Commun.* 14, 2650. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38320-z>
- Kakinoki, Y., Somers, J., Brautigan, D.L., 1997. Multisite Phosphorylation and the Nuclear Localization of Phosphatase Inhibitor 2-Green Fluorescent Protein Fusion Protein during S Phase of the Cell Growth Cycle \*. *J. Biol. Chem.* 272, 32308–32314. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32308>
- Kane, L.A., Lazarou, M., Fogel, A.I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S.A., Banerjee, S., Youle, R.J., 2014. PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J. Cell Biol.* 205, 143–153. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402104>
- Kent, R.S., Modrzynska, K.K., Cameron, R., Philip, N., Billker, O., Waters, A.P., 2018. Inducible developmental reprogramming redefines commitment to sexual development in the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat. Microbiol.* 3, 1206–1213. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0223-6>
- Kesely, K., Noomuna, P., Vieth, M., Hipskind, P., Haldar, K., Pantaleo, A., Turrini, F., Low, P.S., 2020. Identification of tyrosine kinase inhibitors that halt *Plasmodium falciparum* parasitemia. *PLOS ONE* 15, e0242372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242372>
- Khalife, J., Fréville, A., Gnanon, B., Pierrot, C., 2021. The Multifaceted Role of Protein Phosphatase 1 in *Plasmodium*. *Trends Parasitol.* 37, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.003>
- Kianifard, L., Rafiqi, Ab.M., Akcaker, O., Aly, A.S.I., Billingsley, P.F., Uysal, S., 2023. A recombinant *Aspergillus oryzae* fungus transmitted from larvae to adults of *Anopheles stephensi* mosquitoes inhibits malaria parasite oocyst development. *Sci. Rep.* 13, 12177. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38654-0>

- Kim, D.-H., Kang, J.-G., Yang, S.-S., Chung, K.-S., Song, P.-S., Park, C.-M., 2002. A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 3043–3056. <https://doi.org/10.1105/tpc.005306>
- Kimball, S.R., 1999. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 25–29. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(98\)00128-9](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(98)00128-9)
- Kirkman, L.A., Zhan, W., Visone, J., Dziedzic, A., Singh, P.K., Fan, H., Tong, X., Bruzual, I., Hara, R., Kawasaki, M., Imaeda, T., Okamoto, R., Sato, K., Michino, M., Alvaro, E.F., Guiang, L.F., Sanz, L., Mota, D.J., Govindasamy, K., Wang, R., Ling, Y., Tumwebaze, P.K., Sukenick, G., Shi, L., Vendome, J., Bhanot, P., Rosenthal, P.J., Aso, K., Foley, M.A., Cooper, R.A., Kafsack, B., Doggett, J.S., Nathan, C.F., Lin, G., 2018. Antimalarial proteasome inhibitor reveals collateral sensitivity from intersubunit interactions and fitness cost of resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E6863–E6870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806109115>
- Knuepfer, E., Napiorkowska, M., van Ooij, C., Holder, A.A., 2017. Generating conditional gene knockouts in *Plasmodium* – a toolkit to produce stable DiCre recombinase-expressing parasite lines using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* 7, 3881. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03984-3>
- Komiya, Y., Habas, R., 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68–75.
- Korrodi-Gregório, L., Esteves, S.L.C., Fardilha, M., 2014. Protein phosphatase 1 catalytic isoforms: specificity toward interacting proteins. *Transl. Res.* 164, 366–391. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.07.001>
- Kors, S., Geijtenbeek, K., Reits, E., Schipper-Krom, S., 2019. Regulation of Proteasome Activity by (Post-)transcriptional Mechanisms. *Front. Mol. Biosci.* 6.
- Krishnan, K.M., Williamson, K.C., 2018. The proteasome as a target to combat malaria: hits and misses. *Transl. Res.* 198, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.04.007>
- Kulichkova, V.A., Artamonova, T.O., Lyublinskaya, O.G., Khodorkovskii, M.A., Tomilin, A.N., Tsimokha, A.S., 2017. Proteomic analysis of affinity-purified extracellular proteasomes reveals exclusively 20S complexes. *Oncotarget* 8, 102134–102149. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22230>
- Kumar, B., Kim, Y.-C., DeMartino, G.N., 2010. The C Terminus of Rpt3, an ATPase Subunit of PA700 (19 S) Regulatory Complex, Is Essential for 26 S Proteasome Assembly but Not for Activation\*. *J. Biol. Chem.* 285, 39523–39535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.153627>
- Kumar, Prakash, Kumar, Pawan, Mandal, D., Velayutham, R., 2022. The emerging role of Deubiquitinases (DUBs) in parasites: A foresight review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 985178. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.985178>
- Kumar, R., Adams, B., Oldenburg, A., Musiyenko, A., Barik, S., 2002. Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malar. J.* 1, 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-1-5>
- Kunjappu, M.J., Hochstrasser, M., 2014. Assembly of the 20S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.008>
- Kwiatkowski, D., Cannon, J.G., Manogue, K.R., Cerami, A., Dinarello, C.A., Greenwood, B.M., 1989. Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin. Exp. Immunol.* 77, 361–366.
- Langsley, G., Ramdani, G., 2014. ATP, an extracellular signaling molecule in red blood cells: A messenger for malaria? *Biomed. J.* 37, 284. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.132910>
- Laporte, D., Salin, B., Daignan-Fornier, B., Sagot, I., 2008. Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. *J. Cell Biol.* 181, 737–745. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711154>
- Lasonder, E., Janse, C.J., Gemert, G.-J. van, Mair, G.R., Vermunt, A.M.W., Douradinha, B.G., Noort, V. van, Huynen, M.A., Luty, A.J.F., Kroeze, H., Khan, S.M., Sauerwein, R.W., Waters, A.P., Mann, M., Stunnenberg, H.G., 2008. Proteomic Profiling of *Plasmodium* Sporozoite Maturation

- Identifies New Proteins Essential for Parasite Development and Infectivity. *PLOS Pathog.* 4, e1000195. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000195>
- Lee, A.H., Symington, L.S., Fidock, D.A., 2014. DNA repair mechanisms and their biological roles in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 78, 469–486. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00059-13>
- Lee, D.H., Goldberg, A.L., 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8, 397–403. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01346-4](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01346-4)
- Lee, K.P., Kim, H.J., Yang, D., 2018. Functional identification of protein phosphatase 1-binding consensus residues in NBCe1-B. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* 22, 91–99. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2018.22.1.91>
- Lenne, A., De Witte, C., Tellier, G., Hollin, T., Aliouat, E.M., Martoriati, A., Cailliau, K., Saliou, J.-M., Khalife, J., Pierrot, C., 2018. Characterization of a Protein Phosphatase Type-1 and a Kinase Anchoring Protein in *Plasmodium falciparum*. *Front. Microbiol.* 9, 2617. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02617>
- Les oiseaux d’Hawaï ne cessent de mourir, 2021. *Le Monde.fr*.
- Lesage, K.M., Huot, L., Mouveaux, T., Courjol, F., Saliou, J.-M., Gissot, M., 2018. Cooperative binding of ApiAP2 transcription factors is crucial for the expression of virulence genes in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 46, 6057–6068. <https://doi.org/10.1093/nar/gky373>
- Leykauf, K., Trecek, M., Gilson, P.R., Nebl, T., Braulke, T., Cowman, A.F., Gilberger, T.W., Crabb, B.S., 2010. Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS Pathog.* 6, e1000941. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000941>
- Li, H., Bogyo, M., da Fonseca, P.C.A., 2016a. The cryo-EM structure of the *Plasmodium falciparum* 20S proteasome and its use in the fight against malaria. *FEBS J.* 283, 4238–4243. <https://doi.org/10.1111/febs.13780>
- Li, H., O’Donoghue, A.J., van der Linden, W.A., Xie, S.C., Yoo, E., Foe, I.T., Tilley, L., Craik, C.S., da Fonseca, P.C.A., Bogyo, M., 2016b. Structure- and function-based design of *Plasmodium*-selective proteasome inhibitors. *Nature* 530, 233–236. <https://doi.org/10.1038/nature16936>
- Li, H., Tsu, C., Blackburn, C., Li, G., Hales, P., Dick, L., Bogyo, M., 2014. Identification of potent and selective non-covalent inhibitors of the *Plasmodium falciparum* proteasome. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 13562–13565. <https://doi.org/10.1021/ja507692y>
- Li, M., Stefansson, B., Wang, W., Schaefer, E.M., Brautigan, D.L., 2006. Phosphorylation of the Pro-X-Thr-Pro site in phosphatase inhibitor-2 by cyclin-dependent protein kinase during M-phase of the cell cycle. *Cell. Signal.* 18, 1318–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.10.020>
- Li, N., Zhang, Z., Zhang, W., Wei, Q., 2011. Calcineurin B subunit interacts with proteasome subunit alpha type 7 and represses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activity via the proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.055>
- Lin, Z.-F., Xu, H.-B., Wang, J.-Y., Lin, Q., Ruan, Z., Liu, F.-B., Jin, W., Huang, H.-H., Chen, X., 2013. SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.033>
- Liu, C.-C., Lin, Y.-C., Chen, Y.-H., Chen, C.-M., Pang, L.-Y., Chen, H.-A., Wu, P.-R., Lin, M.-Y., Jiang, S.-T., Tsai, T.-F., Chen, R.-H., 2016. Cul3-KLHL20 Ubiquitin Ligase Governs the Turnover of ULK1 and VPS34 Complexes to Control Autophagy Termination. *Mol. Cell* 61, 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.001>
- Liu, L., Richard, J., Kim, S., Wojcik, E.J., 2014. Small Molecule Screen for Candidate Antimalarials Targeting *Plasmodium* Kinesin-5. *J. Biol. Chem.* 289, 16601–16614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.551408>
- Loke, Y.W., 1982. Transmission of parasites across the placenta. *Adv. Parasitol.* 21, 155–228. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60276-6](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60276-6)
- Loubens, M., Marinach, C., Paquereau, C.-E., Hamada, S., Hoareau-Coudert, B., Akbar, D., Franetich, J.-F., Silvie, O., 2023. The claudin-like apicomplexan microneme protein is required for gliding

- motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *PLoS Pathog.* 19, e1011261. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011261>
- Mace, K.E., 2022. Malaria Surveillance — United States, 2018. *MMWR Surveill. Summ.* 71. <https://doi.org/10.15585/ss7108a1>
- Maki, C.G., Huibregtse, J.M., Howley, P.M., 1996. *In vivo* Ubiquitination and Proteasome-mediated Degradation of p531. *Cancer Res.* 56, 2649–2654.
- Malhotra, I., Dent, A., Mungai, P., Wamachi, A., Ouma, J.H., Narum, D.L., Muchiri, E., Tisch, D.J., King, C.L., 2009. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med.* 6, e1000116. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000116>
- Mansour, H., Cabezas-Cruz, A., Peucelle, V., Farce, A., Salomé-Desnoulez, S., Metatla, I., Guerrero, I.C., Hollin, T., Khalife, J., 2023. Characterization of GEXP15 as a Potential Regulator of Protein Phosphatase 1 in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 12647. <https://doi.org/10.3390/ijms241612647>
- Manzoni, G., Briquet, S., Risco-Castillo, V., Gaultier, C., Topçu, S., Ivănescu, M.L., Franetich, J.-F., Hoareau-Coudert, B., Mazier, D., Silvie, O., 2014. A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites. *Sci. Rep.* 4, 4760. <https://doi.org/10.1038/srep04760>
- Marx, F.P., Soehn, A.S., Berg, D., Melle, C., Schiesling, C., Lang, M., Kautzmann, S., Strauss, K.M., Franck, T., Engelender, S., Pahnke, J., Dawson, S., von Eggeling, F., Schulz, J.B., Riess, O., Krüger, R., 2007. The proteasomal subunit S6 ATPase is a novel synphilin-1 interacting protein—implications for Parkinson’s disease. *FASEB J.* 21, 1759–1767. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6734com>
- Matarazzo, L., Bettencourt, P.J.G., 2023. mRNA vaccines: a new opportunity for malaria, tuberculosis and HIV. *Front. Immunol.* 14.
- Maurya, R., Tripathi, A., Kumar, M., Antil, N., Yamaro-Botté, Y., Kumar, P., Bansal, P., Doerig, C., Botté, C.Y., Prasad, T.S.K., Sharma, P., 2022. PI4-kinase and PfCDPK7 signaling regulate phospholipid biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *EMBO Rep.* 23, e54022. <https://doi.org/10.15252/embr.202154022>
- May, J., Evans, J.A., Timmann, C., Ehmen, C., Busch, W., Thye, T., Agbenyega, T., Horstmann, R.D., 2007. Hemoglobin Variants and Disease Manifestations in Severe Falciparum Malaria. *JAMA* 297, 2220–2226. <https://doi.org/10.1001/jama.297.20.2220>
- Mayya, V., Lundgren, D.H., Hwang, S.-I., Rezaul, K., Wu, L., Eng, J.K., Rodionov, V., Han, D.K., 2009. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci. Signal.* 2, ra46. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000007>
- Ménard, D., Arieu, F., Mercereau-Puijalon, O., 2013. Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). *médecine/sciences* 29, 647–655. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013296020>
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K., 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673–679. <https://doi.org/10.1038/415673a>
- Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., 2007. Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 68, 893–914. <https://doi.org/10.1002/prot.21444>
- MMV’s pipeline of antimalarial drugs. <https://www.mmv.org/fr/mmv-pipeline-antimalarial-drugs> (accessed 8.4.23).
- Mogwera, K.S.P., Chibale, K., Arendse, L.B., 2023. Developing kinase inhibitors for malaria: an opportunity or liability? *Trends Parasitol.* S1471492223001320. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.06.001>
- Mok, S., Ashley, E.A., Ferreira, P.E., Zhu, L., Lin, Z., Yeo, T., Chotivanich, K., Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Dhorda, M., Nguon, C., Lim, P., Amaratunga, C., Suon, S., Hien, T.T., Htut, Y., Faiz, M.A., Onyamboko, M.A., Mayxay, M., Newton, P.N., Tripura, R., Woodrow, C.J.,

- Miotto, O., Kwiatkowski, D.P., Nosten, F., Day, N.P.J., Preiser, P.R., White, N.J., Dondorp, A.M., Fairhurst, R.M., Bozdech, Z., 2015. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science* 347, 431–435. <https://doi.org/10.1126/science.1260403>
- Molyneux, M.E., Taylor, T.E., Wirima, J.J., Borgstein, A., 1989. Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria: a study of 131 comatose Malawian children. *Q. J. Med.* 71, 441–459.
- Moorhead, G.B.G., Trinkle-Mulcahy, L., Ulke-Lemée, A., 2007. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 234–244. <https://doi.org/10.1038/nrm2126>
- Morano, A.A., Rudlaff, R.M., Dvorin, J.D., 2023. A PPP-type pseudophosphatase is required for the maintenance of basal complex integrity in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* 14, 3916. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39435-z>
- Morozov, A.V., Karpov, V.L., 2019. Proteasomes and Several Aspects of Their Heterogeneity Relevant to Cancer. *Front. Oncol.* 9.
- Morrisette, N.S., Sibley, L.D., 2002. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 21–38. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.1.21-38.2002>
- Müller, I.B., Knöckel, J., Eschbach, M.-L., Bergmann, B., Walter, R.D., Wrenger, C., 2010. Secretion of an acid phosphatase provides a possible mechanism to acquire host nutrients by *Plasmodium falciparum*. *Cell. Microbiol.* 12, 677–691. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01426.x>
- Muralidharan, V., Oksman, A., Iwamoto, M., Wandless, T.J., Goldberg, D.E., 2011. Asparagine repeat function in a *Plasmodium falciparum* protein assessed via a regulatable fluorescent affinity tag. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4411–4416. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018449108>
- Mwakingwe-Omari, A., Healy, S.A., Lane, J., Cook, D.M., Kalhori, S., Wyatt, C., Kolluri, A., Marte-Salcedo, O., Imeru, A., Nason, M., Ding, L.K., Decederfelt, H., Duan, J., Neal, J., Raiten, J., Lee, G., Hume, J.C.C., Jeon, J.E., Ikpeama, I., Kc, N., Chakravarty, S., Murshedkar, T., Church, L.W.P., Manoj, A., Gunasekera, A., Anderson, C., Murphy, S.C., March, S., Bhatia, S.N., James, E.R., Billingsley, P.F., Sim, B.K.L., Richie, T.L., Zaidi, I., Hoffman, S.L., Duffy, P.E., 2021. Two chemoattenuated PfSPZ malaria vaccines induce sterile hepatic immunity. *Nature* 595, 289–294. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03684-z>
- Nakamura, Y., Umehara, T., Tanaka, A., Horikoshi, M., Padmanabhan, B., Yokoyama, S., 2007. Structural basis for the recognition between the regulatory particles Nas6 and Rpt3 of the yeast 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.138>
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y., 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 458–467. <https://doi.org/10.1038/nrm2708>
- Nauseef, W.M., McCormick, S.J., Clark, R.A., 1995. Calreticulin Functions as a Molecular Chaperone in the Biosynthesis of Myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 4741–4747. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4741>
- Neelam, S., Kakhniashvili, D.G., Wilkens, S., Levene, S.D., Goodman, S.R., 2011. Functional 20S proteasomes in mature human red blood cells. *Exp. Biol. Med.* 236, 580–591. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.010394>
- Newton, C.R., Taylor, T.E., Whitten, R.O., 1998. Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 673–683. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.673>
- Nijman, S.M.B., Luna-Vargas, M.P.A., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M.G., Sixma, T.K., Bernards, R., 2005. A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell* 123, 773–786. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.007>
- Nina, P.B., Morrissey, J.M., Ganesan, S.M., Ke, H., Pershing, A.M., Mather, M.W., Vaidya, A.B., 2011. ATP Synthase Complex of *Plasmodium falciparum*: Dimeric assembly in mitochondrial membranes and resistance to genetic disruption. *J. Biol. Chem.* 286, 41312–41322. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290973>

- Nishizawa, K., Freund, C., Li, J., Wagner, G., Reinherz, E.L., 1998. Identification of a proline-binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14897–14902. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14897>
- Nordling, L., 2023. Malaria's modelling problem. *Nature* 618, S34–S35. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-02054-1>
- Oborník, M., Modrý, D., Lukeš, M., Černotíková-Stříbrná, E., Cihlář, J., Tesařová, M., Kotabová, E., Vancová, M., Prášil, O., Lukeš, J., 2012. Morphology, Ultrastructure and Life Cycle of *Vitrella brassicaformis* n. sp., n. gen., a Novel Chromerid from the Great Barrier Reef. *Protist* 163, 306–323. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.09.001>
- O'Connell, N., Nichols, S.R., Heroes, E., Beullens, M., Bollen, M., Peti, W., Page, R., 2012. The Molecular Basis for Substrate Specificity of the Nuclear NIPP1:PP1 Holoenzyme. *Structure* 20, 1746–1756. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.08.003>
- Ohkura, H., Yanagida, M., 1991. *S. pombe* gene *sds22+* essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1. *Cell* 64, 149–157. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90216-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90216-L)
- Ohtake, F., Saeki, Y., Sakamoto, K., Ohtake, K., Nishikawa, H., Tsuchiya, H., Ohta, T., Tanaka, K., Kanno, J., 2015. Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep.* 16, 192–201. <https://doi.org/10.15252/embr.201439152>
- Olczak, M., Morawiecka, B., Watorek, W., 2003. Plant purple acid phosphatases - genes, structures and biological function. *Acta Biochim. Pol.* 50, 1245–1256. [https://doi.org/10.18388/abp.2003\\_3648](https://doi.org/10.18388/abp.2003_3648)
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., Mann, M., 2006. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>
- Otto, T.D., Böhme, U., Jackson, A.P., Hunt, M., Franke-Fayard, B., Hoeijmakers, W.A.M., Religa, A.A., Robertson, L., Sanders, M., Ogun, S.A., Cunningham, D., Erhart, A., Billker, O., Khan, S.M., Stunnenberg, H.G., Langhorne, J., Holder, A.A., Waters, A.P., Newbold, C.I., Pain, A., Berriman, M., Janse, C.J., 2014. A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. *BMC Biol.* 12, 86. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0086-0>
- Oyelade, J., Isewon, I., Rotimi, S., Okunoren, I., 2016. Modeling of the Glycolysis Pathway in *Plasmodium falciparum* using Petri Nets. *Bioinforma. Biol. Insights* 10, 49–57. <https://doi.org/10.4137/BBI.S37296>
- Palinauskas, V., Žiegytė, R., Iezhova, T.A., Ilgūnas, M., Bernotienė, R., Valkiūnas, G., 2016. Description, molecular characterisation, diagnostics and life cycle of *Plasmodium elongatum* (lineage pERIRUB01), the virulent avian malaria parasite. *Int. J. Parasitol.* 46, 697–707. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.005>
- Paquet, T., Le Manach, C., Cabrera, D.G., Younis, Y., Henrich, P.P., Abraham, T.S., Lee, M.C.S., Basak, R., Ghidelli-Disse, S., Lafuente-Monasterio, M.J., Bantscheff, M., Ruecker, A., Blagborough, A.M., Zakutansky, S.E., Zeeman, A.-M., White, K.L., Shackleford, D.M., Manilla, J., Morizzi, J., Scheurer, C., Angulo-Barturen, I., Martínez, M.S., Ferrer, S., Sanz, L.M., Gamo, F.J., Reader, J., Botha, M., Dechering, K.J., Sauerwein, R.W., Tungtaeng, A., Vanachayangkul, P., Lim, C.S., Burrows, J., Witty, M.J., Marsh, K.C., Bodenreider, C., Rochford, R., Solapure, S.M., Jiménez-Díaz, M.B., Wittlin, S., Charman, S.A., Donini, C., Campo, B., Birkholtz, L.-M., Hanson, K.K., Drewes, G., Kocken, C.H.M., Delves, M.J., Leroy, D., Fidock, D.A., Waterson, D., Street, L.J., Chibale, K., 2017. Antimalarial efficacy of MMV390048, an inhibitor of *Plasmodium* phosphatidylinositol 4-kinase. *Sci. Transl. Med.* 9, eaad9735. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad9735>
- Park, S., Li, X., Kim, H.M., Singh, C.R., Tian, G., Hoyt, M.A., Lovell, S., Battaile, K.P., Zolkiewski, M., Coffino, P., Roelofs, J., Cheng, Y., Finley, D., 2013. Reconfiguration of the proteasome during chaperone-mediated assembly. *Nature* 497, 512–516. <https://doi.org/10.1038/nature12123>

- Patrick, M.B., Omar, N., Werner, C.T., Mitra, S., Jarome, T.J., 2023. The ubiquitin-proteasome system and learning-dependent synaptic plasticity – A 10 year update. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 152, 105280. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105280>
- Paul, A.S., Miliu, A., Paulo, J.A., Goldberg, J.M., Bonilla, A.M., Berry, L., Seveno, M., Braun-Breton, C., Kosber, A.L., Elsworth, B., Arriola, J.S.N., Lebrun, M., Gygi, S.P., Lamarque, M.H., Duraisingh, M.T., 2020. Co-option of *Plasmodium falciparum* PP1 for egress from host erythrocytes. *Nat. Commun.* 11, 3532. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17306-1>
- Pendyala, P.R., Ayong, L., Eatrides, J., Schreiber, M., Pham, C., Chakrabarti, R., Fidock, D.A., Allen, C.M., Chakrabarti, D., 2008. Characterization of a PRL protein tyrosine phosphatase from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 158, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.006>
- Peng, G., Wang, C., Wang, H., Qu, M., Dong, K., Yu, Y., Jiang, Y., Gan, S., Gao, X., 2023. Gankyrin-mediated interaction between cancer cells and tumor-associated macrophages facilitates prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *OncoImmunology* 12, 2173422. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2023.2173422>
- Peti, W., Nairn, A.C., Page, R., 2013. Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *FEBS J.* 280, 596–611. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08509.x>
- Peti, W., Nairn, A.C., Page, R., 2012. Folding of Intrinsically Disordered Protein Phosphatase 1 Regulatory Proteins. *Curr. Phys. Chem.* 2, 107–114. <https://doi.org/10.2174/1877946811202010107>
- Philip, N., Waters, A.P., 2015. Conditional Degradation of *Plasmodium* Calcineurin Reveals Functions in Parasite Colonization of both Host and Vector. *Cell Host Microbe* 18, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.018>
- Phillips, M.A., Burrows, J.N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R.H., Van Voorhis, W.C., Wells, T.N.C., 2017. Malaria. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 1–24. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>
- Pickart, C.M., Cohen, R.E., 2004. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 177–187. <https://doi.org/10.1038/nrm1336>
- Pierrot, C., Zhang, X., Zanghi, G., Fréville, A., Rebollo, A., Khalife, J., 2018. Peptides derived from *Plasmodium falciparum* leucine-rich repeat 1 bind to serine/threonine phosphatase type 1 and inhibit parasite growth *in vitro*. *Drug Des. Devel. Ther.* Volume 12, 85–88. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S153095>
- Pizzi, E., Frontali, C., 2001. Low-complexity regions in *Plasmodium falciparum* proteins. *Genome Res.* 11, 218–229. <https://doi.org/10.1101/gr.gr-1522r>
- Pouch, M.N., Cournoyer, B., Baumeister, W., 2000. Characterization of the 20S proteasome from the actinomycete *Frankia*. *Mol. Microbiol.* 35, 368–377. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01703.x>
- Qiao, Y.-N., He, W.-Q., Chen, C.-P., Zhang, C.-H., Zhao, W., Wang, P., Zhang, L., Wu, Y.-Z., Yang, X., Peng, Y.-J., Gao, J.-M., Kamm, K.E., Stull, J.T., Zhu, M.-S., 2014. Myosin Phosphatase Target Subunit 1 (MYPT1) Regulates the Contraction and Relaxation of Vascular Smooth Muscle and Maintains Blood Pressure. *J. Biol. Chem.* 289, 22512–22523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525444>
- Quinn, C.M., Nolan, T., 2020. Nuclease-based gene drives, an innovative tool for insect vector control: advantages and challenges of the technology. *Curr. Opin. Insect Sci.* 39, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.007>
- Rabl, J., Smith, D.M., Yu, Y., Chang, S.-C., Goldberg, A.L., Cheng, Y., 2008. Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol. Cell* 30, 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.004>
- Ramanathan, A., Robb, G.B., Chan, S.-H., 2016. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* 44, 7511–7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Ramaprasad, A., Burda, P.-C., Koussis, K., Thomas, J.A., Pietsch, E., Calvani, E., Howell, S.A., MacRae, J.I., Snijders, A.P., Gilberger, T.-W., Blackman, M.J., 2023. A malaria parasite phospholipase



- facilitates efficient asexual blood stage egress. *PLOS Pathog.* 19, e1011449. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011449>
- Ramasamy, G., Gupta, D., Mohammed, A., Chauhan, V.S., 2007. Characterization and localization of *Plasmodium falciparum* homolog of prokaryotic ClpQ/HslV protease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.01.002>
- Rashidi, S., Tuteja, R., Mansouri, R., Ali-Hassanzadeh, M., Shafiei, R., Ghani, E., Karimazar, M., Nguewa, P., Manzano-Román, R., 2021. The main post-translational modifications and related regulatory pathways in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: An update. *J. Proteomics* 245, 104279. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104279>
- Rashpa, R., Klages, N., Schwartz, D., Pasquarello, C., Brochet, M., 2023. The Skp1-Cullin1-FBXO1 complex is a pleiotropic regulator required for the formation of gametes and motile forms in *Plasmodium berghei*. *Nat. Commun.* 14, 1312. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36999-8>
- Reboud-Ravaux, M., 2021. Le protéasome, la seconde vie d'une cible thérapeutique validée : aspects structuraux et nouveaux inhibiteurs. *Biol. Aujourd'hui* 215, 1–23. <https://doi.org/10.1051/jbio/2021005>
- Recommandations générales [WWW Document], 2016. . Inst. Pasteur. URL <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/vaccination/recommandations-generales> (accessed 8.3.23).
- Reininger, L., Tewari, R., Fennell, C., Holland, Z., Goldring, D., Ranford-Cartwright, L., Billker, O., Doerig, C., 2009. An Essential Role for the *Plasmodium* Nek-2 Nima-related Protein Kinase in the Sexual Development of Malaria Parasites \*. *J. Biol. Chem.* 284, 20858–20868. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017988>
- Reiterer, V., Pawłowski, K., Desrochers, G., Pause, A., Sharpe, H.J., Farhan, H., 2020. The dead phosphatases society: a review of the emerging roles of pseudophosphatases. *FEBS J.* 287, 4198–4220. <https://doi.org/10.1111/febs.15431>
- Remacha, L., Pirman, D., Mahoney, C.E., Coloma, J., Calsina, B., Currás-Freixes, M., Letón, R., Torres-Pérez, R., Richter, S., Pita, G., Herráez, B., Cianchetta, G., Honrado, E., Maestre, L., Urioste, M., Aller, J., García-Uriarte, Ó., Gálvez, M.Á., Luque, R.M., Lahera, M., Moreno-Rengel, C., Eisenhofer, G., Montero-Conde, C., Rodríguez-Antona, C., Llorca, Ó., Smolen, G.A., Robledo, M., Cascón, A., 2019. Recurrent Germline DLST Mutations in Individuals with Multiple Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Am. J. Hum. Genet.* 104, 651–664. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.02.017>
- Rénia, L., Howland, S.W., Claser, C., Charlotte Gruner, A., Suwanarusk, R., Hui Teo, T., Russell, B., Ng, L.F.P., 2012. Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence* 3, 193–201. <https://doi.org/10.4161/viru.19013>
- Ribbiso, K.A., Heller, L.E., Taye, A., Julian, E., Willems, A.V., Roepe, P.D., 2021. Artemisinin-Based Drugs Target the *Plasmodium falciparum* Heme Detoxification Pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 65, e02137-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02137-20>
- Richter-Ruoff, B., Wolf, D.H., 1993. Proteasome and cell cycle. Evidence for a regulatory role of the protease on mitotic cyclins in yeast. *FEBS Lett.* 336, 34–36. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81603-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81603-w)
- Rigbolt, K.T.G., Prokhorova, T.A., Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P.T., Kratchmarova, I., Kassem, M., Mann, M., Olsen, J.V., Blagoev, B., 2011. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci. Signal.* 4, rs3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001570>
- Rodríguez, M.C., Margos, G., Compton, H., Ku, M., Lanz, H., Rodríguez, M.H., Sinden, R.E., 2002. *Plasmodium berghei*: routine production of pure gametocytes, extracellular gametes, zygotes, and ookinetes. *Exp. Parasitol.* 101, 73–76. [https://doi.org/10.1016/s0014-4894\(02\)00035-8](https://doi.org/10.1016/s0014-4894(02)00035-8)
- Rodríguez-Carmona, E., Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J., Villaverde, A., García-Fruitós, E., 2010. Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microb. Cell Factories* 9, 71. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-71>

- Ross, L.S., Fidock, D.A., 2019. Elucidating Mechanisms of Drug-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Cell Host Microbe* 26, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.001>
- RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 386, 31–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8)
- Sacco, F., Perfetto, L., Castagnoli, L., Cesareni, G., 2012. The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Lett.* 586, 2732–2739. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.008>
- Saito, F., Hirayasu, K., Satoh, T., Wang, C.W., Lusingu, J., Arimori, T., Shida, K., Palacpac, N.M.Q., Itagaki, S., Iwanaga, S., Takashima, E., Tsuboi, T., Kohyama, M., Suenaga, T., Colonna, M., Takagi, J., Lavstsen, T., Horii, T., Arase, H., 2017. Immune evasion of *Plasmodium falciparum* by RIFIN via inhibitory receptors. *Nature* 552, 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature24994>
- Saitoh, Y., Sawada, H., Yokosawa, H., 1993. High-molecular-weight protease complexes (proteasomes) of sperm of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation, characterization, and physiological roles in fertilization. *Dev. Biol.* 158, 238–244. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1182>
- Sakao, Y., Kawai, T., Takeuchi, O., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Takeda, K., Akira, S., 2000. Mouse proteasomal ATPases Psmc3 and Psmc4: genomic organization and gene targeting. *Genomics* 67, 1–7. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6231>
- Sassmannshausen, J., Bennink, S., Distler, U., Küchenhoff, J., Minns, A.M., Lindner, S.E., Burda, P.-C., Tenzer, S., Gilberger, T.W., Pradel, G., 2023. Comparative proteomics of vesicles essential for the egress of *Plasmodium falciparum* gametocytes from red blood cells. *Mol. Microbiol.* n/a. <https://doi.org/10.1111/mmi.15125>
- Sato, S., 2021. *Plasmodium*-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J. Physiol. Anthropol.* 40, 1. <https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9>
- Schoenheimer, R., 1946. The dynamic state of body constituents. *Dyn. State Body Const.*
- Schwartz, A.L., Ciechanover, A., 1999. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50, 57–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.57>
- Scruggs, S.B., Zong, N.C., Wang, D., Stefani, E., Ping, P., 2012. Post-translational modification of cardiac proteasomes: functional delineation enabled by proteomics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, H9–18. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00189.2012>
- Sharma, A., Khan, H., Singh, T.G., Grewal, A.K., Najda, A., Kawecka-Radomska, M., Kamel, M., Altyar, A.E., Abdel-Daim, M.M., 2021. Pharmacological Modulation of Ubiquitin-Proteasome Pathways in Oncogenic Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11971. <https://doi.org/10.3390/ijms222111971>
- Sharma, R., Gupta, R.S., 2019. Novel Molecular Synapomorphies Demarcate Different Main Groups/Subgroups of Plasmodium and Piroplasmida Species Clarifying Their Evolutionary Relationships. *Genes* 10, 490. <https://doi.org/10.3390/genes10070490>
- Sharon, M., Taverner, T., Ambroggio, X.I., Deshaies, R.J., Robinson, C.V., 2006. Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol.* 4, e267. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040267>
- Shen, M., Schmitt, S., Buac, D., Dou, Q.P., 2013. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 1091–1108. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.815728>
- Smith, D.M., Chang, S.-C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., Goldberg, A.L., 2007. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol. Cell* 27, 731–744. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.033>
- Soldati, D., Meissner, M., 2004. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.11.013>
- Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M.M., Semblat, J.-P., Dorin-Semblat, D., Reininger, L., Bottrill, A.R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C., Holland, Z., Demarta, C., Bouza, Y., Sicard, A., Nivez, M.-P., Eschenlauer, S., Lama, T., Thomas, D.C., Sharma, P., Agarwal, S., Kern, S., Pradel, G., Graciotti,

- M., Tobin, A.B., Doerig, C., 2011. Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* 2, 565. <https://doi.org/10.1038/ncomms1558>
- Song, X., Wei, W., Cheng, W., Zhu, H., Wang, W., Dong, H., Li, J., 2022. Cerebral malaria induced by *Plasmodium falciparum*: clinical features, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12.
- Srivastava, G., Choy, M.S., Bolik-Coulon, N., Page, R., Peti, W., 2023. Inhibitor-3 inhibits Protein Phosphatase 1 via a metal binding dynamic protein–protein interaction. *Nat. Commun.* 14, 1798. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37372-5>
- Srivastava, P.N., Mishra, S., 2022. Disrupting a *Plasmodium berghei* putative phospholipase impairs efficient egress of merosomes. *Int. J. Parasitol.* 52, 547–558. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2022.03.002>
- Stevens, T.J., Paoli, M., 2007. RCC1-like repeat proteins: A pangenomic, structurally diverse new superfamily of  $\beta$ -propeller domains. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 70, 378–387. <https://doi.org/10.1002/prot.21521>
- Stevenson, L., Huda, P., Jeppesen, A., Laursen, E., Rowe, J.A., Craig, A., Streicher, W., Barfod, L., Hviid, L., 2015. Investigating the function of Fc-specific binding of IgM to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediating erythrocyte rosetting. *Cell. Microbiol.* 17, 819–831. <https://doi.org/10.1111/cmi.12403>
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., Hershko, A., 1995. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* 6, 185–197.
- Suh, P.F., Elanga-Ndille, E., Tchouakui, M., Sandeu, M.M., Tagne, D., Wondji, C., Ndo, C., 2023. Impact of insecticide resistance on malaria vector competence: a literature review. *Malar. J.* 22, 19. <https://doi.org/10.1186/s12936-023-04444-2>
- Summers, R.L., Nash, M.N., Martin, R.E., 2012. Know your enemy: understanding the role of PfCRT in drug resistance could lead to new antimalarial tactics. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1967–1995. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0906-0>
- Sundararaman, S.A., Plenderleith, L.J., Liu, W., Loy, D.E., Learn, G.H., Li, Y., Shaw, K.S., Ayoub, A., Peeters, M., Speede, S., Shaw, G.M., Bushman, F.D., Brisson, D., Rayner, J.C., Sharp, P.M., Hahn, B.H., 2016. Genomes of cryptic chimpanzee *Plasmodium* species reveal key evolutionary events leading to human malaria. *Nat. Commun.* 7, 11078. <https://doi.org/10.1038/ncomms11078>
- Swain, J.E., Wang, X., Saunders, T.L., Dunn, R., Smith, G.D., 2003. Specific inhibition of mouse oocyte nuclear protein phosphatase-1 stimulates germinal vesicle breakdown. *Mol. Reprod. Dev.* 65, 96–103. <https://doi.org/10.1002/mrd.10258>
- Syed, Y.Y., 2022. RTS,S/AS01 malaria vaccine (Mosquirix®): a profile of its use. *Drugs Ther. Perspect. Ration. Drug Sel. Use* 38, 373–381. <https://doi.org/10.1007/s40267-022-00937-3>
- Taylor, S.M., Parobek, C.M., Fairhurst, R.M., 2012. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12, 457–468. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70055-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70055-5)
- Tellier, G., Lenne, A., Cailliau-Maggio, K., Cabezas-Cruz, A., Valdés, J.J., Martoriati, A., Aliouat, E.M., Gosset, P., Delaire, B., Fréville, A., Pierrot, C., Khalife, J., 2016. Identification of *Plasmodium falciparum* Translation Initiation eIF2 $\beta$  Subunit: Direct Interaction with Protein Phosphatase Type 1. *Front. Microbiol.* 7, 777. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00777>
- Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T., Dominguez, R., 2004. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 429, 780–784. <https://doi.org/10.1038/nature02582>
- Tewari, R., Straschil, U., Bateman, A., Böhme, U., Cherevach, I., Gong, P., Pain, A., Billker, O., 2010. The Systematic Functional Analysis of *Plasmodium* Protein Kinases Identifies Essential Regulators of Mosquito Transmission. *Cell Host Microbe* 8, 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.006>

- Tibúrcio, M., Dixon, M.W.A., Looker, O., Younis, S.Y., Tilley, L., Alano, P., 2015. Specific expression and export of the *Plasmodium falciparum* Gametocyte EXported Protein-5 marks the gametocyte ring stage. *Malar. J.* 14, 334. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0853-6>
- Tilley, L., Straimer, J., Gnädig, N.F., Ralph, S.A., Fidock, D.A., 2016. Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 32, 682–696. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.010>
- Tschan, S., Brouwer, A.J., Werkhoven, P.R., Jonker, A.M., Wagner, L., Knittel, S., Aminake, M.N., Pradel, G., Joanny, F., Liskamp, R.M.J., Mordmüller, B., 2013. Broad-Spectrum Antimalarial Activity of Peptido Sulfonyl Fluorides, a New Class of Proteasome Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3576–3584. <https://doi.org/10.1128/AAC.00742-12>
- Tu, Y., 1999. The development of new antimalarial drugs: qinghaosu and dihydro-qinghaosu. *Chin. Med. J. (Engl.)* 112, 976–977.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* 13, 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
- Uyoga, S., Watson, J.A., Wanjiku, P., Rop, J.C., Makale, J., Macharia, A.W., Kariuki, S.N., Nyutu, G.M., Shebe, M., Mosobo, M., Mturi, N., Rockett, K.A., Woodrow, C.J., Dondorp, A.M., Maitland, K., White, N.J., Williams, T.N., 2022. The impact of malaria-protective red blood cell polymorphisms on parasite biomass in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Nat. Commun.* 13, 3307. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30990-5>
- van der Watt, M.E., Reader, J., Birkholtz, L.-M., 2022. Adapt or Die: Targeting Unique Transmission-Stage Biology for Malaria Elimination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12.
- Vandoolaeghe, P., Schuerman, L., 2018. Le vaccin antipaludique RTS,S/AS01 chez les enfants âgés de 5 à 17 mois au moment de la première vaccination. *Pan Afr. Med. J.* 30. <https://doi.org/10.11604/pamj.2018.30.142.13152>
- Veiga, M.I., Dhingra, S.K., Henrich, P.P., Straimer, J., Gnädig, N., Uhlemann, A.-C., Martin, R.E., Lehane, A.M., Fidock, D.A., 2016. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat. Commun.* 7, 11553. <https://doi.org/10.1038/ncomms11553>
- Vial, H.J., Eldin, P., Tielens, A.G.M., van Hellemond, J.J., 2003. Phospholipids in parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 143–154. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00281-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00281-5)
- Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W., Bollen, M., 2003. Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* 278, 18817–18823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300175200>
- Wakula, P., Beullens, M., van Eynde, A., Ceulemans, H., Stalmans, W., Bollen, M., 2006. The translation initiation factor eIF2 $\beta$  is an interactor of protein phosphatase-1. *Biochem. J.* 400, 377–383. <https://doi.org/10.1042/BJ20060758>
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G.J., 2005. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 7342–7372. <https://doi.org/10.1002/anie.200501023>
- Wang, J., Jiang, N., Sang, X., Yang, N., Feng, Y., Chen, R., Wang, X., Chen, Q., 2021. Protein Modification Characteristics of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* and the Infected Erythrocytes. *Mol. Cell. Proteomics* 20. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002375>
- Wang, L., Delahunty, C., Fritz-Wolf, K., Rahlfs, S., Helena Prieto, J., Yates, J.R., Becker, K., 2015. Characterization of the 26S proteasome network in *Plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* 5, 17818. <https://doi.org/10.1038/srep17818>
- Wang, W., Stukenberg, P.T., Brautigan, D.L., 2008. Phosphatase inhibitor-2 balances protein phosphatase 1 and aurora B kinase for chromosome segregation and cytokinesis in human retinal epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 19, 4852–4862. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0460>
- Wang, X., Chen, C.-F., Baker, P.R., Chen, P., Kaiser, P., Huang, L., 2007. Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex. *Biochemistry* 46, 3553–3565. <https://doi.org/10.1021/bi061994u>

- Ward, P., Equinet, L., Packer, J., Doerig, C., 2004. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 5, 79. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-79>
- Wei, L., Adderley, J., Leroy, D., Drewry, D.H., Wilson, D.W., Kaushansky, A., Doerig, C., 2021. Host-directed therapy, an untapped opportunity for antimalarial intervention. *Cell Rep. Med.* 2, 100423. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100423>
- Weith, M., Seiler, J., van den Boom, J., Kracht, M., Hülsmann, J., Primorac, I., Del Pino Garcia, J., Kaschani, F., Kaiser, M., Musacchio, A., Bollen, M., Meyer, H., 2018. Ubiquitin-Independent Disassembly by a p97 AAA-ATPase Complex Drives PP1 Holoenzyme Formation. *Mol. Cell* 72, 766-777.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.020>
- Wells, T.N.C., Burrows, J.N., Baird, J.K., 2010. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol.* 26, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.12.005>
- Wendler, P., Enenkel, C., 2019. Nuclear Transport of Yeast Proteasomes. *Front. Mol. Biosci.* 6, 34. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00034>
- White, N.J., 1997. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1413–1422. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.7.1413>
- WHO Guidelines for malaria [WWW Document]. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/guidelines-for-malaria> (accessed 10.22.23).
- Wilkes, J.M., Doerig, C., 2008. The protein-phosphatome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* 9, 412. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-412>
- Witkowski, B., Duru, V., Khim, N., Ross, L.S., Saintpierre, B., Beghain, J., Chy, S., Kim, S., Ke, S., Kloeung, N., Eam, R., Khean, C., Ken, M., Loch, K., Bouillon, A., Domergue, A., Ma, L., Bouchier, C., Leang, R., Huy, R., Nuel, G., Barale, J.-C., Legrand, E., Ringwald, P., Fidock, D.A., Mercereau-Puijalon, O., Ariey, F., Ménard, D., 2017. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype–genotype association study. *Lancet Infect. Dis.* 17, 174–183. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30415-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30415-7)
- Wójcik, C., DeMartino, G.N., 2003. Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 579–589. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00380-1](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00380-1)
- World malaria report 2021 <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021> (accessed 8.12.23).
- World malaria report 2022 <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> (accessed 7.26.23).
- Xie, S.C., Dick, L.R., Gould, A., Brand, S., Tilley, L., 2019. The proteasome as a target for protozoan parasites. *Expert Opin. Ther. Targets* 23, 903–914. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1685981>
- Yang, P., Fu, H., Walker, J., Papa, C.M., Smalle, J., Ju, Y.-M., Vierstra, R.D., 2004. Purification of the *Arabidopsis* 26 S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *J. Biol. Chem.* 279, 6401–6413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311977200>
- Yedidi, R.S., Wendler, P., Enenkel, C., 2017. AAA-ATPases in Protein Degradation. *Front. Mol. Biosci.* 4, 42. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00042>
- Yeoman, J.A., Hanssen, E., Maier, A.G., Klonis, N., Maco, B., Baum, J., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Dixon, M.W.A., Tilley, L., 2011. Tracking Glideosome-associated protein 50 reveals the development and organization of the inner membrane complex of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* 10, 556–564. <https://doi.org/10.1128/EC.00244-10>
- Yissachar, N., Salem, H., Tennenbaum, T., Motro, B., 2006. Nek7 kinase is enriched at the centrosome, and is required for proper spindle assembly and mitotic progression. *FEBS Lett.* 580, 6489–6495. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.069>
- Yokoyama, D., Saito-Ito, A., Asao, N., Tanabe, K., Yamamoto, M., Matsumura, T., 1998. Modulation of the Growth of *Plasmodium falciparum in vitro* by Protein Serine/Threonine Phosphatase Inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 18–23. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8730>

- Yu, C., Rahmani, M., Dent, P., Grant, S., 2004. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. *Exp. Cell Res.* 295, 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.02.001>
- Yu, Y., Smith, D.M., Kim, H.M., Rodriguez, V., Goldberg, A.L., Cheng, Y., 2010. Interactions of PAN's C-termini with archaeal 20S proteasome and implications for the eukaryotic proteasome–ATPase interactions. *EMBO J.* 29, 692–702. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.382>
- Yuda, A., Lee, W.S., Petrovic, P., McCulloch, C.A., 2018. Novel proteins that regulate cell extension formation in fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 365, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.024>
- Yuda, M., Kaneko, I., Murata, Y., Iwanaga, S., Nishi, T., 2021. Mechanisms of triggering malaria gametocytogenesis by AP2-G. *Parasitol. Int.* 84, 102403. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102403>
- Zeeshan, M., Pandey, R., Subudhi, A.K., Ferguson, D.J.P., Kaur, G., Rashpa, R., Nugmanova, R., Brady, D., Bottrill, A.R., Vaughan, S., Brochet, M., Bollen, M., Pain, A., Holder, A.A., Guttery, D.S., Tewari, R., 2021. Protein phosphatase 1 regulates atypical mitotic and meiotic division in *Plasmodium* sexual stages. *Commun. Biol.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02273-0>
- Zhang, F., Hu, Y., Huang, P., Toleman, C.A., Paterson, A.J., Kudlow, J.E., 2007a. Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J. Biol. Chem.* 282, 22460–22471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702439200>
- Zhang, F., Hu, Y., Huang, P., Toleman, C.A., Paterson, A.J., Kudlow, J.E., 2007b. Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J. Biol. Chem.* 282, 22460–22471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702439200>
- Zhang, M., Wang, C., Otto, T.D., Oberstaller, J., Liao, X., Adapa, S.R., Udenze, K., Bronner, I.F., Casandra, D., Mayho, M., Brown, J., Li, S., Swanson, J., Rayner, J.C., Jiang, R.H.Y., Adams, J.H., 2018. Uncovering the essential genes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by saturation mutagenesis. *Science* 360, eaap7847. <https://doi.org/10.1126/science.aap7847>
- Zhang, W., Wei, Q., 2011. Calcineurin stimulates the expression of inflammatory factors in RAW 264.7 cells by interacting with proteasome subunit alpha type 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 668–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.071>
- Zong, C., Gomes, A.V., Drews, O., Li, X., Young, G.W., Berhane, B., Qiao, X., French, S.W., Bardag-Gorce, F., Ping, P., 2006. Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners. *Circ. Res.* 99, 372–380. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000237389.40000.02>
- Zwickl, P., Ng, D., Woo, K.M., Goldberg, A.L., Klenk, H.-P., 1999. An Archaeobacterial ATPase, Homologous to ATPases in the Eukaryotic 26 S Proteasome, Activates Protein Breakdown by 20 S Proteasomes \*. *J. Biol. Chem.* 274, 26008–26014. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26008>

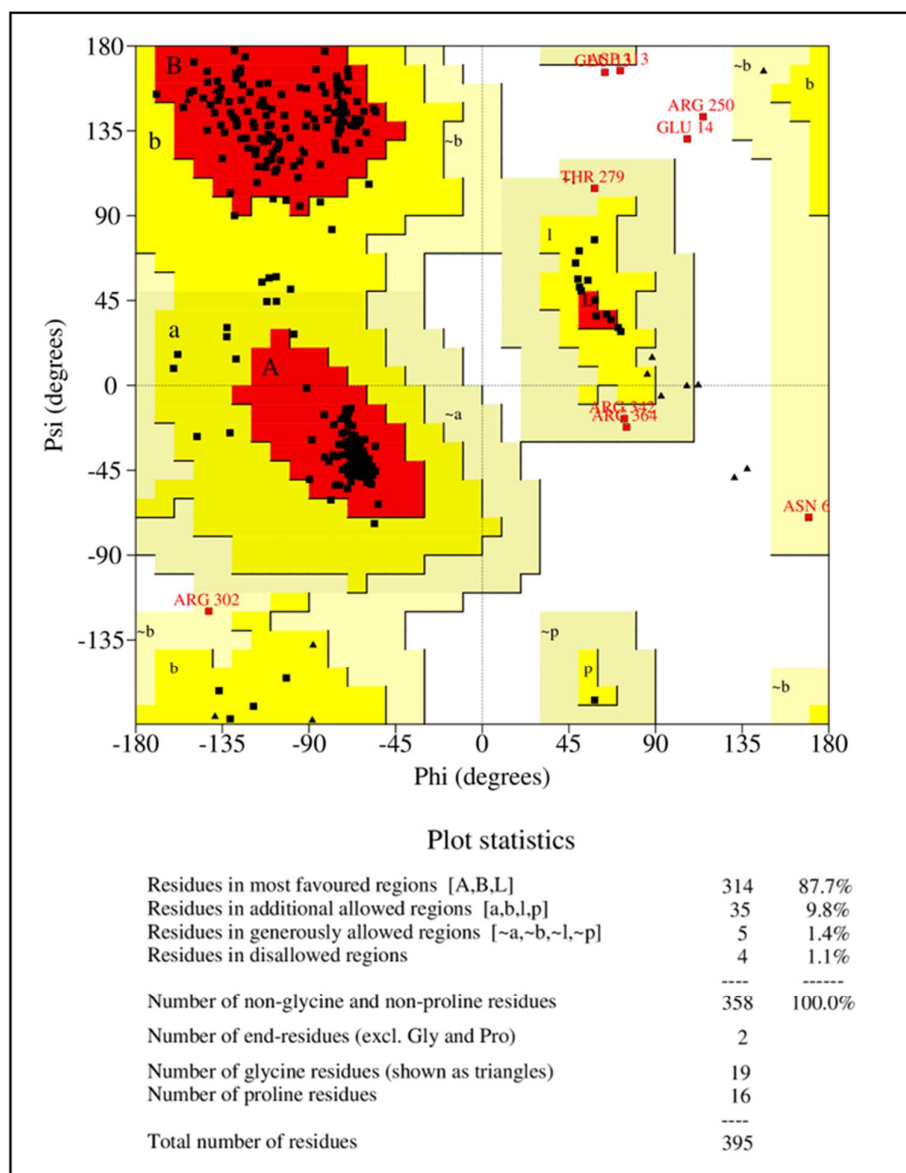


## **ANNEXES**





## ANNEXE 1 – Figures Supplémentaires



**Figure Supplémentaire 1. Diagramme de Ramachandran et statistiques générés par le modèle 3D de PbRpt3 (PBANKA\_0715600), basé sur la structure cryo-EM de PSMC4 (PDB référence 6MSB – chaîne D).**

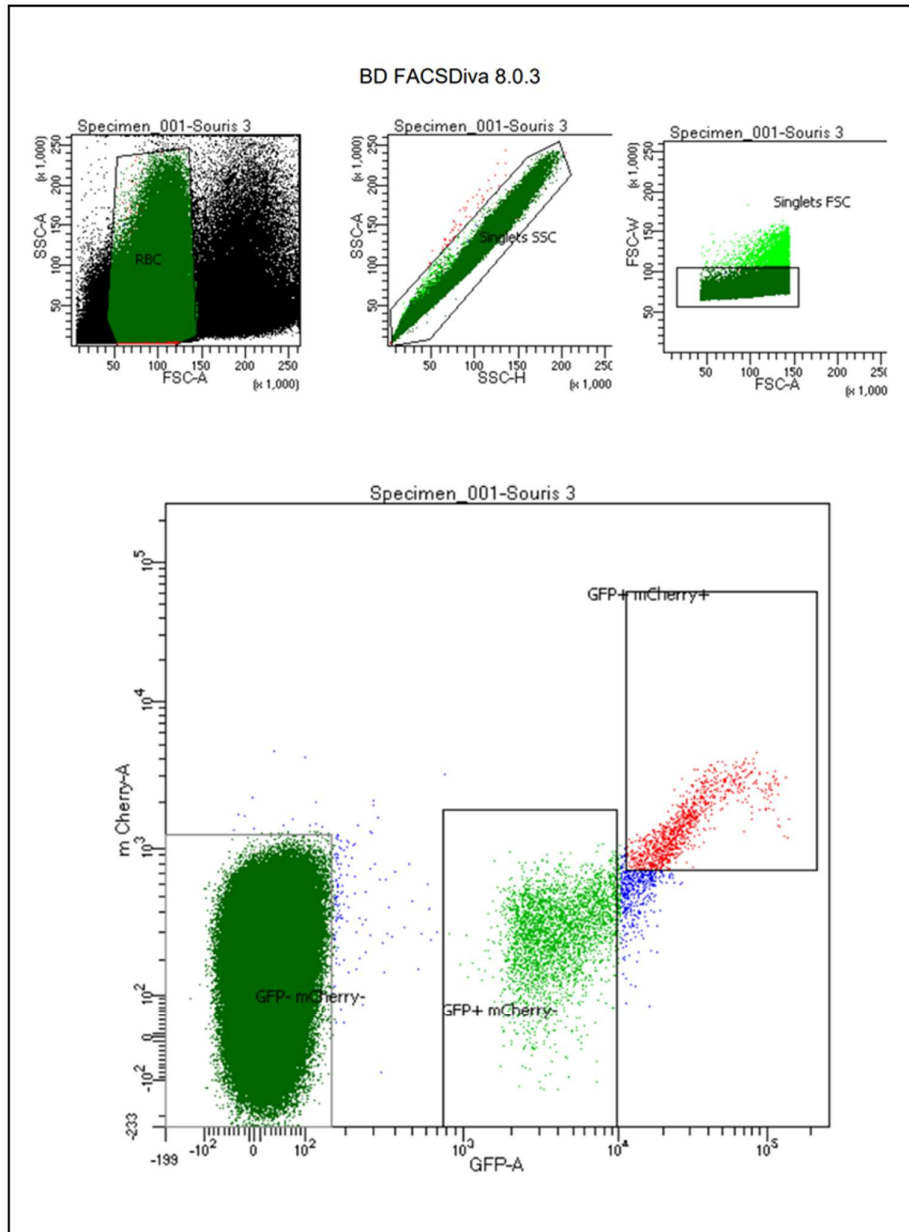


Figure supplémentaire 2. Tri cellulaire par cytométrie en flux des parasites *P. berghei* exprimant les protéines GFP et mCherry.

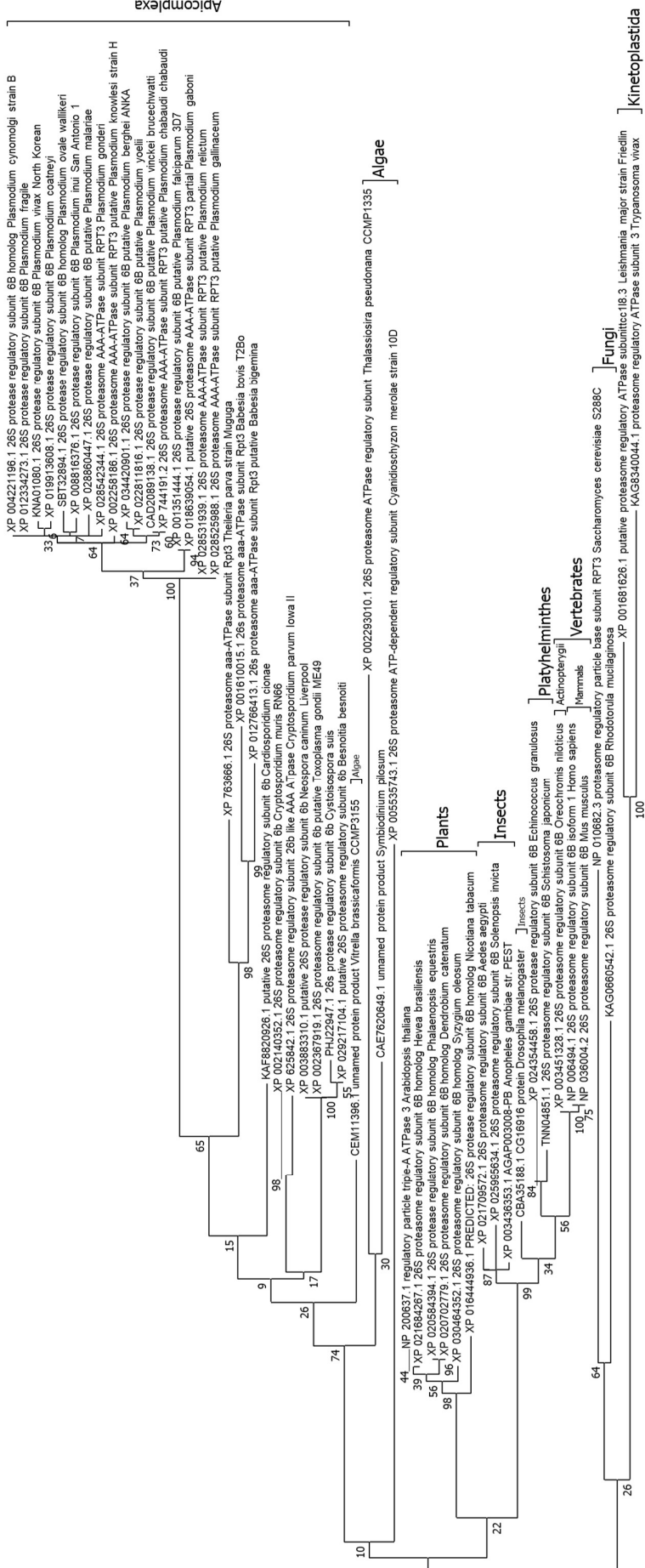
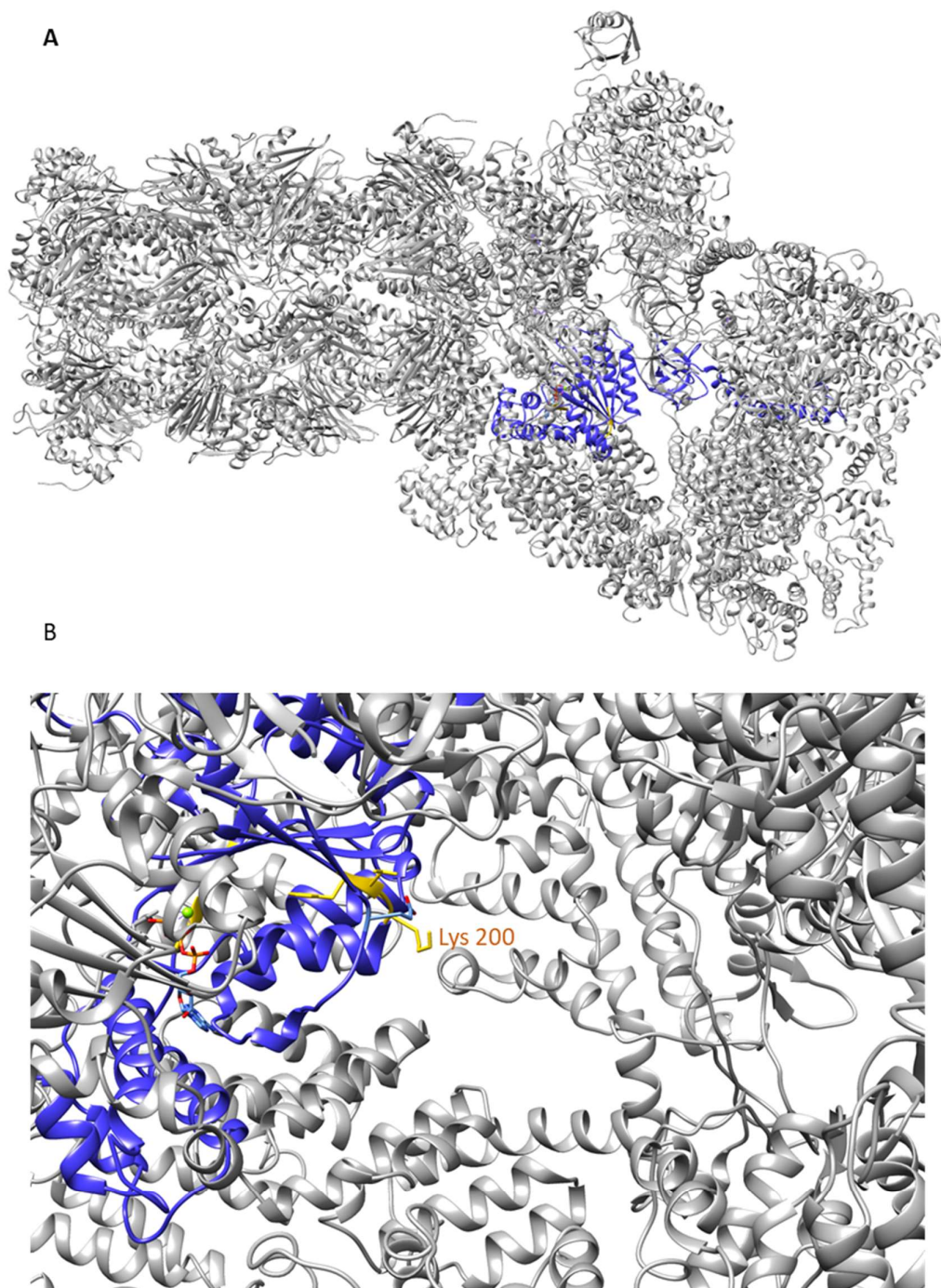


Figure supplémentaire 3.  
 Reconstitution d'un arbre phylogénétique de la protéine PbRpt3 grâce au logiciel Mega 7.



**Figure supplémentaire 4. Modélisation de PbRpt3 au sein du protéasome 26S humain illustrant l'accessibilité du motif KVTF.** A. Illustration par Chimera montrant la localisation de PbRpt3 au sein du complexe 26S humain en remplacement de la chaîne D (PSMC4 - RCSB 6MSB). B. Zoom sur le motif KVTF montrant la chaîne latérale de la Lysine 200 de PbRpt3 et une possible accessibilité pour une interaction avec PP1c.

## **ANNEXE 2**

L'article suivant a été soumis chez l'éditeur IJMS le 23 août 2023 et se trouve en procédure de révision.



# Characterization of the regulatory AAA-ATPase subunit Rpt3 in *Plasmodium berghei* as an activator of Protein Phosphatase 1

Claudianne Lainé <sup>1,a</sup>, Caroline De Witte <sup>1,a</sup>, Alain Martoriati <sup>2</sup>, Amaury Farce <sup>3</sup>, Inès Metatla <sup>4</sup>, Ida Chiara Guerrera <sup>4</sup>, Katia Cailliau <sup>2</sup>, Jamal Khalife <sup>1</sup> and Christine Pierrot <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> Univ. Lille, CNRS, UMR 8576-UGSF-Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - Infinite - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> Proteomics platform 3P5-Necker, Université Paris Descartes - Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UMS3633, Paris, France

<sup>a</sup> These authors have contributed equally to this work

\* Correspondence: christine.pierrot@pasteur-lille.fr

**Abstract:** The 26S proteasome is the main proteolytic machine involved in protein degradation, contributing to homeostasis or stress response of eukaryotic cells. This macromolecular complex, consisting of a 20S core particle assembled with one or two 19S regulatory particles, is highly regulated by phosphorylation. Here we described the *Plasmodium berghei* (Pb) proteasome AAA-ATPase regulatory subunit Rpt3 and showed that it binds to Protein Phosphatase 1 catalytic subunit (PP1c), one of the major and essential parasite phosphatases. In addition, PbRpt3 protein was able to enhance the activity of PP1c both *in vitro* and in a heterologous model of *Xenopus* oocytes. Using mutagenesis approaches, we observed that the RVXF motifs of PbRpt3 are involved in its binding and regulatory function. Further use of *Xenopus* oocytes in combination with PbRpt3 protein mutated for amino acids predicted to be involved in ATP binding, suggested that the ATP binding capacity of PbRpt3 may also contribute to its phosphatase-regulatory activity. In *P. berghei*, reverse genetic studies suggested an essential role for PbRpt3 since no viable knock-out line could be obtained. Finally, immunoprecipitation assays followed by mass spectrometry analyses using transgenic PbRpt3-tagged parasites confirmed that PbRpt3 belongs to the 19S regulatory particle of the proteasome and revealed potential interactions with proteins previously shown to be involved in membrane phospholipid binding.

**Keywords:** Proteasome; 19S regulatory particle; Rpt3; *Plasmodium*; Protein Phosphatase 1

## 1. Introduction

The ubiquitin-proteasome system is one of the main pathways in protein degradation. Its cellular functions range from general cellular homeostasis and stress response to the control of vital processes such as cell division and signal transduction. The proteasome is a large multi-protein enzyme complex found in eukaryotes, archaea and some bacteria of the order Actinomycetales (for review [1]). In eukaryotic cells, it is constitutively present in the cytosol, associated with the endoplasmic reticulum, and can also be present in the nucleus, depending on the cell-type, growth status, and whether the cell is encountering stimulation or stress [2–4]. As the endpoint for the ubiquitin-proteasome system, the 26S proteasome is the principal proteolytic machine responsible for protein degradation of misfolded, denatured or obsolete proteins by proteolysis. The fully assembled 26S proteasome is a macromolecular complex consisting of a 20S core particle and one or two 19S regulatory particles. The 19S is composed of two subcomplexes, the base which directly



binds to the 20S, and the lid [5]. The base is formed by six AAA-ATPase subunits (Rpt1-6), and four non-ATPase subunits (Rpn1, Rpn2, Rpn10, and Rpn13). The other nine non-ATPase subunits form the lid. The role of the 19S is to recognize, to unfold the polyubiquitinated substrates and to open the channel prior to the substrate translocation into the 20S cavity. All these activities except for substrate recognition depend on ATP binding/hydrolysis by the ATPase subunits. The core 20S particle forms a cylinder which houses the proteolytic activity of the proteasome within a central chamber [6]. It is composed of two related types of subunits;  $\alpha$  subunits, which form the outer two heptameric rings, and  $\beta$  subunits, which form the inner pair of heptameric rings and include the proteolytic active sites.

The 26S proteasome is a dynamic complex highly regulated by post-translational modifications (PTMs). These PTMs modulate numerous aspects of proteasome functions, including catalytic activities, assembly and turnover of the complex, interactions with associating partners, subcellular localization, and substrate preference [7]. Among these PTMs, reversible phosphorylation is one of the most frequent and best studied PTM of the proteasome (for review [8]). Thanks to large-scale MS studies, more than 400 phosphosites have been reported on human 26S proteasome and detected on each subunit. While the kinases involved in proteasome phosphorylation have been well studied and include the protein kinases PKA, PKG and CK2, little is known about the phosphatases implicated in the counterbalance dephosphorylation reactions. Treatment of the proteasome with phosphatases such as Protein phosphatase 1 (PP1) or Protein phosphatase 2A (PP2A) reduces its activity *in vitro* [9–11]. Similarly, some PP2A and calcineurin subunits have been found complexed to the 20S proteasome [9,12,13]. However, the exact role of these phosphatases in proteasome regulation is still in its infancy. The only phosphatase that has been shown to play a physiological role is UBLCP1 (Ubiquitin-like domain containing CTD phosphatase-1), which negatively regulates proteasome function by promoting 19S-20S dissociation [14].

More recently, our analyses based on a proteomic approach conducted in *Plasmodium berghei* (Pb) have identified some of the 19S AAA-ATPase and non-ATPase subunits as potential interactors of the parasite PP1 catalytic subunit (PP1c) [15,16]. This parasite, causative agent of malaria, undergoes rapid growth and cell division in an oxidatively stressed environment. Consequently, it is highly dependent of a tight and quick protein turnover machinery. Interestingly, proteasome inhibitors exhibit parasitocidal activity at different stages of the parasite's lifecycle (for review [17]). Moreover, inhibitors of the proteasome strongly synergize artemisinin-induced killing of *Plasmodium*, both *in vitro* and *in vivo* [18,19]. In *Plasmodium falciparum* (Pf), the proteasome 26S has been purified and characterized, together with its physiologic interacting partners [20,21]. As in eukaryotes, it is composed of a 19S regulatory particle and a 20S core particle, the structure of which has been solved by high-resolution electron cryo-microscopy, thus establishing the molecular basis of the parasite 20S proteasome specificity, when compared to its human counterpart [22].

As for PP1, it has been shown to be a key enzyme in *Plasmodium*. This phosphatase seems to be responsible for most of the dephosphorylation processes in the parasite [23], and reverse genetic analyses have demonstrated its essentiality for blood-stage parasite development and egress from erythrocytes [24,25]. PP1 is a holoenzyme composed of a highly conserved catalytic subunit (PP1c) in association with one or several regulatory subunits which direct its localization and shape its activity/specificity [26–30]. A common feature of most of the PP1c regulators is that they contain a RVxF sequence as the primary PP1c-binding motif [31]. In *Plasmodium*, numerous potential regulatory partners have been identified in global analyses of PP1c interactome [15,16]. This includes both conserved and specific regulators [15,32–35]. Among the PP1c-binding proteins, some components of the proteasome 19S were identified, suggesting that they could be PP1c substrates, recruit additional substrates, transport PP1c, and/or regulate the phosphatase activity.

In this paper, we report the molecular and functional characterization of PbRpt3, one of the *P. berghei* 19S AAA-ATPase subunits. We showed that it binds to PP1c and increases the phosphatase activity both *in vitro* and in the heterologous model of *Xenopus* oocytes. Using site-directed mutagenesis, we demonstrated that the PbRpt3 RVxF motifs play a role in this interaction and function, and provided evidence that the enzymatic ATPase activity *per se* of the protein is involved in its regulatory activity. Studies in the parasite suggest an essential role of PbRpt3 since no viable knock-out parasites could be obtained. Finally, immunoprecipitation of tagged PbRPT3 combined to mass spectrometry analysis identified many potential PbRpt3 interactors, including the 19S components of the proteasome and proteins described to be involved in membrane dynamics.

## 2. Results and Discussion

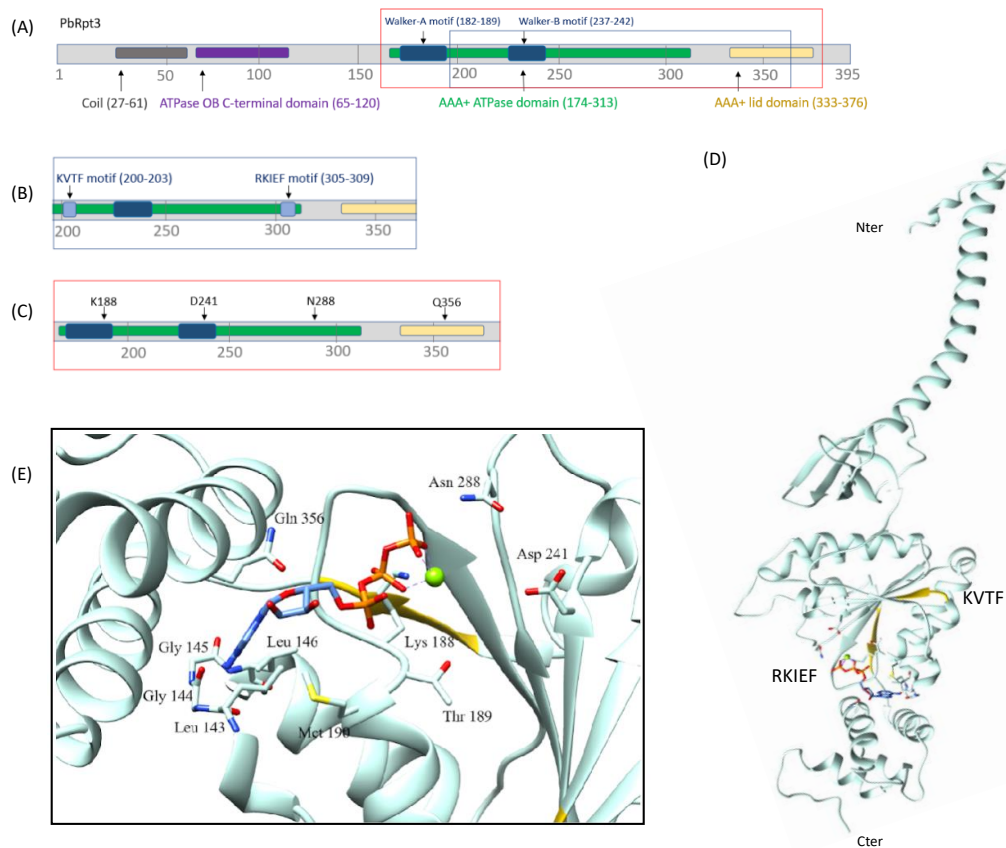
### 2.1. PbRpt3 sequence analysis and protein annotation

Exploration of PlasmoDB database showed that PbRpt3 gene (PBANKA\_0715600) is predicted to span 1516 bp, including an intron of 328 bp. The sequencing of the PCR products obtained with specific primers on both cDNA and genomic DNA confirmed both the transcription of PbRpt3 and its correct exons-introns positions respectively (data not shown). The deduced sequence of 395 amino acid (a.a.) (Supplementary Figure 1) showed 100% identity to the PlasmoDB predicted sequence. Although the *Plasmodium* protein is 23 amino acids shorter than its human counterpart PSMC4 (Supplementary Figure 2), it exhibits conserved motifs and domains. Indeed, the InterproScan analysis of PbRpt3 potential domains revealed the presence of an AAA-ATPase domain with a Walker A motif (consensus G-x(4)-GK-[TS] and sequence GPPGTGKT) at position 182 and a Walker B motif (consensus hhhDE and sequence IIFIDE) at position 237 (Figure 1A, Supplementary Figure 1). These ATP binding motifs are also present in human Rpt [36]. A coil domain is predicted at the Nter of PbRpt3. Coil domains have been previously described to be involved in the coiled-coil interaction between the different Rpt proteins of the proteasome 19S complex [37]. Further, a.a. sequence analysis showed the presence of two consensus RVxF motifs, well known as PP1c binding motif. These two motifs, at positions 200 (200-KVTF-203) and 305 (305-RKIEF-309), fit to the consensus sequence [R/K]-X(0-1)-[V/I]-{P}-[F/W] ({P} being any amino acid except a proline) (Figure 1B). The first motif KVTF is not conserved between all *Plasmodium* species (Supplementary Table 1). It is present in *Plasmodium knowlesi* Rpt3 but absent in *Plasmodium falciparum* Rpt3 (PF3D7\_0413600) and three other *Plasmodium* species infecting humans. Regarding the second motif RKIEF, it is conserved among all *Plasmodium* species as well as among mammals (*Homo sapiens*, *Mus musculus*), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and plants (*Arabidopsis thaliana* - Uniprot Reference A0A178UAH2). The presence of two putative RVxF motifs in PbRpt3 may explain its detection in PbPP1c interactome [15,16], and likely suggests that it could be a direct interactor of the phosphatase.

### 2.2. PbRpt3 exhibits ATP-binding ability and would require a Mg<sup>2+</sup> ion for complex stability

In order to examine the sequence/structure relationship of PbRpt3, a 3D model was predicted (Figure 1D) based on the crystallographic structure of the human Rpt3 (PSMC4 isoform 1 of 418 residues) as these two proteins share a sequence identity of 67% (Supplementary Figure 2). As expected, the 3D structure showed a coil region in its N-terminus, an OB-C-terminal domain (a.a. 64 to 119) including five-stranded  $\beta$ -sheet coiled, with a very short  $\alpha$  helix positioned between the third and fourth strands, followed by the ATPase domain comprising an  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  subdomain which includes the motifs involved in ATP binding and hydrolysis (the Walker A motif is located between a  $\beta$ -sheet and an  $\alpha$  helix, and the Walker B motif forms a whole  $\beta$ -sheet). The AAA-lid domain is also present and reveals an all- $\alpha$  helix subdomain with 4  $\alpha$  helix between a.a. 320-360. Interestingly, our 3D model predicted that an Mg<sup>2+</sup> ion would be required to stabilize the PbRpt3 structure, as reported for the human Rpt3 (PSMC4) [38]. *In silico* docking simulation of the ATP

on our 3D model showed that this molecule would mainly be maintained with hydrogen bonds located on the K188 and the Q356 of the protein (Figure 1E). N288 would also contribute to stabilize ATP through hydrogen bonds. In addition, ATP appears to be essential for the maintenance of the magnesium ion, and D241 would contribute to the stabilization of this ion. Thus, the 4 amino acids K188, D241, N288 and Q356 seem to play an important role in stabilizing the ATP molecule and, *in extenso*, they are important for the binding of  $Mg^{2+}$  and the structural arrangement of the protein. Of note, K188 and D241 are located in the Walker A and Walker B domains respectively (Figure 1C). Another part of the protein backbone of PbRpt3 would also contribute to the stabilization of ATP with the sequence 143-LGG-145. However, the mutation of these amino acids to alanine residues would not change the conformational structure of the pocket where the adenine group of ATP is located (data not shown).



**Figure 1. *Plasmodium berghei* regulatory AAA-ATPase subunit PbRpt3 domains and structural model.** **A.** Prediction of the PbRpt3 domains using InterproScan software. Schematic of the PbRpt3 domains showing **B.** part of the AAA-ATPase domain corresponding to the two RVxF consensus sequences: KVTF and RKIEF and **C.** part of the AAA-ATPase domain where four amino acids are located: K188, D241, N288 and Q356 which are essential for  $Mg^{2+}$  and ATP binding. **D.** Predicted tertiary structure of PbRpt3. Image generated from PDB file 6MSB P auth D chain predicted with Sybyl 6.9.2 (Tripos) and annotated with Chimera, highlighting the two RVxF motifs (in yellow) and the ATP molecule at the center. **E.** Inset shows the side structure of the amino acid chains involved in ATP binding and  $Mg^{2+}$  stabilization: the ATP molecule is modelled next to the  $Mg^{2+}$  ion (green) and surrounded by K188, and Q356 which are the main holders of the molecule.

### 2.3. *PbRpt3* could interact with PP1c independently of the proteasome complex

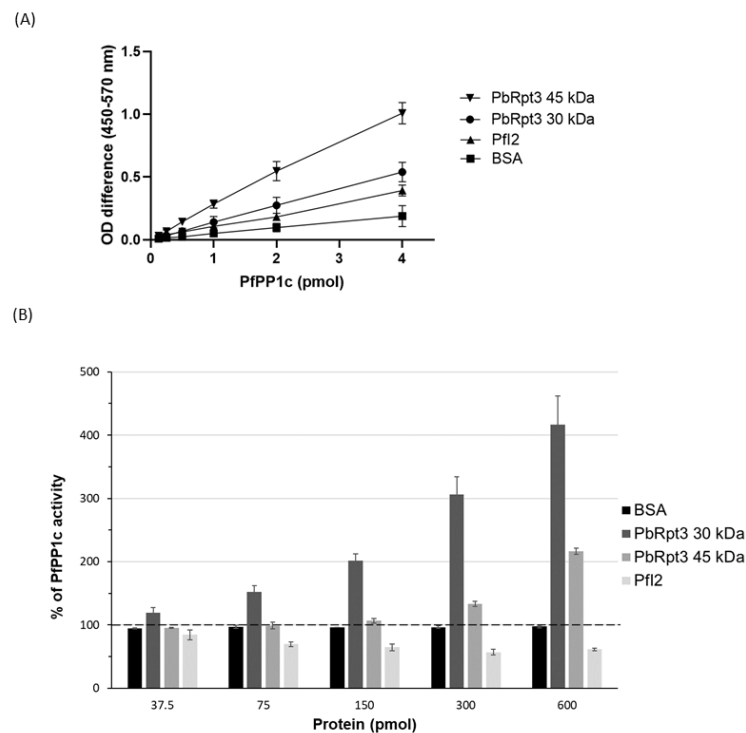
The 3D predicted model of PbRpt3 3D showed that the two RVxF motifs (200-KVTF-203 and 305-RKIEF-309) are located on either side of the protein, within the AAA-ATPase domain (Figure 1A, 1D). This accessible location would allow PbRpt3 to interact with PP1c, an interaction that would occur with either of the two RVxF motifs. Indeed, the

folding of PfPP1c has been modeled (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q8ILV1?csm=9CE0B7C29FEFEFC6>), and it appears that its compact predicted conformation [39] wouldn't allow the interaction with two PbRpt3 RVxF motifs at the same time. However, we cannot exclude that the interaction between the two partners could involve a PbRpt3/PbPP1c protein ratio of 1:2.

To better explore how the 3D model of PbRpt3 protein fits in the proteasome complex, and to assess the accessibility of the RVxF motifs of PbRpt3 for a possible interaction with PbPP1c, we replaced the experimental human PSMC4 by the modeled 3D structure of PbRpt3 within the crystallographic structure of the human proteasome (RCSB PDB, ID 6MSB) (data not shown). The analysis of this integration using the Chimera software revealed, in the immediate environment of the RVxF motifs of PbRpt3, the B chain PSMC1 (Rpt2), the F chain PSMC3 (Rpt5), the K and L chains (alpha subunits) and the f chain PSMD2 (Rpn1). Within this chimera predicted complex, the B chain (Rpt2) appears to be able to contribute to the stabilization of the ATP of PbRpt3, and PbRpt3 would contribute to the stabilization of the ATP of the F chain (Rpt5). Thus, in this proteasome complex, the KVTF and RKIEF motifs of PbRpt3 are not sufficiently accessible for a possible interaction with PP1c. Should all the proteasome protein-protein interactions be conserved in *Plasmodium berghei* compared to human, the interaction between PbRpt3 and PbPP1c could potentially occur when PbRpt3 is untethered to the complex, implying a possible PbRpt3-PbPP1c interaction prior to assembly and/or after disassembly of the 26S proteasome complex.

#### 2.4. His-tagged PbRpt3 protein directly interacts with PP1c

The interactome of PbPP1c showed that PbRpt3 was identified in immunoprecipitated protein complexes by spectrometry analysis [15,16]. In order to investigate whether these proteins interact directly, we produced a recombinant protein corresponding to the PbRpt3 full length (aa 1-395, 45kDa, Supplementary Figure 3A) and performed an ELISA-based assay using biotinylated PP1c. In these experiments, Pfl2 a well-known inhibitor of PP1c, was used as a control [34]. The results shown in Figure 2A demonstrate that PbRpt3-45 kDa directly interacts with PfPP1c in a dose-dependent manner. To determine further which region of PbRpt3 interacts with PP1c, we produced a recombinant truncated PbRpt3 (aa 131-395, 30 kDa, Supplementary Figure 3B). This fragment lacks the coil region and the ATPase OB-C-terminal domain. Interestingly, this truncated PbRpt3 also interacts with PfPP1c in a concentration-dependent manner in ELISA-based assay (Figure 2A). Taken together, these results suggest that the PP1c-interaction domains of PbRpt3 may lie in this region where both RVxF motifs are present.



**Figure 2. Interaction of PbRpt3 with PP1c *in vitro* and effect on phosphatase activity.** **A.** Interaction study of PbRpt3-45 kDa and PbRpt3-30 kDa with PFP1c using Pfl2 as a positive control and BSA as a negative control. Results are representative of two independent experiments. **B.** Effect of PbRpt3-45 kDa, PbRpt3-30 kDa, BSA and Pfl2 on PFP1c phosphatase activity. Different quantities of each protein (37.5 pmol, 75 pmol, 150 pmol, 300 pmol and 600 pmol) were incubated with 1  $\mu$ g of recombinant PFP1c for 30 min before the incubation with the substrate pNPP for 1 hour at 37°C. Results presented as % of relative increase or decrease of phosphatase activity are means  $\pm$  S.D. of two independent experiments performed in duplicate.

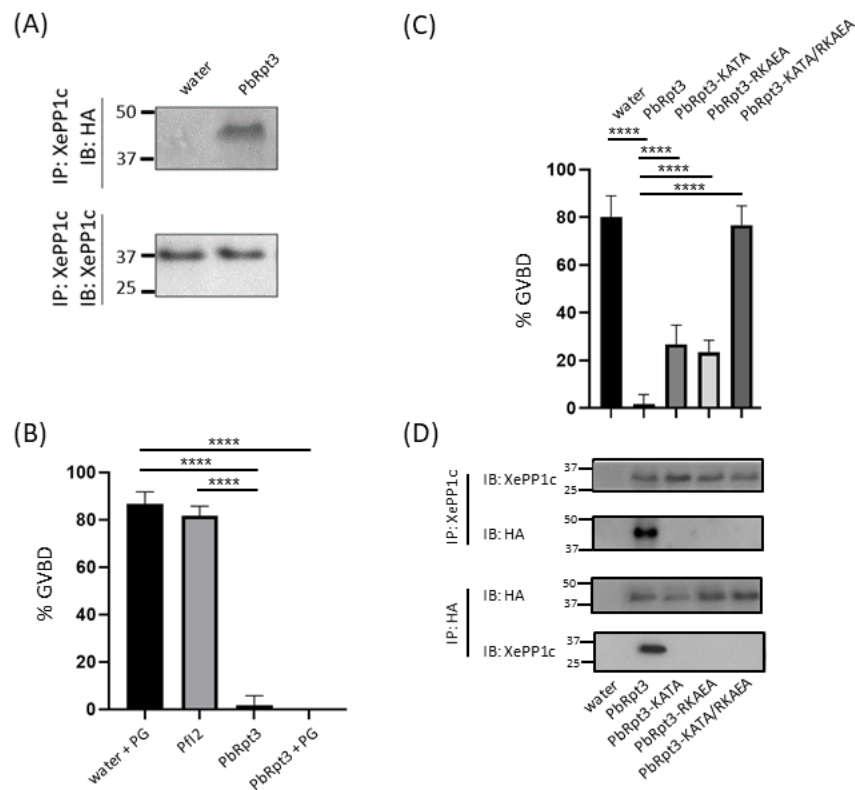
### 2.5. Effect of PbRpt3 on phosphatase activity of PP1c

As PbRpt3 recombinant protein interacts with PP1c, we assessed its effect on the phosphatase activity using the p-Nitrophenyl phosphate (pNPP) as a substrate. First, a control experience showed that when pNPP was used as substrate in the presence of PbRpt3 alone (without PFP1c), no phosphatase activity could be detected (data not shown). In the presence of PFP1c, the recombinant protein PbRpt3-45 kDa strongly increased the dephosphorylation activity of the phosphatase in a concentration-dependent manner (Figure 2B) with a mean value of 220 % of PP1c activity when a quantity of 600 pmol of PbRpt3 was used. Similarly, the PbRpt3-30 kDa recombinant protein also increased PFP1c activity, reaching more than 400% PP1c activity when incubated with 600 pmol of the truncated PbRpt3 (Figure 2B). As expected, Pfl2 decreased PFP1c activity (~60% of PFP1c activity using 600 pmol of Pfl2). These results strongly suggest that PbRpt3 would be an activator of PP1c. Moreover, although we cannot compare the values obtained with PbRpt3-45kDa and PbRpt3-30kDa due to a potential difference in the purity of the two recombinant proteins, these results clearly indicate that the activity of PbRpt3 on PFP1c is carried by the aa 131-395 region of the protein.

### 2.6. PbRpt3 binds to PP1c and shows functional activity in *Xenopus oocytes*

To further determine the functional activity of PbRpt3 in a cellular context, we took advantage of the *Xenopus* oocyte model in which it has been previously shown that several phosphatase partners could regulate cell-cycle progression from G2 to M, assessed by the appearance of GVBD (Germinal Vesicle Break Down) [32,34,35,40]. This is based on the fact that *Xenopus laevis* PP1c (XePP1c) shows >80% identity at the a.a. sequence level with

PbPP1c [35]. In the *Xenopus* model, immature oocytes are blocked in prophase I and the inhibition of PP1c by anti-PP1c antibodies or by an inhibitor of this phosphatase will trigger the GVBD reflecting the G2/M transition to metaphase II [35,40–42]. Conversely, a PP1c activator will lead to an inhibition of the progesterone (PG)-induced maturation. To confirm the *in vitro* results showing the activation of PP1c by the recombinant PbRpt3, we microinjected the cRNA coding for the HA-tagged PbRpt3 protein (Supplementary Figure 4). First, the efficient translation of PbRpt3 in oocytes after cRNA microinjection was checked by immunoblot using anti-HA mAb (Supplementary Figure 5). Next, we performed immunoprecipitations of oocyte extracts using anti-*Xenopus* PP1c (XePP1c) mAb. The immunoblot analysis revealed that PbRpt3 and XePP1c were present in the same complex (Figure 3A). At the functional level, the microinjection of PbRpt3 cRNA alone did not induce the maturation of *Xenopus* oocyte, while PG or Pfl2 did induce GVBD (Figure 3B). When oocytes maturation was induced with PG, we observed that the microinjection of PbRpt3 cRNA resulted in a significant reduction of the percentage of GVBD (Figure 3B; mean percentage of GVBD : 86.7% and 1.7% for PG and PG+PbRpt3 cRNA respectively). Taken together, these results show that PbRpt3 seems to activate XePP1c in oocytes, confirming the results obtained *in vitro*.



**Figure 3. PbRpt3 functional analysis using *Xenopus* oocytes model.** **A.** Interaction of PbRpt3 with *Xenopus* PP1c (XePP1c). Extracts prepared from *Xenopus* oocytes previously micro-injected with either water (80 nl, lane 1) or PbRpt3 cRNA (60 ng in 80nl, lane 2), followed by progesterone (PG) treatment (10  $\mu$ M, 15 hours after micro-injection) were immunoprecipitated using an anti-XePP1c mAb. An immunoblot analysis was performed using anti-HA mAb (upper panel) and anti-XePP1c mAb (lower panel). **B, C.** Role of PbRpt3 on the induction of Germinal Vesicle BreakDown (GVBD). Values are presented as mean percentages, and p value <0,0001 for each test. Each experiment was performed using a set of 10 oocytes and repeated on three animals. **B.** The appearance of GVBD induced by PG 15 h after microinjection of water (60 nl as control, lane 1) is strongly inhibited by the micro-injection of PbRpt3 cRNA (20 ng in 60 nl, lane 4). In the absence of PG, the micro-injection of PbRpt3 cRNA (20 ng in 60 nl, lane 3) is not sufficient to trigger the GVBD. As a control, the microinjection of the PP1c inhibitor Pfl2 cRNA (20 ng in 60 nl, lane 2) triggers the oocytes GVBD. **C.**

Role of the RVxF motifs of PbRpt3 for its functional activity. Percentage of GVBD of oocytes which have been micro-injected with either water as control (80 nl, lane 1), or cRNAs (60 ng in 80 nl) coding for PbRpt3 (lane 2), PbRpt3-KATA (lane 3), PbRpt3-RKAEA (lane 4) or PbRpt3-KATA/RKAEA (lane 5). All micro-injections were followed by PG treatment (10  $\mu$ M, 15 hours after micro-injection). **D.** Role of the RVxF motifs of PbRpt3 for its interaction with XePP1c. Oocytes were micro-injected with water as control (80 nl, lane 1), or cRNAs (60 ng in 80 nl) coding for PbRpt3 (lane 2), PbRpt3-KATA (lane 3), PbRpt3-RKAEA (lane 4), or PbRpt3-KATA/RKAEA (lane 5), 15 hours prior incubation with PG (10  $\mu$ M). Then, the extracts were immunoprecipitated with anti-XePP1c mAb (upper panel) or anti-HA mAb (lower panel) and subjected to immunodetection using the same antibodies. Each experiment was performed using a set of 20 oocytes and repeated on two animals.

### 2.7. *PbRpt3* RVxF motifs are crucial for PP1c binding and functional activity in *Xenopus* oocytes

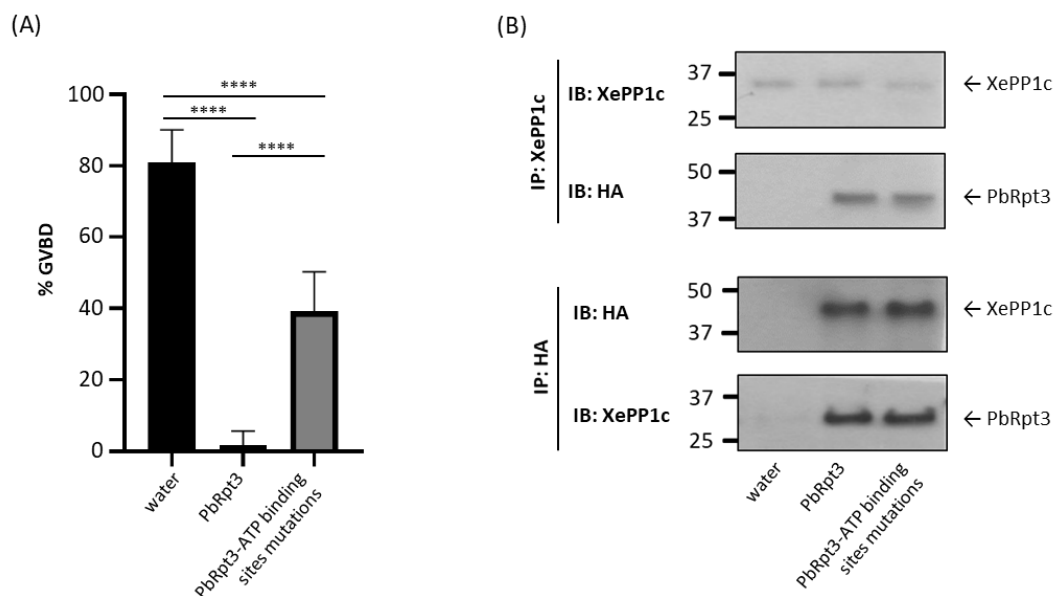
Many studies showed that the binding of PP1c to RVxF-dependent interacting proteins could be disrupted when their RVxF amino acids V/I or F are substituted with alanine residues [43,44]. In order to explore the contribution of RVxF motifs of PbRpt3 in its functional activity, we generated PbRpt3 cRNAs bearing single-motif mutations either on 200-KVTF-203 (PbRpt3-KATA) or 305-RKIEF-309 (PbRpt3-RKAEA), or double-motif mutations (PbRpt3-KATA/RKAEA) (Supplementary Figure 4). The effective translation in the oocytes of each microinjected cRNA was checked by immunoblot using anti-HA mAb (Supplementary Figure 5). We then assessed the capacity of each single mutated protein as well as the double-mutated protein to inhibit the PG-induced GVBD. As with PbRpt3, the microinjection of either single mutated cRNA, PbRpt3-KATA or PbRpt3-RKAEA, resulted in a significant reduction in the PG-induced GVBD (Figure 3C, lanes 3 and 4). However, this inhibition seemed to be partial when single mutated cRNAs were used (mean percentage of GVBD of 80%, 1.7%, 26.6%, and 23.3% for control, PbRpt3, PbRpt3-KATA or PbRpt3-RKAEA respectively). The co-immunoprecipitation/immunoblot assays performed on lysates prepared from these oocytes indicated that the PbRpt3-XePP1c complex was not detected when single mutants were injected (Figure 3D). The partial functional effect of single mutants may thus be attributed to a residual and/or transitory binding of PbRpt3 to XePP1c that would not be detected by immunoblot. In addition, and as mentioned above, a possible PbRpt3/PP1c ratio of 1:2 could also explain the limit of detection of PP1, due to the lower level of XePP1c in the complex. To further define the contribution of both RVxF motifs, we microinjected the double mutated cRNA (PbRpt3-KATA/RKAEA) in the oocytes and followed up the appearance of GVBD. As shown in Figure 3C, this double mutant was not able to inhibit PG-induced GVBD (lane 5; percentage of GVBD 76%). In addition, PbRpt3-KATA/RKAEA mutant protein failed to co-immunoprecipitate with XePP1c (Figure 3D, lane 5), despite its effective translation by the oocyte (Supplementary Figure 5, lane 6). Taken together, these results demonstrate that PbRpt3 directly interacts with PP1c, and that its interaction with PP1c *via* both RVxF motifs would be required for its functional effect.

### 2.8. *The ATPase function of PbRpt3 is involved in the activation of XePP1c*

PbRpt3 is expected to be an AAA-ATPase, as evidenced by the domain present in its protein sequence. In the predicted 3D structure, we observed that 4 amino acids (K188, D241, N288, and Q356) are involved in stabilizing the ATP molecule, as well as in the binding of a Mg<sup>2+</sup>-ion. The mutation of these amino acids may thus disrupt the enzymatic activity of the protein. To explore whether the ATP binding of PbRpt3 is involved in its functional activity towards PP1c in *Xenopus* oocytes, we generated a mutated cRNA for PbRpt3 where all the 4 residues K188, D241, N288 and Q356 (Supplementary Figure 4) were replaced by an alanine. The results in Figure 4 showed that the mutation of these 4 amino acids partially abolished the inhibition of PG-induced GVBD by PbRpt3. The microinjection of the PbRpt3 cRNA mutated for the ATP-binding sites resulted in a 39.2 % GVBD, while PbRpt3 cRNA microinjection resulted in 1.7% GVBD (mean percentage of



GVBD in PG-treated oocytes: 80.8%). Interestingly, we observed that in the subsequent immunoprecipitation experiments, the mutated PbRpt3 protein conserved its binding capacity to XePP1c (Figure 4B, lane 3). The partial effect observed on PG-induced GVBD could be explained either by a partial contribution of the ATPase activity of PbRpt3, or by a possible remaining ATPase activity related to a residual capacity of the mutated protein to bind an ATP molecule. In fact, as described above, the sequence 143-LGG-145 may be involved in stabilizing the ATP even in the absence of certain crucial residues granting the presence of stabilizing hydrogen bonds. However, as described earlier, structure modelling predicted that mutating these three amino acids by alanine residues would bring a direct effect neither on the interaction of the lateral chains with ATP, nor on the backbone organization of this part of the protein, thus predicting a high stability of the ATP maintaining pocket. Taken together, these findings indicate for the first time that the ATPase activity of PbRpt3 could contribute to the activation role of PbRpt3 towards the phosphatase PP1c.



**Figure 4. Role of the predicted ATP-binding sites of PbRpt3 in its functional activity in *Xenopus* oocytes.** **A.** Percentage of GVBD of oocytes which have been micro-injected with either water as control (80 nl, lane 1), PbRpt3 cRNA (60 ng in 80 nl, lane 2) and PbRpt3 cRNA mutated on 4 ATP binding sites (60 ng in 80 nl, lane 3). All micro-injections were followed by progesterone treatment (10  $\mu$ M, 15 hours after micro-injection). This experiment was performed using 40 oocytes from two independent animals, and reproduced on a total of 100 oocytes micro-injected with 3 different batches of cRNA. Values are presented as mean percentages, and p value <0,0001 for each test. **B.** Interaction between XePP1c and PbRpt3 analyzed by immunoprecipitation. 20 oocytes were micro-injected with water as control (80 nl, lane 1), PbRpt3 cRNA (60 ng in 80 nl, lane 2) and PbRpt3 cRNA mutated on 4 ATP binding sites (60 ng in 80 nl, lane 3), 15 hours prior incubation with PG (10  $\mu$ M). The extracts were immunoprecipitated with anti-XePP1c mAb (upper panel) or anti-HA mAb (lower panel) and subjected to immunodetection using the same mAbs. Each experiment was repeated on two animals.

### 2.9. PbRpt3 may be essential during the blood stage life cycle of *P. berghei*

Our results obtained *in vitro* and in *Xenopus* oocytes demonstrated an interaction of PbRpt3 with PP1 catalytic subunit, as well as a regulatory role of the AAA-ATPase -partially *via* its ATPase function- on the dephosphorylation activity of PP1c. In an attempt to understand the role of Rpt3 in the parasite, we used reverse genetics in *P. berghei*. In a previous *P. berghei* high throughput functional analysis of disruption phenotypes, PbRpt3-disrupted mutants showed a 'slow' growing rate phenotype in mice, while 4 out

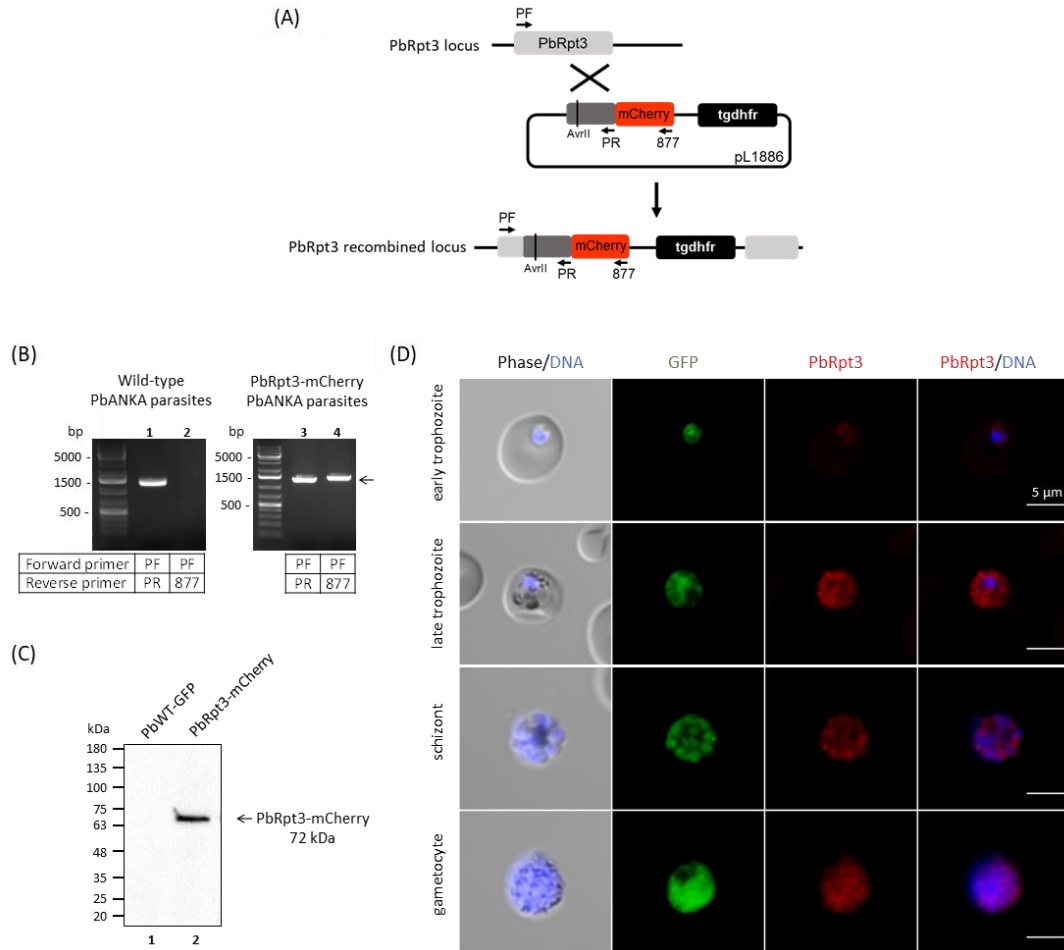


of the 5 other Rpt proteins were suggested to be essential for the erythrocytic cycle [45]. To further study whether the lack of PbRpt3 could affect *P. berghei* blood stages life cycle, we attempted to generate knock-out (KO) lines by taking advantage of the available PlasmoGEM plasmid (PbGEM-022521; 93 % deletion of the PbRpt3 gene). Transfections were performed in two different strains of *P. berghei* ANKA (pG230 and PbGFP) with this KOgem construct. After selection with pyrimethamine, resistant parasites were genotyped by PCR (See Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 6A). A total of 4 independent transfections were performed, allowing the detection of parasites 7 to 9 days after transfection under pyrimethamine selection. In two of these transfections, the diagnosis genotyping showed either no integration of the resistance cassette at the PbRpt3 locus, or an integration only of the 5' side. In the two other transfections, we detected the integration of the construct on 5' and 3' sides, as well as the wild-type PbRpt3 gene (Supplementary Figure 6B). Successive passages of these parasites in mice under pyrimethamine regimen did not result in enrichment of transgenic parasites (data not shown). We thus tried to perform cloning by limiting dilution. However, despite 5 attempts using different amounts of parasites injected per mouse, we only obtained either mixed transgenic and wild-type parasites or pure wild-type parasites (Supplementary Figure 6C). These findings provide support for the crucial role of PbRpt3 in the erythrocytic stage of *P. berghei*. It is worth noting that these results appear to differ from the previous findings in which it has been observed a slow growth rate of PbRpt3-KO parasites during the erythrocytic stages [45]. However, it is important to consider that in this large-scale functional screening, mutants were obtained through simultaneous co-transfection of multiple barcode vectors, and parasite growth was followed in uncloned population, which could potentially account for this discrepancy. In *P. falciparum*, a saturation mutagenesis study showed that most of the proteasome 26S genes, including PfRpt3, were essential for parasite survival [46]. In addition, selective inhibitors of the catalytic subunits of the parasite proteasome have shown potent anti-malarial effect [17,18,47]. Thus, the essentiality of PbRpt3 could be related either to its role in the proteasome complex and/or to its ability to bind and regulate the essential PP1c enzyme in *Plasmodium* [24,25].

#### 2.10. Localization of PbRpt3 in *P. berghei*

In order to localize PbRpt3 throughout the erythrocytic cycle of the parasite, we generated parasites expressing mCherry-tagged PbRpt3 using a single homologous strategy (Figure 5A). The correct integration of the mCherry tag was checked by PCR genotyping (Figure 5B). Following enrichment of the mCherry positive parasites by cell sorting, the expression of the tagged protein was checked by immunoblot analysis (Figure 5C). PbRpt3 localization was then assessed by immunofluorescence assays on different erythrocytic stages of *P. berghei*. Figure 5D shows the expression of PbRpt3 during the asexual development, with a low expression in early trophozoite stages which strongly increases during the late trophozoite stages. In schizonts, the signal corresponding to PbRpt3-mCherry seems to be less intense. Gametocytes showed a high level of PbRpt3-mCherry expression. This expression profile is consistent with the results of transcriptomic studies showing a maximum transcript level at the trophozoite and schizont stages [48]. The absence of the transcript at the gametocyte stage, could indicate that PbRpt3 is present as pre-formed protein. Concerning the cellular distribution of PbRpt3-mCherry, we observed that it is mainly cytoplasmic in trophozoites and schizonts stages, with a punctuated localization particularly observed in late trophozoites. This localization may correspond to parasites organelle structures or to proteasome storage granules. The latter have been described in the cytoplasm of quiescent yeasts [49]. In gametocytes, the IFA signal overlaps with DAPI staining, indicating that PbRpt3 is more accumulated in the nucleus at this stage. Overall, the distribution of PbRpt3 fits with the localization of the proteasomes in eukaryotic cells as they are mainly found in the cytoplasm of the cell, associated with the centrosomes, the cytoskeletal networks and the outer surface of the endoplasmic reticulum [3,4]. However, proteasomes have also been described in the nuclei of

eukaryotic cells where they are present throughout the nucleoplasm. But their relative abundance within nuclei and cytoplasm compartments is variable, often depending on the cell type, growth status and stimulation or stress conditions.



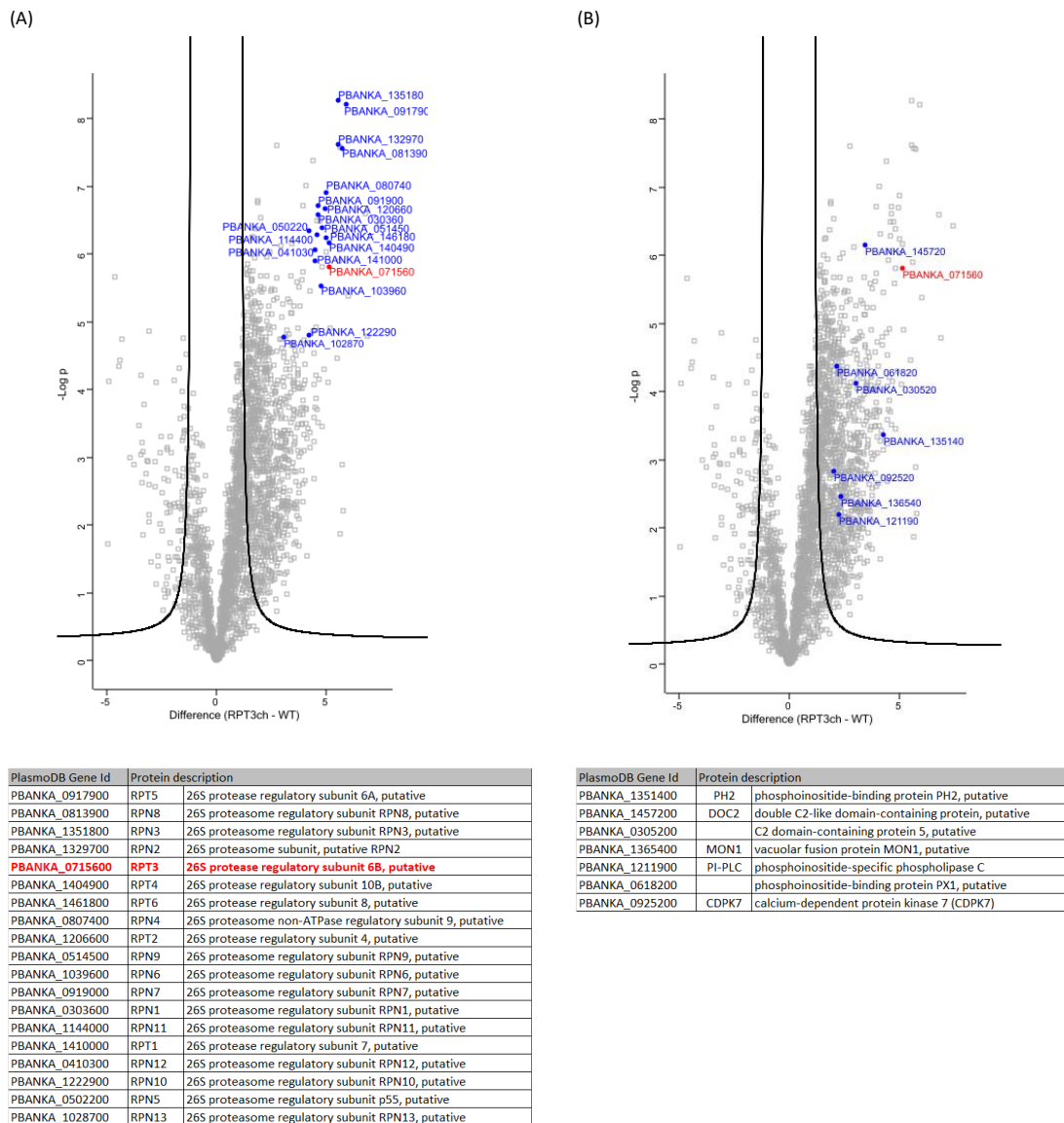
**Figure 5. Tagging of endogenous Rpt3 in *Plasmodium berghei* and localization studies** A. Knock-in strategy using the vector pL1886 that allows the insertion of the mCherry epitope at the C-terminus of *PbRpt3* with a single homologous recombination. The pL1886 construct, the *tgdhfr*-resistance cassette, the location of the primers used for PCR analysis and the locus resulting from integration are shown. A silent mutation was inserted in the coding sequence to generate an *AvrII* single cutter restriction site, in order to linearize the plasmid before transfection into *PbANKA*-GFP strain. B. Diagnosis PCR analysis of pL1886-*tgdhfr*-*PbRpt3*-mCherry transfected *Plasmodium berghei* parasites. Lanes 1 and 2 correspond to DNA extracted from wild-type (WT) *P. berghei* ANKA parasite and lanes 3 and 4 correspond to DNA extracted from transfected parasites. Lanes 1 and 3 represent the detection of the wild-type locus (PCR with PF and PR); and lanes 2 and 4 correspond to the detection of the 5' integration at the *PbRpt3* locus (PCR with PF-877, arrow). C. Immunoblot analysis of pL1886-*PbRpt3*-mCherry transfected *P. berghei*. Proteins extracted from wild type parasites (lane 1) or from transfected parasites (lane 2) were subjected to western blotting, probed with anti-RFP antibodies. D. Cellular distribution of *PbRpt3*-mCherry in *P. berghei* erythrocytic stages (early trophozoite, late trophozoite, schizont and gametocyte), analyzed by immunofluorescence with anti-mCherry antibodies. The *PbRpt3* protein appears in red and the DNA is stained with DAPI. The parasites express the Green Fluorescent Protein (GFP).

### 2.11. Analysis of PbRpt3 interactome: detection of the 19S proteasome complex

In order to identify the pathways involving PbRpt3 in *Plasmodium*, we performed a global immunoprecipitation of PbRpt3-mCherry obtained from mixed schizonts soluble extracts, followed by a mass-spectrometry analysis of the protein complexes (IP/MS). Four biological replicates were analyzed by IP/MS along with wild-type parental line used as a control. This analysis led to the identification of 2713 proteins, of which 623 were significantly enriched in the PbRpt3-mCherry IP (T test q-value < 0.01). (Supplementary Table 3, sheet 1). The detection of PbRpt3 bait confirmed the quality of the IP/MS. The entire putative proteasome regulatory particle ATPase Rpt (Rpt1 to 6) were identified, as well as all the Regulatory particles non-ATPase Rpn (Rpn 1 to 13) (Figure 6A). Of note, none of the alpha or beta subunits belonging to the catalytic 20S proteasome complex were present among the significantly enriched 623 proteins. A previous study reported the characterization of the 26S proteasome of *P. falciparum*, using an affinity purification strategy based on the ubiquitin-like domain of PfRad23, one of the ubiquitin receptors which target ubiquitylated proteins to the proteasome [20]. In this study, all the 19S and 20S proteasome subunits were identified in a mixed population of trophozoites and early schizonts. However, *P. falciparum* parasites were subjected to formaldehyde crosslinking prior to analysis, thus allowing to detect both stable and transient interactions. This procedure allowed the recovery of 20S subunits of the proteasomes. As mentioned by the authors, these 20S subunits were only present in very low quantities in the non-crosslinked control samples. These observations, together with the absence of the *P. berghei* 20S subunits in our study, suggest that the association of 19S and 20S is transient and dynamic in the parasite.

As mentioned above, the 3D model suggested that PP1c would not be able to interact with PbRpt3 when complexed in the 26S proteasome. Thus, with the absence of the 20S proteasome subunits from our interactome study, it could be expected to detect PP1c in the protein complexes. However, PbPP1c was not detected among the 623 PbRpt3 potential partners. PbRpt3 was initially identified in PbPP1c interactome, both in schizonts and gametocyte stages [16]. However, we have already observed that PP1c is not always detected in IP/MS analyses using PP1c partners as bait, despite direct interaction *in vitro* and detection of the complex in the parasite [50]. Interestingly, 6 other phosphatases, and 20 kinases are identified among the 623 PbRpt3 potential partners (Supplementary Table 3, sheet 1). These include Casein kinase 2 (CK2), which has already been shown to phosphorylate 20S proteasome subunits in eukaryotes [51]. These observations suggest that phosphorylation processes may be involved in the assembly and/or regulation of the proteasome 19S in *Plasmodium*.

To further gain new insights into pathways involving PbRpt3 in the parasite, we performed a Gene Ontology enrichment analysis including the 623 potential partners using PlasmoDB software (Release 63, May 2023). Enriched GO terms/pathways of computed and curated biological processes, cellular components and molecular functions were analyzed and summarized in Supplementary Table 3, sheet 2. Ten GO Terms were found significantly enriched, corresponding to 39 different *P. berghei* proteins, including PbRpt3 (Supplementary Table 3, sheet 3). Among them, 19 proteins belong to the Ubiquitin-proteasome pathway. This includes the 6 putative proteasome regulatory particles ATPase Rpt (Rpt1 to 6), as well as the 13 Regulatory particles non-ATPase Rpn (Rpn 1 to 13). We did not observe the presence of other proteasome-related proteins such as the two proteasome ubiquitin receptors, Rad23 and Dsk2 which have been identified in the analysis performed by Wang et al. [20].



**Figure 6. PbRpt3 interactome analysis.** Volcano plot representations of the outcome of the PbRpt3 interactome study. PbRpt3 (PBANKA\_0715600) is highlighted in red. Highlighted in blue are the interacting proteins belonging to the 19S proteasome (A) and to the GO enriched “phospholipid binding pathway” (B). List of the proteins are included in the tables below the plots, ranked according to their Student’s t-test difference. Gene identifiers (Id) and protein descriptions were updated using PlasmoDB relapse 64 (12 jul 2023), except for RPN4 and RPT2 which short names have been attributed based on sequence homology.

### 2.12. PbRpt3 interaction network includes proteins related to gene transcription and phospholipid-binding proteins

Beside the 26S proteasome-related pathways, our GO analysis revealed a significant enrichment in “intracellular protein-containing complex” pathway (Cellular components, GO:0140535) and “phospholipid binding pathway” (Molecular function, GO:0005543) (Supplementary Table 3, sheet 2). In order to get insights into the potential relation with the proteasome 19S subunit, the 39 proteins belonging to enriched pathways underwent the retrieval of networks for interacting proteins using STRING software (v.11.5, July 2023). Interestingly, proteins known to regulate gene transcription were found in this protein–protein interaction network (Supplementary Figure 7). This includes the two acetyltransferases MYST (PBANKA\_0929500) and ARD1 (PBANKA\_1201700) as well as the DNA-directed RNA polymerase 3 largest subunit (PBANKA\_1344000) and the CDC73

485

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

domain-containing protein (PBANKA\_1235400). This observation, together with the presence of the transcription factor TFIID (PBANKA\_0829800) in the list of the 39 proteins (not present in the predicted interaction network), suggest that PbRpt3 and/or the 19S regulatory particle of the proteasome may be linked to transcription regulation in the parasite.

Our GO enrichment and STRING analyses of PbRpt3 interactome has also uncovered 7 proteins belonging to the “phospholipid binding pathway” (Figure 6B, Supplementary Table 3, sheet 3; Supplementary Figure 7). Among these proteins, we find the phosphoinositide-binding protein PH2 (PBANKA\_1351400), which has been described to play a role during the fusion between the micronemes membrane and cytoplasmic membrane in *P. falciparum* [52], the phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC, PBANKA\_1211900), the double C2-like domain-containing protein (DOC2, PBANKA\_1457200) and the phosphoinositide-binding protein PX1 (PBANKA\_0618200). It is worth mentioning that 5 additional phospholipases were found among the 623 potential PbRpt3 partners (Supplementary Table 3, sheet 1), supporting a possible role of PbRpt3 in the regulation of phospholipid hydrolysis. We also observed, linked to the phosphoinositide-binding protein PX1 in our STRING analysis, the calcium-dependent protein kinase 7 (CDPK7, PBANKA\_0925200). Interestingly, PfCDPK7 interacts with 4'-phosphorylated phosphoinositides and is involved in the regulation of phospholipid biosynthesis in *P. falciparum* [53]. Moreover, PfCDPK7 has been described as a partner of PfRCC-PIP, a *Plasmodium*-specific regulator of PfPP1c [35]. This suggests that, like RCC-PIP, PbRpt3 could provide a platform to regulate phosphorylation/dephosphorylation processes, possibly linked to membrane phospholipids. Of note, among the 623 significantly enriched proteins, we also observed the presence of the *P. berghei* GC $\alpha$  (guanylyl cyclase alpha, PBANKA\_0910300). This protein, composed of a guanylyl cyclase and a phospholipid transporter domain (PLT), has been shown to be a substrate of PfPP1c during the late erythrocytic stages of *P. falciparum* [25]. Its cGMP-synthesizing activity, which is required for the downstream Protein kinase G (PKG) activation, may thus be regulated by PfPP1c via PLT phosphorylation, leading to phospholipid translocation and subsequently stimulating the egress process. The identification of PbGC $\alpha$  in the PbRpt3 interactome, together with our results showing the role of PbRpt3 in the activation of PP1c dephosphorylation activity, may indicate an indirect role of this AAA-ATPase in the regulation of GC $\alpha$  activity upstream PKG stimulation and parasite egress from the host erythrocyte. Taken together, although these potential interactions should be confirmed by complementary approaches, our observations support a role for PbRpt3, within the 19S proteasome or alone, in various crucial parasite mechanisms linked to membrane dynamics.

### 2.13. Conclusions

Our study revealed an undescribed relationship between Rpt3, a component of the *Plasmodium* 19S proteasome regulatory complex, and the PP1 phosphatase. Using *in vitro* approaches and a heterologous model, we demonstrated the ability of PbRpt3 to activate PP1c. We observed that the up-regulation of PP1c dephosphorylation activity is not only dependent on the direct binding of PbRpt3 to PP1c via its RVxF motifs, but also potentially on the ATPase function of PbRpt3. In addition, analysis of the PbRpt3 interactome in the parasite confirmed that it belongs to the 19S complex and also revealed interactions with proteins involved in transcriptional regulation and phospholipid binding. The latter include the PH2 and GC $\alpha$  proteins, which have previously been described to play a role in the fusion of micronemes to the cytoplasmic membranes of the parasite and in the regulation of its egress from the host cell, respectively. These observations, combined with the failure to generate KO parasites for PbRpt3, suggest that PbRpt3, either within the proteasome complex or alone, plays a critical role in diverse pathways in *Plasmodium*, likely via PP1c binding/activation and phospholipid (in)direct interaction.

## 3. Materials and Methods

### 3.1. Ethics statement

Mice were purchased from Charles River and housed in an Animal Biosafety Level 2 facility at the Institut Pasteur de Lille. Mature *Xenopus laevis* females were purchased from the CRB-University of Rennes I, and housed in PHEXMAR, University of Lille. All animals were maintained in accordance with the French National Guidelines for Use of Animals for Scientific Purposes which is also in line with EU Directive 2010/63/EU. Experimental protocols performed in this study were reviewed and approved by the “Comité d’Ethique CEEA-75 en Experimentation Animale Nord-Pas de Calais-France” (mice project number: 18905-2019020111166978v2; *Xenopus* project number: F59-00913).

### 3.2. Animals

Mice: Infections with the parasite *Plasmodium berghei* were performed in 4 weeks CD1 male mice maintained in filter cages and sorted randomly into groups of 3-4 animals. Mice were infected with parasites resuspended in phosphate buffered saline by intraperitoneal injection. Drugs were administered in drinking water or by intraperitoneal injection. Intra-erythrocytic parasitemia was monitored regularly on blood smears.

*Xenopus*: After anesthesia, realized by immersion in 2 g/L MS222 solution (tricaine methane sulfonate), ovarian lobes were surgically removed and stored in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5) at 19 °C.

### 3.3. PbRpt3 sequence analysis and molecular modeling

We used PlasmoDB data base version 63 as a reference for gene annotation and expression [<https://plasmodb.org>]. The model was constructed using the sequence alignment of *Plasmodium berghei* PbRpt3 [PBANKA\_0715600] and the human PSMC4 of 418 amino acids (PDB file 6MSB – chain D). This protein shows 67% identity with PbRpt3 (Supplementary Figure 2). The crystallographic structures available on PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>) allowed us to build a 3D model of PbRpt3 by homology modeling. The magnesium ion was copied from the reference, the atomic partial charges calculated with the Gasteiger-Hückel method, the geometry of the backbone was optimized by 2000 iteration steps of conjugated gradients, and the protein was allowed to move until the gradient value was smaller than 0.01 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> with the MMFF94s force field [54]. The quality of the model was checked with its Ramachandran plot (Supplementary Figure 8). The calculations were performed with SYBYL software version 6.9.2 (Tripos Associates, St. Louis, Missouri) and the images with Chimera software version 1.15. PbRpt3 was finally placed in the human proteasome by replacing the D chain in order to have a representation of its environment (PDB file 6MSB).

### 3.4. Plasmids and directed mutagenesis

Plasmids pGADT7 and pETDuet-1 were purchased from Clontech and Novagen respectively. The plasmid pL1886 was kindly provided by Dr B. Franke-Fayard (Leiden University Medical Center, The Netherlands). The plasmid PbGEM-022521 used in the reverse genetic study in *P. berghei* was kindly gifted from the Plasmogem-Wellcome Sanger Institute (Cambridge, UK). For *Xenopus* oocytes experiments, a PbRpt3 cDNA with optimized codons has been synthesized and inserted into the pGADT7 plasmid (Genescript; Supplementary Figure 4). The plasmids pGADT7-PbRpt3-HA mutated 305-RKAEA-309 and pGADT7-PbRpt3-HA substituted for alanines in positions K188, D241, N288 and Q356 both optimized for *Xenopus laevis* were purchased from Azenta (Supplementary Figure 4). For the other mutations on pGAD-T7-PbRpt3, site-directed mutations were performed using the NEB Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, M0493) with primers generated via the NEBaseChanger tool (<https://nebasechanger.neb.com/>) and listed in Supplementary Table 2. This strategy was used for mutating 200-KVTF-203 in 200-KATA-203 on pGADT7-PbRpt3 (primers KA3 and KA4),

and to obtain the double mutant, the mutation 305-RKAEA-309 was performed on pGADT7-PbRpt3-KATA mutated (primers RK3 and RK4). The PCR reactions were performed as recommended by the manufacturer (New England Biolabs) with optimized annealing temperatures as indicated in Supplementary Table 2. After analysis, 1 µl of each PCR product was treated with KLD (kinase, ligase, DpnI) enzyme mix, and 5 µl of the treated mix were used to transform competent bacteria (Takara, Stellar™ Competent Cells, cat # 636763). Mutants were checked by sequencing and all primers used in this study are indicated in Supplementary Table 2.

### 3.5. Recombinant protein expression

The coding regions of PbRpt3-45 kDa (a.a. 1-395) and PbRpt3-30 kDa (a.a.131-395) were obtained by PCR with the primers P1-P2 and P2-P4 respectively (Supplementary Table 2) and cloned into pETDuet-1 (Novagen) using the In-Fusion HD Cloning system (Clontech). All recombinant protein constructs were verified by sequencing. Recombinant His-tagged PbRpt3 expression was carried out in Artic Express BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent *E. coli* cells (Life Technologies) in the presence of 0.5 mM IPTG at 10°C for 24 hours. After centrifuging at 3900 rpm for 30min at 4°C, cells were frozen at -80°C overnight. Cells were resuspended in non-denaturing buffer at 4°C (10 mM Tris, 500 mM NaCl, MgCl<sub>2</sub> 1mM, 3U of DNase I, and protease inhibitor cocktail 1 X from Roche, ref 4693116001, pH 7.9) followed by sonication and ultracentrifugation at 13000 rpm for 45 min at 4°C. Pellets were resuspended in denaturing buffer (10 mM Tris, 500 mM NaCl, 6 M guanidine, 20 mM imidazole, MgCl<sub>2</sub> 1 mM and 1X protease inhibitor, pH 7.9) and sonicated again. After ultracentrifugation at 18000 rpm 45 min at 4°C, supernatant was incubated overnight at 4°C with Ni-NTA agarose beads (Qiagen) used to purify the recombinant proteins as described [41]. Beads were centrifuged at 3900 rpm for 20 min at 4°C and washed 4 times in denaturing buffer. Proteins were eluted with 12 ml of elution buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 6 M guanidine, 600 mM imidazole, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 1X Roche protease inhibitor) and exchanged into #1 to #5 dialysis buffers in order to remove the imidazole and the Guanidine. Exchange buffers were prepared with 10% glycerol deionized water, 500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.9. The exchange buffers #1, #2 and #3 contain additionally Guanidine at a concentration of 6M, 4M and 2M respectively, and exchange buffers #4 to #5 are identical and Guanidine free. After exchange in buffer #4, proteins were ultracentrifuged at 13000 rpm for 10 min at 4°C and concentrated to 1.5 ml using centrifugal filters (Merck, Amicon Ultra-4). They were then exchanged into buffer #5 overnight at 4°C and aliquoted and stored at -80°C. Recombinant proteins were quantified with Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Life Technologies) and the purity of the purified proteins was checked by SDS-PAGE and western blot using anti-His antibody (1:1000, Qiagen) as primary antibody, HRP-labelled anti-mouse IgG (1:20000 dilution, Rockland Immunochemicals) as secondary antibody and Chemiluminescence detection (SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, Life Technologies).

### 3.6. Measurement of binding of PbRpt3 to PP1c

PfPP1c (PF3D7\_1414400) share a high level (99%) of identity of amino acid (301/304) with PbPP1c sequence (PBANKA\_1028300), therefore we used the PfPP1c recombinant protein that we previously purified [32]. To assess binding of recombinant PbRpt3-30kDa and PbRpt3-45kDa proteins to PfPP1c, an ELISA-based assay was used as previously described [33]. Nunc-Immuno™ TM Microwell Maxisorp plates (Sigma-Aldrich) were coated overnight at 4°C with 25pmol of either PbRpt3-30kDa, PbRpt3-45kDa or PfI2 as positive control, diluted in PBS. After five washes with 0.1% PBS-Tween, the plates were blocked with 200 µl/well of PBS containing 0.5% gelatin for 1 h at room temperature. Plates were then incubated at 37 °C for 2 h with different quantities (0.125 - 4 pmol) of biotinylated PfPP1c labeled with biotin-NHS (Calbiochem) in PBS-Tween 0.1%. The binding detection was performed using Streptavidin-HRP (1:150000 in 0.1% PBS Tween) and

trimethylbenzidine substrate (Uptima) (100 µl/well). The reaction was stopped using 2 N HCl. An ELISA plate reader (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific) was used to measure the optical density at 450 nm and 570 nm. The difference between these two OD measures was used for analysis. BSA was used as control. The statistical significance was calculated with the Mann-Whitney U test for nonparametric data. p values < 0.05 were considered significant.

### 3.7. Assays for effects of PbRpt3 on PfPP1 activity

To investigate the role of PbRpt3 on PfPP1c activity, p-nitrophenyl phosphate (pNPP) was used in an assay as a substrate as described previously [32]. Briefly, different quantities of PbRpt3-30-kDa or PbRpt3-45kDa (37.5 to 600 pmol) were preincubated for 30 min at 37 °C with 1 µg of PfPP1c. After adding the substrate, the plate was incubated 1h at 37 °C and the variation of phosphatase activity of PfPP1c in presence of PbRpt3 was measured by optical density at 405 nm. Results are presented as mean of increase or decrease of PP1 phosphatase activity in comparison with PfPP1c activity without PbRpt3.

### 3.8. Analysis of *Xenopus* oocytes GVBD and protein immunoprecipitation

The five plasmids (pGADT7-PbRpt3, pGADT7-PbRpt3-KATA, pGADT7-PbRpt3-RKAEA, pGADT7-PbRpt3-KATA/RKAEA, and pGADT7-PbRpt3 ATP-binding sites mutant), were linearized with XhoI, and used as templates with the T7 mMessage mMachine kit (Ambion) to synthesize *in vitro* capped mRNA (cRNA) encoding full size 45 kDa native or mutated protein PbRpt3. *Xenopus* oocytes were micro-injected with 80 nl of water used as control, or with cRNA coding for PbRpt3 native / mutants (60 ng in 80nl). We also injected PfI2 cRNA as a positive control (60 ng in 80nl) [34]. Microinjections were followed by progesterone extracellular treatment when indicated (10 µM, 15 hours after micro-injection) and for the experiment Figure 3A. After 15 h the GVBD (germinal vesicle breakdown) was detected by the appearance of a white spot at the center of the animal pole [55]. Experiments were performed using 10 oocytes and repeated on two to three animals. For immunoprecipitation experiments, 20 oocytes were lysed in 200 µl of buffer PY (50 mM Hepes pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05% SDS, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 1 mg/ml bovine serum albumin, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 10 µg/ml benzamidine, 1 mM sodium vanadate) and centrifuged at 4°C for 15 min at 12 000 g. Supernatants were incubated with anti-XePP1 antibodies (Santa-Cruz Biotechnology, 1:200) in the presence of protein A-sepharose beads (20 µl of 50% bead solution, Sigma) for 1 hour at 4°C. After centrifugation, beads were washed 3 times with buffer PY, and immune complexes are eluted with 25 µl of Laemmli buffer 2X (Biorad) heated at 90°C for 5 min. For electrophoresis, 15 µl of proteins complex solution were separated by 4–20% SDS-PAGE gels (mini protean TGX, BioRad), blotted onto nitrocellulose, and probed with primary antibody anti-XePP1 (Santa-Cruz Biotechnology, 1:1500) or anti-HA (1:1500, Invitrogen) followed by anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (1:10000, eBiosciences, Trueblot). Chemiluminescence detection was performed with ECL Select detection system (Amersham) on hyperfilm (MP, Amersham).

### 3.9. Isolation of parasites stages

Parasite stages were isolated as previously described [56–58]. Trophozoite stage parasites were obtained from blood collected by cardiac puncture from euthanized mice at a parasitaemia < 5%. For immunofluorescence experiments, mature schizonts were obtained from blood cultured (20 hours of culture) in a RPMI 1640 medium containing 25 mM HEPES, 0.4% Albumax, 0.2 mM hypoxanthine and 20 µg/ml gentamycin. For immunoprecipitation experiment, a mixed schizonts population (early, middle and late schizonts) was obtained after 15 hours culture in the same medium. This mixed population was purified on a 60% Nycodenz gradient (27.6% w/v Nycodenz in 5 mM Tris-HCl pH 7.20, 3 mM KCl, 0.3 mM EDTA) and centrifuged for 20 min à 450 g. For selection of



gametocytes, 200  $\mu$ l of phenylhydrazine (6 mg/ml) were injected (by IP) in mice 3 days prior to parasite infection. On day 3 post-infection and for 2 days, mice were treated with sulfadiazine (Sigma) 20 mg/l in drinking water, then, on day 5 post infection, blood collection was performed by cardiac puncture on euthanized mice. For all parasite stages, the purity of the parasite preparations was checked on Giemsa-stained smears by microscopic examination.

### 3.10. Generation of transgenic parasites

The *Plasmodium berghei* (Pb)ANKA-GFP parasites were a kind gift from Dr. O. Silvie (Université Pierre et Marie Curie, Paris, France) and the pG230 parasites were a kind gift from Dr. N. Philip (The University of Edinburgh, Edinburgh, UK). A PbRpt3 KO line was generated by double homologous recombination of a NotI-linearized PlasmogEM vector (PbGEM-022521, Wellcome Sanger Institute) transfected into PbANKA-GFP parasites. The C-terminal m-Cherry tagged PbRpt3 line was generated by single homologous recombination: a 1228-bp region of PbRpt3 starting 289 bp downstream from the start codon and lacking a stop codon was inserted into pL1886 vector (Genescript). A silent mutation was inserted in the coding sequence to generate an AvrII single cutter restriction site (Figure 5), in order to linearize the plasmid before transfection into PbANKA-GFP strain. All transfections were performed as previously described [45,59,60]. Nycodenz-enriched schizonts were electroporated with 10  $\mu$ g linearized DNA and IV-injected into naive mice. Positive transfectants were selected with pyrimethamine in drinking water (70 mg/L, TCI). Four independent transfections were performed to generate KO lines, with a total number of 6 recipient mice. KO transgenic parasites were cloned by limiting dilution and genotyped using diagnostic PCR (Supplementary Table 2, Supplementary Figure 6). Primers QCR2 - GW2 and GW1 - GT were used to detect the integration of the dhfr resistance cassette at the PbRpt3 locus (5' - and 3' side respectively), and primers QCR2 - P1 / QCR2 - P4 and/or QCR3 - P4 were used to detect the wild-type PbRpt3 gene. PbRpt3-mCherry parasites were enriched by cell-sorting on a FACSARIA cell sorter (Beckton Dickinson) and the mCherry integration was confirmed by PCR using primers PF-877 (Supplementary Table 2). The correct size expression of PbRpt3-mCherry protein was confirmed by western blot analysis, with the parental strain used as control. Samples in Laemmli buffer were denatured at 100°C for 3 min and electrophoresed on a 4–20% SDS polyacrylamide gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were probed with rabbit anti-RFP pAb (1:2000, MBL, PM005) as primary antibody, and anti-rabbit HRP (1:20000, Sigma-Aldrich, A0545) as secondary antibody. Chemiluminescence detection was performed as above.

### 3.11. Immunofluorescence assays

Blood was collected from mice infected with *Plasmodium berghei* PbRpt3-mCherry parasites. *P. berghei* blood stages were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.075% glutaraldehyde for 10 min at 4°C and centrifuged at 2000 rpm 2 min at room temperature. Sedimentation, permeabilization and saturation steps were performed as described [15]. Then a 1:500 dilution in PBS BSA 1% of Anti-RFP pAb (MBL, PM005) was applied for 1h at 37°C. Following PBS washing, coverslips were incubated with anti-Rabbit IgG Cross-Adsorbed, Alexa Fluor 594 (Life Technologies, A11012) diluted at 1:1000 in PBS BSA 1% and parasitic nucleus were stained with DAPI at a concentration of 1  $\mu$ g/ml in PBS BSA 1%, for 1h at 37°C. The coverslips were mounted in Mowiol (3  $\mu$ l), and confocal imaging was performed using a Zeiss LSM880 microscope. Subsequent image treatment was performed with ImageJ software.

### 3.12. Immunoprecipitation

Purified parasites (mixed schizont population) of parental wild-type parasites used as control and PbRpt3-mCherry were suspended with 50 mM Tris-HCl, 0.5% Triton X100

and protease inhibitor cocktail (Roche), pH 8. A 10 freeze-thaw cycles and sonication 30'' on/off cycles followed by a 5 hours centrifugation at 13000 rpm at 4° C allowed to obtain the soluble fractions. RFP-Trap1\_A beads (Chromotek) were equilibrated with dilution buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche), pH 7.5) and incubated overnight at 4° C with parasite soluble extracts on a rotating wheel. Beads were washed 10 times with dilution buffer and elution was performed in Laemmli buffer. After 3 min at 100° C, 8 samples were stored at -20°C for subsequent Mass-spectrometry experience (4 biological samples for Schizonts (15h culture) PbWT-GFP and 4 biological samples for Schizonts (15h culture) PbRpt3-mCherry). The presence of PbRpt3-mCherry in the IP was checked by western blot analysis as above.

### 3.13. Sample preparation for mass spectrometry

S-Trap™ micro spin column (Protifi, Hutington, USA) digestion was performed on immunoprecipitation eluates according to manufacturer's instructions. Briefly, samples were supplemented with 20% SDS to a final concentration of 5%, reduced with 20mM TCEP (Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride) and alkylated with 50mM CAA (chloracetamide) for 5min at 95°C. Aqueous phosphoric acid was then added to a final concentration of 2.5% following by the addition of S-Trap binding buffer (90% aqueous methanol, 100mM TEAB, pH7.1). Mixtures were then loaded on S-Trap columns. Five washes were performed for thorough SDS elimination. Samples were digested with 3µg of trypsin (Promega, Madison, WI, USA) at 47°C for 2 h. After elution, peptides were vacuum dried.

### 3.14. NanoLC-MS/MS protein identification and quantification

The tryptic peptides were resuspended in 35 µL and a volume of 3µL was injected on a nanoElute (Bruker Daltonics, Germany) HPLC (high-performance liquid chromatography) system coupled to a timsTOF Pro (Bruker Daltonics, Germany) mass spectrometer. HPLC separation (Solvent A : 0.1% formic acid in water; Solvent B : 0.1% formic acid in acetonitrile) was carried out at 400nL/min using a packed emitter column (C18, 25 cm×75µm 1.6µm) (Ion Optics, Australia) using a 15min gradient elution (2 to 17% solvent B during 8min; 17 to 25% during 2min; 25% to 37% during 2min; 37% to 95% for 1min and finally 95% for 2min to wash the column). Mass-spectrometric data were acquired using the parallel accumulation serial fragmentation (PASEF) acquisition method in DIA (Data Independent Analysis) mode. The measurements were carried out over the m/z range from 475 to 1000 Th. The range of ion mobilities values from 0.85 to 1.30 V s/cm<sup>2</sup> (1/k0). The total cycle time was set to 0.95s.

Data analysis was performed using DIA-NN software (version 1.8.1) [61]. A search against the UniProt/Swiss-Prot *Mus Musculus* database downloaded from Uniprot on 09/01/2023 (17574entries) and *Plasmodium berghei* ANKA database downloaded from PlasmoDB on 17/05/2023 (Release 63) was performed using library free workflow. For this purpose, "FASTA digest for library free search/library generation" and "Deep learning spectra, RTs and IMs prediction" options were checked for precursor ion generation. A maximum of 1 trypsin missed cleavages was allowed and the maximum variable modification was set to 2. Carbamidomethylation (Cys) was set as the fixed modification, whereas protein N-terminal methionine excision, methionine oxidation and N-terminal acetylation were set as variable modifications. The peptide length range was set to 7–30 amino acids, precursor charge range 2–4, precursor m/z range 300–1800, and fragment ion m/z range 300–1800. To search the parent mass and fragment ions, accuracy was set to 10 ppm manually. The false discovery rates (FDRs) at the protein and peptide level were set to 1%. Match between runs was allowed. For the quantification strategy, Robust LC (high precision) was used as advised in the software documentation, and normalization option was disabled whereas default settings were kept for the other algorithm parameters.

Statistical and bioinformatic analysis including volcano plot with Perseus were performed with Perseus software (version 1.6.15) [62] freely available at [www.perseus-framework.org](http://www.perseus-framework.org). All protein intensities were log<sub>2</sub> transformed to perform statistics. For statistical comparison, we set two groups (WT, RPT3ch), each containing up to 4 biological replicates. We then filtered the data to keep only proteins with at least 4 out of 4 valid values in at least one group. Next, the data were imputed to fill missing data points by creating a Gaussian distribution of random numbers with a standard deviation of 33% relative to the standard deviation of the measured values and 2.5 standard deviation downshift of the mean to simulate the distribution of low signal values. We performed a t-test, FDR<0.01, S0=2.

### Supplementary Materials:

- Supplementary Figure 1. Protein sequence of PbRpt3 (PBANKA\_0715600) 819
- Supplementary Figure 2. Sequence alignment of human PSMC4 with *Plasmodium berghei* PbRpt3. 820
- Supplementary Figure 3. Analysis of PbRpt3 recombinant proteins. 821
- Supplementary Figure 4. Recodonized sequence of PbRpt3 cDNA optimized for translation in *Xenopus laevis*, and deduced amino acid sequence. 822  
823
- Supplementary Figure 5. PbRpt3 functional analysis using *Xenopus* oocytes model. 824
- Supplementary Figure 6. PlasmogEM construct (PbGEM-022521) and genotyping. 825
- Supplementary Figure 7. STRING network visualization of PbRpt3-interacting proteins belonging to the 10 enriched GO terms. 826  
827
- Supplementary Figure 8. Ramachandran plot and statistics of the PbRpt3 model. 828
- Supplementary Table 1. Conservation of the KVTF and RKIEF motifs between different organisms among Rpt3 proteins 829  
830
- Supplementary Table 2. List of primers used throughout this study 831
- Supplementary Table 3, sheet 1. Identified proteins after PbRpt3-mCherry immunoprecipitation in *P. berghei* mixed schizonts. Sheet 2. Analysis of biological processes, cellular components and molecular functions enrichment in PbRpt3 interactome. Sheet 3. List of the PbRpt3 potential partners which belong to enriched GO term. 832  
833  
834  
835
- Author Contributions:** Conceptualization, CP; Data curation, CL, CDW, AM, AF, IM, ICG, KC, CP; Formal analysis, CL, CDW, CP; Investigation, CL, CDW, AM, AF, IM, ICG, KC, CP; Methodology, CL, CDW, AM, AF, IM, ICG, KC, CP; Project administration, CP; Supervision, CL, JK, CP; Validation, CL, CDW, AF, ICG, KC, CP; Writing—original draft, CL, JK, CP; Writing—review and editing, CL, CDW, AM, AF, IM, ICG, KC, JK, CP; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. 836  
837  
838  
839  
840  
841
- Funding:** CL obtained a PhD grant from the University of Lille. This work has been funded by CNRS, Inserm, University of Lille and Institut Pasteur de Lille. 842  
843
- Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the “Comité d’Ethique CEEA-75 en Experimentation Animale Nord-Pas de Calais-France” (mice project number: 18905-2019020111166978v2; Xenopus project number: F59-00913). 844  
845  
846
- Data Availability Statement:** The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [63] partner repository with the dataset identifier PXD044616. 847  
848  
849
- Acknowledgments:** The authors would like to thank Sophie Lecher, Elizabeth Pradel and Stéphanie Cabay for technical assistance. 850  
851
- Conflicts of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. 852  
853

## References

1. Pickart, C.M.; Cohen, R.E. Proteasomes and Their Kin: Proteases in the Machine Age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 177–187, doi:10.1038/nrm1336. 854
2. Enenkel, C.; Kang, R.W.; Wilfling, F.; Ernst, O.P. Intracellular Localization of the Proteasome in Response to Stress Conditions. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 102083, doi:10.1016/j.jbc.2022.102083. 855
3. Wójcik, C.; DeMartino, G.N. Intracellular Localization of Proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 579–589, doi:10.1016/s1357-2725(02)00380-1. 857
4. Guo, X. Localized Proteasomal Degradation: From the Nucleus to Cell Periphery. *Biomolecules* **2022**, *12*, 229, doi:10.3390/biom12020229. 858
5. Sharon, M.; Taverner, T.; Ambroggio, X.I.; Deshaies, R.J.; Robinson, C.V. Structural Organization of the 19S Proteasome Lid: Insights from MS of Intact Complexes. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e267, doi:10.1371/journal.pbio.0040267. 859
6. Kunjappu, M.J.; Hochstrasser, M. Assembly of the 20S Proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2–12, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.008. 860
7. Scruggs, S.B.; Zong, N.C.; Wang, D.; Stefani, E.; Ping, P. Post-Translational Modification of Cardiac Proteasomes: Functional Delineation Enabled by Proteomics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *303*, H9-18, doi:10.1152/ajpheart.00189.2012. 861
8. Guo, X.; Huang, X.; Chen, M.J. Reversible Phosphorylation of the 26S Proteasome. *Protein Cell* **2017**, *8*, 255–272, doi:10.1007/s13238-017-0382-x. 862
9. Zong, C.; Gomes, A.V.; Drews, O.; Li, X.; Young, G.W.; Berhane, B.; Qiao, X.; French, S.W.; Bardag-Gorce, F.; Ping, P. Regulation of Murine Cardiac 20S Proteasomes: Role of Associating Partners. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 372–380, doi:10.1161/01.RES.0000237389.40000.02. 863
10. Zhang, F.; Hu, Y.; Huang, P.; Toleman, C.A.; Paterson, A.J.; Kudlow, J.E. Proteasome Function Is Regulated by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase through Phosphorylation of Rpt6. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 22460–22471, doi:10.1074/jbc.M702439200. 864
11. Kikuchi, J.; Iwafune, Y.; Akiyama, T.; Okayama, A.; Nakamura, H.; Arakawa, N.; Kimura, Y.; Hirano, H. Co- and Post-Translational Modifications of the 26S Proteasome in Yeast. *Proteomics* **2010**, *10*, 2769–2779, doi:10.1002/pmic.200900283. 865
12. Li, N.; Zhang, Z.; Zhang, W.; Wei, Q. Calcineurin B Subunit Interacts with Proteasome Subunit Alpha Type 7 and Represses Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Activity via the Proteasome Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *405*, 468–472, doi:10.1016/j.bbrc.2011.01.055. 866
13. Zhang, W.; Wei, Q. Calcineurin Stimulates the Expression of Inflammatory Factors in RAW 264.7 Cells by Interacting with Proteasome Subunit Alpha Type 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *407*, 668–673, doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.071. 867
14. Guo, X.; Engel, J.L.; Xiao, J.; Tagliabracci, V.S.; Wang, X.; Huang, L.; Dixon, J.E. UBLCP1 Is a 26S Proteasome Phosphatase That Regulates Nuclear Proteasome Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 18649–18654, doi:10.1073/pnas.1113170108. 868
15. Hollin, T.; De Witte, C.; Fréville, A.; Guerrero, I.C.; Chhuon, C.; Saliou, J.-M.; Herbert, F.; Pierrot, C.; Khalife, J. Essential Role of GEXP15, a Specific Protein Phosphatase Type 1 Partner, in Plasmodium berghei in Asexual Erythrocytic Proliferation and Transmission. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007973, doi:10.1371/journal.ppat.1007973. 869
16. De Witte, C.; Aliouat, E.M.; Chhuon, C.; Guerrero, I.C.; Pierrot, C.; Khalife, J. Mapping PP1c and Its Inhibitor 2 Interactomes Reveals Conserved and Specific Networks in Asexual and Sexual Stages of Plasmodium. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1069, doi:10.3390/ijms23031069. 870
17. Krishnan, K.M.; Williamson, K.C. The Proteasome as a Target to Combat Malaria: Hits and Misses. *Transl. Res.* **2018**, *198*, 40–47, doi:10.1016/j.trsl.2018.04.007. 871
18. Dogovski, C.; Xie, S.C.; Burgio, G.; Bridgford, J.; Mok, S.; McCaw, J.M.; Chotivanich, K.; Kenny, S.; Gnädig, N.; Straimer, J.; et al. Targeting the Cell Stress Response of Plasmodium falciparum to Overcome Artemisinin Resistance. *PLoS Biol.* **2015**, *13*, e1002132, doi:10.1371/journal.pbio.1002132. 872
19. Bridgford, J.L.; Xie, S.C.; Cobbold, S.A.; Pasaje, C.F.A.; Herrmann, S.; Yang, T.; Gillett, D.L.; Dick, L.R.; Ralph, S.A.; Dogovski, C.; et al. Artemisinin Kills Malaria Parasites by Damaging Proteins and Inhibiting the Proteasome. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3801, doi:10.1038/s41467-018-06221-1. 873
20. Wang, L.; Delahunty, C.; Fritz-Wolf, K.; Rahlfs, S.; Helena Prieto, J.; Yates, J.R.; Becker, K. Characterization of the 26S Proteasome Network in Plasmodium falciparum. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17818, doi:10.1038/srep17818. 874
21. Muralidharan, V.; Oksman, A.; Iwamoto, M.; Wandless, T.J.; Goldberg, D.E. Asparagine Repeat Function in a Plasmodium falciparum Protein Assessed via a Regulatable Fluorescent Affinity Tag. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 4411–4416, doi:10.1073/pnas.1018449108. 875
22. Li, H.; Bogyo, M.; da Fonseca, P.C.A. The Cryo-EM Structure of the Plasmodium falciparum 20S Proteasome and Its Use in the Fight against Malaria. *FEBS J.* **2016**, *283*, 4238–4243, doi:10.1111/febs.13780. 876
23. Yokoyama, D.; Saito-Ito, A.; Asao, N.; Tanabe, K.; Yamamoto, M.; Matsumura, T. Modulation of the Growth Of Plasmodium falciparum in Vitro by Protein Serine/Threonine Phosphatase Inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *247*, 18–23, doi:10.1006/bbrc.1998.8730. 877
24. Guttery, D.S.; Poulin, B.; Ramaprasad, A.; Wall, R.J.; Ferguson, D.J.P.; Brady, D.; Patzewitz, E.-M.; Whipple, S.; Straschil, U.; Wright, M.H.; et al. Genome-Wide Functional Analysis of Plasmodium Protein Phosphatases Reveals Key Regulators of Parasite Development and Differentiation. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 128–140, doi:10.1016/j.chom.2014.05.020. 878

25. Paul, A.S.; Miliu, A.; Paulo, J.A.; Goldberg, J.M.; Bonilla, A.M.; Berry, L.; Seveno, M.; Braun-Breton, C.; Kosber, A.L.; Elsworth, B.; et al. Co-Option of Plasmodium falciparum PP1 for Egress from Host Erythrocytes. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3532, doi:10.1038/s41467-020-17306-1. 912-914
26. Bollen, M. Combinatorial Control of Protein Phosphatase-1. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 426–431, doi:10.1016/s0968-0004(01)01836-9. 915-916
27. Ceulemans, H.; Bollen, M. Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 1–39, doi:10.1152/physrev.00013.2003. 917-918
28. Fardilha, M.; Esteves, S.L.C.; Korrodi-Gregório, L.; da Cruz e Silva, O. a. B.; da Cruz e Silva, F.F. The Physiological Relevance of Protein Phosphatase 1 and Its Interacting Proteins to Health and Disease. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3996–4017, doi:10.2174/092986710793205363. 919-921
29. Hendrickx, A.; Beullens, M.; Ceulemans, H.; Den Abt, T.; Van Eynde, A.; Nicolaescu, E.; Lesage, B.; Bollen, M. Docking Motif-Guided Mapping of the Interactome of Protein Phosphatase-1. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 365–371, doi:10.1016/j.chembiol.2009.02.012. 922-923
30. Bollen, M.; Peti, W.; Ragusa, M.J.; Beullens, M. The Extended PP1 Toolkit: Designed to Create Specificity. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 450–458, doi:10.1016/j.tibs.2010.03.002. 924-925
31. Choy, M.S.; Hieke, M.; Kumar, G.S.; Lewis, G.R.; Gonzalez-DeWhitt, K.R.; Kessler, R.P.; Stein, B.J.; Hessenberger, M.; Nairn, A.C.; Peti, W.; et al. Understanding the Antagonism of Retinoblastoma Protein Dephosphorylation by PNUITS Provides Insights into the PP1 Regulatory Code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 4097–4102, doi:10.1073/pnas.1317395111. 926-928
32. Daher, W.; Browaey, E.; Pierrot, C.; Jouin, H.; Dive, D.; Meurice, E.; Dissous, C.; Capron, M.; Tomavo, S.; Doerig, C.; et al. Regulation of Protein Phosphatase Type 1 and Cell Cycle Progression by PfLRR1, a Novel Leucine-Rich Repeat Protein of the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum. *Mol. Microbiol.* **2006**, *60*, 578–590, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05119.x. 929-931
33. Fréville, A.; Landrieu, I.; García-Gimeno, M.A.; Vicogne, J.; Montbarbon, M.; Bertin, B.; Verger, A.; Kalamou, H.; Sanz, P.; Werkmeister, E.; et al. Plasmodium falciparum Inhibitor-3 Homolog Increases Protein Phosphatase Type 1 Activity and Is Essential for Parasitic Survival\*. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1306–1321, doi:10.1074/jbc.M111.276865. 932-934
34. Fréville, A.; Cailliau-Maggio, K.; Pierrot, C.; Tellier, G.; Kalamou, H.; Lafitte, S.; Martoriati, A.; Pierce, R.J.; Bodart, J.-F.; Khalife, J. Plasmodium falciparum Encodes a Conserved Active Inhibitor-2 for Protein Phosphatase Type 1: Perspectives for Novel Anti-Plasmodial Therapy. *BMC Biol.* **2013**, *11*, 80, doi:10.1186/1741-7007-11-80. 935-937
35. Lenne, A.; De Witte, C.; Tellier, G.; Hollin, T.; Aliouat, E.M.; Martoriati, A.; Cailliau, K.; Saliou, J.-M.; Khalife, J.; Pierrot, C. Characterization of a Protein Phosphatase Type-1 and a Kinase Anchoring Protein in Plasmodium falciparum. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2617, doi:10.3389/fmicb.2018.02617. 938-940
36. Yedidi, R.S.; Wendler, P.; Enenkel, C. AAA-ATPases in Protein Degradation. *Front. Mol. Biosci.* **2017**, *4*, 42, doi:10.3389/fmolb.2017.00042. 941-942
37. Inobe, T.; Genmei, R. N-Terminal Coiled-Coil Structure of ATPase Subunits of 26S Proteasome Is Crucial for Proteasome Function. *PLoS One* **2015**, *10*, e0134056, doi:10.1371/journal.pone.0134056. 943-944
38. Dong, Y.; Zhang, S.; Wu, Z.; Li, X.; Wang, W.L.; Zhu, Y.; Stoilova-McPhie, S.; Lu, Y.; Finley, D.; Mao, Y. Cryo-EM Structures and Dynamics of Substrate-Engaged Human 26S Proteasome. *Nature* **2019**, *565*, 49–55, doi:10.1038/s41586-018-0736-4. 945-946
39. Khalife, J.; Fréville, A.; Gnangnon, B.; Pierrot, C. The Multifaceted Role of Protein Phosphatase 1 in Plasmodium. *Trends Parasitol.* **2021**, *37*, 154–164, doi:10.1016/j.pt.2020.09.003. 947-948
40. Tellier, G.; Lenne, A.; Cailliau-Maggio, K.; Cabezas-Cruz, A.; Valdés, J.J.; Martoriati, A.; Aliouat, E.M.; Gosset, P.; Delaire, B.; Fréville, A.; et al. Identification of Plasmodium falciparum Translation Initiation EIF2 $\beta$  Subunit: Direct Interaction with Protein Phosphatase Type 1. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 777, doi:10.3389/fmicb.2016.00777. 949-951
41. Fréville, A.; Cailliau-Maggio, K.; Pierrot, C.; Tellier, G.; Kalamou, H.; Lafitte, S.; Martoriati, A.; Pierce, R.J.; Bodart, J.-F.; Khalife, J. Plasmodium falciparum Encodes a Conserved Active Inhibitor-2 for Protein Phosphatase Type 1: Perspectives for Novel Anti-Plasmodial Therapy. *BMC Biol.* **2013**, *11*, 80, doi:10.1186/1741-7007-11-80. 952-954
42. Huchon, D.; Ozon, R.; Demaille, J.G. Protein Phosphatase-1 Is Involved in Xenopus Oocyte Maturation. *Nature* **1981**, *294*, 358–359, doi:10.1038/294358a0. 955-956
43. Egloff, M.P.; Johnson, D.F.; Moorhead, G.; Cohen, P.T.; Cohen, P.; Barford, D. Structural Basis for the Recognition of Regulatory Subunits by the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 1. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1876–1887, doi:10.1093/emboj/16.8.1876. 957-958
44. Wakula, P.; Beullens, M.; Ceulemans, H.; Stalmans, W.; Bollen, M. Degeneracy and Function of the Ubiquitous RVXF Motif That Mediates Binding to Protein Phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18817–18823, doi:10.1074/jbc.M300175200. 959-960
45. Bushell, E.; Gomes, A.R.; Sanderson, T.; Anar, B.; Girling, G.; Herd, C.; Metcalf, T.; Modrzynska, K.; Schwach, F.; Martin, R.E.; et al. Functional Profiling of a Plasmodium Genome Reveals an Abundance of Essential Genes. *Cell* **2017**, *170*, 260–272.e8, doi:10.1016/j.cell.2017.06.030. 961-963
46. Zhang, M.; Wang, C.; Otto, T.D.; Oberstaller, J.; Liao, X.; Adapa, S.R.; Udenze, K.; Bronner, I.F.; Casandra, D.; Mayho, M.; et al. Uncovering the Essential Genes of the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum by Saturation Mutagenesis. *Science* **2018**, *360*, eaap7847, doi:10.1126/science.aap7847. 964-966
47. Li, H.; O'Donoghue, A.J.; van der Linden, W.A.; Xie, S.C.; Yoo, E.; Foe, I.T.; Tilley, L.; Craik, C.S.; da Fonseca, P.C.A.; Bogyo, M. Structure- and Function-Based Design of Plasmodium-Selective Proteasome Inhibitors. *Nature* **2016**, *530*, 233–236, doi:10.1038/nature16936. 967-969

- 
48. Otto, T.D.; Böhme, U.; Jackson, A.P.; Hunt, M.; Franke-Fayard, B.; Hoeijmakers, W.A.M.; Religa, A.A.; Robertson, L.; Sanders, M.; Ogun, S.A.; et al. A Comprehensive Evaluation of Rodent Malaria Parasite Genomes and Gene Expression. *BMC Biol.* **2014**, *12*, 86, doi:10.1186/s12915-014-0086-0. 970
49. Laporte, D.; Salin, B.; Daignan-Fornier, B.; Sagot, I. Reversible Cytoplasmic Localization of the Proteasome in Quiescent Yeast Cells. *J. Cell Biol.* **2008**, *181*, 737–745, doi:10.1083/jcb.200711154. 971
50. Mansour, H.; Cabezas-Cruz, A.; Peucelle, V.; Farce, A.; Salomé-Desnoulez, S.; Metatla, I.; Guerrero, I.C.; Hollin, T.; Khalife, J. Characterization of GEXP15 as a Potential Regulator of Protein Phosphatase 1 in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12647, doi:10.3390/ijms241612647. 972
51. Castaño, J.G.; Mahillo, E.; Arizti, P.; Arribas, J. Phosphorylation of C8 and C9 Subunits of the Multicatalytic Proteinase by Casein Kinase II and Identification of the C8 Phosphorylation Sites by Direct Mutagenesis. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3782–3789, doi:10.1021/bi952540s. 973
52. Ebrahimzadeh, Z.; Mukherjee, A.; Crochetière, M.-È.; Sergerie, A.; Amiar, S.; Thompson, L.A.; Gagnon, D.; Gaumond, D.; Stahelin, R.V.; Dacks, J.B.; et al. A Pan-Apicomplexan Phosphoinositide-Binding Protein Acts in Malarial Microneme Exocytosis. *EMBO Rep.* **2019**, *20*, e47102, doi:10.15252/embr.201847102. 974
53. Maurya, R.; Tripathi, A.; Kumar, M.; Antil, N.; Yamaryo-Botté, Y.; Kumar, P.; Bansal, P.; Doerig, C.; Botté, C.Y.; Prasad, T.S.K.; et al. PI4-Kinase and PfCDPK7 Signaling Regulate Phospholipid Biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *EMBO Rep.* **2022**, *23*, e54022, doi:10.15252/embr.202154022. 975
54. Halgren, T.A. MMFF VI. MMFF94s Option for Energy Minimization Studies. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 720–729, doi:10.1002/(SICI)1096-987X(199905)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X. 976
55. Daher, W.; Oria, G.; Fauquenoy, S.; Cailliau, K.; Browaeys, E.; Tomavo, S.; Khalife, J. A *Toxoplasma Gondii* Leucine-Rich Repeat Protein Binds Phosphatase Type 1 Protein and Negatively Regulates Its Activity. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 1606–1617, doi:10.1128/EC.00260-07. 977
56. Beetsma, A.L.; van de Wiel, T.J.; Sauerwein, R.W.; Eling, W.M. *Plasmodium berghei* ANKA: Purification of Large Numbers of Infectious Gametocytes. *Exp. Parasitol.* **1998**, *88*, 69–72, doi:10.1006/expr.1998.4203. 978
57. Rodríguez, M.C.; Margos, G.; Compton, H.; Ku, M.; Lanz, H.; Rodríguez, M.H.; Sinden, R.E. *Plasmodium berghei*: Routine Production of Pure Gametocytes, Extracellular Gametes, Zygotes, and Ookinetes. *Exp. Parasitol.* **2002**, *101*, 73–76, doi:10.1016/s0014-4894(02)00035-8. 979
58. Fréville, A.; Gnangnon, B.; Tremp, A.Z.; De Witte, C.; Cailliau, K.; Martoriati, A.; Aliouat, E.M.; Fernandes, P.; Chhuon, C.; Silvie, O.; et al. *Plasmodium berghei* Leucine-Rich Repeat Protein 1 Downregulates Protein Phosphatase 1 Activity and Is Required for Efficient Oocyst Development. *Open Biol.* **2022**, *12*, 220015, doi:10.1098/rsob.220015. 980
59. Manzoni, G.; Briquet, S.; Risco-Castillo, V.; Gaultier, C.; Topçu, S.; Ivănescu, M.L.; Franetich, J.-F.; Hoareau-Coudert, B.; Mazier, D.; Silvie, O. A Rapid and Robust Selection Procedure for Generating Drug-Selectable Marker-Free Recombinant Malaria Parasites. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4760, doi:10.1038/srep04760. 981
60. Janse, C.J.; Ramesar, J.; Waters, A.P. High-Efficiency Transfection and Drug Selection of Genetically Transformed Blood Stages of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium berghei*. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 346–356, doi:10.1038/nprot.2006.53. 982
61. Demichev, V.; Messner, C.B.; Vernardis, S.I.; Lilley, K.S.; Ralser, M. DIA-NN: Neural Networks and Interference Correction Enable Deep Proteome Coverage in High Throughput. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 41–44, doi:10.1038/s41592-019-0638-x. 983
62. Tyanova, S.; Temu, T.; Sinitcyn, P.; Carlson, A.; Hein, M.Y.; Geiger, T.; Mann, M.; Cox, J. The Perseus Computational Platform for Comprehensive Analysis of (Prote)Omics Data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 731–740, doi:10.1038/nmeth.3901. 984
63. Perez-Riverol, Y.; Bai, J.; Bandla, C.; García-Seisdedos, D.; Hewapathirana, S.; Kamatchinathan, S.; Kundu, D.J.; Prakash, A.; Frericks-Zipper, A.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE Database Resources in 2022: A Hub for Mass Spectrometry-Based Proteomics Evidences. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D543–D552, doi:10.1093/nar/gkab1038. 985

970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000  
1001  
1002  
1003  
1004  
1005  
1006  
1007  
1008  
1009  
1010  
1011  
1012