



Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la pseudo-tyrosine kinase-like (pTKL) de plasmodium

Bénédicte Gnanon

► To cite this version:

Bénédicte Gnanon. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la pseudo-tyrosine kinase-like (pTKL) de plasmodium. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS003 . tel-02170170

HAL Id: tel-02170170

<https://theses.hal.science/tel-02170170>

Submitted on 1 Jul 2019

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

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

Université de Lille
Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

N° Ordre

Thèse

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille
Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

.....

**Caractérisation Moléculaire et Fonctionnelle de la
pseudo-Tyrosine Kinase-like (pTKL) de *Plasmodium***

.....

Présentée et soutenue publiquement par Bénédicte Gnanon
le 29 Mars 2019

Jury

Professeur Jean-François Bodart	Président du jury
Docteur Blandine Franke-Fayard	Rapporteur
Docteur Mauld Lamarque	Rapporteur
Docteur Serge Roche	Examineur
Docteur Jamal Khalife	Examineur
Docteur Christine Pierrot	Directrice de thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille – Équipe Biologie des Parasites Apicomplexes
INSERM U1019 – CNRS UMR 8204 – Institut Pasteur de Lille

Remerciements

Je remercie le Docteur Camille Locht, directeur du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), pour m'avoir autorisée à effectuer ma thèse au sein du centre de recherche qu'il préside.

Je remercie les Docteurs Blandine Franke-Fayard, Mauld Lamarque et Serge Roche d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse et d'évaluer mon travail. Je remercie le Professeur Christophe Biot pour ses conseils et ses apports lors des Comités de Suivi Individuel (CSI). Je remercie aussi le Professeur Jean-François Bodart qui a également activement pris part aux CSI et qui a de plus accepté de présider le jury de thèse.

Je remercie le Docteur Jamal Khalife de m'avoir permis de rejoindre l'équipe 2 du CIIL et de m'avoir confié ce projet de recherche. Merci de m'avoir donné les moyens de collecter les données qui sont présentées dans ce manuscrit et merci d'avoir participé à l'encadrement de mon projet de thèse.

Je remercie le Docteur Christine Pierrot pour avoir encadré ma thèse avec un optimisme, une bonne humeur, une empathie et un sens de l'écoute à toute épreuve. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir amenée à gagner en autonomie dans la concrétisation de ce projet de recherche. Merci de m'avoir soutenue et encouragée, et merci de m'être venue en aide de bien des manières lors des périodes chargées.

Je remercie le Docteur Mathieu Gissot pour m'avoir fait profiter de son regard extérieur et critique sur le projet de recherche, ainsi que pour son soutien et son « cheering up ».

Je remercie le Docteur Sabrina Marion pour m'avoir fait profiter de son expertise en microscopie et en trafficking, ainsi que pour ses encouragements.

Je remercie le Professeur El-Moukhtar Aliouat ainsi que les Docteurs Colette Dissous, Raymond Pierce, Alejandro Cabezas-Cruz, Flavie Courjol, Maïka Deffieu, Emmanuel Roger et Julien Lancelot pour toutes les discussions que nous avons eues et qui ont contribué à ma formation de doctorante. Un grand merci également au Docteur Anne Bouchut pour sa sympathie et pour m'avoir fait profiter de son réseau.

Je remercie les ITA de toutes les versions de l'équipe 2 : Caro, Jacques, Ludo, Sophia, Stéphanie et Thomas. Merci pour votre pédagogie, votre bonne humeur et tous les coups de main !

Je remercie le Docteur Aline Fréville pour avoir partagé avec moi ses connaissances et pour m'avoir transmis nombre de ses compétences en matière de manipulation et d'analyse phénotypique chez *P. berghei*, sans lesquelles *PbpTKL* serait toujours un mystérieux mystère. Merci aussi pour nos discussions, nos fous rires et les difficultés que nous avons surmontées ensemble.

Je remercie tous les personnes qui ont collaboré au projet : le Docteur David Tulasne et l'Ingénieure Catherine Leroy de l'UMR 8161 – M3T, les Docteurs Katia Cailliau et Alain

Martoriati de l'UMR 8576 – UGSF, le Docteur Chiara Guerrera et Vincent Jung de la Plateforme 3P5-Necker, les Docteurs Olivier Silvie et Priyanka Fernandes du CIMI Paris. Merci à tous pour votre professionnalisme, votre efficacité et votre réactivité.

Je remercie le Docteur Kevin Lesage pour sa gentillesse et pour avoir relu et participé aux corrections de ce manuscrit, à la virgule près, avec sa dulcinée que je remercie également beaucoup pour son énergie et sa gentillesse.

Je remercie tous les étudiants, anciens et actuels, de l'équipe 2 : Amir, Anaïs, Astrid, Cécilia, Géraldine, Lucile, Marion, Quentin, Sarah, Sylia, Thomas. Merci aux anciens de m'avoir accueillie et formée techniquement, merci à ceux qui sont arrivés plus récemment de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de contribuer à leur formation. Merci également aux étudiants, doctorants et post-doctorants rencontrés en-dehors de l'équipe 2 pour votre sympathie, votre aide et nos discussions : Ariane, Inès, Mélodie, Olivia, Tarun. Merci à tous pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, merci pour toutes les fois où nous nous sommesentraîdés et soutenus.

Je remercie tous les autres collaborateurs du Campus Pasteur Lille, scientifiques ou non, pour tous les services rendus, pour la compréhension dont vous avez parfois fait preuve et pour votre aide au quotidien.

Je remercie tous les membres du Think Tank 'Éthique & Recherche' de m'avoir acceptée dans leur groupe. Prendre part aux réunions et aux journées thématiques 'Éthique pour une Conduite Responsable en Recherche' a été très enrichissant.

Je remercie les professeurs qui sont restés en contact avec moi après que j'aie quitté HEI : Claude Baumgarten et son épouse Pascale, Philippe Gautret, Patrick Leghié et David Marseault. Merci pour vos enseignements, votre sympathie, vos encouragements et tous nos échanges très enrichissants.

Je remercie mes amies Anne, Graziella, Iuliana et Manuela, tous les membres des familles Lovi, Vodougnon et Faidherbe, mon frangin Oscar et mes parents, ainsi que tous mes proches. Merci d'avoir essayé de comprendre ce en quoi consistait mon projet de recherche, merci pour le partage des bons et des mauvais moments, merci pour votre soutien indéfectible, merci pour vos conseils en matière de développement personnel, et merci de m'avoir sorti le nez de mes cultures lorsque l'occasion se présentait.

Je remercie toutes les personnes que j'ai oubliées dans cette liste.

MERCI à tous, je vous souhaite le meilleur sur tous les plans !

Résumé

Le paludisme, première endémie parasitaire mondiale ayant engendré près d'un demi-million de morts en 2017 (d'après l'OMS), est due à une infection par un parasite du genre *Plasmodium*. Cet apicomplexe infecte, au cours de son cycle de vie, un hôte définitif, un moustique femelle du genre *Anopheles*, et un hôte intermédiaire homéotherme (l'Homme pour au moins 6 espèces). Chez ce dernier, après une phase de développement hépatique, le parasite envahit puis lyse les érythrocytes. L'accroissement exponentiel de la parasitémie engendre les symptômes du paludisme et permet la production de formes sexuées (gamétocytes) qui seront transmises au vecteur arthropode, permettant ainsi la complétion du cycle de vie du parasite.

Plasmodium a co-évolué avec ses hôtes et mis en place divers modes de régulation de l'expression de ses gènes. La phosphorylation est l'une des modifications post-traductionnelles majeures et rapides qu'il utilise pour répondre aux changements environnementaux auxquels il est confronté au cours de son cycle de vie. Nombre de ses kinases et phosphatases jouent un rôle essentiel dans l'invasion de cellules hôtes, la croissance et la division cellulaires, ainsi que la motilité de certains stades. En revanche, le rôle des cinq pseudokinases de *Plasmodium* dans son développement n'a jusqu'ici pas été exploré.

Durant ma thèse, j'ai caractérisé l'unique pseudo-Tyrosine Kinase-like (pTKL) de *Plasmodium* et étudié son rôle au cours du cycle intra-érythrocytaire du parasite.

L'annotation de la pTKL de *P. falciparum* (PfpTKL) m'a permis d'identifier différents domaines et motifs, et notamment un domaine SAM (Sterile Alpha Motif), deux motifs RVxF (connus pour leur capacité d'interaction avec la Protéine Phosphatase de type 1, PP1) et un pseudo-domaine kinase appartenant à la famille des Tyrosine Kinases-like (TKL). Nous avons montré que ce pseudo-domaine kinase est capable de lier l'ATP de manière cation-indépendante, mais est dépourvu d'activité enzymatique. Des études d'interaction *in vitro* couplées à l'utilisation de modèles hétérologues (Levure, ovocytes de Xénope) m'ont permis d'identifier deux protéines parasitaires partenaires de PfpTKL : le domaine SAM de PfpTKL interagit directement avec la pseudo-protéase PfSERA5 (SErine Repeat Antigen 5), alors que les deux régions de la protéine contenant les motifs RVxF de PfpTKL interagissent avec PfPP1c (phosphatase majeure de *Plasmodium*). De façon intéressante, le deuxième motif RVxF est directement impliqué dans l'interaction avec PP1c et serait capable de moduler l'activité de cette dernière de manière allostérique.

La localisation de la pTKL de *P. berghei* (PbpTKL) a ensuite été étudiée par immunofluorescence et confirmée par des expériences de fractionnement cellulaire. Nous avons ainsi observé que PbpTKL est exportée dans l'érythrocyte infecté au stade trophozoïte, puis retenue dans le parasite et la vacuole parasitophore au stade schizonte. L'étude de l'interactome de PbpTKL par IP/MS au stade trophozoïte a montré que PbpTKL s'associe à diverses protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette de l'érythrocyte, ainsi que dans l'érythropoïèse et l'homéostasie cellulaire. Ces observations suggèrent que pTKL joue un rôle, direct ou via ses partenaires, à l'interface entre le parasite et sa cellule hôte.

Enfin, afin d'approcher la fonction de pTKL chez le parasite, nous avons généré différentes lignées génétiquement modifiées. L'étude phénotypique des souches de *P. berghei* KO et iKD pour pTKL a montré qu'elle était dispensable pour la complétion du cycle intra-érythrocytaire, l'expression des gamétocytes ainsi que l'activation des gamétocytes mâles. Ces données suggèrent que pTKL est dispensable pour ces stades de développement ou que l'expression de gènes redondants compense son absence. Quoi qu'il en soit, il est important de poursuivre les recherches sur le rôle de cette protéine aux autres stades de développement du parasite, notamment du zygote aux stades hépatiques.

Abstract

Malaria is the first endemic parasitic disease in the world with nearly half million deaths in 2017 according to the WHO. This disease is the result of an infection by an agent belonging to the *Plasmodium* genus. This apicomplexan parasite infects two hosts over its complex life cycle: a definitive one – a mosquito belonging to the *Anopheles* genus – and a homoeothermic intermediate host. At least six *Plasmodium* species can infect humans. In its intermediate host, *Plasmodium* first replicates in hepatocytes before releasing erythrocyte-infectious stages in the bloodstream. Once there, parasites invade and replicate within erythrocytes, before lysing them to release other infectious stages. This triggers an exponential rise in the parasitemia, as well as malaria symptoms. Sexual stages, called gametocytes, are produced over this intra-erythrocytic cycle to be transmitted to the arthropod vector, thus allowing the completion of the parasite life cycle.

Plasmodium co-evolved with its hosts and set up diverse gene expression regulation pathways accordingly. Phosphorylation is one of the major and fastest post-translational modifications used by the parasite to respond to environmental changes. Many of its kinases and phosphatases play key roles in host cell invasion, cellular growth and division, as well as motility of specific developmental stages. However, the role of the five pseudo-kinases expressed by *Plasmodium* has not been explored yet.

During my PhD project, I have performed the characterization of the unique *Plasmodium* pseudo-Tyrosine Kinase-like (pTKL) and explored its role over the parasite intra-erythrocytic cycle.

P. falciparum pTKL (*PfpTKL*) *in silico* annotation allowed the delineation of the protein domains. Notably, a SAM (Sterile Alpha Motif) domain, two RVxF motifs (known for their binding potential with the major protein phosphatase type 1, PP1) and a pseudo-kinase domain belonging to Tyrosine Kinase-like (TKL) family were found. This pseudo-kinase domain was found to be able to bind ATP in a cation-independent way although devoid of kinase activity. Two parasite protein partners of *PfpTKL* have been identified using *in vitro* protein-protein interaction studies together with heterologous models (yeast, *Xenopus* oocytes). First, *PfSERA5* (Serine Repeat Antigen 5) specifically and strongly interacts with *PfpTKL* SAM domain and second, *PfPP1c* binds the two RVxF-containing regions of *PfpTKL*. Interestingly, the second RVxF motif, which is located within the pseudo-kinase domain, directly binds *PfPP1c* and seems to be involved in the allosteric regulation of the phosphatase activity. The subcellular localization of *P. berghei* pTKL (*PbpTKL*) was studied by IFA as well as sequential lysis of erythrocytes followed by immunoprecipitation assays. *PbpTKL* was shown to be exported to the host cell cytosol at the trophozoite stage, but retained in the parasitophorous vacuole and the parasite cytosol at the schizont stage. Furthermore, our interactome analysis conducted at the trophozoite stage by IP/MS showed that *PbpTKL* binds many host cell proteins involved in erythrocyte cytoskeleton organization, as well as erythropoiesis and cell homeostasis. These data suggest that pTKL plays a role at the parasite/host interface, either directly or via its protein partners.

Finally, in an attempt to understand the role of pTKL for the parasite development, we generated genetically modified *P. berghei* strains. The phenotypic study of *PbpTKL* KO and iKD strains did not show any difference between the defective parasites and the parental wild type ones during the intra-erythrocytic cycle, gametocyte expression and male gametocyte activation. These data suggest the dispensability of pTKL or the expression of redundant gene(s) with similar functions in these parasite stages. Whatever the explanation, it is still important to follow up this investigation in other parasite stages, from zygotes to hepatic stages.

Table des matières

I. Liste des figures.....	13
II. Liste des tableaux.....	15
III. Liste des abréviations	17
Préambule	19
I. Les personnes impliquées dans le projet	21
1. Parcours de l'étudiante en thèse	21
2. Les membres de l'équipe de recherche 'Biologie des Parasites Apicomplexes'	21
3. Les collaborateurs	22
4. Autres contributeurs au projet (au travers d'échanges)	22
II. Aspects logistiques et financiers du projet	23
Introduction	25
I. <i>Plasmodium</i> est un apicomplexe	27
1. Apicomplexes : de la photosynthèse au parasitisme	27
2. Classification du genre <i>Plasmodium</i>	31
II. <i>Plasmodium</i> est l'agent infectieux responsable du paludisme	32
1. Décryptage : qui des marais ou des moustiques est responsable de la malaria ?	32
2. Cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	39
3. Le paludisme	43
4. La lutte antipaludique.....	49
5. Résumé graphique de la partie II	62
III. Les différents modes de régulation du développement de <i>Plasmodium</i>	63
1. Régulation de l'expression des gènes au niveau épigénétique	63
2. De la transcription à la traduction chez <i>Plasmodium</i>	64
3. Les modifications post-traductionnelles (MPTs) chez <i>Plasmodium</i>	66
4. La phosphorylation chez <i>Plasmodium</i>	72
IV. La Protéine Phosphatase de type 1	79
V. Kinases et pseudokinases.....	83
1. Les kinases de type Hanks	83
2. Les pseudokinases – être ou ne pas être... actives	88
Cadre & Objectifs du projet	91
I. Contexte Scientifique – Étude du régulatome de la PP1 de <i>Plasmodium</i>	93
II. Présentation du projet de recherche sur la pTKL de <i>Plasmodium</i>	94
III. Objectifs de recherche et retombées attendues	95
Résultats	97
I. Séquençage et annotation <i>in silico</i> du gène PF3D7_1106800	99
1. Séquençage	99

2.	Annotation <i>in silico</i>	100
3.	Analyse phylogénétique	100
II.	Caractérisation des domaines de PF3D7_1106800.....	102
1.	Caractérisation du domaine catalytique de PF3D7_1106800.....	102
2.	Caractérisation du domaine SAM	108
3.	Caractérisation des motifs RVxF	112
III.	Étude de <i>Pfp</i> TKL chez le parasite	119
IV.	Étude de <i>Pbp</i> TKL	123
1.	Étude de l'expression et de la localisation de <i>Pbp</i> TKL (KI-mCherry).....	123
2.	Étude de l'expression et de la localisation de <i>Pbp</i> TKL (KI-AID-HA).....	125
3.	Étude de l'interactome de <i>Pbp</i> TKL	129
4.	Étude de l'essentialité de <i>Pbp</i> TKL.....	131
	Matériels & Méthodes.....	139
I.	Matériels	141
1.	Plasmides	141
2.	Souches.....	142
3.	Amorces	143
4.	Anticorps.....	145
5.	Kits commerciaux	146
II.	Méthodes.....	147
1.	Culture de <i>Plasmodium falciparum</i>	147
2.	Entretien et suivi de <i>Plasmodium berghei</i>	147
3.	Extraction d'ADN et d'ARN de <i>P. berghei</i> (<i>Pb</i>) et de <i>P. falciparum</i> (<i>Pf</i>).....	147
4.	Extraits protéiques <i>P. falciparum</i> utilisés pour les tests d'activité kinase	147
5.	Lyse des GRi par <i>P. berghei</i> et immunoprécipitations.....	148
6.	Clonages moléculaires	148
7.	Mutagenèse dirigée	149
8.	Séquençage du transcrit de <i>Pfp</i> TKL (PF3D7_1106800).....	150
9.	Annotation <i>in silico</i> de la séquence protéique <i>Pfp</i> TKL	150
10.	Analyses phylogénétiques.....	150
11.	Production et purification des protéines recombinantes	151
b.	Conditions de production et de purification des protéines recombinantes	152
12.	Test d'activité kinase par radioactivité	153
13.	Tests de liaison à l'ATP (billes ATP-agarose – Jena Bioscience).....	153
14.	Test de consommation d'ATP (Kinase Glo® – Promega)	154
15.	Études d'interaction par GST Pull Down	155
16.	Expérimentation animale.....	155
17.	Expériences en ovocyte de Xénope	156

18. Double Hybride de levure (Y2H)	157
19. Transfection de <i>P. falciparum</i>	159
20. Purification de stades chez <i>P. berghei</i>	159
21. Génération des souches <i>P. berghei</i> transgéniques	159
22. Analyse de l'interactome de <i>PbpTKL</i> dans des GRi (globules rouges infectés) par LC-MS/MS	160
23. Immunofluorescence sur des globules rouges infectés (GRi) par <i>P. berghei</i>	160
24. Analyse phénotypique des lignées <i>P. berghei PbpTKL_KO</i> vs WT	161
25. Induction conditionnelle de la dégradation de <i>PbpTKL-AID-HA</i>	161
Discussion & Perspectives	163
I. Résumé des résultats obtenus <i>in vitro</i> ou avec des modèles hétérologues	165
II. Le pseudo-domaine kinase de <i>PfpTKL</i> lie l'ATP mais ne présente pas d'activité catalytique	166
1. Étude du pseudo-domaine kinase	166
2. Étude du rôle du domaine BTK-like	168
3. <i>PfpTKL</i> interagit avec PP1c et module son activité via le motif RVxF2	171
4. <i>PfpTKL</i> interagit avec <i>PfSERA5</i> via son domaine SAM	174
III. Résumé graphique des résultats collectés <i>in vivo</i> (uniquement chez <i>P. berghei</i>)	178
IV. Étude de <i>PfpTKL</i>	179
1. Étude de la localisation de <i>PfpTKL</i>	179
2. Étude des motifs MORN de <i>PfpTKL</i>	180
3. Étude du rôle de <i>PfpTKL</i> dans le développement du parasite	181
V. Étude de <i>PbpTKL</i>	185
1. <i>PbpTKL</i> est exportée dans la cellule-hôte au stade trophozoïte	185
2. Étude du rôle de <i>PbpTKL</i> pour le développement de <i>P. berghei</i>	188
Références	193
Annexes	227
I. Positionnement des amorces pour le séquençage du transcrit <i>PfpTKL</i>	229
II. Alignement - résultat du séquençage de <i>PfpTKL</i>	231
III. Positionnement des domaines de <i>PfpTKL</i> sur sa séquence protéique	234
IV. Analyse phylogénétique du domaine kinase de <i>PfpTKL</i>	235
V. Gènes synthétiques (WT et mutants)	236
1. Gène synthétique – domaine SAM	236
2. Gène synthétique – domaine kinase	236
VI. Classification du domaine SAM de <i>PfpTKL</i>	238
VII. Résultats du double hybride de levure (Y2H)	239
VIII. Alignement entre les séquences protéiques de <i>PfpTKL</i> et <i>PbpTKL</i>	240
IX. Positionnement des amorces pour les clonages moléculaires de <i>PbpTKL</i>	243
X. Données brutes de l'interactome de <i>PbpTKL</i> (partenaires de <i>PbpTKL</i>)	246

I. Liste des figures

Figure 1 : Frise chronologique décrivant l'histoire évolutive des apicomplexes	28
Figure 2 : Ultrastructure d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i> et d'un mérozoïte de <i>P. falciparum</i>	29
Figure 3 : Classification phylogénétique du genre <i>Plasmodium</i>	31
Figure 4 : Planche I dessinée et publiée par Laveran en 1881	34
Figure 5 : Planche II dessinée et publiée par Laveran en 1881	35
Figure 6 : Planche reprenant les observations de Ross	37
Figure 7 : Frise chronologique reprenant les étapes de l'élucidation du cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	38
Figure 8 : Schéma du cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	42
Figure 9 : Répartition géographique de <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> et endémicité du paludisme.....	43
Figure 10 : Schéma résumant les processus à l'origine des formes sévères de paludisme à <i>P. falciparum</i>	46
Figure 11 : Présentation du pipeline des vaccins antipaludiques en cours d'étude clinique	52
Figure 12 : Chien renifleur en plein test 'Sniff & Test' Source = ScienceDaily®	54
Figure 13 : Présentation des molécules à utiliser en chimioprophylaxie pour prévenir les accès palustres en fonction des régions du monde (www.safetravel.ch)	57
Figure 14 : Exemple d'un pipeline de molécules anti-malariques en développement (pré)clinique.....	60
Figure 15 : Schéma présentant quelques kinases et phosphatases clés pour l'accomplissement des différentes phases du cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	78
Figure 16 : Structure tertiaire de la sous-unité catalytique PP1c (β).	79
Figure 17 : Présentation de la structure du domaine kinase de la PKA.....	84
Figure 18 : Schémas des conformations ON et OFF des domaines kinases	86
Figure 19 : Alignement des structures de deux kinases atypiques et de la PKA.....	88
Figure 20 : Séquençage du transcrit PF3D7_1106800 par RT-PCR chevauchantes	99
Figure 21 : Résumé graphique de l'annotation <i>in silico</i> de PF3D7_1106800	100
Figure 22 : Analyse phylogénétique de PF3D7_1106800 et de ses homologues apicomplexes	101
Figure 23 : Alignement des séquences primaires des domaines kinase de PF3D7_1106800 et de kinases à S/T (RAF1, PKAc), Y (BTK) ou pseudo-TKL (RIPK1).....	103
Figure 24 : Alignement des domaines BTK-like de plusieurs pTKL de différentes espèces de <i>Plasmodium</i> et de lobes N-ter de la PKAc et de la BTK humaines.	104
Figure 25 : Production du domaine kinase WT et des mutants sous forme de protéines recombinantes. .	105
Figure 26 : Test d'affinité à l'ATP effectué par pull-down avec des billes ATP-agarose	105
Figure 27 : Analyse de l'activité du domaine kinase de pTKL par incubation avec de l'ATP[γ - 33 P]	106
Figure 28 : Quantification de la consommation d'ATP par le domaine kinase de PfpTKL en présence de Myelin Basic Protein.	107
Figure 29 : Alignement de séquences primaires des 4 domaines SAM existant chez <i>P. falciparum</i> avec des domaines SAM de référence.....	109
Figure 30 : Résultat de la prédiction de la structure tertiaire du domaine SAM de PfpTKL	109
Figure 31 : Graphique présentant les résultats du criblage d'une banque d'ADNc de <i>P. falciparum</i> en utilisant la région de PfpTKL incluant SAM et RVxF1 comme appât.....	110
Figure 32 : Interaction entre les domaines SAM de PfpTKL et PfSERA5 en double hybride de levure.....	110
Figure 33 : Analyse par GST Pull Down de l'interaction PfSERA5-6His vs plusieurs types de billes GST.111	

Figure 34 : Analyse par GST Pull Down de l'interaction entre RVxF1 et RVxF2 d'une part, et différentes protéines étiquetées GST	113
Figure 35 : Analyse de l'interaction des différentes régions de <i>PfpTKL</i> avec <i>XePP1c</i>	115
Figure 36 : Suivi du déclenchement de la GVBD pendant 15 à 16 heures après micro-injection des protéines étudiées	115
Figure 37 : Knock In HA de <i>PfpTKL</i>	119
Figure 38 : Présentation des systèmes de KO chez <i>P. falciparum</i> basés sur le pCAM-BSD et le pSLI-TGD.....	120
Figure 39 : Présentation du pARL-2-GFP	121
Figure 40 : Knock In mCherry de <i>PbpTKL</i> à l'aide du pL1886.	123
Figure 41 : Expériences d'IFA effectuées sur des parasites exprimant <i>PbpTKL</i> -mCherry.....	124
Figure 42 : Knock In AID-HA de <i>PbpTKL</i> • AID = Auxin - Induced Degradation.	125
Figure 43 : Localisation de <i>PbpTKL</i> -AID-HA aux stades érythrocytaires.....	126
Figure 44 : Détection de <i>PbpTKL</i> -AID-HA par IP anti-HA et WB anti-HA.....	127
Figure 45 : Étude de la localisation de <i>PbpTKL</i> au sein du GRI par fractionnement cellulaire.....	128
Figure 46 : Volcano plot des résultats de l'étude d'interactome de <i>PbpTKL</i> par IP/MS.....	129
Figure 47 : Knock Out de <i>PbpTKL</i>	131
Figure 48 : Délétion de 18% de <i>PbpTKL</i> à l'aide du PbGEM-342364.	132
Figure 49 : Analyse phénotypique aux stades sanguins des souches pGEM versus <i>PbGFP</i> WT.....	134
Figure 50 : Analyses phénotypiques effectuées <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> avec le système AID	135
Figure 51 : Tests d'exflagellation	136
Figure 52 : Étude du rôle de <i>PbpTKL</i> pour <i>P. berghei</i> chez le moustique et dans les hépatocytes	137
Figure 53 : Principe de la lyse séquentielle des GRI	148
Figure 54 : Schéma présentant la SOE-PCR.....	149
Figure 55 : Présentation des différentes billes ATP-agarose du kit AK102 de Jena Bioscience	153
Figure 56 : Schéma du principe du KinaseGlo® de Promega.	154
Figure 57 : Présentation du principe des expériences effectuées en ovocyte de Xénope	156
Figure 58 : Schéma du principe du criblage d'une banque d'ADNc de <i>Plasmodium falciparum</i> à l'aide du double hybride de levures de polarité sexuelle opposée (mata versus mata).....	157
Figure 40 : Schéma du système AID publié par Philip & Waters (<i>Philip and Waters 2015</i>)	161
Figure 60 : Le domaine BTK-like de pTKL se replie de la même manière que le lobe N-ter de la Bruton's Tyrosine Kinase (BTK).....	168
Figure 61 : Alignements des lobes N-ter de la PKA humaine (Hs_PKA), la BTK humaine (Hs_BTK), de la région BTK-like (Pf_pTKL_BTK-lik) et/ou du pseudo-domaine kinase de <i>PfpTKL</i> (Pf_pTKL_pseudoK).	169
Figure 62 : Modèle de la structure tertiaire du pseudo-domaine kinase de <i>PfpTKL</i>	171
Figure 63 : Représentation des différents loci encodant des protéines SERA chez plusieurs espèces de <i>Plasmodium</i>	174
Figure 64 : Protéolyse de <i>PfSERA5</i> et localisation des différentes régions issues de cette protéolyse	175
Figure 65 : Présentation du système de SLI-KI-GFP	179
Figure 66 : Présentation des motifs MORN de la pTKL de plusieurs espèces de <i>Plasmodium</i>	180
Figure 67 : Présentation du système <i>glmS</i>	182
Figure 68 : Présentation du système <i>loxPint</i> avec le domaine kinase de la FIKK 10.1	183
Figure 69 : Données de Single Cell RNA sequencing obtenues pour <i>PbpTKL</i> (PBANKA_0940100)	189

II. Liste des tableaux

Tableau 1 : Présentation des divers dispositifs utilisés pour se protéger des moustiques vecteurs du paludisme.....	49
Tableau 2 : Présentation de différentes stratégies vaccinales anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	50
Tableau 3 : Présentation des outils de diagnostic utilisés actuellement pour diagnostiquer le paludisme..	53
Tableau 4 : Présentation des familles de molécules utilisées en chimioprophylaxie et en chimiothérapie du paludisme (adapté de (Antony and Parija 2016)).	55
Tableau 5 : Structure chimique et fréquence des MPTs retrouvées chez <i>Plasmodium</i>	70
Tableau 6 : Présentation et essentialité des kinases de <i>P. falciparum</i>	74
Tableau 7 : Présentation et essentialité des Phosphatases de <i>P. falciparum</i>	76
Tableau 8 : Résumé des résultats d'annotation du domaine kinase de PF3D7_1106800	102
Tableau 9 : Alignement (avec MAFFT) des régions contenant RVxF1 et RVxF2 chez des homologues de <i>PfpTKL</i> chez différentes espèces de <i>Plasmodium</i>	113
Tableau 10 : Analyse de la GVBD (Germinal Vesicle Breakdown) induite dans des ovocytes de <i>X. laevis</i> bloqués en Prophase I après micro injection de différentes régions de <i>PfpTKL</i>	114
Tableau 11: Résumé des essais d'obtention d'une souche clonée exprimant <i>PfpTKL</i> -HA.....	120
Tableau 12 : Résumé des essais effectués pour obtenir des parasites KO pour <i>PfpTKL</i>	121
Tableau 13 : Résumé des essais d'obtention de souches transfectées avec des construits en pARL-2-GFP	122
Tableau 14 : Présentation des protéines partenaires de <i>PbpTKL</i> identifiées par IP/MS.....	130
Tableau 15 : Récapitulatif des protéines recombinantes produites dans le cadre de ce projet.....	152
Tableau 16 : Récapitulatif des expériences de GST Pull Down effectuées dans le cadre de ce projet.....	155

III. Liste des abréviations

Abréviation	Signification de l'abréviation
ACT	Artemisinin-based Combination Therapies
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide Désoxyribonucléique génomique
ApiAP2	Apicomplexan Apetala-2
ATP	Adénosine Triphosphate
AID	Auxin Induced Degradation
AMA1	Apical Membrane Antigen 1
BSD	Blasticidine
BTK	Bruton's Tyrosine Kinase
CDPK	Calcium-Dependent Protein Kinase
CSA	Chondroïtine Sulfate A
CSP	Circumsporozoïte Protein
EBA	Erythrocyte Binding Antigen
eIF2 β / γ	Eukaryotic Initiation factor 2 β / γ
EMP1	Erythrocyte Membrane Protein 1
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
EXP2	Exported Protein 2
GAP	Glideosome Associated Protein
GAPDH	<u>G</u> lyceraldehyde-3-phosphate <u>d</u> ehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GR	Globule Rouge (appelé aussi érythrocyte ou hématie)
GRA	Dense <u>G</u> ranule protein
GRI	Globule Rouge infecté
GST	Glutathion-S-transférase
GVBD	<u>G</u> erminal <u>V</u> esicle <u>B</u> reak <u>d</u> own
6-His	6-Histidines
HRP	Histidine-Rich Protein
HSP	Heat Shock Protein
I2	Inhibitor 2 protein
I3	Inhibitor 3 protein
IAA	3- <u>I</u> ndole <u>a</u> cetic <u>A</u> cid (auxine)

ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFA	<u>I</u> mmuno <u>f</u> luorescence <u>A</u> ssay
IMC	Inner Membrane Complex
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KAHRP	Knob Associated Histidine-Rich Protein
KD	<i>Dans les noms de protéines recombinantes : Kinase Domain</i>
KDi	Knock Down inductible
KI	Knock In
KO	Knock Out
LRR1	<u>L</u> eucine- <u>r</u> ich <u>R</u> ep e at protein <u>1</u>
MBP	Myelin Basic Protein (<u>ne pas confondre</u> avec Maltose Binding Protein)
MORN	Membrane Occupation Recognition Nexus
MPT	Modification Post Traductionnelle
MVP	Membrane de la Vacuole Parasitophore
pGEM	Lignée issue de la transfection avec le construit PlasmogEM-342364
PKA	Protéine Kinase A (cAMP-dépendante)
PKG	Protéine Kinase G (cGMP-dépendante)
PNEP	<u>P</u> EXEL- <u>N</u> egative <u>E</u> xported <u>P</u> rotein
pTKL	<u>p</u> seudo- <u>T</u> yrosine <u>K</u> inase- <u>l</u> ike
PP1	Protéine Phosphatase de type 1
RH	Reticulocyte binding Homolog
RON	Rhoptry Neck Protein
ROP	Rhoptry Bulb Protein
ROPK	Rhoptry Protein Kinase
SAM	Sterile Alpha Motif
SERA	<u>S</u> erine <u>R</u> ep e at <u>A</u> ntigen
SLI	<u>S</u> election- <u>l</u> inked <u>I</u> ntegration
TKL	<u>T</u> yrosine <u>K</u> inase- <u>l</u> ike
TM	Domaine <u>T</u> rans <u>m</u> embranaire
VP	Vacuole Parasitophore
WB	Western Blot
WR	Antibiotique de sélection WR99120
WT	Wild Type (parental)

Préambule

I. Les personnes impliquées dans le projet

1. Parcours de l'étudiante en thèse

J'ai d'abord intégré l'école des Hautes Études d'Ingénieur (HEI) de Lille après mon baccalauréat. Après 3 années de formation généraliste (automatique, chimie, électronique, informatique, management, mécanique classique et des fluides, sciences des matériaux et de l'ingénieur, etc.), j'ai opté pour une réorientation de ma formation dans le but d'accéder à la recherche pharmaceutique ou académique.

J'ai donc effectué ma quatrième année HEI en tant qu'étudiante d'échange à Juniata College, Huntingdon, Pennsylvanie, USA. Cela m'a permis de choisir des cours en adéquation avec mes objectifs professionnels (biologie, chimie organique, management, recherche académique en chimie inorganique, spectroscopie). Mes choix de formation m'ont permis de m'inscrire et de suivre les cours du Master 2 Recherche 'Conception du Médicament' de l'ICPAL – Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (Université de Lille 2) en parallèle de ma dernière année HEI. Mon stage de Master 2 visait à effectuer la synthèse chimique et la caractérisation de composés potentiellement inhibiteurs de la kinase mTOR (Target Of Rapamycin, une enzyme jouant un rôle central dans le métabolisme cellulaire et située au carrefour de plusieurs voies de transduction du signal ; elle participe au déclenchement de pathologies variées lorsque suractivée : cancer, désordres métaboliques, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, etc.). Ce stage s'est effectué au laboratoire de pharmacochimie d'HEI.

C'est au cours de cette dernière année HEI que j'ai pris contact avec le Dr Jamal Khalife, responsable de l'équipe 2 du CIIL, dans une volonté de mener des projets de recherche académique portant sur le paludisme. Au vu de mon parcours plutôt atypique, plusieurs rendez-vous et visites au laboratoire ont été organisés avec différents membres de l'équipe 2 effectuant des recherches sur *Plasmodium*. Cela m'a permis de mieux cerner les activités de recherche de l'équipe, ainsi que les techniques et méthodes utilisées au sein du laboratoire. Un projet de thèse a ensuite été élaboré conjointement et déposé auprès de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (EDBSL).

2. Les membres de l'équipe de recherche 'Biologie des Parasites Apicomplexes'

Les membres de l'équipe 2 du CIIL, dont le nom complet est 'Biologie des parasites apicomplexes : facteurs régulant la croissance, la différenciation et la virulence', ont tous, de près ou de loin, joué un rôle dans la conduite et/ou la réalisation du projet d'étude de pTKL de *Plasmodium*.

Ainsi, les objectifs de recherche à court, moyen et long termes ont été élaborés au cours de réunions organisées entre le Dr Christine Pierrot, ma directrice de thèse, et moi. Le Dr Jamal Khalife, responsable de l'équipe 2 du CIIL, a également activement pris part à l'élaboration des objectifs à long terme du projet. Ce co-encadrement m'a permis de profiter de l'expérience de mes deux référents. Ces derniers se sont également assurés que je dispose des conditions de travail optimales pour effectuer ma thèse sereinement (sur les plans administratif, financier, logistique, matériel, scientifique, technique, etc.).

Les interactions que j'ai eues avec les autres membres de l'équipe 2 (lors de réunions scientifiques, de discussions techniques, etc.) ont contribué à :

- ♦ (ré)orienter certains aspects du projet de thèse,

- ◆ participer à l'élaboration, l'optimisation et la réalisation de certaines techniques/méthodes utilisées pour atteindre les objectifs de recherche,
- ◆ me rendre autonome dans la réalisation des expériences à effectuer pour répondre aux objectifs de recherche.

3. Les collaborateurs

Nous avons mis en place diverses collaborations afin de réaliser différentes expériences nécessaires pour atteindre les objectifs de recherche :

- ◆ Les tests d'activité kinase basé sur l'incorporation de phosphate marqué au ^{33}P à partir d'ATP marqué [$\gamma\text{-}^{33}\text{P}$] ont été effectués en collaboration avec le Dr David Tulasne et l'ingénieure Catherine Leroy de l'UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Target Therapies de l'Institut de Biologie de Lille.
- ◆ Les expériences de micro-injection de protéines en ovocyte de Xénope ont été effectuées en collaboration avec les Drs Katia Cailliau et Alain Martoriati de l'UMR 8576 UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (Université de Lille).
- ◆ L'analyse de l'interactome de *PbpTKL*-AID-HA par spectrométrie de masse a été effectuée par le Dr Chiara Guerrera et Vincent Jung de la Plateforme 3P5-Necker – Protéomique Necker – (Université Paris Descartes).
- ◆ L'analyse phénotypique de la souche pGEM (issue de la modification du locus de *PbpTKL* à l'aide de la construction Plasmogem PbGEM342364 disponible auprès du Wellcome Trust Sanger Institute, Royaume-Uni), chez le moustique et dans les hépatocytes est en cours de réalisation au sein de l'équipe du Dr Olivier Silvie, Centre d'Immunologie et des Infections (CIMI - UPMC UMRS CR7 - Inserm U1135 - CNRS ERL 8255) de Paris.

4. Autres contributeurs au projet (au travers d'échanges)

De nombreuses personnes extérieures à l'équipe 2 du CIIL ont également contribué à ma formation et à la concrétisation de mon projet de thèse :

- ◆ les membres du Comité de Suivi Individuel (CSI) : les professeurs Jean-François Bodart et Christophe Biot de l'Université de Lille ont participé au suivi de ce projet sur une base annuelle. Leur point de vue extérieur a contribué à l'orientation du projet ;
- ◆ des scientifiques des campus Pasteur Lille et Paris, des universités de Leiden (Pays-Bas) et Heidelberg (Allemagne), ainsi que du Drexel College of Medicine de Philadelphie (États-Unis), qui m'ont fait profiter de leurs connaissances sur les kinases ou sur *Plasmodium*, ou qui ont gracieusement fourni du matériel biologique (souches de bactéries ou de parasites) – ou non (anticorps, plasmides) – nécessaire à l'avancement du projet tant sur le plan scientifique que technique ;
- ◆ des commerciaux ou des référents techniques de divers fournisseurs : en présentant leurs produits ou en facilitant l'optimisation de leur utilisation, ils ont eux aussi contribué à donner des pistes de solutions techniques à certains problèmes soulevés au cours de la concrétisation du projet de thèse.

II. Aspects logistiques et financiers du projet

La majorité des expériences visant à remplir les objectifs du projet de caractérisation de pTKL a été effectuée au sein de l'équipe 2 du CIIL (campus de l'Institut Pasteur de Lille). Les expériences d'étude de l'activité kinase par radioactivité ont été réalisées en collaboration avec l'UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Target Therapies (Institut de Biologie de Lille). Les expériences en ovocyte de Xénope ont été réalisées en collaboration avec l'UMR 8576 UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (Université de Lille). Les études d'interactome par spectrométrie de masse ont été menées en collaboration avec la plateforme 3P5-Necker - Protéomique Necker (Université Paris Descartes).

Le contrat doctoral a été financé par l'Université de Lille pendant 36 mois, du 1^{er} Octobre 2015 au 30 Septembre 2018. En raison, entre autres, du fait que des parasites *P. berghei* et *P. falciparum* transfectés étaient en tout début d'étude (clonage, intégration des constructions d'intérêt, etc.) au début de la troisième année de thèse, un dossier de demande de financement pour 9 mois (Aide à la fin de thèse) a été déposé auprès de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) en Janvier 2018. Suite à l'annonce du rejet de la demande en Mai 2018, 6 mois de thèse supplémentaires ont été financés sur les fonds du laboratoire jusqu'à la soutenance de thèse fin Mars 2019. Une autre demande de financement (pour le prix Jeune Chercheur 2019) a été déposée auprès de la Fondation des Treilles fin Octobre 2018 sous la forme d'une demande d'aide au soutien financier des trois derniers mois de thèse.

Introduction

I. *Plasmodium* est un apicomplexe

1. Apicomplexes : de la photosynthèse au parasitisme

Il y a environ 800 millions d'années, une cellule eucaryote hétérotrophe et une algue rouge se sont associées par endosymbiose pour donner le premier Chromalvéolé (*van Dooren and Striepen 2013*, [Figure 1](#)). L'hôte et son endosymbionte ont ensuite évolué pour maintenir une relation qui soit, à priori, profitable tant à l'un qu'à l'autre. La majorité des gènes du symbionte a été transférée au noyau de l'hôte pour faciliter la coordination de la division cellulaire et la transmission de l'endosymbionte aux cellules filles (*Martin et al. 2002*). Ce transfert est parfois décrit comme une forme de domestication de l'endosymbionte par l'hôte car il lui permet de limiter l'accumulation de mutations délétères, de contrôler la division et le nombre de copies de symbiontes et, donc, de garantir l'unité de l'entité ainsi créée (*McFadden and Yeh 2017*). Il s'est accompagné de la mise en place de systèmes d'expression et d'orientation de protéines des organites de l'hôte au symbionte, notamment avec l'élaboration de peptides signaux dédiés (*Waller et al. 2000*; *C. J. Tonkin et al. 2008*). Des voies métaboliques se sont également mises en place pour que l'hôte et le symbionte puissent tirer parti des ressources produites par l'un et l'autre, instaurant ainsi une forme d'homéostasie bénéfique aux deux parties (*van Dooren and Striepen 2013*; *Low, Stanisic, and Good 2018*). Ces différents phénomènes ont contribué à la réduction de la taille du symbionte et à la disparition de son noyau ; il est devenu un organite à part entière du Chromalvéolé : le plaste (ou plastide). Grâce à sa capacité à faire de la photosynthèse, le chloroplaste a rendu le Chromalvéolé autotrophe (*van Dooren and Striepen 2013*). Il a ensuite été transmis aux différentes espèces descendant du Chromalvéolé. Certaines de ces espèces (des algues brunes pour la plupart) sont restées autotrophes et ont mis en place des relations de symbiose avec d'autres êtres vivants comme le corail (*Trench and Blank 1987*). C'est le cas des chroméridés *Chromera velia* ([Figure 1](#)) et *Vitrella brassicaformis* dont la découverte a facilité la compréhension de l'évolution des apicomplexes, de leurs ancêtres et de leurs liens avec d'autres descendants des Chromalvéolés (*Moore et al. 2008*; *Oborník et al. 2012*; *Janouškovec et al. 2010*; *Füssy et al. 2017*).

Contrairement aux chroméridés, les apicomplexes font partie des descendants des Chromalvéolés qui ont perdu les gènes du plaste impliqués dans la photosynthèse et sont tombés dans le côté obscur du parasitisme ([Figure 1](#), (*Weatherby and Carter 2013*)). Il y a probablement eu explosion du nombre d'apicomplexes de concert avec la multiplication des espèces de métazoaires (*van Dooren and Striepen 2013*). Il existe aujourd'hui environ 5000 espèces d'apicomplexes, les plus connus étant *Plasmodium* (agent responsable du paludisme), *Toxoplasma* (responsable de la toxoplasmose) ou encore *Cryptosporidium* (responsable de la cryptosporidiose) (*Sibley 2011*). La transition de la symbiose au parasitisme s'est matérialisée par l'évolution du plaste : le chloroplaste est devenu un apicoplaste, un organite essentiel à la survie des apicomplexes qui l'ont conservé au cours de leur évolution (*Yeh and DeRisi 2011*; *Hadariová et al. 2018*). Les apports de l'apicoplaste pour le parasite ne sont pas encore complètement élucidés. Son génome d'environ 35 kb encode une trentaine de gènes impliqués principalement dans son auto-réplication (*Wilson et al. 1996*; *Milton and Nelson 2016*). Il joue également un rôle clé dans 4 voies métaboliques importantes à différents stades de développement des apicomplexes selon leur mode d'infection et les cellules qu'ils parasitent (*van Dooren and Striepen 2013*; *McFadden and Yeh 2017*; *D. Sharma et al. 2018*) :

- ◆ Synthèse de l'Isopentenyl Pyrophosphate (IPP), précurseur des isoprénoïdes, importants, entre autres, pour la synthèse de l'ubiquinone (co-facteur de plusieurs enzymes mitochondriales) ou pour la modification post-traductionnelle des protéines par prénylation (*Guggisberg et al. 2014*)
- ◆ Synthèse d'acides gras (*Shears, Botté, and McFadden 2015*)
- ◆ Synthèse de l'hème en coopération avec la mitochondrie (l'hème est un groupement prosthétique important pour les cytochromes) (*Ralph et al. 2004*)
- ◆ Synthèse de clusters Fer-Soufre faisant office de co-facteurs pour des enzymes de la mitochondrie et de l'apicoplaste (impliquées notamment dans la synthèse d'acides gras - (*van Dooren and Striepen 2013*)).

Au vu de l'importance des produits de ces différentes voies métaboliques pour la mitochondrie, l'apicoplaste est souvent accolé à cette dernière (comme démontré par (*Ralph et al. 2004*) et schématisé sur la Figure 2). Divers antibiotiques capables de bloquer plusieurs des voies métaboliques évoquées ci-dessus (*Low, Staniscic, and Good 2018; D. Sharma et al. 2018*) ont permis de mettre en lumière l'importance de chacune d'entre elles pour le développement de plusieurs apicomplexes à plusieurs moments de leur cycle de vie. Ils ont également permis de démontrer l'essentialité de l'apicoplaste pour le développement des parasites qui en détiennent un. Nous reviendrons sur le potentiel anti-malarique de ces molécules en détails plus loin dans ce manuscrit.

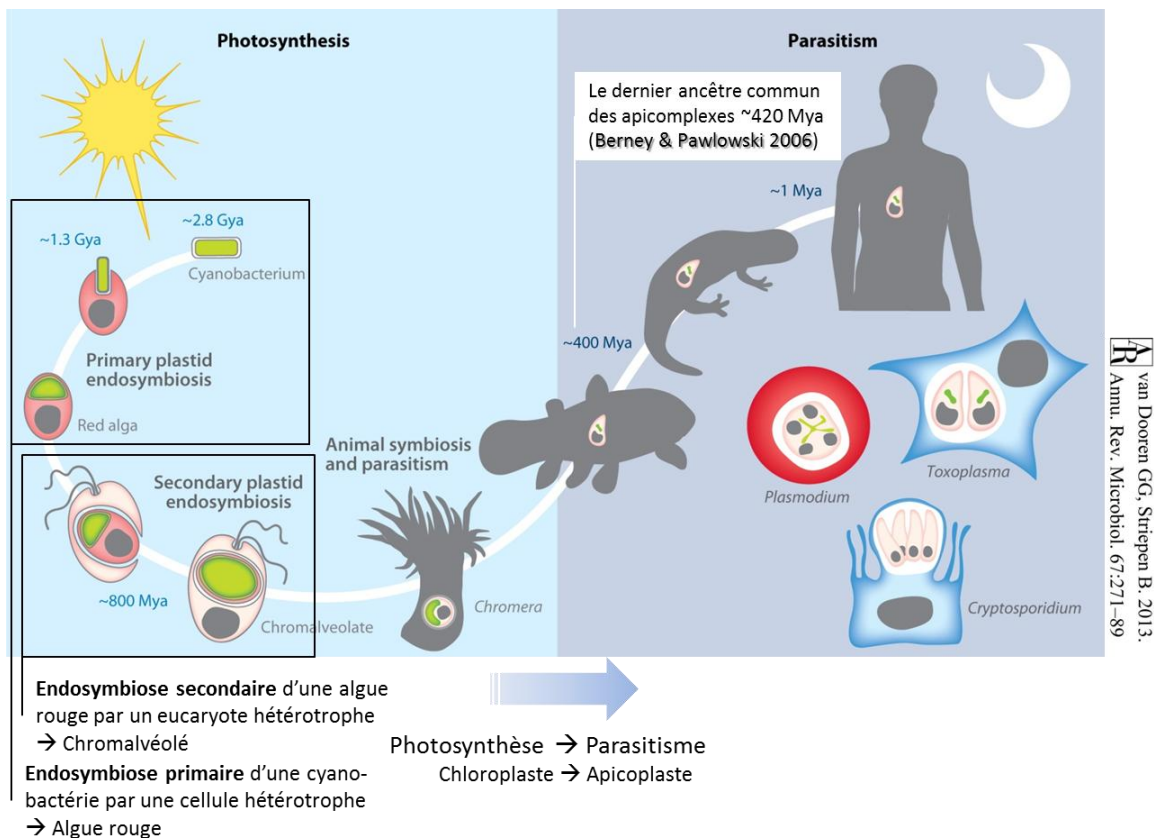


Figure 1 : Frise chronologique décrivant l'histoire évolutive des apicomplexes (*van Dooren and Striepen 2013*)

En plus de leur apicoplaste, pour ceux qui l'ont conservé, les apicomplexes se sont dotés, au fur et à mesure de l'évolution, d'un dispositif d'invasion efficace qui leur permet d'infecter une nouvelle cellule

hôte en moins d'une minute (Besteiro, Dubremetz, and Lebrun 2011). Ce dispositif, dont la biogenèse commence à être comprise (Hallée et al. 2018), est essentiellement composé d'organites ou réseaux membranaires/du cytosquelette propres aux apicomplexes (Figure 2) :

- ◆ Les rhoptries sont des organites de sécrétion situés au pôle apical de différents stades infectieux d'apicomplexes. Ces sacs en forme de poire contiennent deux sortes de protéines : les RONS (Rhoptry Neck Proteins) situées dans le col des rhoptries et les ROPs (Rhoptry Bulb Proteins) situées dans la partie la plus large des rhoptries (Besteiro, Dubremetz, and Lebrun 2011).
- ◆ Les micronèmes sont des organites de sécrétion situés près des rhoptries (Besteiro, Dubremetz, and Lebrun 2011).
- ◆ Les granules denses, organites de sécrétion spécifiques des apicomplexes, libèrent les protéines qu'elles contiennent après infection d'une cellule-hôte (Torii et al. 1989), contrairement aux rhoptries et aux micronèmes qui interviennent au début et au cours de l'infection (voir plus bas).
- ◆ L'IMC (Inner Membrane Complex), composé d'un réseau de sacs membranaires, forme, avec la membrane plasmique, une pellicule autour des stades infectieux. L'espace entre l'IMC et la membrane plasmique renferme un moteur actine-myosine appelé glideosome (Besteiro, Dubremetz, and Lebrun 2011). L'IMC joue donc un rôle clé dans la motilité des apicomplexes, mais aussi dans la division et l'architecture cellulaire (Absalon, Robbins, and Dvorin 2016).
- ◆ Une autre caractéristique des stades infectieux d'apicomplexes est l'ensemble d'anneaux polaires situés au pôle apical. Il forme un centre d'organisation des microtubules. Chez certains apicomplexes comme *Toxoplasma gondii*, ils sont accompagnés d'un conoïde de tubuline (Morrisette and Sibley 2002; Hu, Roos, and Murray 2002).

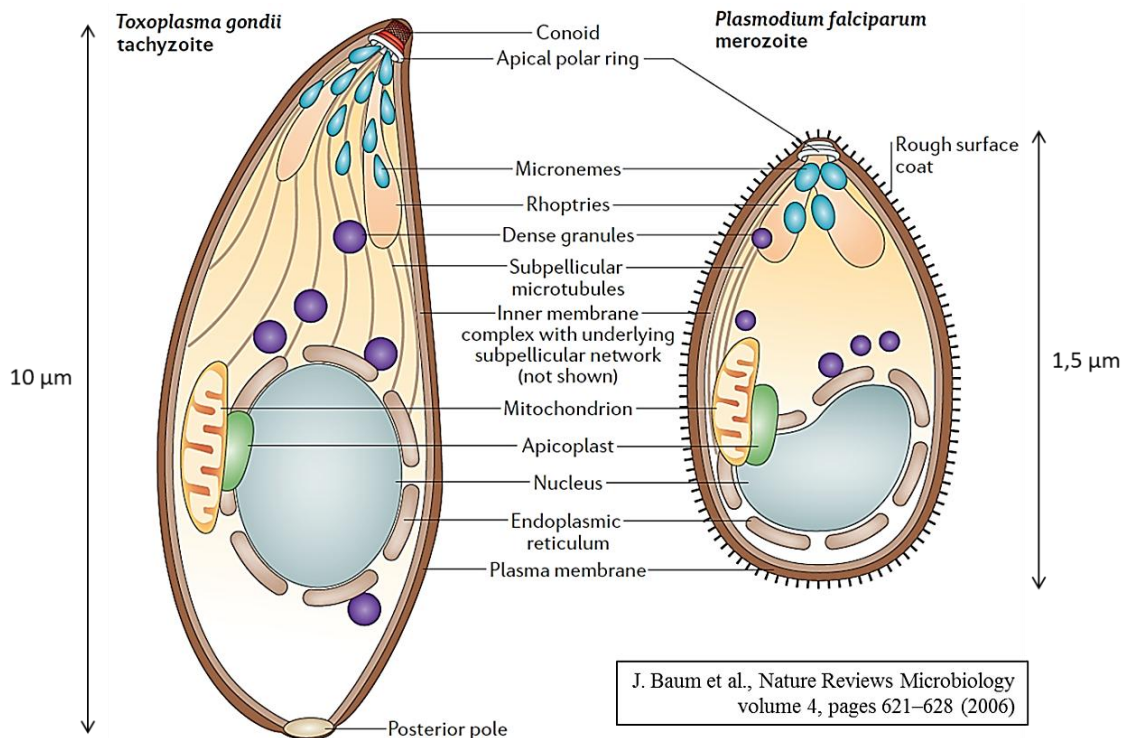


Figure 2 : Ultrastructure d'un tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* et d'un mérozoïte de *Plasmodium falciparum*

Le processus d'invasion de nouvelles cellules hôtes par les apicomplexes est soigneusement orchestré et démarre après reconnaissance d'une cellule hôte potentielle (Hakimi, Olias, and Sibley 2017). L'exocytose des micronèmes est d'abord déclenchée de manière calcium-dépendante ; les protéines ainsi sécrétées interagissent avec différents récepteurs situés à la surface de la future cellule hôte, offrant au parasite un premier point d'ancrage (P. Sharma and Chitnis 2013). Les protéines RONS, qui sont bien conservées entre les différentes espèces d'apicomplexes, sont ensuite sécrétées et s'ancrent dans la membrane plasmique de la future cellule hôte, offrant de nouveaux sites d'interaction avec des protéines de micronèmes comme AMA1 (Alexander et al. 2005, 2006). L'interaction AMA1-RON2 (ou de paires d'homologues AMA-RON en cas d'absence de l'un des précédents partenaires) a ainsi été particulièrement bien décrite chez *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* et démontre l'importance de la mise en place d'un ancrage fort entre l'apicomplexe et sa future cellule hôte (M. L. Tonkin et al. 2011; Lamarque et al. 2011, 2014). L'interaction entre les RONS et les protéines de micronèmes, mais aussi entre les RONS et des protéines de la future cellule hôte, permet ensuite la mise en place d'une jonction mobile qui va se déplacer du pôle apical au pôle postérieur du stade apicomplexe infectieux (Aikawa et al. 1978; Guérin et al. 2017). Ce déplacement est permis par le glideosome qui propulse le parasite dans la cellule hôte grâce au moteur actine-myosine, de concert avec des protéines de l'IMC (Drewry and Sibley 2015; Kentaro 2018; V. Kumar et al. 2019). Cette invasion active engendre une invagination de la membrane de la cellule hôte sans perturbation majeure de son cytosquelette, créant une poche au sein de laquelle le parasite va se loger et se développer une fois que l'invasion sera terminée : la vacuole parasitophore. La formation de cette dernière n'est pas laissée au hasard : diverses études ont en effet montré que les apicomplexes opèrent une sélection des lipides et des protéines localisées à la membrane plasmique de la cellule hôte pour définir précisément la composition de la membrane de la vacuole parasitophore (Mordue et al. 1999; Lauer et al. 2000; Samuel et al. 2001; Charron and Sibley 2004). Chez *Toxoplasma gondii*, la formation de la vacuole parasitophore s'accompagne de la sécrétion de plusieurs ROPs et de protéines des granules denses (appelées GRAs) capables d'interférer avec des voies de transduction du signal de l'hôte ou de moduler la réponse inflammatoire de ce dernier, dans le but de favoriser la (sur)vie du parasite (Hakimi, Olias, and Sibley 2017). Chez *Plasmodium*, les ROPs et les GRAs semblent plutôt impliquées dans le maintien de la vacuole parasitophore et la croissance du parasite au cours de son cycle intra-érythrocytaire (Ghosh et al. 2017; Morita et al. 2018).

Le processus d'infection unique des apicomplexes permet donc une infection rapide, la création d'une niche de survie (la vacuole parasitophore), et par la même occasion, d'une interface de communication avec l'hôte, tout en endormant la vigilance de ce dernier. Les différents stratagèmes ainsi mis au point par les apicomplexes pour garantir leur réplication et leur survie témoignent de leur co-évolution avec les organismes qu'ils parasitent.

2. Classification du genre *Plasmodium*

La classification du genre *Plasmodium* (résumée sur la [Figure 3](#)) et des ensembles auxquels il appartient est le résultat de patientes études d'observation réalisées au XX^{ème} siècle puis de classifications basées sur des arbres phylogénétiques construits selon des données morphologiques puis génétiques. Le développement d'outils informatiques capables de traiter des quantités de données de plus en plus importantes a récemment permis d'ajuster le regroupement d'espèces eucaryotes.

Ainsi, en analysant 65 espèces eucaryotes (et 135 gènes par espèce), Burki et al. ont démontré que la majorité des organismes photosynthétiques (plantes terrestres, algues) ou comportant un plaste comme cela a été décrit plus haut dans ce manuscrit peuvent être regroupés dans le méga-groupe des Diaphoretickes (*Burki, Shalchian-Tabrizi, and Pawlowski 2008*). Le super-groupe des SAR (Straménopiles, Alvéolés, Rhizaria) a été défini de manière similaire (*Burki et al. 2007*). Le groupe des Alvéolés a été défini en 1991 par Cavalier-Smith comme suit : 'Protistes possédant des vésicules (alvéoli, sacs) aplaties et assemblées en une couche continue sous la membrane plasmique, la supportant et formant une pellicule flexible. Les Alvéolés possèdent des mitochondries dotées de cristae tubulaires (rides), et leur flagelle ou leurs cils ont une structure distincte' (*Cavalier-Smith 1991*). Au sein du groupe des Alvéolés se trouve le phylum des Apicomplexes qui a été défini par Lévine en 1970 : 'un groupe présentant un complexe apical constitué d'anneaux polaires, d'un conoïde, de micronèmes, de rhoptries, de microtubules subpelliculaires. Les apicomplexes ont un cycle de vie majoritairement haploïde et asexué comportant une phase sexuée diploïde brève' (*Levine 1988*). Divers apicomplexes capables d'infecter des cellules sanguines de vertébrés ont ensuite été classés dans l'ordre des Hémospodidés par Danilewsky en 1885 (*Carreno et al. 1997*). Le regroupement de certains Hémospodidés, dont des espèces du genre *Plasmodium*, a été effectué en 1903 par Félix Mesnil sur la base de similarités entre leurs cycles de vie (*A. J. Davies and Johnston 2000*). L'histoire de la découverte du cycle de vie de *Plasmodium* et le cycle en lui-même sont décrits dans la partie suivante de ce manuscrit.

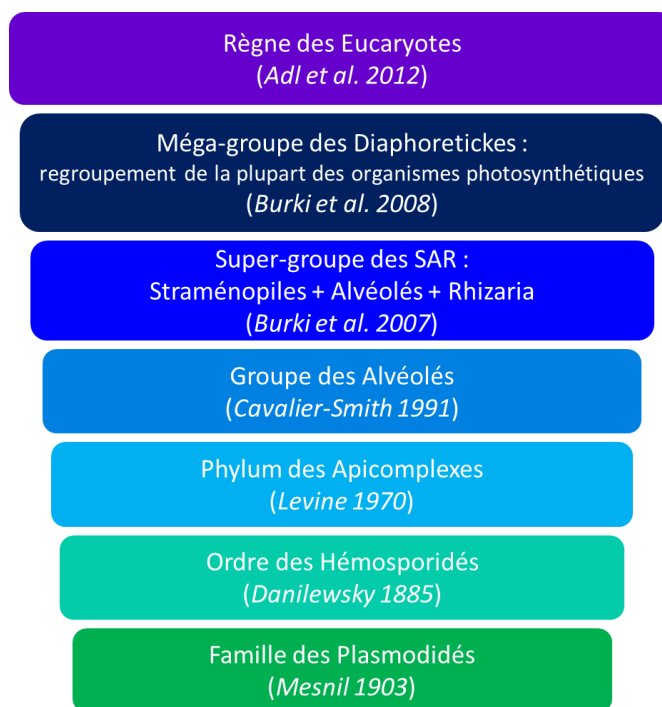


Figure 3 : Classification phylogénétique du genre *Plasmodium*

II. *Plasmodium* est l'agent infectieux responsable du paludisme

1. Décryptage : qui des marais ou des moustiques est responsable de la malaria ?

Ainsi que cela a été décrit plus haut, les apicomplexes ont co-évolué avec leurs hôtes et ont adapté leur cycle de vie à celui de ces organismes qu'ils parasitent et, inversement, les hôtes ont mis en place des stratégies pour empêcher l'infection. *Plasmodium* n'échappe pas à la règle, et ce de manière assez efficace (Sabbatani, Manfredi, and Fiorino 2010). Russel dira ainsi en 1943 : "No disease has, or has had through centuries, a more profound influence on world health than malaria" (Russell 1943).

Les plus anciennes allusions à la malaria remontent à 2700 avant JC pour la Chine, où l'on pense alors qu'elle est infligée par des démons armés du marteau, du brasero et de la marmite d'eau froide (description des différentes phases de la pathologie : courbatures et céphalées, fièvre, frissons/sueurs puis rémission entre deux accès de fièvre) (Gantier 1998; F. E. G. Cox 2002). D'autres allusions à la malaria sont faites dans des tables d'argile de Mésopotamie datant de 2000 avant JC, ou encore dans le papyrus d'Ebers en Égypte en 1570 environ avant JC, où les habitants faisaient des offrandes à la déesse Sekhmet contre les 'pestilences périodiques' particulièrement dangereuses pour les jeunes enfants pendant les périodes de crues du Nil (Gantier 1998; F. E. Cox 2010). La caractéristique première de la fièvre des marais était en effet sa périodicité (fièvre tierce ou quarte), qui permettait de la distinguer d'autres types de fièvres comme la fièvre typhoïde, par exemple. Hippocrate, en 400 avant JC, avait remarqué cette périodicité, ainsi que le fait que les malades présentaient une splénomégalie et une grande faiblesse. Il attribue alors les fièvres à la consommation de l'eau des marais (traduction du grec ancien - chapitre 7 de son écrit 'On Airs, Waters, and Places') :

"Such waters then as are marshy, stagnant, and belong to lakes, are necessarily hot in summer, thick, and have a strong smell, since they have no current; but being constantly supplied by rain-water, and the sun heating them, they necessarily want their proper color, are unwholesome and form bile; in winter, they become congealed, cold, and muddy with the snow and ice, so that they are most apt to engender phlegm, and bring on hoarseness; those who drink them have large and obstructed spleens, their bellies are hard, emaciated, and hot; and their shoulders, collar-bones, and faces are emaciated [...]. This disease is habitual to them both in summer and in winter, and in addition they are very subject to dropsies of a most fatal character; and in summer dysenteries, diarrheas, and protracted quartan fevers frequently seize them, and these diseases when prolonged dispose such constitutions to dropsies, and thus prove fatal." (Hippocrates 400BC)

Aulus Cornelius Celsus (25 av. JC-54), encyclopédiste romain, décrit également les différents accès de fièvre (tierce, quarte, paroxysme puis rémission...) (Cunha and Cunha 2008). En Rome antique, les cas de fièvre étaient également reliés à la présence des marais, mais cette fois, c'est l'air émanant des eaux stagnantes qui était incriminé. On y parlait de *mal aria*, le mauvais air en italien médiéval, qui est utilisé sous la forme contractée *malaria* en anglais à partir de 1740 (Cunha and Cunha 2008; Hempelmann and Krafts 2013). Des systèmes de drainage conçus par les ingénieurs romains ont permis d'assécher ces marais et d'améliorer les conditions de santé des habitants de la ville. Jusqu'à ce qu'Alaric et ses barbares prennent possession de la ville vers 410 et détruisent les systèmes de drainage... avant de fuir Rome car le retour du *mal aria* s'avéra particulièrement meurtrier pour le prince et ses troupes (Cunha and Cunha 2008).

Au vu de l'impact de la malaria sur la santé des populations de l'époque, la maladie était prise très sérieusement et perçue comme une punition divine ou un mauvais sort. Quintus Serenus Sammonicus, médecin auprès de l'empereur romain Caracalla, avait mis au point une amulette antipyrétique. Il préconisait d'écrire ABRACADABRA (parfois traduit par « qu'il soit détruit ») d'une certaine manière sur un morceau de papier et de le porter autour du cou à l'aide d'un cordon en lin pendant 9 jours, puis de le jeter par-dessus son épaule dans un ruisseau courant vers l'Est (*Hempelmann and Krafts 2013*). Beaucoup d'auteurs parlent de la fièvre des marais comme d'une catastrophe redoutée, à l'instar de Homère dans l'Iliade : « Le Chien d'Oriôn [...] est la plus éclatante des étoiles, mais c'est aussi un signe funeste qui présage une fièvre ardente aux misérables hommes mortels. » (*Homer 850BC*).

Il a fallu plusieurs siècles de cohabitation entre *Plasmodium* et *Homo sapiens* avant que la curiosité, la persévérance et la patience de quelques scientifiques et médecins militaires ne permettent de trouver le vrai coupable de la malaria. La découverte des bactéries en 1676 par Antoni van Leeuwenhoek puis la théorie des germes de Louis Pasteur et Robert Koch (en 1878-79) a poussé à rechercher l'organisme microscopique responsable de la malaria (*F. E. Cox 2010*). L'étude d'espèces phylogénétiquement proches de *Plasmodium* (des Hémosporeidés capables d'infecter des oiseaux par exemple) a également fourni des pistes de compréhension du cycle de vie de l'apicomplexe.

Tout commença avec Louis Alphonse Laveran, médecin militaire français affecté à Constantine en Algérie en 1878. Pendant deux ans, dans les hôpitaux de Bône, Biskra et Constantine, Laveran va s'attacher à comprendre la cause de la malaria, qu'il appelle par ailleurs plutôt paludisme (*palus*, en latin, signifie marais – paludisme est aujourd'hui utilisé pour nommer la malaria en français) (*Petithory 1995*). En effectuant des autopsies sur des patients décédés d'un accès palustre, il remarque des pigmentations noires accumulées préférentiellement dans certains organes : la rate, le foie, les vaisseaux capillaires du cerveau et de la moelle épinière. Il observe également, notamment chez les algériens ayant vécu dans des endroits insalubres (ayant donc probablement contracté plusieurs fois le paludisme) une splénomégalie importante et la présence de ce pigment (*Figure 4*). Il décide alors de rechercher ce pigment dans le sang frais prélevé à des patients atteints du paludisme. À l'aide de son microscope optique (grossissement x400) et de carmin, il examine minutieusement du sang qu'il a prélevé. Il remarque la présence du pigment dans le sang des malades, sous différentes formes – qu'il appelle 'corps' – en fonction des phases de la pathologie et rapporte ses observations sur des lames (*Figure 5*). La quinine, extraite de l'écorce de quinquina pour la première fois au début XIX^{ème} siècle, étant le seul traitement antipaludique disponible à l'époque, il l'administre aux malades dont il a la charge et observe également la disparition des fameux pigments dans le sang des patients traités (*Laveran 1881*). Toutes ces observations amènent Laveran à conclure que le paludisme est dû à un parasite et non à une bactérie comme suggéré plus tôt par Klebs et Tommasi-Crudeli. Ayant remarqué également des mouvements oscillants et l'apparition de flagelles sur les corps n°2 (*Figure 5*), il décide d'appeler le parasite qu'il observe *Oscillaria malariae*. Si Laveran ne réussit pas à faire entendre ses découvertes aux membres de l'Académie Française de Médecine, il parviendra néanmoins à convaincre les italiens Grassi, Bignami, Bastianelli, Celli, Golgi et Marchiafava qui contribueront eux aussi à élucider le cycle de vie de *Plasmodium*.

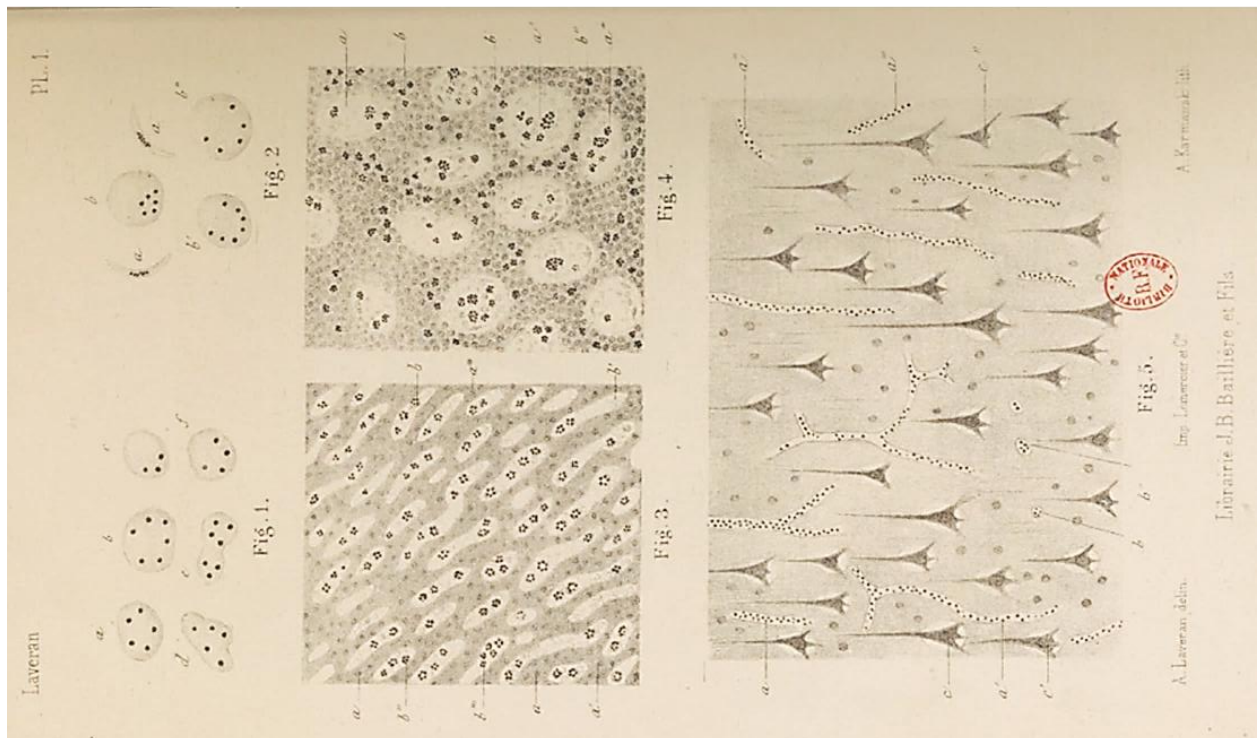


Figure 4 : Planche I dessinée et publiée par Laveran en 1881 ('Nature Parasitaire des Accidents de l'Impaludisme' – Source = Gallica – Bibliothèque Nationale de France)

PLANCHE I

Figure 1. — *a, b, c, d, e, f*, éléments pigmentés trouvés au milieu des éléments dissociés de la rate dans un cas de fièvre pernicieuse. (Grossissement, 1000 diamètres environ.)

Figure 2. — Éléments pigmentés trouvés dans le sang d'un homme mort de fièvre pernicieuse. — *a, a'*, éléments pigmentés allongés analogues aux corps n° 1. — *b, b', b'', b'''*, éléments pigmentés sphériques identiques aux corps n° 3. (Grossissement, 1000 diamètres environ.)

Figure 3. — Coupe du foie dans un cas de fièvre pernicieuse. (Oculaire 1, objectif vi de Verick.) — *a, a', a'', a'''*, trabécules de substance hépatique. — *b, b', b'', b'''*, capillaires sanguins renfermant des hématies et des éléments pigmentés en grand nombre.

Figure 4. — Coupe de la rate dans un cas de fièvre pernicieuse. (Oculaire 1, objectif vii de Verick.) — *a, a', a'', a'''*, orifices vasculaires; les bords de ces orifices sont mal limités; à l'intérieur on aperçoit des cellules endothéliales détachées plus ou moins complètement de la paroi sous-jacente, des cellules lymphoïdes et des éléments pigmentés. — *b, b', b'', b'''*, pulpe splénique; au milieu des cellules lymphoïdes on distingue des éléments pigmentés en grand nombre.

Figure 5. — Coupe du cerveau (substance grise des circonvolutions motrices) dans un cas de fièvre pernicieuse à forme comateuse. (Oculaire 2, objectif vii de Verick.) — *a, a', a'', a'''*, capillaires renfermant un grand nombre d'éléments pigmentés. — *b, b'*, capillaires coupés en travers; on distingue au centre des granulations de pigment. — *c, c', c'', c'''*, cellules cérébrales; les espaces pérircellulaires sont bien marqués. Cette coupe du cerveau a été colorée par le carmin et montée dans le baume de Canada. Par suite de la transparence parfaite des éléments pigmentés dans le baume, on ne distingue de ces éléments que les granulations de pigment.

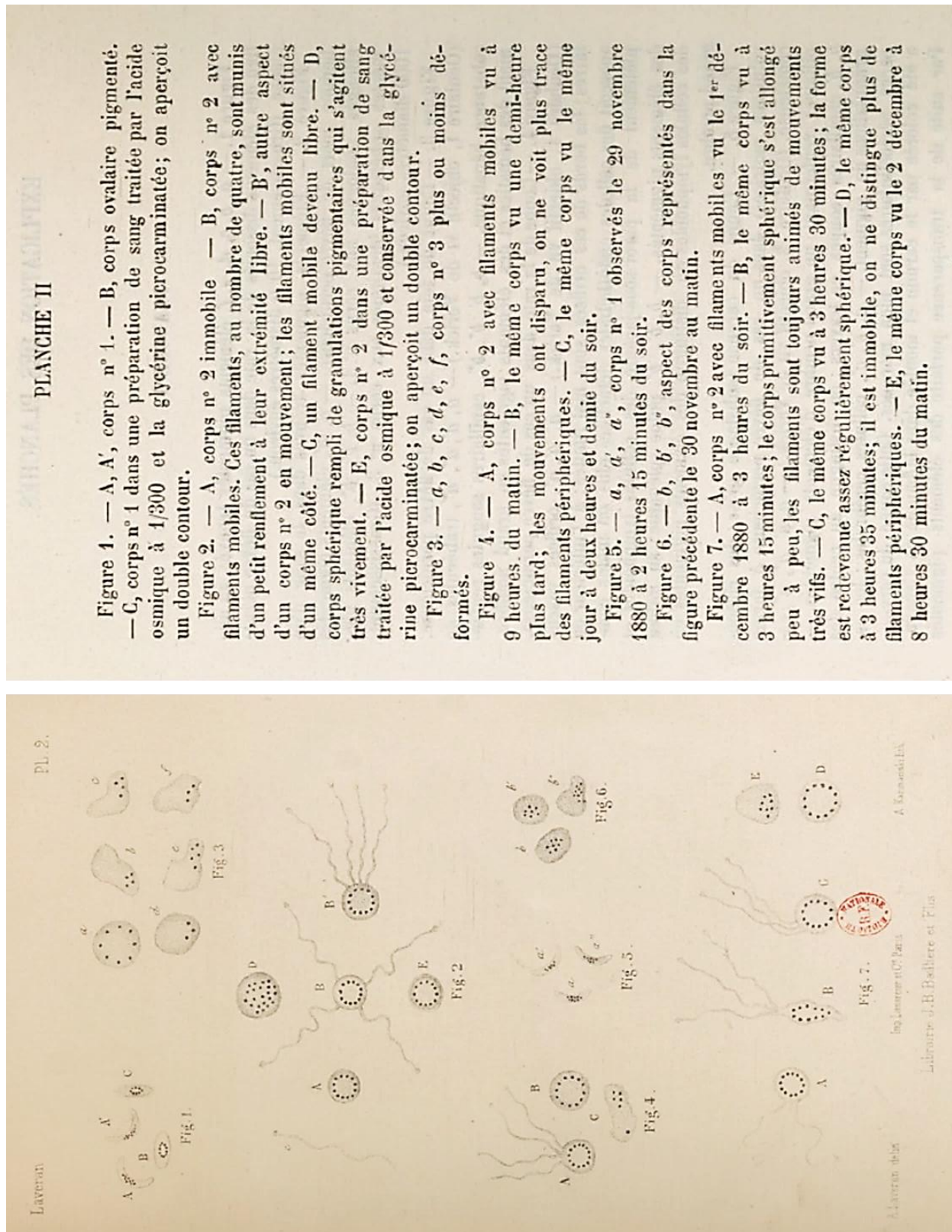


Figure 5 : Planche II dessinée et publiée par Laveran en 1881 ('Nature Parasitaire des Accidents de l'Impaludisme' – Source : Gallica – Bibliothèque National de France)

PLANCHE II

Figure 1. — A, A', corps n° 1. — B, corps ovulaire pigmenté. — C, corps n° 1 dans une préparation de sang traitée par l'acide osmique à 1/300 et la glycérine picocarminée; on aperçoit un double contour.

Figure 2. — A, corps n° 2 immobile. — B, corps n° 2 avec filaments mobiles. Ces filaments, au nombre de quatre, sont munis d'un petit renflement à leur extrémité libre. — B', autre aspect d'un corps n° 2 en mouvement; les filaments mobiles sont situés d'un même côté. — C, un filament mobile devenu libre. — D, corps sphérique rempli de granulations pigmentaires qui s'agitent très vivement. — E, corps n° 2 dans une préparation de sang traitée par l'acide osmique à 1/300 et conservée dans la glycérine picocarminée; on aperçoit un double contour.

Figure 3. — a, b, c, d, e, f, corps n° 3 plus ou moins déformés.

Figure 4. — A, corps n° 2 avec filaments mobiles vu à 9 heures du matin. — B, le même corps vu une demi-heure plus tard; les mouvements ont disparu, on ne voit plus trace des filaments périphériques. — C, le même corps vu le même jour à deux heures et demie du soir.

Figure 5. — a, a', a'', corps n° 1 observés le 29 novembre 1880 à 2 heures 15 minutes du soir.

Figure 6. — b, b', b'', aspect des corps représentés dans la figure précédente le 30 novembre au matin.

Figure 7. — A, corps n° 2 avec filaments mobiles vu le 1^{er} décembre 1880 à 3 heures du soir. — B, le même corps vu à 3 heures 15 minutes; le corps primitivement sphérique s'est allongé peu à peu, les filaments sont toujours animés de mouvements très vifs. — C, le même corps vu à 3 heures 30 minutes; la forme est redevenue assez régulièrement sphérique. — D, le même corps à 3 heures 35 minutes; il est immobile, on ne distingue plus de filaments périphériques. — E, le même corps vu le 2 décembre à 8 heures 30 minutes du matin.

Laveran, comme beaucoup de ses confrères de l'époque, pense que le microorganisme qui déclenche les crises de paludisme est transmis par l'inhalation de l'air des marais ou la consommation d'eau stagnante (Newton 1895). Albert Freeman Africanus King, un médecin américain, croit en revanche fermement que les moustiques n'y sont pas pour rien dans la transmission du paludisme et établit sa doctrine paludisme-moustique sur la base de 19 points factuels (F. E. Cox 2010). Ces 19 faits sont en grande majorité des comparaisons entre les conditions de reproduction et de vie idéales des moustiques (température supérieure à 60°F, soit environ 15°C, besoin de points d'eau stagnante pour le développement des larves de moustique, capacité des moustiques adultes à voler, incapacité à voler à une altitude supérieure à 3-4 mètres) et des saisons/conditions de transmission du paludisme (King 1883).

Il faudra attendre 1897, avec les canadiens William Mc Callum et Eugène Opie qui étudient des pathologies touchant les oiseaux, pour obtenir des informations sur les formes sexuées d'*Haemoproteus columbae* et leur fécondation dans l'estomac du moustique. Les deux étudiants en médecine observent également la séquestration de *Plasmodium relictum* dans le foie et la rate d'oiseaux morts de paludisme aviaire (F. E. Cox 2010). Patrick Manson, parasitologue écossais, est intéressé par cette découverte mais ne peut se rendre dans des zones impaludées pour l'étudier. Il réussit à convaincre Ronald Ross, médecin de l'armée britannique, de faire quelques études en ce sens (F. E. Cox 2010). Ross fait différentes expériences au cours desquelles il capture des oiseaux, examine leur sang pour retrouver le pigment de Laveran et les met en présence de moustiques appartenant à différentes espèces, ce qui lui permettra de noter que les parasites aviaires ne sont pas transmis par les *Anopheles* qui transmettent le paludisme humain (Ross 1898). Il dissèque ensuite les moustiques et suit l'évolution du cycle de vie des protozoaires dans leur estomac (Ross 1898). Il montre ainsi que les flagelles observés par Laveran (qui sont les stades sexués mâles) fusionnent avec des cellules rondes qu'il prend pour des leucocytes (mais qui sont en réalité les stades sexués femelles), avant de donner des « vermicules » qui traversent la paroi de l'estomac du moustique et forment des boules dans la paroi à l'extérieur de l'estomac. Il observe ensuite les changements d'aspect de ces boules pendant 1 à 2 semaines puis leur destruction suivie par la libération de parasites (stades sporozoïtes) qui sont stockés dans les glandes salivaires des moustiques (Figure 6, (F. E. Cox 2010)). À la même époque, les italiens Bignami et Grassi, puis Manson, démontrent à l'aide d'une approche similaire que les moustiques sont responsables de la transmission de *Plasmodium* de personnes atteintes d'un accès palustre à des personnes saines (tout simplement en laissant les Anophèles femelles se nourrir sur des malades puis sur des personnes saines) (F. E. Cox 2010).

Le monde de la malariologie pensa la boucle bouclée en 1903 avec l'affirmation du scientifique allemand Fritz Schaudinn que les sporozoïtes étaient capables d'infecter directement des hématies, bien que personne n'ait pu confirmer ses résultats (F. E. Cox 2010). Cependant, 34 ans plus tard, Sydney James et Parr Tate démontrent qu'il y a une phase de latence entre le moment où des sporozoïtes de *Plasmodium gallinaceum* sont injectés à des poules et le moment où les parasites sont détectés dans le sang (F. E. Cox 2010). Une décennie plus tard, en 1947, Henry Shortt et Cyril Garnham, des parasitologues britanniques ayant déjà travaillé sur un parasite du genre *Hepaticystis*, découvrent que cette période de latence est due à une phase de développement dans le foie (F. E. Cox 2010). L'élucidation du cycle de vie complet de *Plasmodium* (qui sera présenté dans la partie suivante de ce manuscrit) est enfin achevée (Figure 7).

REPORT ON THE CULTIVATION
OF PROTEOSOMA, LABBE, IN
GREY MOSQUITOS.

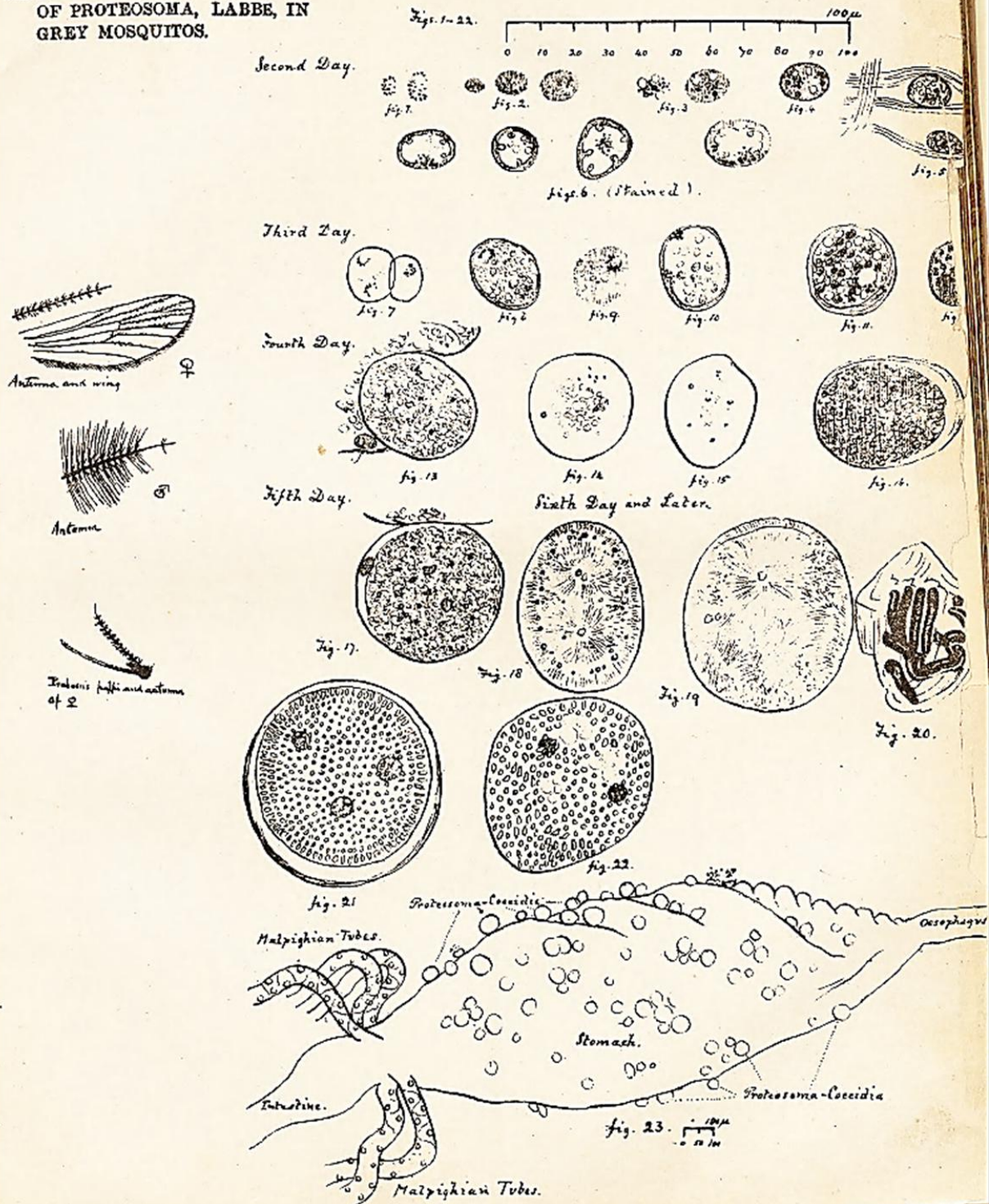


Figure 6 : Planche reprenant les observations de Ross sur le développement de *Plasmodium* dans l'estomac du moustique (Source : 'Report on the Cultivation of Proteosoma, Labbé, in Grey Mosquitos' - 1898)

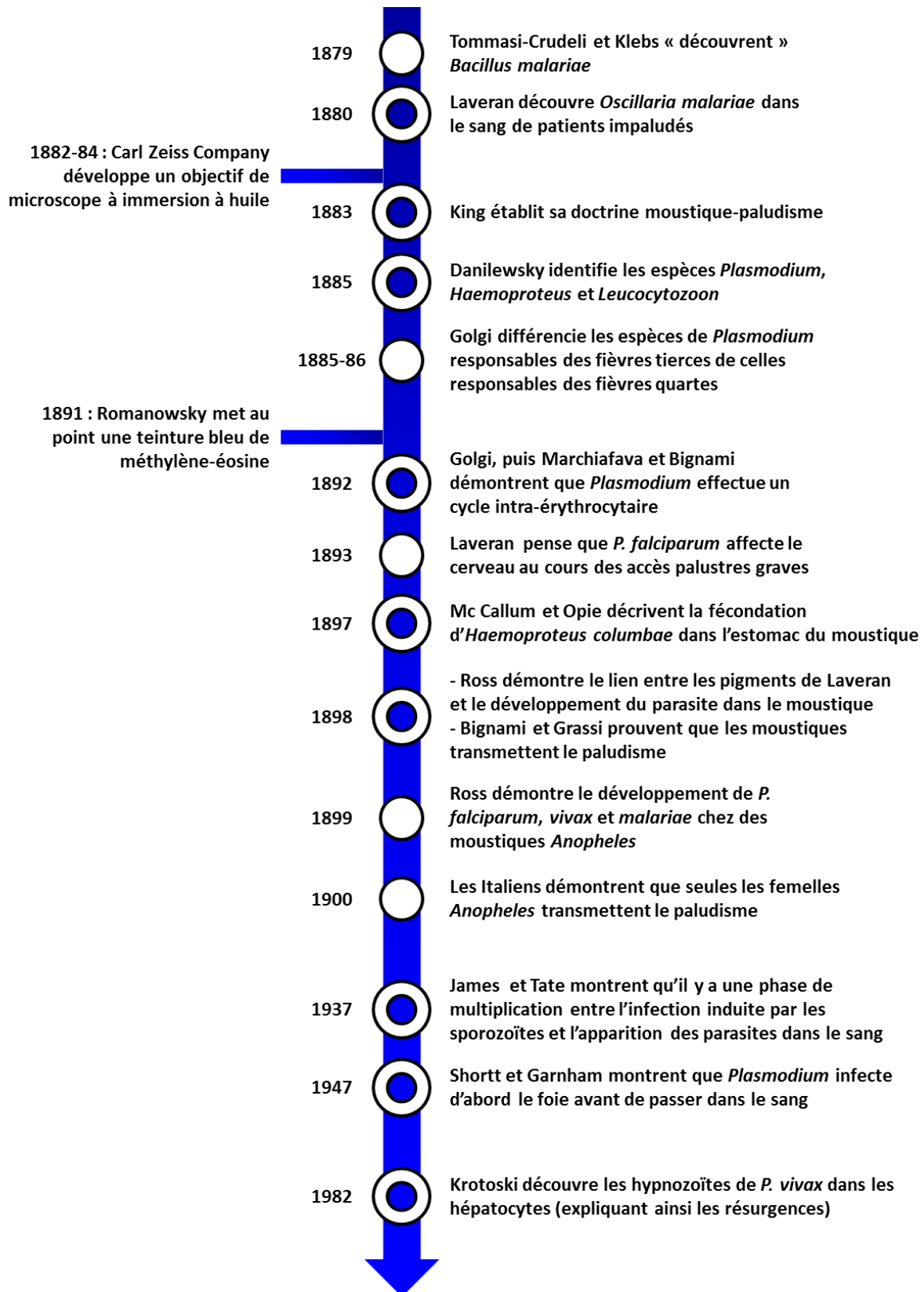


Figure 7 : Frise chronologique reprenant les événements majeurs de l'élucidation du cycle de développement de *Plasmodium*

2. Cycle de vie de *Plasmodium*

Divers travaux de recherche ont contribué à étayer les données collectées aux XIX^{ème} et XX^{ème} siècles par les savants et scientifiques cités dans la partie précédente de ce manuscrit. Actuellement, six espèces de *Plasmodium* sont responsables de la majorité des cas de paludisme répertoriés dans le monde : *falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale* (deux espèces sympatriques, *wallikeri* et *curtisi*, sont responsables des cas de paludisme à *P. ovale* (Groger et al. 2017)) et *knowlesi*. Des cas isolés d'infection d'êtres humains par des espèces parasitant habituellement des singes, comme *P. brasilianum* ou *P. cynomolgi*, ont également été rapportés, ce qui porte à minimum huit le nombre d'espèces de *Plasmodium* capables d'infecter l'Homme (McFadden 2018). Les différentes espèces de *Plasmodium* présentent toutes le même cycle de vie (schématisé en Figure 8) ; elles diffèrent par la morphologie de certains de leurs stades de développement ainsi que par la durée de certaines phases de leur cycle de vie (Lover et al. 2018).

a. Développement de *Plasmodium* au sein de son hôte intermédiaire

La phase de développement de *Plasmodium* chez son hôte intermédiaire débute avec l'injection de maximum 50 (sur le terrain) à 100 (en laboratoire) sporozoïtes par un moustique femelle du genre *Anopheles* dans le derme d'un homéotherme au cours d'un repas sanguin (Ménard et al. 2013). Les sporozoïtes font partie des cellules eucaryotes les plus rapides : ils sont capables de se déplacer à 1-2 µm/seconde dans le derme dans le but d'atteindre la circulation sanguine (Ménard et al. 2013; Cyrklaff, Frischknecht, and Kudryashev 2017). Seuls 25% l'atteindront, les autres pouvant soit rester bloqués au point d'injection, soit infecter des cellules du derme, de l'épiderme ou du follicule pileux (sans que l'on sache s'ils sont capables de s'y développer), soit atteindre la circulation lymphatique où ils seront éliminés par le système immunitaire (Ménard et al. 2013). La plupart des sporozoïtes ayant réussi à atteindre la circulation sanguine vont parvenir aux sinusoides du foie. Ils ressentent leur environnement à l'aide de protéines de surface capables d'interagir avec des récepteurs localisés à la surface de diverses cellules du foie (cellules stellaires, cellules de Kupffer, cellules endothéliales) (Vaughan and Kappe 2017). Après avoir traversé l'endothélium ou une cellule de Kupffer (préférentiellement), les sporozoïtes atteignent les cellules qu'ils sont en charge d'infecter : les hépatocytes (Pradel and Frevert 2001; Ménard et al. 2013). Les interactions entre sporozoïtes et hépatocytes ne sont pas encore toutes comprises mais semblent distinctes de l'interaction AMA1-RON2 décrite en partie I.1 pour les mérozoïtes (Dundas et al. 2018). De plus, les sporozoïtes ne s'établissent pas directement dans le premier hépatocyte qu'ils infectent ; ils en traversent plutôt plusieurs, formant une vacuole parasitophore transitoire dans chacun d'eux (Risco-Castillo et al. 2015). Après avoir choisi l'hépatocyte capable de supporter son développement (sans que les raisons motivant ce choix ne soient connues), un sporozoïte met en place une vacuole parasitophore définitive et entame son développement dans sa cellule hôte (Vaughan and Kappe 2017). Le passage de la phase d'invasion à celle de développement s'accompagne de l'expression « juste-à-temps » de diverses protéines et de synthèse d'acides gras. Le parasite prend également le contrôle de sa cellule hôte, notamment en la dépouillant de ses lipides et en l'empêchant d'entrer en apoptose (Ménard et al. 2013; Vaughan and Kappe 2017). Au bout d'un cycle de réplication de 7 à 10 jours (schizogonie hépatique) jusqu'à 90.000 mérozoïtes, qui sont les stades infectieux des hématies, sont formés (Vaughan and Kappe 2017; H. Matthews, Duffy, and Merrick 2018). La membrane de la vacuole parasitophore est lysée et l'hépatocyte hôte, dont la membrane plasmique sert de leurre vis-à-vis du système immunitaire, est transformé en un sac de mérozoïtes appelé mérosome. Ce dernier atteint les sinusoides par intravasation et se brise dans les capillaires pulmonaires,

libérant les milliers de mérozoïtes qu'il contient dans la circulation sanguine (Vaughan and Kappe 2017). Chez *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes n'entament pas leur développement intra-hépatocytaire mais entrent dans une phase de dormance, formant des hypnozoïtes. Chez ces stades, il n'y a pas de réplication de l'ADN (d'où le terme de dormance) mais la réplication de certains organites se poursuit. Les hypnozoïtes résident dans une vacuole parasitophore à la membrane épaisse et semblent capables d'allonger la durée de vie de l'hépatocyte qu'ils infectent à leur gré (Markus 2012; Vaughan and Kappe 2017). Les hypnozoïtes peuvent sortir de leur dormance des semaines voire des mois après avoir infecté leur hépatocyte hôte, entamer une phase de développement comme décrit ci-dessus, et, donc, engendrer de nouvelles infections. L'existence de formes dormantes chez d'autres espèces de *Plasmodium* n'a pas été décrite, bien que des cas de rechute aient été signalés des mois voire des années après infection – cela dit, une absence de preuves de leur existence n'est pas une preuve de leur non-existence (Richter et al. 2016).

Les mérozoïtes qui ont été relargués dans le sang infectent des réticulocytes et/ou des érythrocytes en fonction des espèces de *Plasmodium* (E. Meibalan and Marti 2017). Après reconnaissance d'une potentielle cellule hôte naïve, le mérozoïte s'oriente de manière à ce que son pôle apical se retrouve contre la membrane de la cellule à infecter (Phillips et al. 2017). Le processus d'invasion suit les étapes décrites en partie I.1 : le mérozoïte met en place des interactions fortes avec sa future cellule hôte (notamment avec ses récepteurs RH = Reticulocyte binding Homologs ou EBA = Erythrocyte Binding Antigens), puis une jonction mobile qui lui permet de générer une vacuole parasitophore par invagination de la membrane de la cellule hôte (Cowman et al. 2016). Une fois à l'intérieur du globule rouge, le parasite entame une phase de développement intra-érythrocytaire, donnant un stade anneau. Ce dernier, en forme de disque, est nommé ainsi car son noyau est allongé, localisé à sa périphérie et visible sous la forme d'un anneau lorsque l'on examine les parasites par frottis sanguin coloré au giemsa (Bannister and Mitchell 2003). L'anneau se développe pour donner un trophozoïte. Le parasite entame alors une phase de croissance et de modification de sa cellule-hôte intense, en y exportant des protéines et en y récupérant des nutriments importants pour son développement, qui le prépare à un cycle de réplication par schizogonie (Bannister and Mitchell 2003). Le trophozoïte devient donc un schizonte ; à ce stade, la schizogonie permet, en un cycle de réplication, de générer en moyenne 16 nouveaux mérozoïtes taillés pour l'invasion de nouvelles hématies, c'est-à-dire comportant tous les organites nécessaires à leur motilité, la reconnaissance d'une cellule hôte potentielle et l'invasion de cette dernière (Bannister and Mitchell 2003; H. Matthews, Duffy, and Merrick 2018). La répétition de cycles intra-érythrocytaires engendre une augmentation exponentielle de la parasitémie, notamment avec *P. falciparum*, et déclenche les symptômes du paludisme (la pathogénèse du paludisme sera développée dans la partie II.3).

b. Transmission de *Plasmodium* à son hôte définitif

Chez 0,1 à 5% des stades intra-érythrocytaires, avant que la schizogonie n'ait démarré, la protéine Gametocyte Development 1 (GDV1) lève la répression de l'expression du facteur de transcription AP2-G (Tadesse et al. 2018). Elle permet ainsi de programmer la maturation de stades anneaux en stades sexuels, appelés gamétocytes. Cette maturation s'effectuera au cours du cycle intra-érythrocytaire suivant. Les facteurs responsables de l'expression de GDV1 ne sont pas encore compris, bien que certains changements environnementaux (notamment accroissement de la parasitémie, anémie importante, réponse immunitaire de l'hôte accrue, utilisation d'un traitement antipaludique) soient capables de déclencher la production de gamétocytes, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (E. Meibalan and Marti 2017). Par ailleurs, le moment de l'émergence des gamétocytes varie d'une espèce de *Plasmodium* à l'autre. Ainsi, chez *P. vivax*, l'expression des gamétocytes semble prioritaire, et l'on peut trouver des stades sexuels chez des personnes infectées avant même de détecter des stades sanguins (E. Meibalan and Marti 2017; Adams and Mueller 2017). Les hématies infectées par des stades anneaux engagés dans la conversion en stades sexuels sont séquestrées dans la moelle osseuse et la rate où ils effectuent leur maturation (stades I à V) avant de se rendre dans la circulation périphérique (De Niz et al. 2018). Les gamétocytes sont en effet les stades devant être transmis au moustique pour permettre la complétion du cycle de vie de *Plasmodium*. Leur présence dans la circulation périphérique facilite donc leur absorption lors d'un repas sanguin. Elle s'accompagne par ailleurs de la diffusion d'espèces organiques volatiles par l'hôte homéotherme qui attirent les moustiques vecteurs, surtout lorsque la gamétocythémie est élevée. L'on ne sait pas encore si les gamétocytes les produisent eux-mêmes ou si leur présence joue sur le profil microbien des cellules de la peau, déclenchant alors l'expression de ces molécules (Busula et al. 2017; De Boer et al. 2017).

Les femelles moustiques effectuent des repas sanguins pour nourrir leurs œufs. Ces derniers sont ensuite fécondés par des moustiques mâles, puis pondus dans des points d'eau stagnante où les larves pourront se développer. Sur les 400 espèces d'Anophèle existantes, 60 à 70 sont capables de transmettre le paludisme et 40 d'entre elles sont les hôtes définitifs principaux des espèces de *Plasmodium* capables d'infecter l'Homme (Tuteja 2007; Phillips et al. 2017). Lorsqu'une femelle Anophèle, par l'odeur alléchée, effectue un repas sanguin sur une personne infectieuse (i.e. des gamétocytes sont présents dans sa circulation périphérique), les gamétocytes subissent un changement d'environnement radical : chute de la température de 37°C à environ 20°C, augmentation du pH à environ 8, présence d'acide xanthurénique issu du métabolisme du moustique, etc. (Bennink, Kiesow, and Pradel 2016). Ces différents changements se traduisent, au niveau moléculaire, par l'activation de guanylyl cyclases et de kinases, et de voies de transduction du signal dépendantes du calcium et de l'inositol triphosphate (Bennink, Kiesow, and Pradel 2016). Ces dernières déclenchent la répression de gènes impliqués dans la transition zygote-ookinète chez les femelles, afin qu'elles soient prêtes pour la fécondation. Chez les mâles, elles engendrent trois cycles de division et l'exflagellation permettant la libération de 8 gamètes mâles comportant un flagelle leur permettant de partir à la recherche d'un gamète femelle (Bennink, Kiesow, and Pradel 2016). Cette activation, qui dure environ 15 minutes, implique que les gamétocytes sortent de leur cellule hôte. La membrane de la vacuole parasitophore est d'abord lysée, puis c'est le tour de la membrane du globule rouge, ce qui permet au parasite de profiter le plus longtemps possible de la membrane de sa cellule hôte pour se protéger du système immunitaire et du microbiote du moustique, ainsi que des constituants du repas sanguin (Sologub et al. 2011). L'IMC est également désintégré, ce qui a pour conséquence que les

gamètes sont contenus uniquement dans leur membrane plasmique. La fusion entre un gamète mâle et un gamète femelle est suivie de celle de leurs noyaux et de la méiose. Le zygote ainsi obtenu est tétraploïde, tout comme l'ookinète qu'il va donner en une vingtaine d'heures (Bennink, Kiesow, and Pradel 2016). Ce dernier est un stade mobile capable de traverser la paroi de l'estomac du moustique (Gao et al. 2018). Il comporte pour cela des micronèmes, un IMC et des microtubules subpelliculaires, mais pas de rhoptries car il n'a pas besoin de créer de vacuole parasitophore (Soldati-Favre, Foth, and Cowman 2004). Une fois dans la lamina basale de la paroi de l'estomac du moustique, il se développe en un oocyste qui, après une sporogonie de 10 à 17 jours en fonction des espèces de *Plasmodium*, donnera des milliers de sporozoïtes (retour à l'haploïdie) qui migreront vers les glandes salivaires du moustique (Ménard et al. 2013; H. Matthews, Duffy, and Merrick 2018). Comme aux autres phases de son développement, *Plasmodium* manipule son hôte ; ainsi, les moustiques contenant des oocystes dans la paroi de leur estomac font moins de repas sanguins, pourtant nécessaires à leur reproduction, et préfèrent se nourrir de nectar de plantes. Ce mode de nutrition peut permettre au vecteur de vivre plus longtemps (Busula et al. 2017) mais dans certains cas, il peut s'agir d'une stratégie antipaludique utilisée par les moustiques (Balaich et al. 2016). En revanche, il semble, avec plus de certitude, que la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique induise des changements d'habitudes alimentaires : une femelle moustique infectieuse se pose plus fréquemment et fait des repas sanguins plus courts qu'une femelle moustique non infectieuse. Le parasite augmente ainsi ses chances d'être transmis à un nouvel hôte homéotherme (Busula et al. 2017).

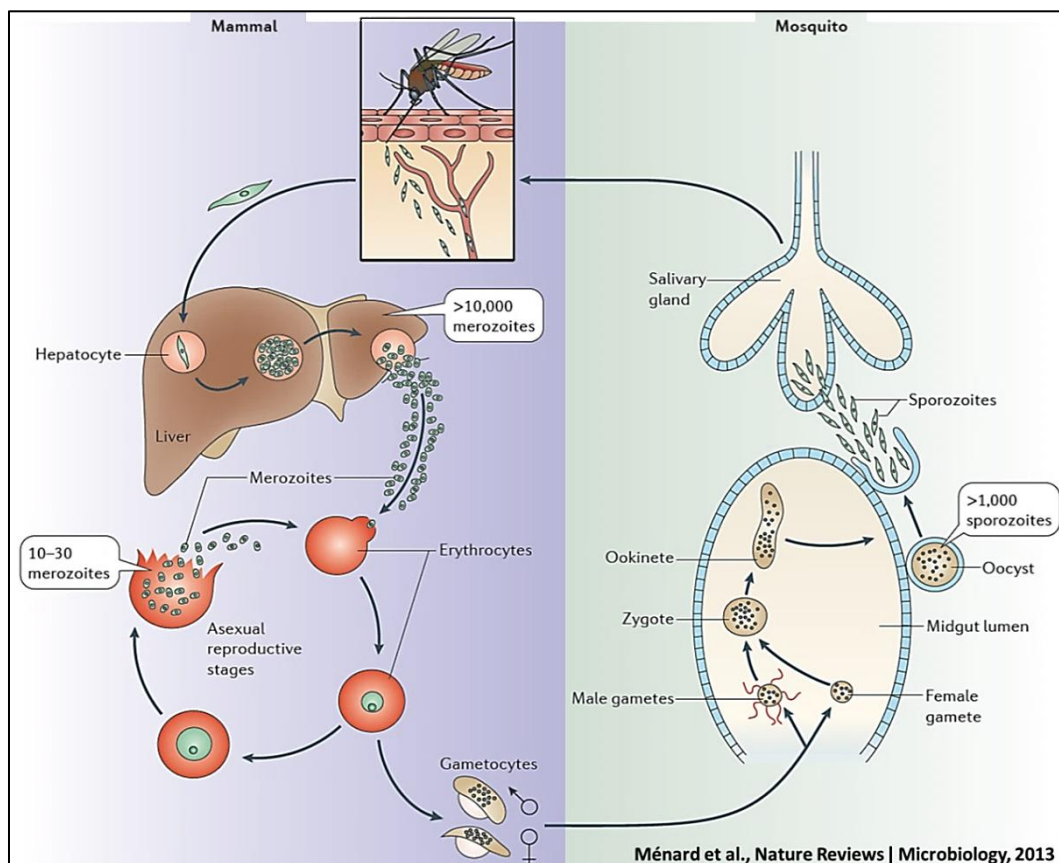


Figure 8 : Schéma du cycle de vie de *Plasmodium* (chez l'hôte intermédiaire à gauche et chez l'hôte définitif à droite)

3. Le paludisme

Le paludisme est le résultat d'interactions complexes entre les différentes espèces de *Plasmodium* et leurs hôtes définitifs et intermédiaires. Il semblerait qu'il ait commencé à faire des ravages dans les populations humaines avec les débuts de l'agriculture. Sédentarisation et donc concentration des populations, déforestation, mise en place de méthodes d'irrigation, etc., tous ces facteurs ont contribué à créer de nouvelles niches de prolifération pour les moustiques, facilitant ainsi la transmission de la maladie (Waters, Higginst, and Mccutchan 1991; Perry 2014). Les moustiques se sont ensuite adaptés aux changements de mode de vie des humains, notamment à l'urbanisation et à la pollution des villes. L'adaptabilité des Anophèles capables de transmettre le paludisme, notamment les espèces très anthropophiles *Anopheles gambiae* et *funestus*, a contribué à accroître leur efficacité vectorielle (Saïssy 2001; Tannous and Ghanem 2018). Le cours du paludisme est dicté par l'immunité des hôtes intermédiaires et définitifs de *Plasmodium*. Le système immunitaire des moustiques travaille ainsi de concert avec leur microbiote intestinal pour contrer le développement des oocystes de *Plasmodium* (Crompton et al. 2014; Smith et al. 2016). Dans cette partie, nous allons nous focaliser sur la pathogénèse du paludisme chez l'Homme afin de comprendre son impact sur les populations qu'il affecte ; environ 3 milliards de personnes sont à risque de contracter la maladie et 216 millions de cas ayant engendré environ ½ million de morts ont été répertoriés dans le monde en 2016 (WHO 2017c).

a. Le paludisme à *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum est considéré par certains scientifiques comme le Voldemort de tous les parasites (Seydel et al. 2015). La majorité (90%) des accès palustres qu'il provoque ont lieu en Afrique, où il sévit tout particulièrement (Figure 9). Il est responsable de la majorité des décès dus à la malaria, dont 91% sont des Africains (principalement des enfants de moins de cinq ans) (WHO 2017c).

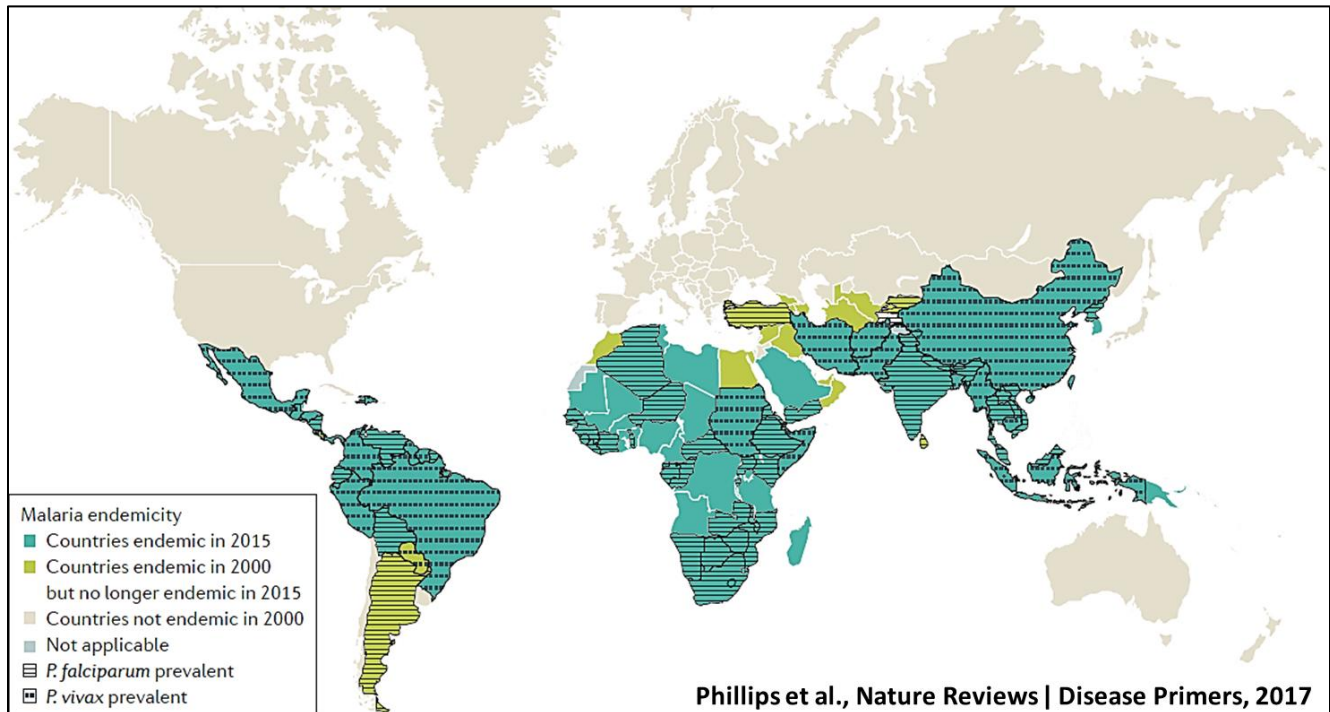


Figure 9 : Répartition géographique de *P.falciparum* et *P. vivax* et endémicité du paludisme selon les régions du monde

Pathogénèse

La physiopathologie du paludisme à *P. falciparum* est directement liée à la manière dont il se développe au sein de son hôte intermédiaire. La phase hépatique est asymptomatique, notamment en raison du faible nombre de sporozoïtes qui sont injectés, mais aussi des stratagèmes qu'ils déploient pour tromper le système immunitaire (variabilité génétique des protéines de surface, utilisation de la membrane de l'hépatocyte infecté pour transporter les mérozoïtes - (Vaughan and Kappe 2017; Tannous and Ghanem 2018)).

Au contraire, la phase de développement intra-érythrocytaire permet l'accroissement rapide de la parasitémie. En effet, les stades sanguins se développent de manière parfaitement synchronisée, ce qui fait qu'à chaque fin de cycle intra-érythrocytaire, toutes les hématies infectées sont lysées en même temps pour libérer les mérozoïtes. Le système immunitaire contient l'infection tant que la parasitémie reste en-dessous de 0,5-1% (Crompton et al. 2014; Gazzinelli et al. 2014; Weiss, Crabb, and Gilson 2016). Puis, la parasitémie augmente de manière exponentielle. Le système immunitaire est alors rapidement débordé par l'augmentation fulgurante du nombre de parasites. Cela se traduit par le déclenchement d'un accès de fièvre à chaque fin de cycle intra-érythrocytaire (Figure 10 - (Gazzinelli et al. 2014)).

En plus de sa capacité à se développer rapidement, *P. falciparum* exprime des protéines qu'il exporte à la surface des érythrocytes qu'il parasite : les différents variants de PfEMP1 (Erythrocyte Membrane Protein 1) qui sont encodés par les 60 gènes de la famille *var*. Leur capacité à interagir avec des récepteurs situés à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins permet aux hématies d'adhérer à l'endothélium des vaisseaux sanguins, et, dans le cas des formes sévères de la pathologie, dans les capillaires sanguins du cerveau et du placenta (L. H. Miller et al. 2002). En fonction des récepteurs avec lesquels les protéines PfEMP1 interagissent, les érythrocytes infectés peuvent également se lier aux érythrocytes sains (phénomène de 'rosetting'), formant alors des bouchons dans les vaisseaux sanguins impactés (L. H. Miller et al. 2002; Gallego-Delgado and Rodriguez 2017). Enfin, la séquestration d'érythrocytes infectés dans la rate active les macrophages qui y résident. En conséquence, une inflammation systémique est déclenchée et peut également perturber la perméabilité de l'endothélium des vaisseaux sanguins et de la barrière hémato-encéphalique (Figure 10 - (Barber, Grigg, et al. 2017; Gallego-Delgado and Rodriguez 2017)).

Symptômes et manifestations graves de la pathologie (résumés en figure 10)

En l'absence de prise en charge, l'état du patient s'aggrave rapidement (Saïssy 2001; Gazzinelli et al. 2014) :

1. **Anémie** : en raison de la lyse d'un nombre croissant d'érythrocytes post-infection et de la complétion du cycle de développement intra-érythrocytaire du parasite (se manifeste par de la pâleur, une grande faiblesse voire de la léthargie, risque d'hypovolémie et d'hypotension artérielle).
2. **Inflammation systémique** : elle se manifeste par de la fièvre, une tachycardie, l'accroissement du rythme respiratoire voire une détresse respiratoire, de l'hyperlactatémie et, parfois, des troubles mentaux.
3. **Acidose métabolique** : elle résulte de l'incapacité de l'organisme à éliminer l'acide lactique produit pour compenser le manque d'oxygène (qui se manifeste par des céphalées, des vomissements, des troubles mentaux, traduisant l'hypoxie cérébrale) et engendre de l'hyperventilation, des douleurs et de la faiblesse musculaire.
4. **Paludisme cérébral** : dans les régions hautement endémiques, il affecte 1% des enfants de moins de cinq ans infectés par *P. falciparum* et dont l'immunité antipaludique n'est pas encore développée

(Luzolo and Ngoyi 2019). Dans les régions peu endémiques, toutes les tranches d'âge peuvent développer du paludisme cérébral (Milner 2018). Il est lié aux variants de PfEMP1 que *P. falciparum* exporte à la surface des hématies qu'il parasite et à la capacité de ces derniers à se lier aux récepteurs endothéliaux ICAM-1 et EPCR, abondants dans le cerveau, ou exclusivement aux récepteurs CD36 qui sont ubiquitaires (Tuikue Ndam et al. 2017). L'on ne sait cependant pas quels facteurs poussent le parasite à exprimer un variant de PfEMP1 plutôt qu'un autre. L'adhérence des hématies infectées dans les capillaires cérébraux entraînent une hypoxie locale et peut favoriser la survenue d'hémorragies cérébrales si l'endothélium est fragilisé par l'inflammation systémique décrite plus haut - (Gallego-Delgado and Rodriguez 2017). Un gonflement général de l'encéphale pouvant engendrer des pertes de conscience, voire un coma, a également été répertorié (Seydel et al. 2015). Environ 15 à 20% des enfants atteints de paludisme cérébral décèdent, 25% en réchappent avec des séquelles neurologiques (troubles cognitifs, moteurs et/ou de concentration et d'apprentissage) et les autres s'en sortent indemnes (Gallego-Delgado and Rodriguez 2017).

5. **Paludisme placentaire :** de manière similaire à ce qui a été décrit plus haut pour le paludisme cérébral, les érythrocytes infectés par *P. falciparum* peuvent présenter à leur surface certains variants de PfEMP1 capables de lier la CSA (Chondroitin Sulphate protein), récepteur abondant dans le placenta (Milner 2018). Les femmes primipares, dont l'immunité est modifiée pour la première fois en raison de leur grossesse, sont particulièrement à risque de développer un paludisme placentaire. La séquestration d'hématies infectées dans le placenta et l'anémie de la mère accroissent le risque d'hypoxie fœtale et peuvent affecter la croissance du fœtus, voire engendrer des fausses couches. Le paludisme placentaire était ainsi responsable de 20% des fausses couches en Afrique Subsaharienne en 2016. Le décès du nouveau-né en cas de malaria congénitale (100.000 morts en 2007, soit 11% des décès de nouveau-nés en Afrique Sub-saharienne) ou le décès de la mère par hémorragie post-partum (10.000 morts par an en 2001) sont loin d'être rares (Rogerson et al. 2007; CDC 2017). L'environnement socio-économique de la mère est directement lié à l'incidence du paludisme, et, donc, au risque de développer une forme placentaire de la maladie au cours d'une grossesse (Williams et al. 2016).

Populations à risque

En plus des jeunes enfants et des femmes primipares, les voyageurs provenant de régions non affectées par le paludisme à *P. falciparum*, ou où sévissent des espèces voire des souches de *Plasmodium* différentes, sont également une population à risque, car ils ne possèdent pas de protection immunitaire contre l'infection (Trampuz et al. 2003). En fonction de la durée de leur séjour dans une région endémique, ils sont susceptibles de contracter le paludisme sur place et/ou de ne présenter les symptômes qu'à leur retour (paludisme dit d'importation – environ 5000 cas sont répertoriés en France chaque année (Camus and Chidiac 2018)). Ils doivent prendre des précautions particulières pour se protéger contre les moustiques et contre *Plasmodium* (partie II.4).

Dans les régions hautement endémiques, la coévolution entre *Plasmodium* et les populations qu'il a côtoyées au fil des siècles a engendré une sélection de traits relativement protecteurs contre le paludisme (Hémoglobine S par exemple) et qui sont principalement répandus dans les régions où sévit *P. falciparum* (Egan 2018). Quel que soit cependant le génotype des populations vivant dans ces régions, l'exposition répétée aux infections permet la mise en place d'une protection immunitaire. Ainsi, les enfants de moins

de 6 mois sont protégés un temps par l'immunité maternelle. Par la suite, les infections répétées, si elles sont prises en charge correctement et que les enfants en réchappent, contribuent à leur forger une protection immunitaire qui les protégera des formes graves de la pathologie, tel que le paludisme cérébral. De même, les femmes vivant dans des régions hautement endémiques développent une forme de protection immunitaire contre le paludisme placentaire au bout d'une à deux grossesses (*Crompton et al. 2014; Phillips et al. 2017*). Cette protection est néanmoins à double tranchant car elle favorise la sélection de populations parasitaires capables d'effectuer des infections chroniques asymptomatiques, c'est-à-dire où la parasitémie est maîtrisée et parfois indétectable, faisant de ces personnes des réservoirs de transmission pour le parasite (*Deitsch 2017*).

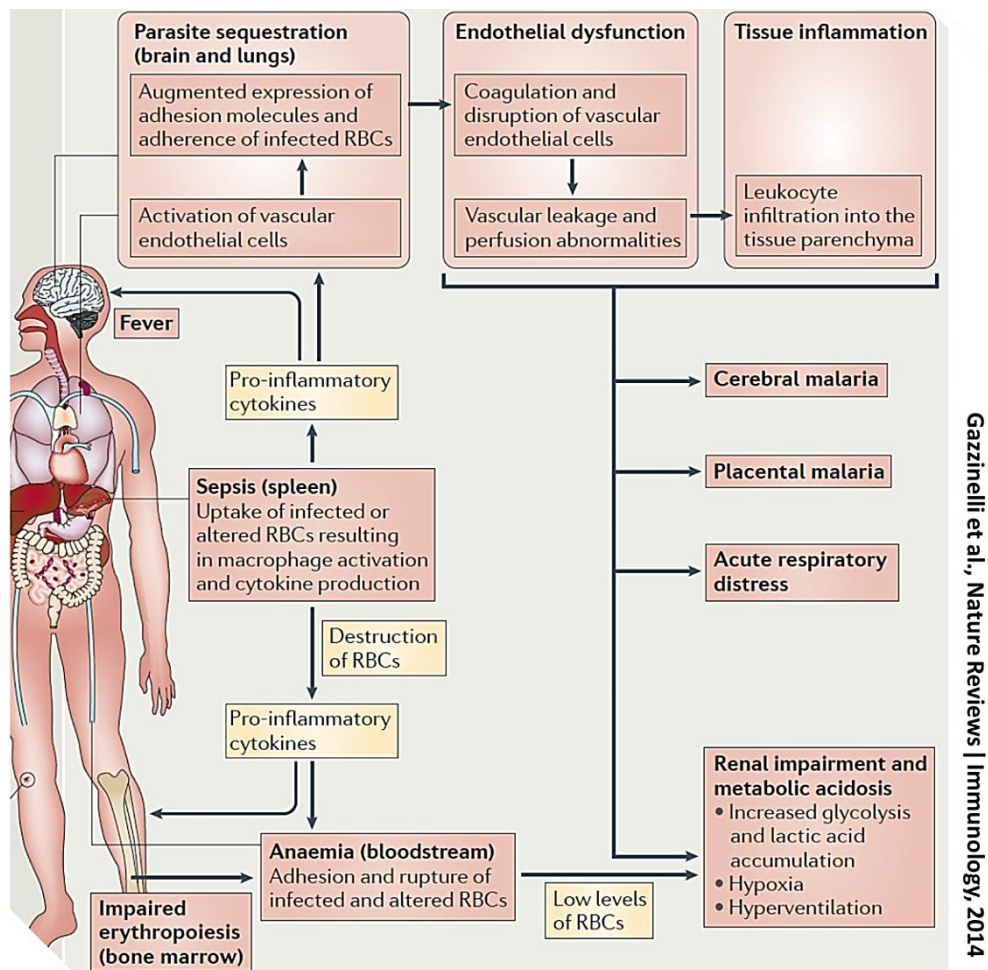


Figure 10 : Schéma résumant les processus à l'origine des formes sévères de paludisme à *P. falciparum*

b. Un paludisme ou des paludismes ?

La majorité des travaux de recherche se focalisent sur *P. falciparum* en raison de la gravité, voire de la létalité, des accès palustres qu'il provoque. Il ne faut cependant pas négliger l'impact des autres espèces de *Plasmodium* dont les cycles de vie présentent chacun des particularités et, donc, des défis spécifiques à relever dans la course à l'éradication de la malaria (Lover et al. 2018).

Plasmodium vivax est l'espèce de *Plasmodium* la plus répandue, et donc, la première cause de paludisme en-dehors d'Afrique (Adams and Mueller 2017). Elle est présente en Asie du Sud-Est, en Amérique Centrale et du Sud, en Océanie et dans quelques foyers en Afrique de l'Est et sub-saharienne (Figure 9). La biologie de cette espèce présente plusieurs singularités (Adams and Mueller 2017; E. Meibalan and Marti 2017; Lover et al. 2018; Milner 2018) :

- ◆ Certains sporozoïtes peuvent donner des hypnozoïtes, des stades restant en dormance dans les hépatocytes. Les hypnozoïtes sont à l'origine de résurgences (qui sont responsables de 80% des cas de paludisme à *P. vivax*).
- ◆ Les mérozoïtes envahissent préférentiellement les réticulocytes, donc la parasitémie est généralement faible ; *P. vivax* persiste à des parasitémies submicroscopiques (67% des cas), soit bien en-deçà des autres espèces de *Plasmodium*. *P. vivax* est cependant responsable de 14 à 80 millions de cas de paludisme chaque année. Ces cas ne sont généralement pas fatals, mais si le système immunitaire de l'hôte est affaibli, l'infection peut engendrer des accès fébriles, une anémie sévère, puis mener à une détresse respiratoire, des problèmes rénaux et hépatiques voire des états de choc. Des cas de fausses couches ont également été répertoriés chez des femmes enceintes atteintes de paludisme à *P. vivax*.
- ◆ La pathogénèse de *P. vivax* est encore peu connue. Néanmoins, à l'instar de *P. falciparum* et de ses gènes *var*, *P. vivax* possède une famille multigénique *vir* qui pourrait jouer un rôle dans la variabilité des protéines de surface des hématies parasitées, voire dans leur cytoadhérence et, donc, engendrer un accès palustre sévère (Bernabeu et al. 2012).
- ◆ L'expression des gamétocytes peut démarrer une semaine après inoculation de sporozoïtes, ce qui fait qu'une personne infectée peut être infectieuse avant de (ou sans) déclarer la pathologie. De plus, le taux d'infection des moustiques par *P. vivax* est élevé et la durée de son développement chez son hôte définitif est plus courte que les autres espèces de *Plasmodium*. *P. vivax* est ainsi transmissible très rapidement, et peut ainsi persister dans des régions qui sont inhospitalières à *P. falciparum*.

Bien que plus discrète que *P. falciparum*, avec laquelle elle peut co-infecter des humains, l'espèce *P. vivax* présente d'excellentes capacités de persistance et de transmission à des parasitémies particulièrement faibles. Sa culture *in vitro* est particulièrement fastidieuse, ce qui complexifie d'avantage son étude (White et al. 2018).

Les espèces sympatriques *P. ovale wallikeri* et *curtisi* sont peu étudiées. Il est donc difficile d'avoir des informations sur les cas de paludisme qu'elles engendrent (impact clinique, pathogénèse) ou les traitements appropriés (en l'absence d'études dédiées et d'informations sur les potentielles résistances, les combinaisons thérapeutiques préconisées pour *P. falciparum* et *P. vivax* sont utilisées pour les cas de malaria à *P. ovale*). Les espèces *P. ovale* sont présentes en Afrique sub-saharienne et en Asie du Sud-Est (aucune donnée disponible en Amérique). Les cas de paludisme à *P. ovale* sont généralement bénins, bien que des cas sévères aient également été répertoriés chez une minorité de patients (anémie sévère, détresse

respiratoire sévère, paludisme congénital, décès). Comme *P. vivax*, *P. ovale* est capable de former des hypnozoïtes dans le foie ; ces derniers ne semblent par ailleurs pas toujours sensibles à la primaquine, molécule utilisée pour empêcher les cas de résurgence chez *P. vivax* (voir partie II.4). Toutes ces données ne sont cependant issues que de l'étude d'un nombre réduit de cas de malaria à *P. ovale* et mériteraient d'être étayées afin de mieux cerner les défis que représente l'éradication de ces deux espèces (Groger *et al.* 2017).

Plasmodium malariae est présent en Afrique, en Asie du Sud-Est, en Amérique du Sud et en Océanie (climats tropicaux). Cette espèce présente toutes les caractéristiques nécessaires à la mise en place d'infections chroniques. En effet, les phases de son cycle de développement sont les plus longues de toutes les espèces de *Plasmodium* capables d'infecter l'Homme : phase hépatique de 3 semaines, cycle intra-érythrocytaire de 72 heures, avec production de 6 à 14 mérozoïtes par schizonte quand les autres espèces en produisent en moyenne 16, phase de développement des oocystes de 2 à 3 semaines. *P. malariae* est ainsi responsable des fièvres quartes évoquées par Hippocrate dans l'Antiquité (W. E. Collins and Jeffery 2007; Milner 2018). Il est souvent co-infectant avec *P. falciparum* ou *P. ovale* mais demeure particulièrement discret (la parasitémie résultant du cycle intra-érythrocytaire de *P. malariae* atteint maximum 1,3% en 2 semaines et peut rester stable pendant 2 mois (W. E. Collins and Jeffery 2007)). La plupart du temps, les personnes infectées ne présentent aucun signe clinique et il est parfois nécessaire d'utiliser des techniques de biologie moléculaire pour détecter *P. malariae*. Les infections chroniques que cette espèce engendre peuvent durer des décennies, faciliter une rechute de la pathologie jusqu'à 20 ans après infection mais aussi engendrer des problèmes rénaux sévères (dus au dépôt de complexes immuns dans les néphrons) (da Silva Junior *et al.* 2017; Milner 2018).

Plasmodium knowlesi est la principale cause de paludisme en Malaisie (plus d'un million de cas de paludisme y ont été reportés en 2015) (Barber, Rajahram, *et al.* 2017). *P. knowlesi* infecte naturellement les singes (la sévérité de l'infection est variable d'une espèce simienne à une autre) et l'on ne sait pas encore clairement comment cette espèce est transmise entre singes et humains (Butcher and Mitchell 2016). Souvent confondue avec *P. falciparum* ou *P. vivax* sur le plan morphologique, *P. knowlesi* se distingue par la durée de son cycle intra-érythrocytaire : 24 heures (Barber, Rajahram, *et al.* 2017). Il semble que, chez l'humain, l'infection à *P. knowlesi* soit contenue par le système immunitaire et soit la plupart du temps asymptomatique (Butcher and Mitchell 2016; Barber, Grigg, *et al.* 2017). En revanche, de manière similaire à l'infection à *P. falciparum* chez les adultes dans les régions peu endémiques, la pathogénèse du paludisme à *P. knowlesi* semble liée à une réponse immunitaire exagérée qui se traduit, dans un premier temps, par des accès fébriles (Milner 2018). De plus, la présence chronique de *P. knowlesi* peut altérer les fonctions de microcirculation des personnes infectées (Barber, Grigg, *et al.* 2017). Tous ces paramètres peuvent contribuer à l'aggravation des cas de paludisme à *P. knowlesi* (anémie sévère, hypotension, détresse respiratoire, problèmes rénaux ou hépatiques sévères) voire à l'apparition de co-infections, bactériennes par exemple (Milner 2018). De manière préoccupante, les cas de paludisme à *P. knowlesi* mènent à des complications fatales dans 8% des cas, contre 3% pour *P. falciparum* ou *P. vivax*, sans compter que le génome de *P. knowlesi* encode 200 gènes *var*, ce qui pourrait faciliter la mise en place de nombreuses stratégies d'échappement du système immunitaire de ses hôtes (Milner 2018).

4. La lutte antipaludique

La lutte antipaludique comprend plusieurs versants : prévenir la pathologie en protégeant l'humain des piqûres de moustiques et de l'infection par le parasite, d'une part, et si la pathologie se déclare, la diagnostiquer correctement pour prendre le patient en charge de la manière la plus adaptée possible.

a. Mesures de protection contre les piqûres de moustiques

Le moyen à priori le plus simple de ne pas contracter le paludisme est de se protéger des piqûres de moustiques, à fortiori des piqûres d'Anophèles femelles infectieuses. Les divers dispositifs de protection contre les piqûres de moustiques utilisés actuellement sont résumés dans le [Tableau 1](#). Le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) n'est plus utilisé aujourd'hui en raison de son coût, de son impact environnemental, de sa toxicité et du fait que les moustiques ont développé des résistances à cet insecticide massivement utilisé au XX^{ème} siècle (*Phillips et al. 2017*).

Tableau 1 : Présentation des divers dispositifs utilisés pour se protéger des moustiques vecteurs du paludisme

Dispositif anti-moustique	Efficacité relative
Moustiquaires imprégnées d'insecticide (pyréthroïdes)	Ont contribué à réduire l'incidence de la pathologie de 69% dans le monde – Efficacité = ++++
Moustiquaires grillagées aux fenêtres et aux portes	Efficacité = +++
Pulvérisation d'insecticides à l'intérieur des habitations (organophosphorés, organochlorés, carbamates, pyréthroïdes)	Ont contribué à réduire l'incidence de la pathologie de 10% dans le monde – Efficacité = ++
Utilisation de larvicides (organophosphorés, organochlorés, carbamates, pyréthroïdes)	Aucune donnée sur l'efficacité de l'utilisation de ces produits
Utilisation de répulsifs cutanés (DEET, IR3535, Icaradine)	Efficacité = +++
Pulvérisation de « bombes » insecticides ou utilisation de « serpentins » en intérieur (pyréthroïdes) ou en extérieur (organophosphorés, pyréthroïdes)	Efficacité = +
Désinsectisation des avions au départ d'un pays où le paludisme est endémique (pyréthroïdes)	Aucune donnée sur l'efficacité de l'utilisation de ces produits
Sources : (<i>WHO 2017b; WHO-VCAG 2017; Phillips et al. 2017; Benelli and Beier 2017</i>)	

Ces dispositifs de contrôle des vecteurs du paludisme doivent être utilisés de manière complémentaire avec de la chimioprophylaxie pour les voyageurs non immuns se rendant dans une région hautement endémique (voir partie 4.d). Les défis actuels concernant le contrôle des vecteurs du paludisme seront abordés en partie 4.e.

b. Vaccins

Ainsi que cela a été évoqué en partie II.3.a de ce manuscrit, les personnes vivant dans des régions hautement endémiques développent une protection immunitaire au fil des infections répétées qui les protège contre les formes sévères du paludisme. Dans l'idéal, un vaccin antipaludique efficace agirait contre *P. vivax* et *P. falciparum* et permettrait de protéger aussi bien les jeunes enfants vivant dans des zones hautement endémiques et n'ayant pas encore développé d'immunité contre l'infection, que des personnes de toutes les tranches d'âge vivant dans des régions peu endémiques ou des régions où le paludisme est en cours d'éradication (Phillips et al. 2017).

Différentes stratégies vaccinales ont été envisagées afin de cibler différentes phases du cycle de vie de *Plasmodium*. Les stratégies vaccinales visant *P. falciparum* sont résumées dans le Tableau 2. Il n'existe pas de vaccin efficace à l'heure actuelle contre le paludisme mais plusieurs sont en développement (pipeline sur la Figure 11). L'objectif est d'obtenir d'un vaccin conférant une protection de 2 ans avec une efficacité de 75% d'ici 2030, quitte à combiner plusieurs stratégies (Draper et al. 2018).

Tableau 2 : Présentation de différentes stratégies vaccinales anti-*Plasmodium falciparum*

Type de vaccin	Observations
Vaccins ciblant les sporozoïtes et les stades hépatiques	
Vaccins contre des sous-unités des sporozoïtes	Le vaccin le plus connu de cette catégorie est le RTS,S/AS01. Il est basé sur l'injection de 18 copies des régions centrale et C-terminale de la CSP (Circumsporozoïte Protein), protéine de surface majeure des sporozoïtes, fusionnées à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B. Il confère une protection âge-dépendante (surtout aux enfants de 5 à 17 mois – 3 doses à 1 mois d'intervalle) de 51% la 1^{ère} année, 26% la 2^{ème} année et 39% la 4^{ème} année si une 4^{ème} dose est administrée 15 à 18 mois après la 3^{ème}. Ce vaccin vient de passer la 3^{ème} phase clinique de son développement et va être expérimenté au Ghana, au Malawi et au Kenya dans un premier temps.
Vaccins contre des sporozoïtes entiers	Diverses stratégies sont utilisées pour générer des sporozoïtes atténués incapables de se développer dans les hépatocytes : - RAS = Radiation-Attenuated Sporozoïtes – exemple avec le vaccin <i>PfSPZ</i> – meilleure protection si les RAS sont injectés en intraveineux. - GAP = Genetically Attenuated Parasites – un gène important pour le développement dans les hépatocytes est muté → arrêt de la phase intra-hépatique. Une troisième stratégie consiste à injecter des sporozoïtes de concert avec une molécule antipaludique (chloroquine par exemple). Cette technique est efficace jusqu'à deux ans après immunisation (67% d'efficacité) mais ne protège pas contre des souches autres que celle injectée.
Vaccins contre des sous-unités des stades hépatiques	Ces vaccins recombinants sont vectorisés par des virus incapables de se répliquer (comme l'Adénovirus sérotype 63 de chimpanzé – ChAd63). Leur but est de favoriser la détection et l'élimination des hépatocytes infectés.

Vaccins ciblant les stades sanguins	
Vaccins contre l'invasion des hématies	Ces vaccins ont été conçus dans le but d'engendrer une réponse immunitaire contre diverses protéines situées à la surface des mérozoïtes ou impliquées dans le processus d'invasion des hématies (RHP5, AMA1, RON2, etc.). La limite de ce système : il est impossible de lutter contre les polymorphismes génétiques ou les cocktails alléliques d'AMA1, entre autres.
Vaccins pour la prévention du paludisme placentaire	<u>Exemple de PAMVAC :</u> Il est basé sur l'injection d'un fragment recombinant de la protéine <i>PfVAR2CSA</i> et d'un adjuvant. <i>PfVAR2CSA</i> est exportée par <i>P. falciparum</i> à la surface de son hématie hôte et lie le récepteur placentaire CSA. Il a récemment passé la phase I de son essai clinique avec succès. Il va donc être injecté à des femmes vivant en région endémique, avant leur première grossesse, afin d'évaluer sa capacité de prévention du paludisme placentaire.
Vaccins bloquant la transmission	
Ces vaccins sont dits « altruistes » car ils ne protègent pas directement les personnes vaccinées. Le fait qu'ils gênent le développement de <i>Plasmodium</i> dans l'estomac du moustique, empêchant le moustique infecté de devenir infectieux, protège plutôt les membres de la communauté du sujet vacciné.	
Vaccins dirigés contre les stades sexués et/ou les ookinètes de <i>Plasmodium</i>	Le but de ces vaccins est de générer une production d'anticorps dirigés contre les protéines suivantes : - <i>Pfs25</i> est une protéine de surface des ookinètes - <i>Pfs48/45</i> et <i>Pfs230</i> qui sont des antigènes des gamétocytes - <i>Pfs47</i>, protéine impliquée dans l'échappement du système immunitaire de l'estomac du moustique, et <i>PfHAP2</i>, exprimée chez le gamète mâle, ou microgamète, et qui joue un rôle essentiel dans la fusion des membranes des deux gamètes au cours de la fécondation.
Vaccin dirigé contre une protéine de l'estomac de l'Anophèle	<u>Exemple de l'ANAPN1 :</u> Le but est de générer une production d'anticorps dirigés contre l'Alanyl Aminopeptidase d'<i>Anopheles</i> (<i>AnAPN1</i>). Une fois dans l'estomac du moustique, ces anticorps sont susceptibles d'empêcher une Perforin-like de <i>Plasmodium</i> d'interagir avec <i>AnAPN1</i> pour créer un pore dans la paroi de l'estomac du moustique, permettant à l'ookinète de poursuivre son développement dans la lamina basale de l'estomac de l'arthropode.
Sources : (RTS S Clinical Trials 2015; Atkinson et al. 2015; Malaria Vaccine Initiative, n.d.; WHO 2018b; Dimala et al. 2018; Draper et al. 2018; Mordmüller et al. 2019)	

Par ailleurs, deux vaccins dirigés contre des régions de la CSP de *P. vivax* entrent en étude clinique. Si les premiers vaccins bloquant la transmission étaient destinés à cibler le cycle de vie de *P. vivax*, la recherche

vaccinale concernant cette espèce est complexe car l'on commence seulement à comprendre les stratégies d'échappement qu'elle met en place vis-à-vis du système immunitaire de ses hôtes (Draper et al. 2018).

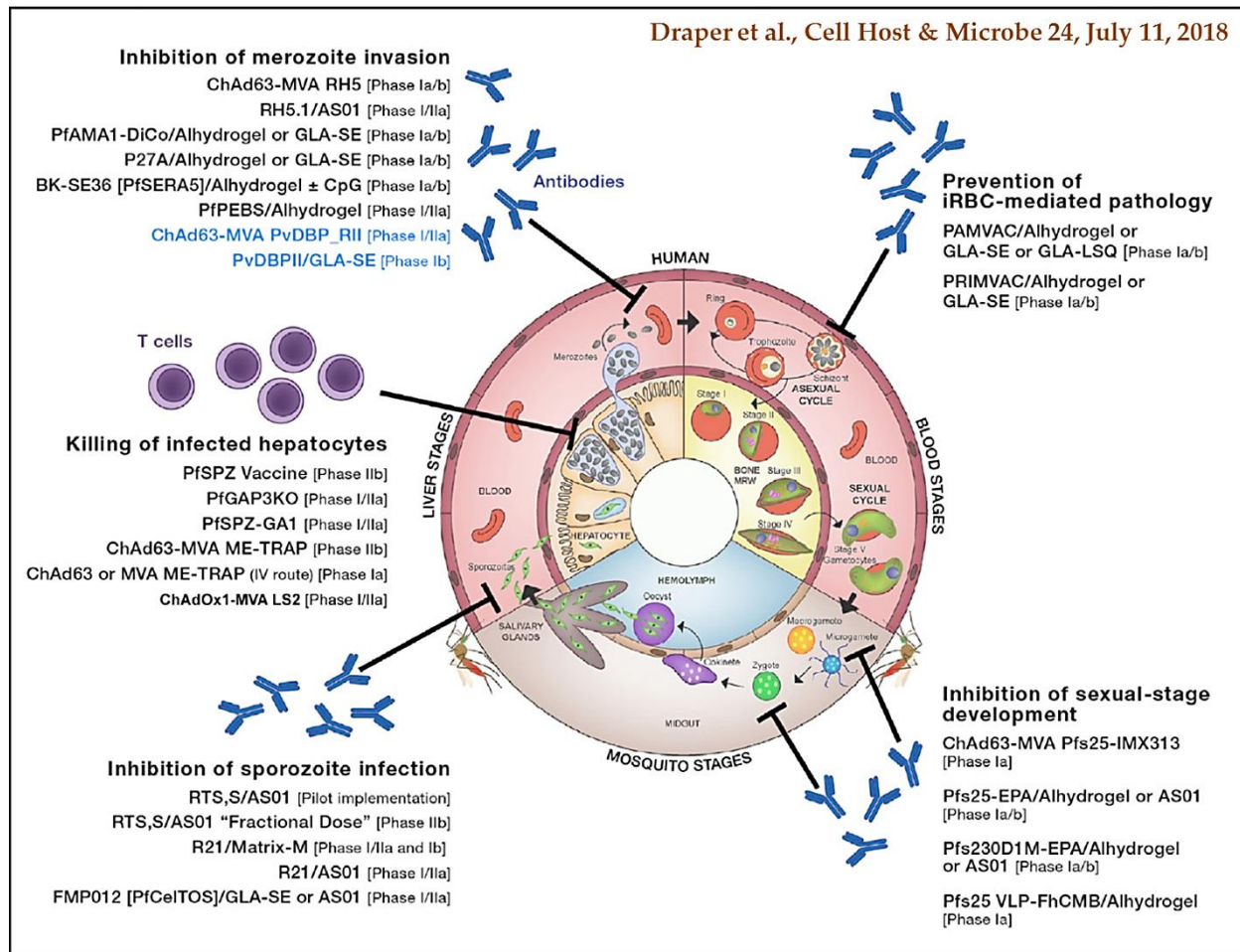


Figure 11 : Présentation du pipeline des vaccins antipaludiques en cours d'étude clinique et des stades ciblés par chacun d'entre eux (les vaccins dont le nom apparaît en bleu sont ceux ciblant des stades de *P. vivax*, les autres ciblent tous différents stades de *P. falciparum*)

c. Diagnostic du paludisme

Le diagnostic du paludisme (c'est-à-dire l'estimation de la parasitémie et l'identification de(s) espèce(s) de *Plasmodium* infectante(s)) est à effectuer dès qu'un accès de fièvre survient, notamment dans ou au retour d'une région hautement endémique pour le paludisme. Sa fiabilité est critique car elle va conditionner la prise en charge thérapeutique du patient. Les techniques de diagnostic du paludisme utilisées actuellement sont résumées dans le [Tableau 3](#).

Tableau 3 : Présentation des outils de diagnostic utilisés actuellement pour diagnostiquer le paludisme

	Techniques de diagnostic	Avantages	Inconvénients
MICROSCOPIE	Frottis sanguin (étalement d'une goutte de sang sur une lame suivi d'une coloration au Giemsa)	- Identification de l'espèce de <i>Plasmodium</i> - Estimation de la parasitémie	- Besoin d'un microscopiste expert pour identifier les espèces de <i>Plasmodium</i> et pour estimer la parasitémie de manière fiable
	Goutte épaisse (concentration des hématies d'une goutte de sang à l'aide d'une lame puis coloration au Giemsa)	- Détection des parasites - 10 fois plus sensible que le frottis sanguin - Seuil de détection = 5 parasites/μl de sang	- Impossible d'identifier les espèces de <i>Plasmodium</i> infectantes
	Quantitative Buffer Coat (QBC) (coloration de l'ADN des parasites à l'aide d'acridine orange)	- Détection des parasites - 5,5% plus sensible que la goutte épaisse	- Impossible d'identifier les espèces de <i>Plasmodium</i> infectantes
TDR	Tests de Diagnostic Rapide (basés sur la reconnaissance d'antigènes du parasite - HRP2, LDH – Sensibilité comparable aux techniques de microscopie)	- Pas besoin d'un microscopiste expert - Utilisable facilement pour effectuer un suivi épidémiologique - Facile à utiliser sur le terrain	- Limité à certaines espèces (<i>P. falciparum</i>, <i>P. vivax</i>) - Problèmes de faux négatifs (si les parasites arrêtent d'exprimer la protéine utilisée comme antigène) - Détection des antigènes de manière très variable après traitement antipaludique (20 à 60 jours)
PCR	Techniques de biologie moléculaire (PCR, nested PCR, qPCR)	- Très sensible (détection de 0,02 parasite/μL) - Identification de(s) espèce(s) infectante(s)	- Difficile à utiliser sur le terrain (matériel coûteux, expertise nécessaire pour effectuer les PCR et analyser les résultats obtenus)
Sources : (Phillips et al. 2017; Dalrymple et al. 2018; Amir et al. 2018)			

Deux techniques d'évaluation de la parasitémie basées sur l'utilisation de la microscopie ont également été mises au point ces dernières années :

- **Partec Rapid Malaria Test (Partec CyScope®)** : Les frottis sanguins sont effectués sur des lames recouvertes de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, marque l'ADN) puis examinées à l'aide d'un microscope équipé d'une ampoule à UV qui permet de faciliter la détection des noyaux des parasites. La sensibilité de ce microscope est proche des autres techniques de microscopie indiquées ci-dessus. Le microscope est équipé de batteries rechargeables permettant de le transporter et de l'utiliser facilement sur le terrain (*Amir et al. 2018*).
- **xRapid** : l'intelligence artificielle (IA) s'invite dans le diagnostic du paludisme. Ce dispositif de diagnostic inclut un microscope (pouvant être automatisé et/ou portable) et un smartphone dont l'objectif de l'appareil photo est placé au-dessus de celui du microscope. Les buts de l'application xRapid sont les suivants : évaluer la parasitémie sur des frottis sanguins et des gouttes épaisses avec fiabilité (l'IA permettant à l'application d'acquérir une certaine « expérience » dans la lecture des lames) et rapidité (une lame peut être examinée en 100 secondes). Cette solution est plutôt adaptée au terrain, notamment dans les laboratoires où il y a un grand nombre de diagnostics à effectuer chaque jour (<http://www.xrapid-group.com/>).

Des techniques de diagnostic innovantes, notamment parce qu'elles sont non invasives, tirent parti des dernières avancées, en matière de relations hôte-pathogène notamment, et se veulent rapides et précises, ont récemment été mises au point :

- **Saliva-based rapid test** : ce test est basé sur la détection d'une protéine marqueur des gamétocytes femelles (PSSP17) présente dans la salive des personnes ayant des gamétocytes circulants à des taux submicroscopiques. La protéine est détectée via un anticorps spécifique et un système de révélation fluorescent permet la lecture du résultat du test ; il tient ainsi compte des réalités du terrain (besoin d'un test fiable, facile à conserver et à utiliser et donnant un résultat rapide et facile à analyser). La sensibilité de ce test a été évaluée à 90% par rapport à des techniques d'évaluation de la gamétocytemie par PCR (seuil de détection : 0,7 gamétocytes par μL de sang). Ce dispositif pourrait permettre de faciliter le suivi des réservoirs de la transmission parasitaire (personnes porteuses mais ne déclarant pas la maladie), notamment dans les régions où le paludisme est en cours d'élimination (*Tao et al. 2019*).
- **Sniff & Tell** : des chiens renifleurs spécialement dressés sont capables de détecter des enfants infectés par le paludisme simplement en reniflant des chaussettes qu'ils ont portées (*Figure 12*). La fiabilité de la truffe des canins enrôlés dans cette étude était de 70% (*Kasstan et al. 2019*). Bien que les chiens apparaissent comme effrayants dans les pays africains où les risques de rage sont toujours présents, le meilleur ami de l'Homme pourrait peut-être contribuer à la lutte anti-malarique.



Figure 12 : Chien renifleur en plein test 'Sniff & Tell'
Source = ScienceDaily®

d. Chimio prophylaxie et prise en charge thérapeutique du paludisme

Quatre familles de molécules sont utilisées contre différents stades de développement (i.e. stades sanguins, gamétocytes, hypnozoïtes) des six espèces de *Plasmodium* responsables de la majorité des accès palustres. Ces familles de molécules sont présentées dans le [Tableau 4](#).

Tableau 4 : Présentation des familles de molécules utilisées en chimio prophylaxie et en chimiothérapie du paludisme (adapté de (Antony and Parija 2016)).

Famille de molécules	Famille chimique	Nom des molécules (demi-vie)	Mécanisme d'action	Utilisation
Dérivés de la quinoline	4-aminoquinolines	Chloroquine (41±14 j.) Amodiaquine (5 h)	S'accumulent dans la vacuole digestive et empêchent la détoxification de l'hème en hémotoïne	Cible les stades intra-érythrocytaires
	Amino-alcools	Quinine (10-12 h) Méfloquine (14-18 j.) Halofantrine (10-90 h) Luméfántrine (3-6 j.)		
	8-aminoquinolines	Primaquine (6 h)	?	Cible les hypnozoïtes et les gamétocytes
	Naphtoquinone	Atovaquone (59 h)	Cible le cytochrome <i>bc1</i> (inhibe la respiration cellulaire du parasite)	Cible les stades intra-érythrocytaires
Dérivés d'antifolates	Sulfa-	Sulfadoxine (100-200 h) Sulfène (65 h)	Inhibition de la synthèse du folate (ciblent la DHPS ou la DHFR)	Cible les stades intra-érythrocytaires
	Pyriméthamine	Pyriméthamine (80-100 h)		
	Proguanil	Proguanil (24 h)		
Dérivés de l'artémisinine	Endopéroxydes	Artésunate (0.5-1.4 h) Artémisinine (2-7 h) Artéméthér (4-11 h)	À priori, production de radicaux libres qui perturbent l'homéostasie du parasite	Utilisés contre les stades sanguins + légèrement les gamétocytes
Antibiotiques	-	Tétracycline (10 h) Doxycycline (16 h) Clindamycine (3 h)	Inhibition de la traduction ou les voies de synthèse des protéines	Utilisés en combinaison avec des dérivés de la quinine contre les stades sanguins

Les molécules présentées ci-dessus sont utilisées en combinaisons thérapeutiques à base d'un dérivé de l'artémisinine (ACT) depuis le début des années 2000 sur recommandation de l'OMS afin de prévenir l'apparition de résistances. Ainsi, pour traiter les cas de paludisme non compliqués et suivant les résistances locales, les combinaisons suivantes sont recommandées (*WHO 2015*) :

- Artéméter + Luméfantrine
- Artésunate + Amodiaquine
- Artésunate + Méfloquine
- Dihydroartémisinine + Pipéraquline
- Artésunate + Sulfadoxine-Pyriméthamine

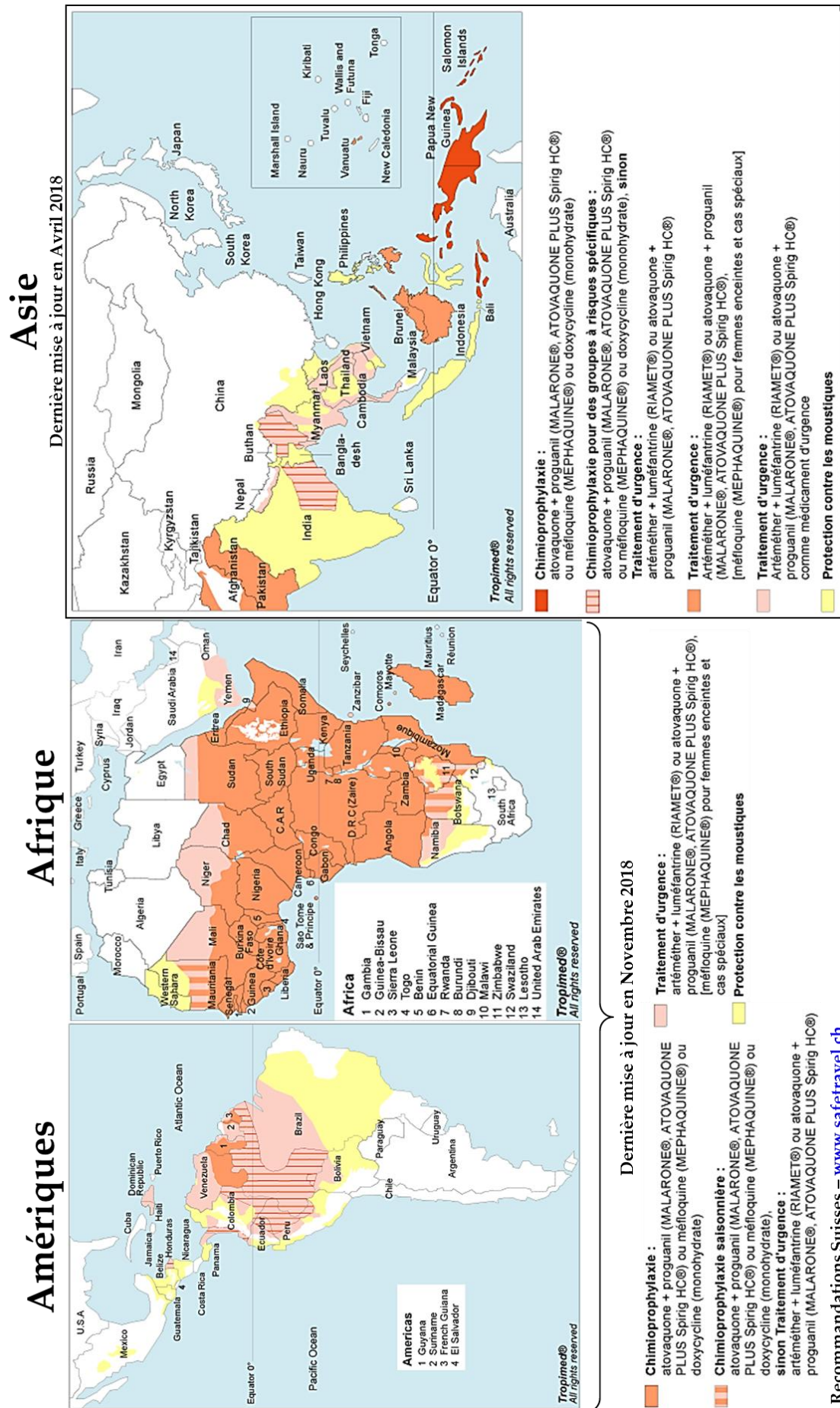
Si le traitement échoue, l'OMS recommande de changer d'ACT et d'éviter les monothérapies. Le traitement est à compléter avec de la Primaquine pour les cas de paludisme à *P. vivax* et *P. ovale* afin de prévenir les rechutes, mais aussi pour le paludisme à *P. falciparum* pour réduire la gamétocythémie, si le patient n'est pas déficient en G6PD (Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase) (*Wampfler et al. 2017*). L'OMS recommande que ces ACTs soient administrés par voie orale pendant 3 jours. En cas de nausées ou de vomissements, l'administration des mêmes molécules par voie parentérale ou rectale est à privilégier dans un premier temps, avant d'administrer le traitement de 3 jours par voie orale. Chez les femmes enceintes, en l'absence d'information sur l'impact potentiel des ACTs au 1^{er} trimestre de la grossesse, la quinine et la clindamycine sont à privilégier (*WHO 2015*).

Pour les cas de paludisme sévère, la prise en charge doit être rapide afin d'éviter les complications et de potentielles séquelles (notamment chez les enfants vivant dans des régions hautement endémiques, la rapidité de la prise en charge peut diviser la probabilité de décès par 10). L'OMS recommande un dérivé de l'Artémisinine (Artésunate ou Artéméter) ou un amino-alcool (Quinine, Quinidine) en intraveineux ou en intramusculaire jusqu'à ce que le patient ne présente plus de nausées. Un traitement de 3 jours à base d'ACTs est ensuite préconisé. Pour les enfants de moins de six ans, une chimioprophylaxie à base d'Amodiaquine + Sulfadoxine-Pyriméthamine est recommandée à chaque saison de transmission. Chez la femme enceinte, le risque d'avoir un accès palustre sévère est plus important aux deuxième et troisième trimestres de la grossesse. La prise en charge doit s'effectuer comme indiqué précédemment sans délai. Une chimioprophylaxie à base de Sulfadoxine-Pyriméthamine est conseillée aux femmes enceintes pour la première ou la deuxième fois (*WHO 2015*).

Les voyageurs non immuns se rendant dans une zone endémique constituent la troisième population à risque de contracter une forme sévère de paludisme. Afin de prévenir les accès palustres, en l'absence d'un vaccin efficace, une chimioprophylaxie est préconisée (en fonction des régions du monde, voir *Figure 13*). S'ils contractent le paludisme, la prise en charge sera la même que celle décrite ci-dessus en fonction de la sévérité de la maladie et de l'état du patient. Tout accès de fièvre au retour d'une région endémique doit être considéré comme un cas de paludisme potentiel (*WHO 2015; Camus and Chidiac 2018*).

Dans tous les cas, il est primordial de prendre en compte les antécédents du patient, les éventuels polymorphismes génétiques pouvant impacter l'assimilation des principes actifs ou des excipients, les autres traitements en cours afin d'éviter les interactions médicamenteuses, etc., le plus vite possible afin d'éviter les formes sévères surtout chez les populations à risque (*WHO 2015*).

Figure 13 : Présentation des molécules à utiliser en chimioprophylaxie pour empêcher les accès palustres en fonction des régions du monde (www.safetravel.ch)



e. Les défis de la lutte antipaludique

Les défis de la lutte antipaludique sont multiples et concernent le contrôle de la transmission de la maladie, la prise en charge efficace des patients et la gestion des réservoirs de transmission (majoritairement des personnes infectieuses mais ne déclarant pas la pathologie).

En matière de transmission, le contrôle des vecteurs de la pathologie est une priorité. Les moustiques développent en effet des résistances aux insecticides utilisés, adaptent leur mode de vie à celui des humains (se mettant à les piquer plus tôt dans la journée s'ils dorment sous moustiquaire la nuit, par exemple) (*Benelli and Beier 2017*). Différentes approches sont en cours d'étude. Elles comprennent la synthèse, la reformulation ou la réutilisation de molécules insecticides, larvicides ou répulsives (*Phillips et al. 2017*). D'autres projets consistent à créer et lâcher des populations d'Anophèles mâles ou femelles génétiquement modifiés (pour altérer leur fertilité, biaiser le ratio mâle/femelle dans les populations vectorielles, ou empêcher le développement de *Plasmodium* dans l'estomac du moustique – <https://targetmalaria.org/>). Ces projets nécessitent par ailleurs un renforcement et une harmonisation des réglementations des pays africains, les vecteurs les plus efficaces se trouvant sur le sol africain (*Glover et al. 2018*). De manière plus générale, l'élaboration puis la mise en place de méthodes de maîtrise des vecteurs du paludisme nécessite une meilleure compréhension de leur écologie : leur comportement, leurs capacités à développer des résistances aux insecticides, leurs capacités d'adaptation, leur biodiversité et leur répartition géographique, les interactions inter-espèces, l'impact des changements environnementaux sur les dynamiques des populations, etc. (*Benelli and Beier 2017; Ogola et al. 2017; Monroe et al. 2019*).

'We call it drug resistance; the malaria parasite calls it surviving!'¹ La résistance aux chimiothérapies est définie par la capacité du parasite à survivre et/ou à effectuer sa réplication malgré l'administration et l'absorption d'un antipaludique dans des doses égales ou supérieures à la tolérance du sujet malade (*WHO 2017a*). Elle se manifeste donc dans un premier temps par un retard dans la clairance des parasites. Dans un second temps, la résistance sera confirmée si le traitement échoue, c'est-à-dire si les parasites ne sont pas éliminés par le traitement utilisé ou que ce dernier ne permet pas de contenir une éventuelle recrudescence (*WHO 2017a*).

Historiquement et quel que soit l'antipaludique utilisé en monothérapie, les souches de *Plasmodium* résistantes apparaissent d'abord en Asie du Sud-Est, puis d'autres foyers de résistances sont détectés en Amérique du Sud et en Afrique, parfois en moins de dix ans, en fonction de la formule chimique des molécules, de leur mode d'administration et de leur mode d'action (*Brock et al. 2018*). Pour parer au problème, l'OMS a recommandé l'utilisation des ACTs à partir des années 2000. C'était sans compter sur la capacité d'adaptation des espèces *Plasmodium*. En l'espace d'une quinzaine d'années, des souches résistantes à plusieurs (1 à 5) ACT se sont répandues en Asie du Sud-Est (*Roberts 2017; WHO 2017a*). Si les mêmes événements se produisaient avec les souches de *Plasmodium* répandues en Afrique, les conséquences seraient dramatiques.

¹ <https://www.yourgenome.org/stories/the-ongoing-battle-against-drug-resistant-malaria>

Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer l'apparition de mécanismes de résistance aux antipaludiques, parmi lesquelles :

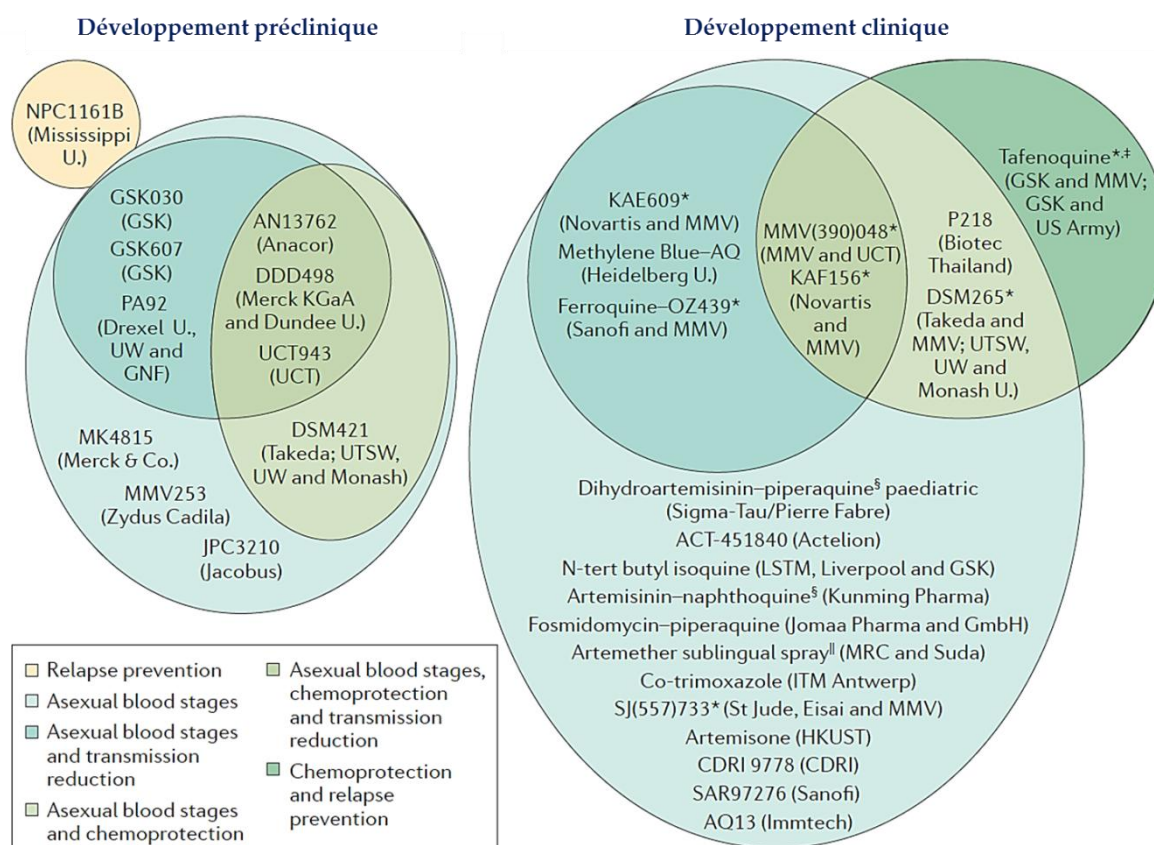
- ♦ La présence de molécules antipaludiques impacte le cours du développement des parasites, qui doivent faire le choix de poursuivre leur développement au sein de leur hôte intermédiaire (en stimulant la réplication des stades intra-érythrocytaires par exemple), ou de privilégier la transmission à leur hôte définitif (en favorisant l'expression des gamétocytes). Ces stratégies permettent au parasite de se protéger des molécules utilisées et peut favoriser la sélection de certaines populations en fonction de leur capacité à résister au traitement ou à perpétuer l'espèce (*Birget et al. 2018*).
- ♦ Un mécanisme de quiescence a été proposé, notamment pour l'Artémisinine et ses dérivés. En effet, certains stades anneaux mis sous pression arrêtent leur développement. Des changements de la transcription des gènes associés à cet arrêt de leur développement et à l'acquisition de résistances aux dérivés de l'artémisinine (diminution de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN et surexpression de chaperones par exemple) s'ensuivent. Les parasites ayant trouvé une parade aux traitements antipaludiques reprennent ensuite leur réplication (*Witkowski et al. 2010; Intharabut et al. 2019*). Il est par ailleurs à noter qu'une souche de parasites ayant mis au point un mécanisme de résistance vis-à-vis d'une molécule (comme l'Artémisinine) n'aura que peu de difficulté à résister à des molécules similaires (endoperoxydes) (*Paloque et al. 2017*).
- ♦ La persistance : dans une population de parasites, se trouvent des individus capables de résister au(x) traitement(s) utilisé(s). Les individus vulnérables vont donc être éliminés par la thérapie utilisée et les individus résistants persisteront et se développeront, engendrant ainsi un retard à la clairance des parasites (*Cohen, Lobritz, and Collins 2013*).

Trois mécanismes de résistance ont été relevés chez *Plasmodium* :

- ♦ Mutation d'un transporteur afin de rejeter la molécule antipaludique ; c'est le cas avec la chloroquine qui s'accumule dans la vacuole digestive du parasite et empêche la détoxification de l'hème. Chez les souches résistantes à la chloroquine, l'un des transporteurs membranaires de la vacuole digestive est muté pour rejeter la chloroquine dans le cytoplasme du parasite, loin de son site d'action (*Pulcini et al. 2015*).
- ♦ Mutation de la cible afin d'empêcher la molécule de se fixer et, donc, d'avoir l'effet escompté sur sa cible thérapeutique ; c'est le cas avec l'atovaquone qui cible le cytochrome *bc1*. Chez les souches résistantes à l'atovaquone, un acide aminé du cytochrome *bc1* impliqué dans la stabilisation de la liaison de l'atovaquone est muté, empêchant la fixation de la molécule sans impacter la fonction du Cytochrome (*Sodero et al. 2017*).
- ♦ Mise en place de mécanismes de compensation afin de contrebalancer l'effet délétère du médicament. C'est notamment le cas avec l'artémisinine et ses dérivés. Le mode d'action de ces molécules n'est pas complètement compris ; il semble que les ponts peroxydes présents dans leur structure chimique soient détruits une fois dans le cytoplasme du parasite, libérant des radicaux libres. Ces derniers sont capables d'alkyler des protéines et/ou d'oxyder des lipides, perturbant l'homéostasie du parasite (*Meshnick 2002*). L'expression de plusieurs gènes, le plus connu étant *kelch13*, est altérée chez les parasites présentant une résistance à l'artémisinine et ses dérivés, dans

le but de favoriser le repliement ou l'élimination par autophagie des protéines dont la structure a été impactée par la présence des radicaux libres (Haldar, Bhattacharjee, and Safeukui 2018).

Les marqueurs des résistances (mutations comme celles évoquées ci-dessus) sont répertoriés afin de suivre la répartition géographique des souches présentant des résistances à diverses molécules anti-malariques (Haldar, Bhattacharjee, and Safeukui 2018; WHO 2018a). De nombreuses molécules, la plupart sous forme d'associations thérapeutiques, sont en cours de développement préclinique et clinique (voir un exemple de pipeline en Figure 14). Elles sont soit des molécules revisitées (comme la ferroquine par exemple), soit optimisées pour viser une cible thérapeutique précise (la fosmidomycine qui cible l'apicoplaste) ou, enfin, issues de screening de molécules sur le parasite (i.e. leur potentiel antipaludique est avéré mais leur cible thérapeutique n'est pas identifiée) (Fraisie 2017; Phillips et al. 2017; Mathews and Odom John 2018). Dans le même temps, l'étude de la plante *Artemisia annua* entière a montré qu'en plus de dérivés de l'Artémisinine, les feuilles de la plante contiennent un grand nombre d'autres molécules qui facilitent leur bio-assimilation. Il semble également que les dérivés de l'artémisinine ne soient pas les seuls principes actifs antipaludiques présents dans la plante. Des infusions des feuilles de cette plante ou des tablettes fabriquées en comprimant des feuilles séchées se sont ainsi avérées très efficaces pour soigner 18 personnes vivant en région endémique et infectées avec des souches de *P. falciparum* résistantes aux ACTs (Weathers et al. 2014; Daddy et al. 2017).



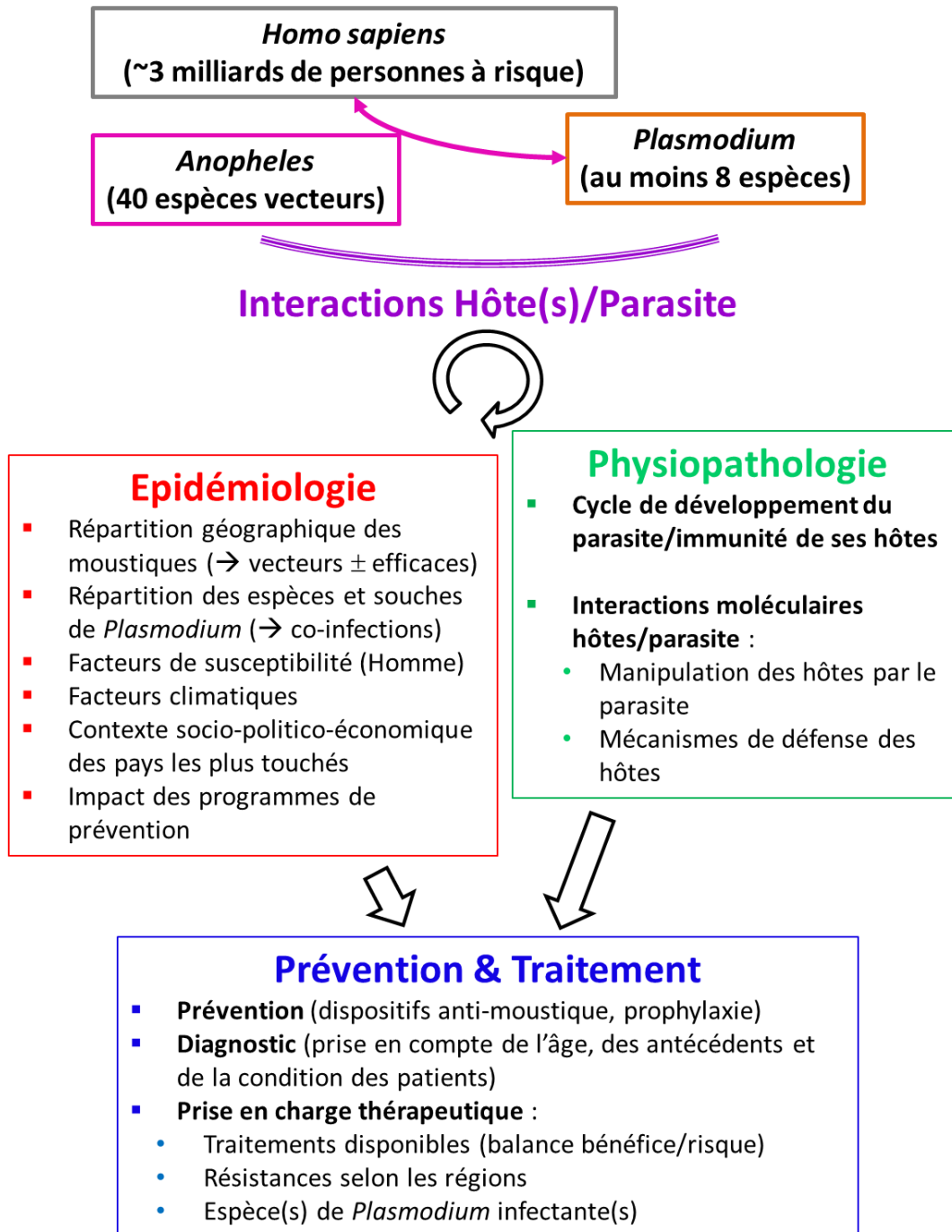
Phillips et al., Nature Reviews | Disease Primers, 2017

Figure 14 : Exemple d'un pipeline de molécules anti-malariques en développement préclinique ou clinique

Nous avons déjà évoqué la recherche sur de potentiels nouveaux vaccins anti-malariques (voir [Figure 11](#) pour le pipeline des vaccins en cours de développement). Le développement de tels vaccins fait bien entendu partie de la course contre le parasite.

Enfin, il ne faut pas oublier que le troisième protagoniste du paludisme, à côté des Anophèles et des parasites, est l'humain. Ce facteur humain est particulièrement complexe. Il dépend en effet du contexte politico-socio-culturel et économique des populations concernées, contexte qui détermine leur niveau de vie et la stabilité de leurs conditions de vie, leur accès à l'information et à l'éducation, et, en fonction de la situation géographique de leur lieu de vie, leur accès à des infrastructures de santé plus ou moins solides et, donc à une prise en charge plus ou moins adéquate en fonction de leurs problèmes de santé. Tous ces paramètres relèvent de l'anthropologie et sont parfois mis de côté alors qu'ils sont des facteurs clés de la réussite de campagnes ou programmes d'information et/ou de prévention. Pourtant, décliner les grands objectifs mondiaux de l'éradication du paludisme pour les adapter à un contexte national, régional puis local permet de délivrer un message précis aux populations concernées (e.g. nécessité de respecter la prescription d'un traitement antipaludique car réduire les doses par souci d'économie ou arrêter un traitement thérapeutique ou une prophylaxie trop tôt peut favoriser l'apparition de résistances ou de rechutes) (*Jaffré 2007; Chandler and Beisel 2017*). En bref, l'implication des populations vivant dans les régions endémiques au paludisme, la formation des personnels soignants se trouvant dans des zones reculées, le développement des infrastructures de santé et de drainage des eaux stagnantes, le démantèlement de réseaux de trafic de médicaments, etc. sont tous aussi nécessaires que le développement de stratégies de protection contre les moustiques et le parasite pour éradiquer cette maladie. Certains chefs d'état africains se sont par ailleurs regroupés au sein de l'Alliance ALMA pour amorcer des démarches en ce sens et pour l'éradication du paludisme des pays qu'ils gouvernent (<http://www.alma2030.org/>). Dimala et al. ont également très récemment recommandé de prendre de tels paramètres en compte pour l'implémentation du vaccin RTS,S/AS01 dans trois pays d'Afrique : le Ghana, le Malawi et le Kenya (*Dimala et al. 2018*).

5. Résumé graphique de la partie II



III. Les différents modes de régulation du développement de *Plasmodium*

Après avoir présenté l'évolution de *Plasmodium* et l'implication de ses différentes espèces dans le paludisme au niveau mondial, nous allons maintenant nous concentrer sur les modes de régulation de l'expression des gènes que le parasite met en œuvre pour adapter son développement aux changements environnementaux auxquels il est confronté tout au long de son cycle de vie complexe. Cette régulation intervient aux niveaux épigénétique, transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Une attention particulière sera portée aux modifications post-traductionnelles par phosphorylation/déphosphorylation.

1. Régulation de l'expression des gènes au niveau épigénétique

Le génome de *Plasmodium falciparum* est porté par 14 chromosomes. Il est extrêmement riche en A/T (80,6%), notamment au niveau des introns (90%). Ses 22,8 Mégabases codent pour environ 5000 gènes, dont 10% expriment des protéines qui sont envoyées à l'apicoplaste (*Gardner et al. 2002*). Comme chez les autres eucaryotes, l'ADN de *P. falciparum* est enroulé autour d'histones (certaines étant conservées, tandis que d'autres sont des variantes propres au parasite), et ce de manière plus serrée que chez les autres eucaryotes (*Kundu and Sikder 2018*). La chromatine ainsi formée peut être fortement compacte et empêcher l'expression des gènes (hétérochromatine) ou plus lâche et permettre l'expression des gènes (euchromatine) (*Cortés and Deitsch 2017; Kundu and Sikder 2018*). Différents mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes chez *Plasmodium* :

- ◆ Les ARN non codants, qui sont plutôt associés à la chromatine située aux centromères ou aux télomères des chromosomes, sont capables de s'y incorporer et de favoriser l'expression de certains gènes, notamment les gènes *var* codant pour PfEMP1 (*Gupta and Bozdech 2017*).
- ◆ Les modifications post-traductionnelles (MPTs) des histones altèrent les propriétés physico-chimiques de ces dernières et impactent directement leur capacité de liaison à l'ADN, et donc, l'organisation de la chromatine. Ces MPTs sont catalysées par diverses enzymes, dont certaines sont essentielles pour le développement du parasite ; les Histone Méthyltransférases catalysent l'ajout d'un groupement méthyl sur les arginines ou les lysines de différentes histones et contribuent à la formation de l'hétérochromatine tandis que l'acétylation des histones par des Histone Acétyltransférases contribue à la formation de l'euchromatine. Ces différentes MPTs sont réversibles et les réactions inverses sont catalysées respectivement par des Histone Déméthylases et des Histone Déacétylases. La densité des nucléosomes est ainsi en corrélation directe avec la transcription des gènes (*Doerig et al. 2015; Jabeena and Rajavelu 2019*).
- ◆ D'autres protéines, comme l'Heterochromatin Protein 1 (HP1), contribuent à l'organisation de la chromatine ; ainsi, HP1 est recrutée sur les sites de méthylation de l'Histone H3 et contribue à la formation de l'hétérochromatine (*Duraisingh and Skillman 2018*).
- ◆ Il est également possible que l'organisation spatiale du génome au sein du noyau joue un rôle sur l'accessibilité des gènes et, donc sur leur expression (*Bechtsi and Waters 2017; Gupta and Bozdech 2017*).

Tous ces différents mécanismes agissent de concert pour réguler l'expression des gènes impliqués dans l'invasion des érythrocytes, la variation antigénique des protéines exportées à la surface de l'érythrocyte infecté (impactant ainsi directement les phénomènes de cytoadhérence et les mécanismes d'échappement vis-à-vis du système immunitaire), l'apport de nutriments de l'hôte vers le parasite, la différenciation

sexuelle des stades asexués (notamment via les facteurs de transcription AP2-G et AP2-G2) (Bechtsi and Waters 2017; Cortés and Deitsch 2017; Duraisingh and Skillman 2018). Au vu du rôle essentiel joué par l'épigénétique dans la régulation de l'expression des gènes de *Plasmodium*, des molécules ciblant notamment les enzymes impliquées dans la modification des histones constituent une approche antipaludique intéressante (Bouchut et al. 2019).

2. De la transcription à la traduction chez *Plasmodium*

Les apicomplexes possèdent peu de facteurs de transcription ; 73 facteurs de transcription ont été prédits *in silico* chez *P. falciparum*, ce qui représente environ le tiers de ce qui est habituellement comptabilisé chez les eucaryotes (Coulson, Hall, and Ouzounis 2004; Bischoff and Vaquero 2010). La première famille de facteurs de transcription spécifique des apicomplexes a été découverte plus tard : les ApiAP2 (Apicomplexan Apetala-2) (Balaji et al. 2005). Ces facteurs de transcription sont au nombre de 27 chez *Plasmodium* et possèdent chacun un à quatre domaines de liaison à l'ADN (Balaji et al. 2005; X. M. Lu et al. 2017). La caractérisation fonctionnelle de certains d'entre eux, ainsi que le suivi de leur profil transcriptomique, a permis de démontrer l'importance de plusieurs d'entre eux à divers moments du cycle de vie du parasite : cycle intra-érythrocytaire, gamétocytogénèse, développement des ookinètes, développement des sporozoïtes, développement des stades hépatiques (Sinha et al. 2014; Modrzynska et al. 2017).

En plus de ces facteurs de transcription, *Plasmodium* utilise des modes de régulation de l'expression des gènes aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel qui lui sont spécifiques :

- ◆ **Utilisation d'ARNs non codants** : *Plasmodium* ne possède pas les enzymes nécessaires pour faire de l'ARN interférence à partir de micro-ARNs (Baum et al. 2009). Il n'en produit d'ailleurs pas ; les seuls micro-ARNs qui ont été identifiés dans des érythrocytes humains infectés par *Plasmodium* sont d'origine humaine (Xue et al. 2008). Ces derniers sont capables de former des chimères avec les ARNm du parasite par fusion avec leurs extrémités 5', inhibant ainsi leur traduction en protéine (LaMonte et al. 2015). Il semble que ce mécanisme soit d'ailleurs à l'origine de l'inhibition du développement de *Plasmodium* dans les hématies falciformes, chez lesquelles il y a une production abondante de micro-ARNs (LaMonte et al. 2015).

En revanche, les mécanismes d'épissage alternatif tiennent une part importante dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes chez *Plasmodium*. En effet, l'épissage alternatif permet l'expression de différents isomères protéiques, qui sont ou non fonctionnels, et la rétention d'introns non épissés dans des transcrits donne des ARNm non-sens qui pourront participer à la destruction d'ARNm contenant des codons STOP prématurés (Nonsense Mediated Decay) (Lunghi et al. 2016).

Les demi-ARNt constituent la troisième sorte d'ARN non codant utilisée par *Plasmodium*, à priori pour adapter son développement à des stimuli environnementaux stressants comme un choc thermique, une baisse des nutriments disponibles, comme les acides aminés, ou pour entrer en quiescence, ou encore chez les parasites extracellulaires. La raison exacte de la production de ces demi-ARNt n'est pas encore connue avec précision (Galizi et al. 2013).

- ◆ **Expression de protéines liant l'ARN** : selon l'approche de prédiction *in silico* utilisée, le nombre de protéines capables de lier l'ARN chez *Plasmodium* varie entre 150 et 1000 (Coulson, Hall, and Ouzounis 2004; Reddy et al. 2015; Bunnik et al. 2016). L'analyse du protéome lié à l'ARNm du

parasite a permis l'identification de 150 d'entre elles chez les stades asexués de *Plasmodium* (Bunnik et al. 2016). Nombre de ces protéines sont impliquées dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression des gènes et certaines sont essentielles à divers moments clés du cycle de vie du parasite. À titre d'exemple :

- ♦ Chez le gamète femelle, l'hélicase à ARN DOZI (Development Of Zygote Inhibited) et la protéine CITH (homolog of worm CAR-I and fly Trailer Hitch) s'associent à 16 facteurs de traduction différents, qui ne sont ni des facteurs d'initiation de la traduction ni des facteurs de dégradation de l'ARNm, et à des centaines d'ARNm. Le complexe ribonucléoprotéique qui en résulte stabilise ainsi les ARNm liés et réprime leur traduction. Ainsi, dès que la fécondation a lieu, les ARNm maternels réprimés jusque-là sont traduits et permettent le développement du zygote obtenu en ookinète fonctionnel en une vingtaine d'heures (Mair et al. 2010; Bunnik et al. 2016; Garcia et al. 2018).
- ♦ Les protéines Alba (Acetylation lowers binding affinity) 1 à 4 sont capables de lier de l'ADN (principalement aux télomères des chromosomes) ou de l'ARN. À titre d'exemple, PfAlba1 est capable de lier jusqu'à 1193 transcrits au stade trophozoïte, principalement pour réprimer leur traduction. Les transcrits qu'elle lie sont impliqués dans l'invasion et ne sont pas nécessaires au trophozoïte en plein développement. Ils le seront en revanche au stade schizonte, lorsque les mérozoïtes devront être appareillés d'un complexe apical fonctionnel pour être à même d'envahir de nouveaux érythrocytes (Chêne et al. 2012; Vembar et al. 2015).
- ♦ **Autres mécanismes de régulation temporelle de la transcription et de la traduction :** l'avènement des techniques de séquençage de l'ARN, notamment sur cellule unique (single cell RNA sequencing), permet de mettre à nu le transcriptome de *Plasmodium* au fil de ses stades de développement et en fonction de ses conditions de vie. Ils permettent de déceler les spécificités d'expression des gènes à chaque stade de développement et d'observer la synchronicité de la traduction de gènes co-exprimés (J. Wang et al. 2016). Ils devraient peut-être également permettre de comprendre comment, en l'absence de chromosomes sexuels, le ratio mâle/femelle des gamétocytes est déterminé et quels gènes sont impliqués dans la maturation de ces stades sexuels (Poran et al. 2017; Reid et al. 2018; Tadesse et al. 2018).

Ces différents mécanismes permettent ainsi au parasite d'ajuster son transcriptome (et par conséquent son protéome) à ses besoins de développement ou de différenciation et de répondre à des stimuli environnementaux, de stress notamment, auxquels il peut être confronté tout le long de son cycle de vie. Il sélectionne ainsi les gènes qu'il veut voir exprimés au niveau protéique et au moment/stade de développement où il en a besoin (« juste-à-temps ») pour s'adapter le mieux possible (J. Wang et al. 2016).

3. Les modifications post-traductionnelles (MPTs) chez *Plasmodium*

Les modifications post-traductionnelles (MPTs) sont des modifications, réversibles ou non, de la structure des protéines. Des enzymes dédiées catalysent la formation d'une liaison covalente entre un groupement chimique donné et un acide aminé (Tableau 5). Cet ajout induit des changements dans la structure de la protéine substrat, impactant alors son activité, sa capacité d'interaction et sa localisation. De manière générale, les MPTs permettent la diversification du protéome des cellules et, à fortiori, de *Plasmodium*, lui fournissant un moyen d'affiner le « réglage » de la fonction de ses protéines afin, une fois de plus, de s'adapter aux changements environnementaux qu'il rencontre (Doerig et al. 2015; Yakubu, Weiss, and Silmon de Monerri 2018). Les différentes MPTs retrouvées chez *Plasmodium* sont présentées ci-dessous, à l'exception de la phosphorylation qui sera présentée en partie III.4.

a. Acétylation

L'acétylation des lysines est une MPT réversible (Doerig et al. 2015). Chez *Plasmodium*, l'ajout du groupement acétyl- sur le groupement amine d'une lysine de la protéine substrat est catalysé par 4 Lysine Acétyltransférases (KATs) qui ciblent des résidus spécifiques. Le groupement acétyl- peut être retiré par l'une des 5 Lysine Désacétylases (KDACs) exprimées par le parasite. En plus de l'acétylation des histones qui a été évoquée plus haut, les KATs acétylent également des facteurs de transcription (62 sites d'acétylation ont été répertoriés sur 16 ApiAP2). Cette MPT module ainsi la capacité d'interaction des protéines substrats avec l'ADN ou de l'ARN, participant alors à la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes. L'acétylation de protéines impliquées dans le métabolisme affecte leur capacité de liaison à des molécules (carbohydrates, hétérocycles, anions, etc.) (Cobbold et al. 2016). Des sites d'acétylation ont également été répertoriés sur des protéines exportées (RIFIN, PfEMP1, etc.) (Yakubu, Weiss, and Silmon de Monerri 2018).

b. Méthylation

La méthylation, qui est également une MPT réversible, est la 4^{ème} MPT chez les eucaryotes (Kaur et al. 2016). Chez *Plasmodium*, 10 Histone Lysine Méthyltransférases (HKMTs), 3 Lysine Specific Déméthylases (LSD1) et une jumonji-C-histone déméthylase (JHDM) ont été identifiées. Les 10 HKMTs sont capables de transférer des groupements méthyl- sur des lysines d'histones, une lysine pouvant être mono-, di- ou triméthylée. Les Déméthylases catalysent la réaction inverse. Ainsi que cela a été évoqué plus haut, cette MPT favorise la formation de l'hétérochromatine et module donc l'expression des gènes au niveau épigénétique (Kaur et al. 2016).

Les histones ne sont pas les seules protéines à être méthylées. Une étude protéomique réalisée en 2016 a ainsi permis de mettre à jour le fait que diverses protéines impliquées dans le repliement des protéines (des Heat Shock Proteins, par exemple), ou exportées (PfEMP1, RIFIN, KAHRP), ou de l'IMC, mais aussi des kinases ou encore des protéines de rhoptries, sont méthylées. Les lysines ne sont par ailleurs pas les seuls résidus méthylés ; des méthylations ont déjà été reportées sur des arginines, des histidines ou encore des acides glutamiques. Enfin, environ 300 protéines sont méthylées aux stades anneau, trophozoïte et schizonte chez *P. falciparum* (Tableau 5) (Kaur et al. 2016). Plus récemment, la Protein Arginine Methytransferase 1 (PRMT1) a été caractérisée chez *Toxoplasma gondii*. Elle joue un rôle important dans la croissance et la division cellulaires ; parmi ses substrats, l'on compte majoritairement des protéines nucléaires ou cytoplasmiques capables de lier l'ARN, ainsi que des ApiAP2 et plusieurs kinases (Yakubu et

al. 2017). La caractérisation de Méthyltransférases autres que les HKMTs devrait ainsi permettre d'en apprendre plus sur le rôle de cette MPT au-delà de la modification des histones.

c. S-glutathionylation

Dans le cadre de cette MPT réversible, le groupement thiol du glutathion est lié à celui d'une cystéine précise sur la protéine substrat ((Xiong et al. 2011), [Tableau 5](#)). Au cours de son cycle de développement intra-érythrocytaire, *Plasmodium* est soumis à un stress oxydatif intense ; il est donc probable qu'il utilise la S-glutathionylation pour gérer ce stress tout en modulant la fonction de ses protéines (Kehr et al. 2011). Des enzymes de la famille des Thioredoxins (comme la Glutaredoxine Grx1 ou la Thioredoxin Trx1 ou encore la Plasmoredoxin Plrx) ont été identifiées chez *Plasmodium* et leur capacité à catalyser des réactions de déglutathionylation a également été démontrée (Kehr et al. 2011). La S-glutathionylation peut moduler l'activité des protéines ciblées (la GAPDH de *Plasmodium* est inhibée lorsqu'elle est glutathionylée), indiquant qu'il s'agit bien d'une PTM. En revanche, le rôle exact de cette PTM et les raisons physiologiques de son utilisation par le parasite ne sont pas encore comprises (Kehr et al. 2011; Doerig et al. 2015).

d. Lipidation

La lipidation des protéines les rend capables de s'associer à la membrane ou modifie leur capacité à interagir avec d'autres partenaires protéiques (Resh 2006). Les 4 MPT lipidiques relevées à ce jour chez *Plasmodium* sont présentées ci-dessous.

Palmitoylation

La palmitoylation consiste à lier une molécule de palmitate avec une cystéine (soit son groupement amine si elle est située en N-ter d'une protéine, soit son groupement thiol – [Tableau 5](#)). Cette MPT réversible permet de moduler l'affinité des protéines ciblées pour les membranes lipidiques, jouant ainsi un rôle clé dans le trafic de ces protéines, leur stabilité, leur repliement, etc. (Frénal et al. 2013; Doerig et al. 2015). Chez *Plasmodium falciparum*, 372 sites de palmitoylation ont été répertoriés sur 315 protéines au stade schizonte ; il s'agit principalement de protéines impliquées dans l'invasion de la cellule hôte ou dans la résistance aux médicaments. Douze Protein S-acyl Transferases (PATs) ont été identifiées chez *P. falciparum*. Elles comportent toutes un motif DHHC dans leur région catalytique, d'où leur nom : PfDHCC1 à 12. Ces différentes enzymes sont localisées dans différents compartiments du parasite : le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, l'IMC ou encore les rhoptries (Hodson et al. 2015). Elles ne semblent pas essentielles au développement intra-érythrocytaire de *Plasmodium* (Frénal et al. 2013). Néanmoins, plus récemment, la DHHC3 a été caractérisée chez *P. berghei* aux stades de développement hors cycle intra-érythrocytaire, et s'est avérée être cruciale pour la motilité glissante ('gliding') des ookinètes et des sporozoïtes (Hopp et al. 2016).

Myristoylation

Cette MPT consiste en l'ajout d'une molécule de myristate sur le groupement amine d'une glycine située à l'extrémité N-ter d'une protéine ([Tableau 5](#) – (Traverso, Giglione, and Meinel 2013)). A priori, les Glycines situées juste après la Méthionine encodée par le codon START sont des substrats potentiels, du moment que la Méthionine est enlevée au cours de la traduction de la protéine (Doerig et al. 2015). Des Glycines internes à une protéine peuvent également être ciblées, mais une protéolyse du début de la protéine est préalablement nécessaire pour les rendre accessibles ; c'est notamment ce qu'il se produit dans une cellule

en cours d'apoptose, où les caspases peuvent lyser l'extrémité N-ter de certaines protéines, dévoilant alors un site de myristoylation potentiel (Resh 2006). La myristoylation n'est pas réversible et peut permettre l'ancrage définitif d'une protéine à une membrane. Ainsi, les protéines destinées à faire partie de l'IMC sont d'abord palmitoylées pour être adressées à ce dernier, puis la palmitoylation est retirée et est remplacée par une myristoylation qui permet aux protéines d'intégrer l'IMC (Yakubu, Weiss, and Silmon de Monerri 2018). En conséquence, inhiber la N-myristoylation au moyen d'inhibiteurs spécifiques d'une N-myristoyltransférase désorganise le processus d'assemblage de l'IMC (Wright et al. 2014).

Prénylation

Cette MPT irréversible consiste à lier une molécule de farnésyl ou de géranylgéranyl au groupement thiol d'une cystéine ((Doerig et al. 2015) – Tableau 5). *Plasmodium* possède une farnésyltransférase (FT) pour catalyser le premier type de prénylation, et une Géranylgéranyltransférase (GGT1) et une Rab Géranylgéranyltransférase qui cible les Rab GTPases. Le prénylatome de *Plasmodium* a été caractérisé récemment et permet de mieux comprendre l'impact de cette MPT chez le parasite ((Gisselberg et al. 2017) – Tableau 5). Ainsi l'adressage de la FYVE-containing coiled-coil protein (FCP) à la vacuole digestive du parasite ne peut se faire si la protéine n'est pas prénylée, ce qui démontre l'importance de cette MPT dans le trafic des protéines au sein du parasite (Gisselberg et al. 2017).

Ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol)

Cette macromolécule est synthétisée à partir d'acides gras et de précurseurs de carbohydrates (Doerig et al. 2015). Elle est composée d'une portion phosphoéthanolamine, d'un cœur de glycanes et d'une queue phospholipidique (Tableau 5 – (Paulick and Bertozzi 2008)). L'ajout d'une ancre GPI sur une protéine est réversible et permet donc de moduler sa localisation de manière assez dynamique (Doerig et al. 2015). Trente protéines liées à une ancre GPI ont été détectées au cours du cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum* (Gilson et al. 2006). Parmi elles, se trouvent les protéines MSP1 et 2 (Merozoite Surface Protein), indiquant donc que cette MPT joue un rôle dans l'adressage des protéines exportées à la membrane plasmique du parasite (Doerig et al. 2015; Cova et al. 2015).

e. Glycosylation

Plasmodium possède un système enzymatique lui permettant de produire différents glycanes et des ancres GPI (Cova et al. 2015). Au cours de son cycle de développement intra-érythrocytaire, il produit de l'ATP et différents glycanes à partir du glucose qu'il fermente en lactate. La consommation en glucose d'un érythrocyte infecté par un trophozoïte est ainsi 100 fois supérieure à celle d'un érythrocyte non infecté (von Itzstein et al. 2008; Cova et al. 2015). La capacité de *Plasmodium* à effectuer des MPTs basées sur la N- ou l'O-glycosylation est toujours controversée. Les seules protéines de *Plasmodium* O-glycosylées sont exprimées à des stades autres que les stades sanguins ; la Circumsporozoïte protein (CSP), qui se trouve à la surface des sporozoïtes, est ainsi O-glycosylée (Lopaticki et al. 2017). Voici tout de même ci-dessous les dernières données collectées à propos des MPTs basées sur la glycosylation des protéines chez *Plasmodium*.

O-Fucosylation

Une étude a rapporté récemment la caractérisation d'une O-fucosyltransférase (*Pf*POFUT2). *Pf*POFUT2 est localisée dans le réticulum endoplasmique du parasite et catalyse l'ajout d'un fucose sur le groupement

alcool d'une Sérine ou d'une Thréonine. Le KO du gène encodant cette protéine atténue la capacité des ookinètes à coloniser l'intestin du moustique et impacte la motilité des sporozoïtes (motilité glissante/'gliding', traversée des hépatocytes, invasion, production de stades parasites exo-érythrocytaires) (Lopaticki et al. 2017). Cette étude démontre qu'une MPT jusque-là jugée secondaire se révèle au contraire importante pour certains stades de développement impliqués dans la transmission du parasite.

O-Acétyleglucosaminylation (O-GlcNAc)

Une étude protéomique récente indique que 13 protéines O-GlcNAcétylées ont été identifiées chez des trophozoïtes âgés de *P. falciparum* (Tableau 5). Ces 13 protéines sont, entre autres, des kinases, des protéines impliquées dans le repliement des protéines (HSP70) ou des protéines nécessaires à la motilité du parasite (actine, myosine). Bien que l'impact de cette MPT sur la structure/fonction des protéines ciblées ne soit pas encore comprise, l'identification de ses substrats indique qu'elle pourrait jouer un rôle essentiel dans la capacité du parasite à envahir de nouvelles cellules hôtes (Kupferschmid et al. 2017).

f. Ubiquitination

Cette MPT consiste en la formation d'une liaison covalente entre une protéine d'ubiquitine et une lysine de la protéine cible par une ubiquitin-ligase (Tableau 5). Sur les 4200 substrats prédits *in silico*, 72 ont été validés expérimentalement au cours du cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum* ((Ponts et al. 2011) – Tableau 5). L'ubiquitination cible une grande variété de substrats : des protéines de glideosome, des histones et des facteurs de transcription ApiAP2, des protéines impliquées dans le métabolisme, etc., impliquant cette MPT dans la régulation de nombreux processus indispensables au développement du parasite (Yakubu, Weiss, and Silmon de Monerri 2018). Le nombre le plus important de protéines ubiquitinylées a été détecté au stade schizonte, indiquant que cette MPT est probablement impliquée dans la régulation générale de l'activité cellulaire, notamment lorsque le schizonte se prépare à se différencier en mérozoïtes (Ponts et al. 2011).

g. SUMOylation

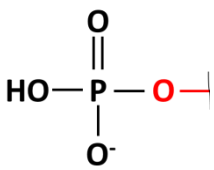
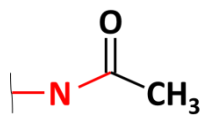
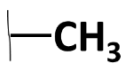
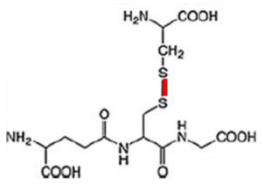
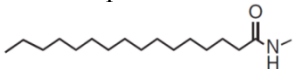
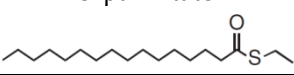
SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) est une protéine de 100 acides aminés chez *P. falciparum*. Chez ce dernier, elle est localisée dans le noyau et le cytoplasme du parasite, ainsi que dans les sillons de Maurer qui sont des modifications de la surface des érythrocytes engendrées par le parasite (Issar et al. 2008; Mundwiler-Pachlatko and Beck 2013). SUMO est d'abord activée par protéolyse (par des protéases E2 enzyme SUMO comme la SENP, SUMO-specific Protease), puis liée à des lysines de protéines substrats pour moduler leur stabilité ou leur capacité à interagir avec des partenaires protéiques, voire réguler leur transport intracellulaire (Ponder et al. 2011; Maruthi et al. 2017). Elle peut ensuite être retirée de la protéine cible par les mêmes protéases (Ponder et al. 2011). Chez *P. falciparum*, 23 protéines SUMOylées présentant des fonctions diverses (liaison à la chromatine, l'ADN ou l'ARN, dynamine, heat shock proteins, etc.) ont été identifiées (Tableau 5 - (Issar et al. 2008)). Des protéines SUMOylées peuvent être également ubiquitinylées (Ponts et al. 2011). Enfin, la SUMOylation semble jouer un rôle important dans les relations hôte-pathogène. Ainsi, la surexpression de SUMO1 dans les hépatocytes est délétère pour le développement des sporozoïtes, sans que le mécanisme de ce dispositif antiparasite ne soit connu. De plus, toujours sans que l'on sache comment, les sporozoïtes inhibent la SUMOylation de la protéine SMAD4 des hépatocytes pour la déstabiliser et l'empêcher d'atteindre le noyau de l'hépatocyte, réduisant

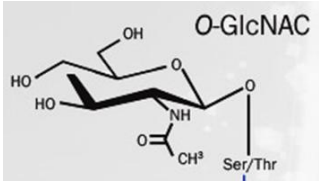
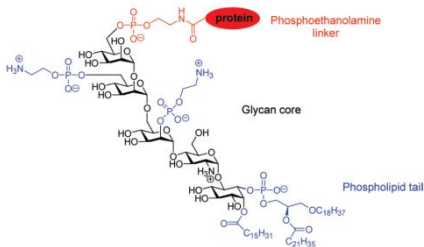
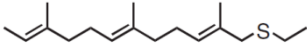
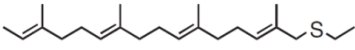
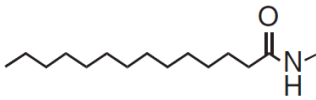
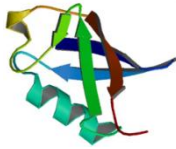
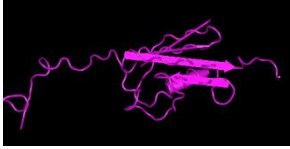
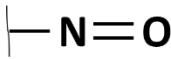
de moitié son activité de transcription, et impactant en conséquence l'expression des gènes de l'hépatocyte hôte (Maruthi et al. 2017).

h. Nitrosation

Il n'y a à ce jour qu'une seule étude rapportant des cas de nitrosation (S-nitrosylation) chez *P. falciparum*. Ce dernier est soumis à diverses espèces d'oxydes nitriques tout le long de son développement, car elles font partie de l'action anti-parasitaire mise en place par ses hôtes, notamment dans l'intestin du moustique dont elles inhibent l'invasion par les ookinètes. Il est donc possible que *Plasmodium* ait mis en place un système de S-nitrosation pour répondre à ce stress (Tableau 5). Les auteurs de l'étude évoquée ici ont montré que la Thioredoxin 1 (Trdx1) détient un pouvoir dénitrosant fort. Ils ont ensuite émis l'hypothèse que Trdx1 est d'abord nitrosylée en cas de stress nitrosant, puis catalyse des réactions de transnitrosylation entre protéines, afin de moduler leur activité enzymatique et de permettre au parasite de survivre à cette période stressante (L. Wang et al. 2014).

Tableau 5 : Structure chimique et fréquence des modifications post-traductionnelles retrouvées chez *Plasmodium*

Modification post-traductionnelle (MPT)	Structure chimique du groupement ajouté	Abondance de la MPT chez <i>P. falciparum</i>
Phosphorylation (Liaison d'un groupement phosphate au groupement alcool d'une Sérine, Thréonine ou Tyrosine) – voir partie III.4		4409 sites phosphorylés sur 1225 protéines/2359 détectées au stade schizonte (<i>P. falciparum</i>) (M. O. Collins et al. 2014)
Acétylation (Liaison d'un groupement acétyl- à une lysine de la protéine substrat)		2876 sites acétylés sur 1146 protéines au stade trophozoïte (<i>P. falciparum</i>), dont 197 sur 72 protéines exportées (Cobbold et al. 2016)
Méthylation (liaison d'un groupement méthyl- ci-contre à une lysine de la protéine substrat)		570 protéines méthylées tout le long du cycle intra-érythrocytaire (anneau : 292, trophozoïte : 335, schizonte : 358) – <i>P. falciparum</i> (Kaur et al. 2016)
S-Glutathionylation (liaison entre le groupement thiol d'une molécule de glutathion et le groupement thiol d'une cystéine de la protéine substrat)		493 protéines cibles identifiées dans des stades sanguins de <i>P. falciparum</i> (Kehr et al. 2011)
Palmitoylation (liaison d'une molécule de palmitate avec une cystéine en N-ter ou son groupement thiol – N ou S-palmitoylation)	N-palmitate  S-palmitate 	372 sites de palmitoylation sur 315 protéines au stade schizonte (<i>P. falciparum</i>) (Hodson et al. 2015)

N- et O-Glycosylation (liaison d'une molécule de sucre au groupement alcool d'une Sérine/Thréonine ou l'amide d'une Asparagine) Exemple de l'O-GlcNAcylation →	 O-N-Acetylglucosamine	13 protéines O-GlcNAcylées au stade trophozoïte âgé (<i>P. falciparum</i>) (Kupferschmid et al. 2017)
Ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (Le glycolipide ci-contre est ajouté à l'extrémité C-terminale de la protéine substrat)		30 protéines comporteraient une ancre GPI sur tout le cycle intra-érythrocytaire de <i>P. falciparum</i> (Gilson et al. 2006)
Prénylation (Liaison d'une des deux molécules ci-contre au groupement thiol de cystéines situées à l'extrémité C-ter de la protéine substrat)	Farnésyl  Géranylgéranyl 	20 candidats identifiés aux stades trophozoïte/schizonte de <i>P. falciparum</i> (Gisselberg et al. 2017)
Myristoylation (Liaison d'une molécule de Myristate à la Glycine dévoilée en N-ter de la protéine d'intérêt)		30 substrats validés au stade schizonte chez <i>P. falciparum</i> (Wright et al. 2014)
Ubiquitination (Liaison d'une à plusieurs ubiquitines sur des lysines de la protéine substrat)	 <i>H. sapiens</i> – PDB = 1UBQ	4200 substrats prédits <i>in silico</i> et 73 validés expérimentalement (anneau : 24, trophozoïte : 36 et schizonte : 63) chez <i>P. falciparum</i> (Ponts et al. 2011)
SUMOylation (Liaison d'une Small Ubiquitin-related Modifier à une lysine de la protéine substrat)	 <i>H. sapiens</i> – PDB = 1A5R	23 protéines SUMOylées détectées dans les stades sanguins chez <i>P. falciparum</i> (Issar et al. 2008)
S-Nitrosation (Ajout d'un groupement nitroso- sur le groupement thiol d'une cystéine)		37 sites de S-Nitrosation et 319 substrats potentiels identifiés chez <i>P. falciparum</i> (L. Wang et al. 2014)

En somme, bien que ne disposant que d'un arsenal de facteurs de transcription réduit, *Plasmodium* a mis en place des systèmes de régulation transcriptionnelle à traductionnelle qui lui permettent d'exprimer les gènes dont il a besoin au moment où il en a besoin. Les MPTs s'ajoutent à ces différents phénomènes pour affiner leur régulation et moduler la fonction des protéines traduites, facilitant l'adaptation du parasite aux changements, voire aux attaques, qu'il subit tout le long de son cycle de vie.

4. La phosphorylation chez *Plasmodium*

a. La phosphorylation est une MPT de premier plan pour *Plasmodium*

La phosphorylation est une MPT réversible. Elle consiste à créer une liaison covalente entre l'Oxygène du groupement alcool d'une Sérine ou d'une Thréonine, ou le groupement phénol d'une Tyrosine, et un groupement phosphate. Les kinases sont les enzymes capables de catalyser les transferts de groupements phosphate de l'ATP ou du GTP vers un substrat. Les phosphatases sont capables de retirer le groupement phosphate ainsi rajouté par hydrolyse (Doerig et al. 2015). Il existe également des kinases et phosphatases à histidine ou à lipide (Khalife et al. 2013).

L'importance de la phosphorylation a été prouvée à l'aide de trois approches :

- ♦ **Utilisation d'inhibiteurs de kinases et/ou de phosphatases** : divers inhibiteurs de kinase, comme la staurosporine, ou de phosphatase, comme l'acide okadaïque, ont été testés sur des cultures *in vitro* de *P. falciparum* ou de *P. knowlesi*. Plusieurs d'entre eux ont eu un effet délétère sur l'invasion des érythrocytes ou le développement intra-érythrocytaire du parasite. Bien que la ou les cible(s) exacte(s) de chacune de ces molécules n'ai(en)t pu être identifiée(s), ces expériences ont eu le mérite de fournir une première démonstration de l'importance de la phosphorylation pour le développement de *Plasmodium* (G. E. Ward et al. 1994; Dluzewski and Garcia 1996).
- ♦ **Utilisation d'approches « OMICS »** : cinq études du phosphoprotéome de *P. falciparum* ont été publiées entre 2011 et 2015 et ont permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques de la phosphorylation chez *Plasmodium* (Lasonder et al. 2012) :
 - La phosphorylation est la MPT la plus abondante chez *Plasmodium* avec, en fonction des conditions de préparation des échantillons et de la sensibilité des techniques de détection des peptides phosphorylés, jusqu'à plus de 6000 sites phosphorylés répertoriés tout le long du cycle intra-érythrocytaire du parasite (Pease et al. 2013).
 - La phosphorylation est une MPT dynamique dont l'intensité et les cibles varient au cours du cycle intra-érythrocytaire de *Plasmodium*, lui permettant d'adapter la régulation de l'expression de ses gènes aux besoins de chacun de ses stades (Solyakov et al. 2011; Lasonder et al. 2015). Par ailleurs, la détection de kinases phosphorylées présage de l'existence de voies de transduction du signal chez le parasite (Pease et al. 2013).
 - Les sites phosphorylés sont majoritairement des Sérines, à 89%, puis des Thréonines (10,5%). La phosphorylation de Tyrosines a également été répertoriée (0,5%). De plus, les résidus qui encadrent ces sites de phosphorylation sont de nature plus basique (Lysine, Asparagine) que chez d'autres eucaryotes, probablement en raison de la richesse en A/T du génome de *P. falciparum* (Treeck et al. 2011).
- ♦ **Utilisation d'approches de génétique inverse** : plusieurs études systématiques (par KO) de l'essentialité des kinases (Solyakov et al. 2011; Tewari et al. 2010) ou des phosphatases (Guttery et al. 2014), ou des criblages de l'essentialité de tous les gènes du parasite (Bushell et al. 2017; M. Zhang et al. 2018), ont permis d'en apprendre plus sur le rôle des membres du kinome et du phosphatome de *Plasmodium* au cours de son cycle de vie.

b. Le kinome de *Plasmodium*

Selon les critères de recherche *in silico* utilisés, les études réalisées sur le kinome de *P. falciparum* indiquent qu'il comprend 84 (P. Ward et al. 2004) à 99 kinases (Anamika, Srinivasan, and Krupa 2005). Diverses études phylogénétiques incluant tout ou partie de ces 99 protéines ont permis de répartir les kinases de l'apicomplexe dans les familles initialement décrites par Hanks (Hanks 2003). Il est à noter que *Plasmodium* ne possède pas de kinases à tyrosine et que son kinome comporte certaines spécificités que nous évoquerons au fur et à mesure des familles ((P. Ward et al. 2004; Anamika, Srinivasan, and Krupa 2005; Talevich, Mirza, and Kannan 2011; Talevich et al. 2012; Talevich, Kannan, and Miranda-Saavedra 2013) – Tableau 6) :

- ◆ **La famille CMGC** regroupe 18 kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la transduction du signal, et 70% d'entre elles sont spécifiques des apicomplexes. Les CMGC comprennent, entre autres, les sous-familles suivantes :
 - ◆ Les Kinases Cycline-dépendantes (CDKs)
 - ◆ Les Kinases Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs)
 - ◆ Les Glycogen-Synthase Kinases (GSKs)
 - ◆ Les Kinases Cycline-dépendantes-like (CLKs)
- ◆ **La famille CAMK** regroupe les kinases Calcium et Calmoduline-dépendantes. Avec ses 17 membres, c'est le second groupe le plus important du kinome de *P. falciparum* qui comprend :
 - ◆ Les Kinases Calcium-dépendantes (CDPKs)
 - ◆ Des Protéines Kinases ne comportant pas de motif EF de liaison au calcium : PK2 et PK9
 - ◆ Plusieurs kinases phylogénétiquement proches de celles citées ci-dessus (Tableau 6)
- ◆ **La famille des FIKK**, ainsi appelées en raison de la conservation d'un motif Phe-Ile-Lys-Lys dans leur domaine kinase, est une famille de kinases spécifique des apicomplexes. Elle comprend une vingtaine de membres chez *P. falciparum* et seulement un chez la plupart des autres espèces de *Plasmodium*.
- ◆ **La famille des Tyrosine Kinase-like (TKL)** comprend cinq membres chez *P. falciparum* et six chez *P. berghei* (Tewari et al. 2010). Les TKL sont phylogénétiquement proches des kinases à tyrosine mais présentent une activité de kinase à Sérine/Thréonine.
- ◆ **La famille PEK** regroupe trois kinases de type eIK (eukaryotic translation Initiation factor 2-alpha Kinase).
- ◆ **La famille NEK** regroupe quatre kinases de type NIMA-related (NIMA signifie Never in Mitosis Aspergillus). Ces kinases sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, avec notamment les kinases Aurora (ARK).
- ◆ **La famille des AGC**, pour PKA, PKG, PKC, regroupe des kinases dépendantes de nucléotides cycliques et d'autres messagers secondaires. Chez *P. falciparum*, il n'y a pas de PKC. Le parasite possède en revanche une PKB comportant un domaine N-ter capable de lier le calcium et la calmoduline et qui régule l'activité kinase.
- ◆ **La famille CK1** comprend une seule kinase de type Casein Kinase 1.
- ◆ **La famille STE** (qui comprend les kinases impliquées dans la voie des MAPK chez les eucaryotes) ne comprend elle aussi qu'un seul membre chez *P. falciparum*.

- ◆ **Des kinases atypiques (aPKs)** comme les autres eucaryotes (*LaRonde-LeBlanc and Wlodawer 2005*) :
 - ◆ 3 kinases à lipides de type Kinase à Phosphatidylinositol (PI3K)
 - ◆ 2 kinases de la famille ABC1 (Activity of bc1 complex)
 - ◆ 2 kinases de type RIO (Right Open reading frame)
- ◆ **Des kinases orphelines** ne pouvant être classées avec les kinases listées citées précédemment.

Tableau 6 : Présentation et essentialité des kinases de *P. falciparum*

Famille	Membres chez <i>P. falciparum</i> (<i>Talevich et al. 2012</i>)	Essentialité (stades sanguins) Rouge d'après (<i>Solyakov et al. 2011</i>) Souligné d'après (<i>M. Zhang et al. 2018</i>)
CMGC	CK2, CLK1, CLK3, CRK1, CRK3, CRK4, CRK5, GSK3, MAP1, MAP2, MRK, PK1, PK5, PK6, SRPK1, SRPK2, PF3D7_1316000, PF3D7_1338900	<u>CK2</u>, <u>CLK1</u>, <u>CLK3</u>, <u>CRK1</u>, <u>CRK3</u>, <u>CRK4</u>, <u>CRK5</u>, <u>GSK3</u>, <u>MAP2</u>, <u>MRK</u>, <u>PK5</u>, <u>PK6</u>, <u>SRPK1</u>, <u>SRPK2</u>, <u>PF3D7_1316000</u>, <u>PF3D7_1338900</u>
CAMK	CDPK1, CDPK2, CDPK3, CDPK4, CDPK5, CDPK6, CDPK7, KIN, PK2, PK9, PF3D7_0214600, PF3D7_0311400, PF3D7_0704500, PF3D7_0715300, PF3D7_1104900, PF3D7_1423600, PF3D7_1450000	<u>CDPK1</u>, <u>CDPK2</u>, <u>CDPK3</u>, <u>CDPK5</u>, <u>CDPK7</u>, <u>KIN</u>, <u>PK2</u>, <u>PK9</u>, <u>PF3D7_1450000</u>
FIKK	FIKK1, FIKK3, FIKK4.1, FIKK4.2, FIKK5, FIKK7.1, FIKK8, FIKK9.1, FIKK9.2, FIKK9.3, FIKK9.4, FIKK9.5, FIKK9.6, FIKK9.7, FIKK10.1, FIKK10.2, FIKK11, FIKK12, PF3D7_1371700	<u>FIKK3</u>, <u>FIKK9.5</u>
TKL	TKL1, TKL2, TKL3, TKL4, PF3D7_1106800	<u>TKL1</u>, <u>TKL3</u>
PEK	eIK1, eIK2, eIK4	<u>eIK4</u>
NEK	NEK1, NEK2, NEK3, NEK4	<u>NEK1</u>, <u>NEK4</u>
ARK (non monophylétique)	ARK1, ARK2, ARK3	<u>ARK1</u>, <u>ARK2</u>, <u>ARK3</u>
AGC	PKA, PKB, PKG	<u>PKA</u>, <u>PKB</u>, <u>PKG</u>
CK1	PF3D7_1136500	<u>PF3D7_1136500</u>
STE	PK8	
aPKs	ABCK1, ABCK2, PI3K, PI4K, RIO1, RIO2, PF3D7_0419900	<u>ABCK1</u>, <u>ABCK2</u>, <u>PI3K</u>, <u>PI4K</u>, <u>RIO1</u>, <u>RIO2</u>, <u>PF3D7_0419900</u>
Kinases orphelines	PK7, PF3D7_0321400, PF3D7_0503500, PF3D7_0823000, PF3D7_0926000, PF3D7_0926100, PF3D7_0926300, PF3D7_0928800, PF3D7_1121900, PF3D7_1145200, PF3D7_1148000, PF3D7_1247500, PF3D7_1331000, PF3D7_1428500, PF3D7_1433900, PF3D7_1441300, PF3D7_1474700	<u>PF3D7_0321400</u>, <u>PF3D7_0823000</u>, <u>PF3D7_0926300</u>, <u>PF3D7_1121900</u>, <u>PF3D7_1145200</u>, <u>PF3D7_1148000</u>

c. Le phosphatome de *Plasmodium*

Suivant la manière dont les domaines phosphatases sont recherchés par criblage *in silico*, le phosphatome de *Plasmodium* comprend 34 (Wilkes and Doerig 2008) à 69 membres (Khalife et al. 2013). En fonction de leur structure primaire, et de la structure tertiaire qui en découle, les phosphatases sont classées par familles (Chen, Dixon, and Manning 2017). Celles qui sont représentées chez *Plasmodium* sont présentées ci-dessous (Khalife et al. 2013; Pandey et al. 2014; Chen, Dixon, and Manning 2017; Yang and Arrizabalaga 2017) et dans le Tableau 7 :

- ◆ **Les Phosphatases à Sérine/Thréonine (PSPs)** sont divisées en 2 sous-familles :
 - ◆ Les Phosphoprotéine phosphatases (PPPs) sont exprimées sous la forme de sous-unités catalytiques. Leur localisation, spécificité de substrat et activité enzymatique sont régulées via des interactions avec d'autres protéines qui font alors office de sous-unités régulatrices. La PP1 sera présentée en partie IV de ce manuscrit.
 - ◆ Les Protéines Phosphatases Métal-dépendantes (PPMs) ont besoin d'ions Mg^{2+} et/ou Mn^{2+} pour être actives. Contrairement aux PPPs, les PPMs comportent des domaines de régulation en plus de leur site catalytique.
- ◆ **Les Phosphatases HAD-like** (Haloacide Déhalogénase-like) : cette famille inclut, entre autres, les phosphatases de type NIF (NLI interacting factor-like phosphatase). Ces dernières sont des Protéines Phosphatases 'Aspartate-based' ou FCP/SCP qui hydrolysent les monoesters de phosphate par un mécanisme utilisant des Aspartates situés dans leur site catalytique (DxDT/V).
- ◆ **Les Phosphatases à Tyrosine (PTPs)** sont divisées en trois sous-familles :
 - ◆ Les Phosphatases à Tyrosine classiques et les Phosphatases à Double Spécificité (i.e. capables de déphosphoryler des Sérines, des Thréonines et des Tyrosines phosphorylées).
 - ◆ Les Phosphatases de faible poids moléculaire qui ne sont pas représentées chez *Plasmodium*.
 - ◆ Les Phosphatases de type CDC25, qui ne sont pas non plus représentées chez *Plasmodium*.
- ◆ **Les Phosphatases Exonucléases/Endonucléases (EEPs)** sont des phosphatases comportant un domaine EEP. Leur famille inclut également des phosphatases de lipides. Ces dernières possèdent des domaines supplémentaires leur permettant d'hydrolyser des phospholipides.
- ◆ **Les Phosphatases à Histidine (HPs)** sont des phosphatases à S/T utilisant une Histidine de leur site actif comme accepteur de groupement phosphate.
- ◆ **Les Phosphatases à Tyrosine-like (PTPLs)** sont divisées en trois sous-familles :
 - ◆ La PTPLA est une phosphatase à Tyrosine putative
 - ◆ Les phosphatases comportant un domaine RHOD (homologue à la rodanèse) qui sont au nombre de deux chez *Plasmodium*
 - ◆ La phosphatase CYTH-like (Triphosphate Tunnel Metaloenzyme Phosphatase)
- ◆ **Les Phosphatases orphelines** sont réparties en quatre sous-familles :
 - ◆ Les Phosphatases Acide 2-Phosphatidique like (PAP2-like)
 - ◆ Les Phosphatases Syja-N comportent un domaine N-ter similaire à celui de la protéine inositol-5-phosphatase synaptojanine
 - ◆ La Phosphatase Peptidyl-tRNA Hydrolase de type 2 (PTH2)
 - ◆ Les Phosphatases à Nucléoside GDA1_CD39 sont potentiellement capables de déphosphoryler des nucléotides.

Tableau 7 : Présentation et essentialité des Phosphatases de *P. falciparum*

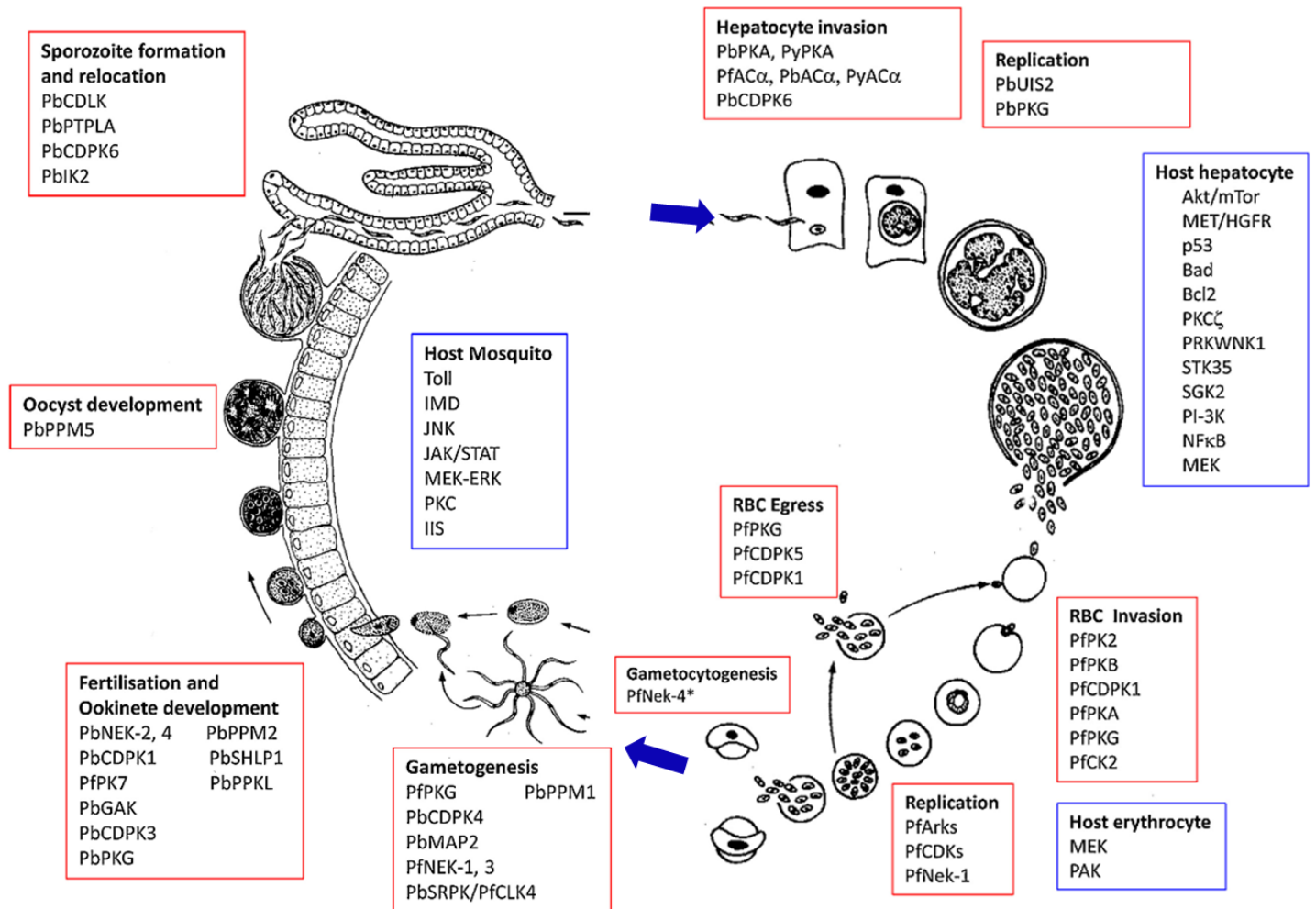
Famille / Sous-Famille	Membres chez <i>P. falciparum</i> (<i>Pandey et al. 2014</i>)	Essentialité (stades sanguins) Rouge d'après (<i>Guttery et al. 2014</i>) ; souligné d'après (<i>M. Zhang et al. 2018</i>)
PSPs /PPPs	PP1 (partie IV), PP2A (PP6), PP2B (CNA), PPβ, PP4, PP5, PP7, PP8, PPKL, CPPED1, DBR1, GAP50, Mre11, SHLP1, SHLP2, Vps29, UIS2, PF3D7_0912400	<u>PP1</u>, <u>PP2A (PP6)</u>, <u>PP2B(CNA)</u>, <u>PPβ</u>, <u>PP4</u>, <u>PP5</u>, <u>PP7</u>, <u>PP8</u>, <u>PPKL</u>, <u>CPPED1</u>, <u>DBR1</u>, <u>GAP50</u>, <u>SHLP1</u>, <u>SHLP2</u>, <u>Vps29</u>
PSPs /PPMs	PPM1, PPM2, PPM3, PPM4, PPM5, PPM6, PPM7, PPM8, PPM9, PPM10, PPM11	<u>PPM2</u>, <u>PPM6</u>, <u>PPM8</u>, <u>PPM9</u>
HAD-like	HAD3, NIF2, NIF3, NIF4, PNKP, PNPase, TIM50, PF3D7_0303200, PF3D7_0817400, PF3D7_1118400	<u>HAD3</u>, <u>NIF3</u>, <u>NIF4</u>, PNKP, <u>TIM50</u>, <u>PF3D7_0303200</u>, <u>PF3D7_0817400</u>
PTPs	PTP1, PRL, YVH1, PF3D7_1127000	<u>PRL</u>, <u>YVH1</u>
EEPs	PF3D7_0107200, PF3D7_0305600, PF3D7_0319200, PF3D7_0705500, PF3D7_1111600, PF3D7_1238600, PF3D7_1363500, PF3D7_1430600	<u>PF3D7_0305600</u>, <u>PF3D7_0705500</u>, <u>PF3D7_1111600</u>
HPs	PGM1, PGM2, PF3D7_0208400, PF3D7_0310300, PF3D7_1430300	<u>PGM1</u>, <u>PGM2</u>
PTPLs /PTPLA	PTPLA	<u>PTPLA</u>
PTPLs /RHOD	MKP1, PF3D7_1206400	
PTPLs /CYTH-like	PRT1	
Orphelines /PAP2-like	PAP.1 (PF3D7_0625000.1), PAP.2 (PF3D7_0625000.2), PF3D7_0805600	
Orphelines /Syja-N	SAC1, PF3D7_0705500, PF3D7_0805600	<u>PF3D7_0705500</u>
Orphelines /PTH2	PF3D7_0610500	<u>PF3D7_0610500</u>
Orphelines /Phosphatases GDA1_CD39	PF3D7_1322000, PF3D7_1431800	<u>PF3D7_1322000</u>

d. La balance phosphorylation/déphosphorylation à l'œuvre

Les criblages systématiques de l'essentialité des gènes encodant des kinases et des phosphatases, ainsi que la caractérisation fonctionnelle de certaines kinases ou familles de kinases, ont permis d'en apprendre plus sur le rôle de plusieurs de ces enzymes aux différentes phases du cycle de vie de *P. berghei* et *P. falciparum*. Des cascades de transduction responsables du déclenchement et du bon déroulement de certaines étapes du développement du parasite commencent ainsi à être comprises ((Doerig et al. 2015; Carvalho et al. 2016) - Figure 15) :

- ♦ **Invasion des globules rouges** : *Pf*PKG phosphoryle *Pf*CDPK1 au pôle apical des mérozoïtes, puis cette dernière, de concert avec *Pf*PKB, phosphoryle *Pf*GAP45 (composant de l'IMC qui joue un rôle clé dans l'invasion des érythrocytes). La fonction des protéines permettant l'ancrage du mérozoïte à sa future cellule-hôte est également régulée par phosphorylation : *Pf*PKA phosphoryle la partie de *Pf*AMA1 qui reste cytoplasmique, tandis que *Pf*CK2 procède de manière similaire avec *Pf*RH4 (Reticulocyte binding Homolog 4).
- ♦ **Initiation de la gamétogénèse** : elle se déroule en une quinzaine de minutes. La baisse de température due au passage de l'hôte intermédiaire vers l'hôte définitif et la présence d'acide xanthurénique dans l'estomac du moustique activent les Guanylate Cyclases de *P. berghei* qui produisent du GMP cyclique. La *Pb*PKG est donc activée et phosphoryle *Pb*PI3K et *Pb*PI4K, qui produisent du phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphatase (PIP₂). Ce dernier est alors pris en charge par la *Pb*PI-PLC (Phosphoinositolide-specific Phospholipase C) pour donner de l'inositol-(1,4,5)-triphosphate (IP₃). Ce dernier, à priori, déclenche le relargage d'ions Ca²⁺ dans le cytoplasme des gamétocytes. Ces ions Ca²⁺ activent plusieurs CDPK (1 et 4) de *P. berghei*, ainsi que la calcineurine chez les gamétocytes mâles, et inhibent l'activité des Guanylate Cyclases (boucle de rétroaction). Les enzymes activées par les ions Ca²⁺ déclenchent alors la maturation des gamétocytes selon des processus qui ont déjà été évoqués plus haut (i.e. préparation des gamètes femelles pour la fécondation et exflagellation des mâles). Les voies de transduction du signal en aval ne sont pas encore connues. Il est en revanche intéressant de noter que *Pb*CDPK1 est activée aussi bien chez les gamétocytes femelles que chez les mâles ; elle est également exprimée au cours du cycle intra-érythrocytaire de *Plasmodium* où elle joue un rôle clé dans les processus d'invasion et de sortie des érythrocytes (Carvalho et al. 2016; Bennink, Kiesow, and Pradel 2016).

En plus de jouer un rôle clé pour l'invasion et la sortie des cellules hôtes, la réplication, la différenciation, la motilité et l'activation de certains stades de développement, mais aussi la gestion de différents stress (nutritif, notamment), la phosphorylation intervient également dans les relations hôte-pathogène. Ainsi, l'activation des kinases MEK et PAK1 des érythrocytes favorise le développement intra-érythrocytaire de *Plasmodium*, mais aussi son développement dans l'estomac du moustique et dans les hépatocytes (Sicard et al. 2011; Carvalho et al. 2016). En conséquence, il a été proposé, et validé *in vitro*, que des inhibiteurs de kinases ciblant le parasite ou ses cellules hôtes potentielles soient développés et constituent une alternative antipaludique (Doerig et al. 2005; Derbyshire et al. 2014; Mitcheson, Tobin, and Alam 2015; Hallyburton et al. 2017).



Carvalho et al., Molecular & Biochemical Parasitology, 2016

Figure 15 : Schéma présentant quelques kinases et phosphatases clés pour l'accomplissement des différentes phases du cycle de vie de *Plasmodium* chez son hôte intermédiaire (à droite) et son hôte définitif (à gauche). Les enzymes du parasite (*P. berghei* = Pb, *P. falciparum* = Pf, *P. yoelii* = Py) sont présentées dans des cadres rouges. Les kinases des hôtes dans des cadres bleus.

Tiré de Carvalho et al. 2016.

IV. La Protéine Phosphatase de type 1

La Protéine Phosphatase de type 1 (PP1) est la première phosphatase à avoir été découverte (*Brautigan 2013*). Cette phosphatase à Sérine/Thréonine appartient à la famille PPP (Phosphoprotein phosphatase) évoquée dans la partie précédente de ce manuscrit (*Khalife et al. 2013*). Les phosphatases membres de la famille des PPP sont exprimées sous la forme de sous-unités catalytiques capables d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques qui font office de sous-unités régulatrices (*Yang and Arrizabalaga 2017*). Ainsi, chez les mammifères, 3 isoformes de sous-unités catalytiques PP1, notées PP1c, (α , β/δ et γ) sont encodées par des gènes différents et sont capables d'interagir avec plus de 200 sous-unités régulatrices, formant ainsi une multitude d'holoenzymes, notées PP1 (*Verbinnen, Ferreira, and Bollen 2017*). D'un point de vue moléculaire, PP1c est une sous-unité catalytique comportant de nombreux sillons capables d'accueillir différents motifs d'interaction présents sur les sous-unités régulatrices (*Figure 16*).

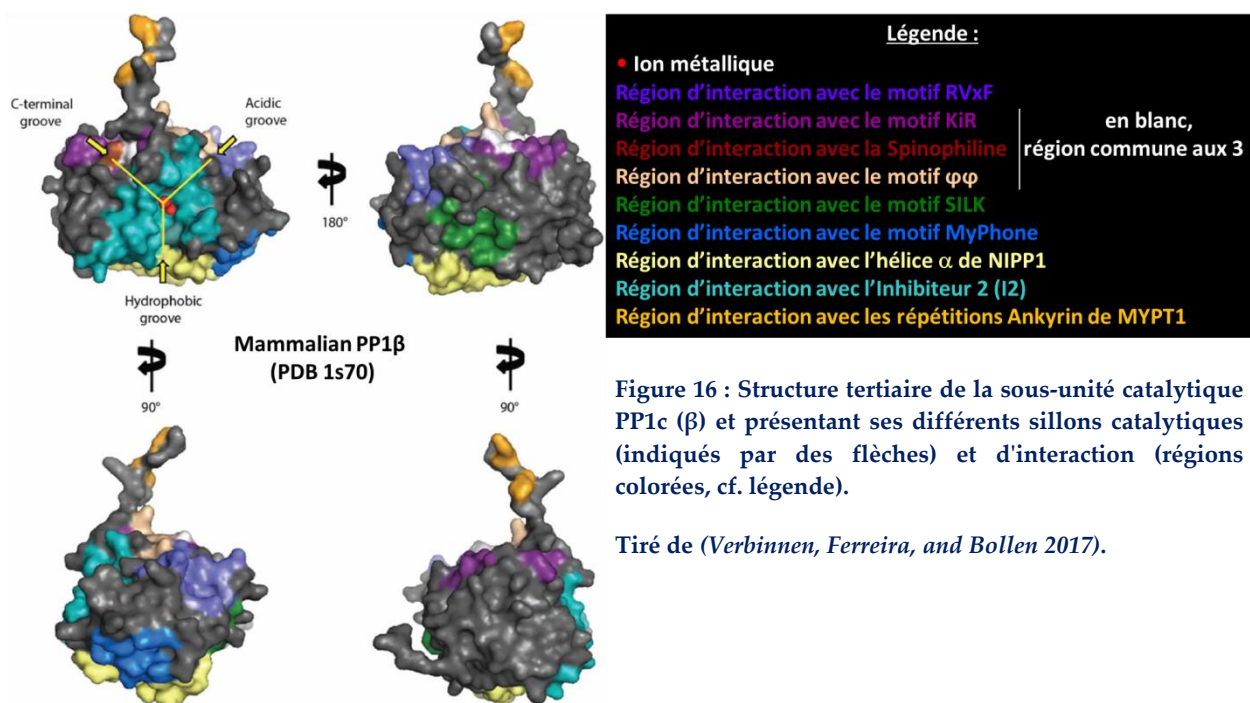


Figure 16 : Structure tertiaire de la sous-unité catalytique PP1c (β) et présentant ses différents sillons catalytiques (indiqués par des flèches) et d'interaction (régions colorées, cf. légende).

Tiré de (*Verbinnen, Ferreira, and Bollen 2017*).

Verbinnen et al, Biochemical Society Transactions, 2017

Les sous-unités régulatrices interagissent avec PP1c au moyen de domaines entiers (comme les répétitions Leucine-Rich chez Sds22 ou Ankyrin chez MYPT1) ou via un à plusieurs motif(s) d'interaction de quelques acides aminés de longueur (RVxF, FKK, SILK, $\varphi\varphi$, ainsi nommés à partir des acides aminés qu'ils contiennent et qui leur confère un potentiel de liaison à PP1c - (*Khalife and Pierrot 2016*)). Les surfaces d'interaction ainsi créées (1500 à 5000 Å²) recouvrent 5 à 20% de la surface de PP1c et impactent plus ou moins sa structure, notamment celles des sillons acide, hydrophobe et C-ter qui encadrent son site catalytique, et, donc, sa fonction (*Figure 16*, (*Verbinnen, Ferreira, and Bollen 2017*)). Le code de liaison à PP1c est par ailleurs très précis (*Verbinnen, Ferreira, and Bollen 2017*) :

- ♦ **Spécifique** : les sous-unités régulatrices de PP1c n'interagissent pas avec d'autres PPP
- ♦ **Universel** : PP1c étant conservée à plus de 80% dans le règne des eucaryotes (*Bhattacharyya et al. 2002*), le code de liaison à la sous-unité catalytique est le même quel que soit l'eucaryote

- ◆ **Recouvrant** : deux motifs d'interaction ciblant le même sillon sur PP1c ne peuvent se combiner pour interagir en même temps ; le premier à interagir avec le sillon de PP1c empêchera le second de faire de même – premier arrivé, premier servi !
- ◆ **Dégénéré** : des variabilités dans la séquence des motifs d'interaction induisent des différences d'affinité avec PP1c
- ◆ **Non exclusif** : PP1c peut interagir avec plus d'une sous-unité régulatrice si les différents partenaires protéiques lient des régions ou sillons différents sur la sous-unité catalytique
- ◆ **Dynamique** : les partenaires de PP1c sont en compétition pour lier la sous-unité catalytique, suivant les motifs d'interaction qu'ils contiennent et l'affinité de l'interaction qu'ils sont capables d'instaurer avec la phosphatase.

Les sous-unités régulatrices jouent un rôle de premier plan dans la régulation de l'activité enzymatique de PP1c. En effet, PP1c est l'une des phosphatases les plus actives ; elle présente une telle affinité avec l'intermédiaire réactionnel du groupement phosphate à retirer, qu'elle multiplie par 10^{21} le taux de réaction de déphosphorylation (*Lad, Williams, and Wolfenden 2003; Verbinen, Ferreira, and Bollen 2017*). Une sous-unité catalytique PP1c seule est donc une véritable « machine de guerre » qui déphosphoryle tout sur son passage, comme l'illustrent les expériences de Chatterjee et al. montrant que sa surexpression entraîne la mort de la cellule (*Chatterjee et al. 2012*). Pour maintenir la balance phosphorylation/déphosphorylation, il est donc primordial de maîtriser la « puissance déphosphorylatrice » de PP1c en modulant son activité, sa spécificité de substrat, et en l'orientant dans l'espace et dans le temps (*Khalife and Pierrot 2016*). Ces mécanismes de régulation sont d'autant plus importants que PP1c est exprimée de manière abondante (jusqu'à 250.000 copies dans les cellules des souches cancéreuses HeLa) et ubiquitaire (*Verbinen, Ferreira, and Bollen 2017*). C'est là que les sous-unités régulatrices prennent toute leur importance :

- ◆ Contrairement à la PP1c, les sous-unités régulatrices sont exprimées à différentes phases du cycle cellulaire ; elles peuvent donc se relayer au chevet de la/des sous-unité(s) catalytique(s) PP1c pour laquelle/lesquelles elles présentent une certaine affinité afin de contrôler sa/leur localisation et/ou son/leur activité (*G. S. Kumar et al. 2016; Verbinen, Ferreira, and Bollen 2017*).
- ◆ Certaines sous-unités régulatrices sont capables de réguler la localisation de PP1c. Ainsi, dès qu'il est exprimé, NIPP1 (Nuclear Inhibitor of PP1) recrute spécifiquement PP1 α et γ au noyau (*Trinkle-Mulcahy, Sleeman, and Lamond 2001*).
- ◆ Certaines sous-unités régulatrices sont capables de moduler la spécificité de substrat de la phosphatase. Ainsi, la Spinophiline recrute la PP1 α neuronale aux synapses. Son interaction avec la PP1c n'induit pas de changement drastique de charge ou de repliement dans la sous-unité catalytique. Pourtant, les subtiles modulations de la structure de la sous-unité catalytique induites par cette interaction orientent sa spécificité de substrat, en l'empêchant notamment de déphosphoryler la phosphorylase *a* sans impacter sa capacité à déphosphoryler d'autres substrats neurone-spécifiques (*Ragusa et al. 2010*).
- ◆ Certaines sous-unités régulatrices sont capables d'inhiber l'activité phosphatase. C'est le cas, par exemple, de l'Inhibiteur 2 (I2). Cette sous-unité régulatrice de PP1c est conservée chez tous les eucaryotes. Son expression est à son niveau le plus élevé pendant la mitose, où il joue un rôle clé dans la régulation de la kinase Aurora B (qui est notamment impliquée dans la validation des points de contrôle du cycle cellulaire, l'alignement des chromosomes et la complétion de la

cytokinèse) et de PP1c. I2 inhibe PP1c qui, elle, inhibe Aurora B en la déphosphorylant. I2 tient ainsi un rôle important dans l'orchestration des différentes étapes de la mitose (W. Wang, Stukenberg, and Brautigan 2008). Par ailleurs, l'Inhibiteur 2 est pressenti pour jouer un rôle dans la biogénèse de PP1c, et notamment dans l'incorporation des ions divalents Fe^{2+} et Zn^{2+} dans son site catalytique (Verbinnen, Ferreira, and Bollen 2017; Heroes et al. 2015).

- ♦ Aux différents niveaux de régulation de l'activité phosphatase évoqués ci-dessus, s'ajoutent les MPTs ; la phosphorylation de PP1c (G. S. Kumar et al. 2016) ou celle des sous-unités régulatrices (Nasa et al. 2018), participe directement à la régulation de l'assemblage de plusieurs holoenzymes PP1. De plus, la compétition entre les sous-unités régulatrices, qui est liée à leur nombre et à leur affinité relative avec PP1c et avec leurs autres partenaires, influe également sur la formation de différentes holoenzymes PP1 (Verbinnen, Ferreira, and Bollen 2017).

La régulation de l'activité et de la localisation des holoenzymes PP1 leur permet de contrôler des processus cellulaires très variés comme la division cellulaire (Rebelo et al. 2015; Moura et al. 2017), la synthèse des protéines (Yang and Arrizabalaga 2017), la transcription, le trafic intracellulaire ou l'apoptose (Ceulemans and Bollen 2004) au niveau cellulaire et, à l'échelle d'un organe, des processus importants comme la contraction musculaire (Lacampagne, Fauconnier, and Richard 2008) ou la plasticité synaptique (Munton, Vizi, and Mansuy 2004). Cette liste est loin d'être exhaustive, mais permet de présumer de l'essentialité des holoenzymes PP1 (c'est-à-dire des sous-unités catalytiques, mais aussi des sous-unités régulatrices ainsi que des interactions entre elles) pour les cellules eucaryotes.

Chez *Plasmodium falciparum*, comme chez les autres apicomplexes, un seul isoforme de PP1c est exprimé (Yang and Arrizabalaga 2017). *PfPP1c* est localisée dans le noyau et le cytoplasme du parasite, et est également exportée aux sillons de Maurer (Daher et al. 2006; Blisnick et al. 2006). Une étude basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de phosphatase, comme la calyculine A, qui inhibe spécifiquement PP1c, ou l'acide okadaïque qui cible préférentiellement PP2A, a montré qu'elle est la phosphatase majeure du parasite (Bhattacharyya et al. 2002). Diverses approches destinées à statuer sur l'essentialité de cette enzyme ont ensuite été entreprises. La première était basée sur l'utilisation de l'ARN interférence. Les parasites transfectés dans le cadre de cette étude n'ayant pas survécu, les auteurs ont conclu à l'essentialité de *PfPP1c* pour le cycle intra-érythrocytaire du parasite (R. Kumar et al. 2002). Cependant, ces résultats sont à relativiser car, comme évoqué plus haut, *Plasmodium* ne dispose pas du dispositif enzymatique nécessaire pour permettre au système d'ARN interférence de fonctionner (Baum et al. 2009). La mortalité observée par Kumar et al pourrait peut-être s'expliquer par une toxicité intrinsèque de l'ARN utilisé. Les essais d'interruption de *PfPP1c* effectués chez les stades sanguins dans les années qui ont suivi ont tous été infructueux, montrant ainsi la vraisemblable essentialité de cette enzyme à cette phase du cycle de vie de *Plasmodium* (Guttery et al. 2014; M. Zhang et al. 2016). Ces informations ont été confirmées plus récemment en utilisant un système d'insertion de transposons PiggyBac chez *P. falciparum* (M. Zhang et al. 2018). En parallèle, une étude, basée cette fois sur l'utilisation d'un système de KO conditionnel où le gène d'intérêt est remplacé par une cassette de résistance au stade sporozoïte, a été effectuée chez *P. berghei* (M. Zhang et al. 2016). Lorsque l'expression de *PbPP1c* a ainsi été abolie, les parasites n'ont présenté aucun défaut de développement ni au stade sporozoïte, ni aux stades hépatiques. Néanmoins, par la suite, les parasites KO pour *PbPP1c* n'ont pas pu établir d'infection des érythrocytes, confirmant ainsi l'essentialité de *PbPP1c* pour le développement intra-érythrocytaire des parasites. La fonction de la PP1c

de *Plasmodium* lors de l'émergence puis de l'activation des gamétocytes, ainsi que lors de la fécondation des gamètes et du développement des ookinètes, n'est donc pas connue à ce jour.

Au sein de l'équipe 2 du CIIL, plusieurs sous-unités régulatrices de PfPP1c conservées, et identifiées par génomique comparative, ont été caractérisées : Leucine-Rich Repeat 1 (LRR1, (Daher et al. 2006)), Inhibiteur 2 (I2, (Fréville et al. 2013, 2014)), Inhibiteur 3 (I3, (Fréville et al. 2012)), eukaryotic Initiation factor 2 β (eIf2 β , (Tellier et al. 2016)). Différentes approches de criblage d'interactions protéine-protéine ont ensuite permis d'identifier des partenaires de PfPP1c spécifiques de *Plasmodium* (Hollin et al. 2016). Nous y reviendrons plus tard dans la partie Cadre & Objectifs de ce manuscrit.

La capacité des motifs d'interaction, notamment RVxF qui est présent chez 70% des sous-unités régulatrices de PP1c (Rebello et al. 2015), à interagir fortement et très localement avec un sillon de PP1c a mené à des approches d'inhibition des interactions permettant la formation d'holoenzymes PP1 basées sur l'utilisation de molécules ou de peptides mimant des motifs d'interaction comme RVxF (Guerignon et al. 2006; Godet et al. 2010; Chatterjee et al. 2012; Ammosova et al. 2012; Brautigam 2013). Ces approches se sont avérées particulièrement efficaces dans l'inhibition du développement de *Plasmodium falciparum* *in vitro* (Pierrot et al. 2012; Fréville et al. 2014; Pierrot et al. 2018). Elles s'ajoutent aux études de l'essentialité de PP1c effectuées chez *Plasmodium*, notamment en démontrant l'importance des interactions protéine-protéine à l'origine de la création des holoenzymes PP1 pour la (sur)vie du parasite.

V. Kinases et pseudokinases

Nous avons présenté plus haut les kinases de *Plasmodium*, et notamment leurs classes, celles qui sont essentielles à une ou plusieurs phases de développement du parasite, etc. sans pour autant mentionner leur structure et la manière dont elles catalysent les réactions de phosphorylation. Nous allons donc évoquer dans cette dernière partie de l'introduction les caractéristiques structurales (primaire à tertiaire) des kinases eucaryotes et leur implication dans la catalyse de la phosphorylation. Cela nous permettra de définir ensuite ce qu'est une pseudokinase, afin de faciliter la présentation du projet de thèse rapporté ici.

1. Les kinases de type Hanks

Suite à la découverte de la phosphorylation au milieu du XX^{ème} siècle, et de la PKA (Protéine Kinase A ou cAMP-dépendante Protéine Kinase A), l'identification et la caractérisation de kinases à Sérine/Thréonine (S/T) et à Tyrosine (Y) ont littéralement explosé (*Brautigan 2013*). Ainsi, à la fin du XX^{ème} siècle, Hanks et Hunter ont répertorié toutes les kinases eucaryotes alors caractérisées et ont effectué un alignement de 60 séquences de kinases appartenant à différentes familles. Cette analyse leur a permis d'identifier 12 sous-domaines conservés à plus de 95% parmi toutes les kinases comparées. Au vu du taux de conservation de ces sous-domaines, qui présageait de leur importance dans la catalyse de réactions de phosphorylation, et en s'appuyant sur le cristal de la PKA α qui venait d'être publié, ils ont commencé à attribuer un rôle à chacun des sous-domaines (*Hanks, Quinn, and Hunter 1988; Hanks and Hunter 1995*). Il a par ailleurs été récemment proposé d'englober toutes les kinases à S/T, eucaryotes ou non, dans une même appellation, les kinases de type Hanks, car elles comportent toutes la même signature composée des 12 sous-domaines définis par Hanks et Hunter (*Stancik et al. 2018*). Au début du XXI^{ème} siècle, les cristaux de plusieurs autres kinases de type Hanks ont été publiés, puis examinés et comparés les uns aux autres afin de définir le cœur du domaine, les différentes conformations qu'il adopte au cours de la catalyse de la phosphorylation et de mettre en lumière les différences existant entre kinases (*Taylor et al. 2012*).

a. Domaine kinase

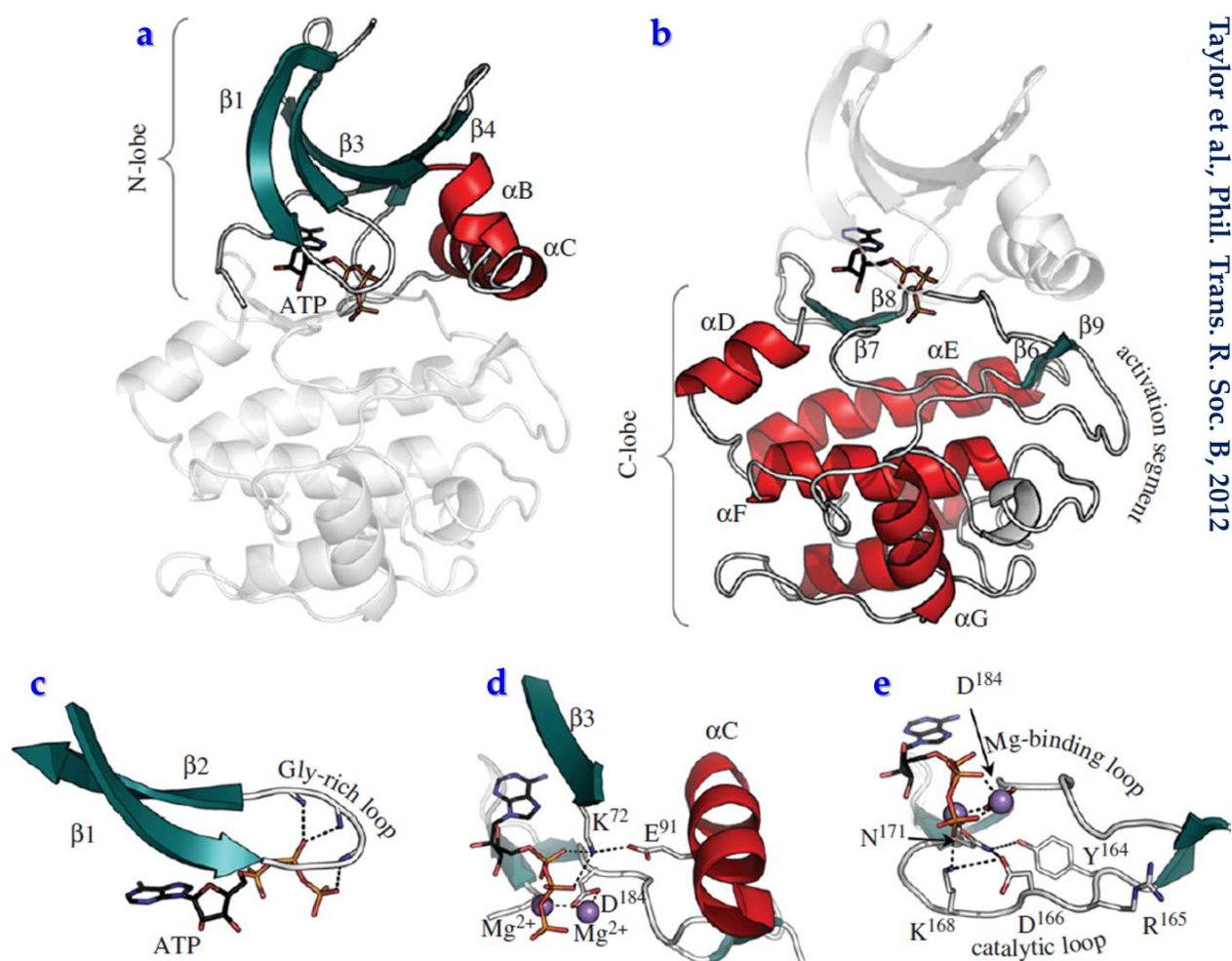
Un domaine kinase est composé de 250 à 300 acides aminés qui se replie en deux lobes : un lobe N-terminal essentiellement composé de brins β antiparallèles (brins β 1 à 5, une à deux hélice(s) α) (*Figure 17a*) et un lobe C-terminal essentiellement composé d'hélices α (4 petits brins β et 6 hélices α) (*Figure 17b*) (*Hanks, Quinn, and Hunter 1988*). Le lobe N-ter comporte les sous-domaines I à IV définis par Hanks et Hunter et est spécialisé dans l'accommodation de l'ATP (*Hanks and Hunter 1995; Taylor et al. 2012*) :

- ◆ Sous-domaine I : il est constitué d'une triade de glycines qui est localisée dans une boucle entre les brins β 1 et 2 du lobe N-ter (*Figure 17c*). Cette boucle, particulièrement flexible, est localisée entre deux brins β qui maintiennent l'ATP dans le site catalytique. Elle comporte divers acides aminés polaires non chargés (Sérine, Thréonine, Arginine) qui forment des liaisons hydrogène avec les groupements phosphates de l'ATP et permettent d'orienter le phosphate γ de l'ATP vers le site catalytique du domaine kinase (*Figure 17c*). La fonction de cette boucle est modulée par la composition de sa structure primaire, et parfois par phosphorylation chez certaines kinases (*Bossemeyer 1994*).
- ◆ Sous-domaine II : il est caractérisé par une lysine dont la chaîne latérale plonge dans le site catalytique (K72 sur la *Figure 17d*) et stabilise les groupements phosphate de l'ATP (α et β lorsque

la kinase est en conformation inactive, et β et γ lorsque la kinase est en conformation active). Cette Lysine est l'un des sous-domaines indispensables à la fonction catalytique d'un domaine kinase (Manning et al. 2002).

- ◆ Sous-domaine III : il contient un glutamate qui se situe dans l'hélice αC du lobe N-ter (E91 sur la Figure 17d). Ce glutamate facilite la stabilisation de la conformation active du domaine kinase en formant une liaison hydrogène avec la lysine du sous-domaine II.
- ◆ Sous-domaine IV : il a été repéré par Hanks et Hunter parce qu'il contenait un acide aminé conservé entre toutes les séquences de domaine kinase alignées alors. Cependant, il ne semble pas impliqué dans l'activité kinase.

Vient ensuite le sous-domaine V, qui est une région hydrophobe non structurée séparant les deux lobes du domaine kinase ; cette région est donc appelée « région inter-lobe ». Son rôle dans l'accommodation de l'ATP sera développé par la suite.



Taylor et al., Phil. Trans. R. Soc. B, 2012

Figure 17 : Présentation de la structure du domaine kinase de la PKA tirée de Taylor et al. 2012 – les brins β sont en vert et numérotés de 1 à 9, les hélices α sont en rouge et nommées de A à G. Les liaisons hydrogènes sont symbolisées par des segments en pointillés a) Lobe N-terminal b) Lobe C-terminal c) Zoom sur le sous-domaine I (la triade de Glycines maintenant l'ATP dans le site catalytique de la kinase) d) Zoom sur les sous-domaines II (K72) et III (E91) et leur contribution à la stabilisation de l'ATP e) Zoom sur les sous-domaines VIb ($^{165}RDxKxxN^{171}$, boucle catalytique) et VII (D184 du motif DFG) et leur contribution à la stabilisation de l'ATP.

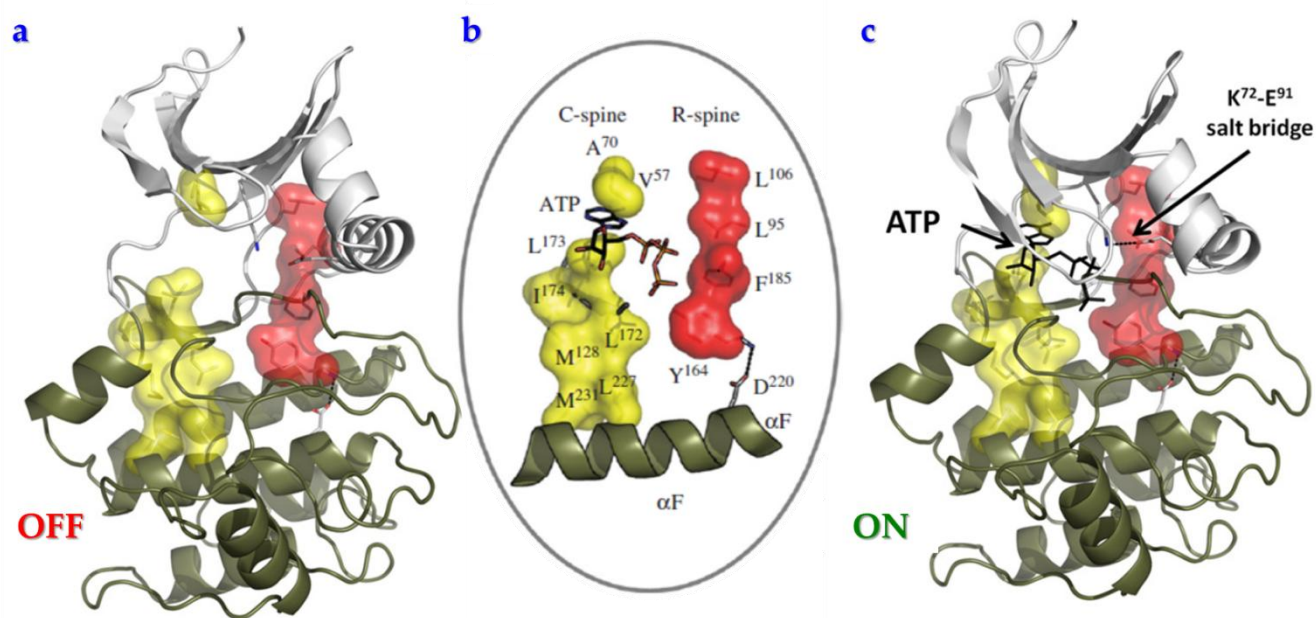
Le lobe C-ter comporte les sous-domaines VI à XI définis par Hanks et Hunter et qui sont impliqués dans la catalyse de la phosphorylation et la reconnaissance du substrat. Une petite plateforme de brins β courts forme le fond du site catalytique du domaine et repose sur un cœur plus compact d'hélices α ((*Hanks and Hunter 1995; Taylor et al. 2012*) – [Figure 17b](#)) :

- ◆ Sous-domaine VIa : cette région a été identifiée de manière similaire au sous-domaine IV et joue potentiellement un rôle de stabilisation de certaines conformations du domaine kinase. Il ne semble pas jouer de rôle précis dans l'activité kinase.
- ◆ Sous-domaine VIIb : ce sous-domaine se replie en deux petits brins β (6 et 7, [Figure 17e](#)). Entre eux se trouve la boucle catalytique du domaine kinase HRDxKxxN pour les kinases à S/T et plutôt HRDxAARN pour les kinases à Y (*Araki et al. 2014*). L'aspartate (D166 sur la [Figure 17e](#)) de cette boucle catalytique est responsable des transferts de groupement phosphate et ses acolytes Lysine (K168 sur la [Figure 17e](#)) et Asparagine (N171 sur la [Figure 17e](#)) lui facilitent la tâche en stabilisant les ions Mg^{2+} cofacteurs de l'activité kinase et le groupement phosphate γ de l'ATP (*Pérez-Gallegos et al. 2014*).
- ◆ Sous-domaine VII : ce sous-domaine est localisé entre les feuillets β 8 et 9 du lobe C-ter ; il s'agit de la boucle de liaison aux ions Magnésium (« Mg-binding loop » sur la [Figure 17e](#)). Ces derniers sont des cofacteurs de l'activité kinase importants qui prennent part au positionnement de l'ATP et facilitent le transfert du groupement phosphate γ de l'ATP au substrat (*Pérez-Gallegos et al. 2014*). Le sous-domaine VII contient le motif « DFG » très conservé dont l'aspartate (D184 sur la [Figure 17e](#)) est directement impliqué dans la stabilisation des ions Mg^{2+} .
- ◆ Sous-domaine VIII : il contient le motif très conservé « APE » dont le rôle sera développé un peu plus tard. Entre les sous-domaines VII et VIII se trouve la boucle d'activation (« activation segment » sur la [Figure 17b](#)) dont le repliement et la fonction peuvent être modulés par phosphorylation, et dont la structure primaire (i.e. sa composition en acides aminés) et la longueur influencent sa fonction (*Nolen, Taylor, and Ghosh 2004*).
- ◆ Sous-domaine IX : il s'agit de l'hélice α F ; elle est probablement plutôt impliquée dans des interactions de stabilisation du lobe C-ter et de soutènement de la plateforme du site actif.
- ◆ Sous-domaines X et XI : malgré leur conservation, leur rôle est plutôt obscur et probablement proche de celui du sous-domaine IX.

b. Conformations ON/OFF

Les kinases possédant la signature des 12 sous-domaines de Hanks, qui sont donc des kinases « classiques », changent de conformation de manière très dynamique (suivant des processus de régulation qui seront évoqués dans la sous-partie juste après) (*Taylor and Kornev 2011*). Un ensemble d'interactions de différentes sortes s'instaurent entre les sous-domaines définis ci-dessus et permettent la formation de deux colonnes vertébrales ('spine' en anglais) au sein du domaine kinase : la colonne « C » pour « catalytic » et la colonne « R » pour « regulatory » ((*Kornev and Taylor 2010*) - [Figure 18](#)). La colonne « C » (en jaune sur la [Figure 18](#)) résulte de la superposition de plusieurs chaînes latérales hydrophobes, de la région inter-lobe notamment, qui s'empilent de part et d'autre de l'adénine de l'ATP, la bloquant ainsi au fond du site catalytique ([Figure 18b](#)). La colonne « R » résulte aussi de l'empilement de chaînes hydrophobes : une tyrosine ou une histidine légèrement en amont de la boucle catalytique (Y164 sur la

Figure 18b), la phénylalanine du motif DFG (F185 sur la Figure 18b) et d'autres résidus hydrophobes du lobe N-ter (hélice α C et feuillet β 5). Le passage de la conformation OFF (Figure 18a) à la conformation ON (Figure 18c) ne se résume pas simplement à la formation/stabilisation de ces colonnes. Il coïncide parfois avec une rotation du motif DFG qui passe alors d'une configuration OUT à une configuration IN. Cette rotation est intimement liée aux mouvements des résidus alentour situés dans l'hélice α C ou proches de la boucle catalytique (Treiber and Shah 2013; Möbitz 2015). La phosphorylation de la boucle d'activation, qui débute avec le motif DFG, peut également impacter cette configuration IN (Nolen, Taylor, and Ghosh 2004). Enfin, d'autres interactions peuvent se mettre en place pour renforcer la conformation ON du domaine kinase : liaison hydrogène entre la Lysine du sous-domaine II et le Glutamate du sous-domaine III (schématisé sur la Figure 18c), liaison similaire entre le Glutamate du motif APE et une Arginine située entre les hélices α H et I du lobe C-ter, etc. (Taylor et al. 2012). Toutes ces données démontrent l'existence d'un cœur catalytique commun à toutes les kinases. Ainsi, une kinase chez qui les colonnes C et/ou R sont brisées n'est pas active (Taylor et al. 2012; Chao and Avruch 2019). Des comparaisons des surfaces de plusieurs cristaux de kinases ont permis de démontrer que ces changements de conformation, qui visent à stabiliser l'ATP au sein du site catalytique pour faciliter la catalyse de la phosphorylation, peuvent comporter des spécificités d'une kinase à une autre, comme des poches plus ou moins spacieuses ou accessibles (Kornev et al. 2006; Thompson et al. 2009). Enfin, dans le brin β 5 du lobe N-ter, au début du sous-domaine V, se trouve un acide aminé appelé « gatekeeper ». Sa chaîne latérale est suspendue au-dessus du site catalytique, entre les colonnes C et R (Kornev and Taylor 2010). La taille de cette chaîne, qui est spécifique à chaque kinase, va donc impacter l'accès au site catalytique.



Kornev & Taylor, Biochimica et Biophysica Acta, 2010 – Taylor et al. Phil. Trans. R. Soc. B, 2012

Figure 18 : Schémas des conformations ON et OFF des domaines kinases d'après Kornev and Taylor 2010 et Taylor et al. 2012. La colonne « C » comme Catalytic (C-spine) est en jaune et la colonne « R » comme Regulatory (R-spine) est en rouge. a) Conformation OFF = inactive b) Acides aminés impliqués dans la formation des colonnes C et R c) Conformation ON = active.

c. Régulation de l'activité kinase

Aux changements de conformation dynamiques évoqués ci-dessus, s'ajoutent divers modes de régulation de l'activité kinase (*Hunter 1987; Kornev and Taylor 2010*) :

- ◆ Des modulations par MPT, principalement par phosphorylation, dans la boucle catalytique, dans la boucle de la triade de glycines ou ailleurs dans le domaine catalytique, induisent des changements conformationnels et peuvent donc activer ou inhiber l'activité kinase (*Doerig et al. 2015*).
- ◆ Certaines kinases, comme la kinase à S/T PKA ou la kinase à Y BTK (Bruton's Tyrosine Kinase), comportent des domaines de régulation en amont et en aval du domaine kinase et qui sont capables d'interagir avec ce dernier pour le stabiliser, soit en conformation active soit en conformation inactive (*Taylor et al. 2012; Q. Wang et al. 2015*). D'autres kinases forment des complexes avec des partenaires protéiques. C'est le cas de la kinase à S/T mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (*Chao and Avruch 2019*). La force des interactions mises en place entre une kinase et ses différents partenaires, les variations de l'expression de ces derniers au cours du cycle cellulaire, les modulations de leur structure et de leur capacité d'interaction avec la kinase par MPT sont tous autant de facteurs qui modulent la formation de complexes protéiques et, donc, de l'activité kinase.
- ◆ Certaines kinases sont dépendantes de cofacteurs spécifiques leur permettant d'adopter une conformation 'ON'. C'est le cas de la PKA (qui est cAMP-dépendante), des kinases cycline-dépendantes (CDK), ou encore des kinases calcium et/ou calmoduline-dépendantes (CDPK), par exemple (*Morgan 1995; Pérez-Gallegos et al. 2014; Simon, Huart, and Wilmanns 2015*). La présence de ces cofacteurs active la kinase suivant les mêmes processus que ceux décrits aux deux points précédents.
- ◆ La présence et la quantité de substrat(s) à phosphoryler peut également impacter l'activité kinase. En effet, les kinases ciblent un nombre de substrat(s) plus ou moins limité (*Taylor and Kornev 2011*). Elles possèdent donc des modes de reconnaissance de leur substrat (en général 3 acides aminés en amont et 3 en aval du site à phosphoryler) plus ou moins précis (i.e. des résidus spécifiques et/ou enfouis) selon leur spécificité de substrat (*Kobe et al. 2005; Turk 2008*). En fonction des kinases, la reconnaissance du substrat peut induire des changements de conformation suffisants pour l'activation du site catalytique et l'accommodation de l'ATP. Dans d'autres cas, c'est l'inverse qui se produit (*Taylor and Kornev 2011*).

Les points abordés au cours de ce chapitre démontrent la plasticité des domaines kinases, la diversité des modes de régulation de leur activité, alors qu'elles présentent globalement toutes le même cœur catalytique (*Huse and Kuriyan 2002*).

2. Les pseudokinases – être ou ne pas être... actives

Les pseudokinases sont des kinases auxquelles il manque un ou plusieurs des sous-domaines définis par Hanks et Hunter et qui joue(nt) un rôle clé dans la catalyse de la phosphorylation, c'est-à-dire principalement la lysine du sous-domaine II, l'aspartate du sous-domaine VIB et/ou l'aspartate du sous-domaine VII (motif DFG) (Eyers and Murphy 2013). Elles sont donc inactives d'un point de vue théorique. Chez l'Homme, l'on estime que les pseudokinases constituent 10% du kinome (soit une cinquantaine de pseudokinases sur 518 kinases) (Manning et al. 2002). Chez *Plasmodium*, 5 pseudokinases ont été identifiées sur les 66 kinases définies par Tewari et al. (Tewari et al. 2010).

Même si la frontière entre pseudokinases et kinases atypiques semble parfois ténue ou incomprise, il est important de distinguer ces deux classes de kinases. Les kinases atypiques (aPKs) présentent une activité enzymatique alors qu'elles ne présentent globalement pas de similarité de séquence importante avec les kinases de type Hanks ; en ce qui concerne leur structure tertiaire, certaines aPKs se replient de manière similaire aux kinases de Hanks, tandis que d'autres adoptent une structure complètement différente (Figure 19 – (LaRonde-LeBlanc and Wlodawer 2005)). Elles seraient au nombre de 40, réparties en 8 classes dans le kinome humain (Manning et al. 2002).

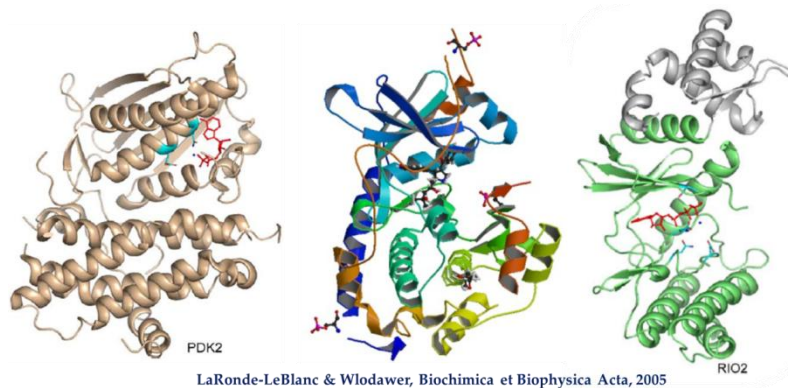


Figure 19 : Alignement des structures de deux kinases atypiques (PDK2 à gauche, RIO2 à droite) et de la PKA (au centre, PDB ID = 4UJB). La portion de RIO2 qui est structuralement proche de la PKA est colorée en vert. Adapté de LaRonde-LeBlanc and Wlodawer 2005.

a. Pseudokinases humaines

Plusieurs pseudokinases humaines ont été caractérisées :

- ♦ **CASK** (Ca^{2+} /calmodulin activated Ser-Thr kinase) ne possède pas de motif DFG et l'Aspartate de sa boucle catalytique est muté en Cystéine. Pourtant, la résolution de la structure de son site catalytique a montré que CASK se replie d'une manière assez similaire à une kinase de type Hanks. Elle comporte une triade de glycines et une paire Lysine-Glutamate similaire aux sous-domaines II et III des kinases de type Hanks. Elle est capable d'accommoder l'ATP dans son site catalytique de manière Mg^{2+} -indépendante ; elle présente une faible activité kinase (autophosphorylation et phosphorylation de la neurexine-1) qui est augmentée en présence d'EDTA mais inhibée en présence d'ions divalents. CASK présente ainsi une faible activité kinase dans un environnement pauvre en ions où les kinases calcium- et calmoduline-dépendantes sont inactives (Mukherjee et al. 2008; Kannan and Taylor 2008).

- ♦ **VRK3** (Vaccinia Related Kinase 3) ne possède pas de triade de glycines ni de motif DFG et l'Aspartate de sa boucle catalytique est muté en Asparagine. Le cristal de son domaine kinase seul a révélé que malgré tous ces manques/mutations, il se replie dans une conformation proche de celle de kinases VRK actives mais qu'il est incapable d'accommoder l'ATP ou des ions Mg^{2+} (Scheeff *et al.* 2009). Une étude plus récente a montré qu'un domaine régulateur en N-ter du domaine kinase est primordial pour lui conférer une activité kinase. VRK3 est alors capable de phosphoryler le facteur BAF (Barrier to Autointegration Factor) de manière modérée, contrairement à VRK1 qui phosphoryle BAF sur 3 sites. La modulation du niveau de phosphorylation de BAF pourrait permettre le contrôle de sa fonction cellulaire (i.e. réplication de l'ADN et contrôle de l'expression de gènes dans le premier cas, et l'hyperphosphorylation de BAF serait liée à la rupture de l'enveloppe nucléaire au cours de la mitose) (Park *et al.* 2015).
- ♦ **ERbB3/HER3** (Human Epidermal growth factor Receptor 3) comporte deux mutations : le Glutamate du sous-domaine II est muté en Histidine, tandis que l'Aspartate de la boucle catalytique est muté en Asparagine. Il est donc, en théorie, incapable de catalyser des phosphorylations. Pourtant, il accommode l'ATP et est capable de se *trans*-autophosphoryler avec un taux de réaction 1000 fois inférieur à celui d'autres récepteurs à l'EGF. Il est également capable de s'hétérodimériser avec ERbB2/HER2 et, donc, de s'impliquer dans la transduction du signal avec lui (Shi *et al.* 2010).

La liste est loin d'être exhaustive mais démontre que les différences structurales (primaire à tertiaire) des pseudokinases leur permet de présenter une activité parfois originale, et que sa modération (i.e. en comparaison avec une kinase active) permet d'orienter et/ou de mesurer son impact sur la fonction du substrat et, par extension, la régulation des processus biologiques qui en découlent (Eyers and Murphy 2013). Plusieurs revues présentent les nombreuses fonctions des pseudokinases (Boudeau *et al.* 2006; Zeqiraj and van Aalten 2010; Shaw *et al.* 2014) :

- ♦ **Régulation de l'activité d'autres kinases** : bien que dénuée d'activité catalytique, la pseudokinase Pragmin effectue une homodimérisation via des domaines N-ter et C-ter, lie la tyrosine kinase CSK et potentialise son activité (Lecointre *et al.* 2018); un autre exemple avec les récepteurs JAK (Janus Kinase) qui comportent un pseudo-domaine kinase capable de réguler l'activité du domaine kinase situé en aval (Lupardus *et al.* 2014).
- ♦ **Interaction avec d'autres protéines** : afin de faciliter la formation de complexes protéiques ou prendre part à la régulation de la localisation subcellulaire des partenaires protéiques liés. Cela nécessite parfois que la pseudokinase concernée soit liée à l'ATP (Zeqiraj and van Aalten 2010; Knape and Herberg 2017).
- ♦ **Mise en place de nouvelles MPTs** : la récente caractérisation de la pseudokinase Selenoprotein-O (SelO) a montré qu'elle se replie suivant une conformation similaire aux kinases de type Hanks mais qu'elle accommode l'ATP dans son site actif à l'inverse de ces dernières. Cela lui permet de catalyser des transferts d'AMP (AMPylation) sur des résidus S/T/Y (auto-AMPylation et AMPylation d'enzymes impliquées dans la S-glutathionylation) (Sreelatha *et al.* 2018).

L'importance des pseudokinases est par ailleurs renforcée par le fait qu'elles peuvent être impliquées dans des pathologies comme le cancer (H. Zhang *et al.* 2012).

b. Pseudokinases apicomplexes

Chez les apicomplexes, les seules pseudokinases qui ont été caractérisées sont encodées par *Toxoplasma gondii* (Zeqiraj and van Aalten 2010). À priori, environ 1/3 du kinome (soit 51 sur 159 kinases) de cet apicomplexe serait des pseudokinases. Ces dernières sont pour la grande majorité des protéines spécifiques du parasite (Peixoto et al. 2010). Pourquoi un si grand nombre (en comparaison des 10% de pseudokinases encodées par le génome humain) ? L'étude des Kinases de Rhoptries (ROPKs), et notamment de leur rôle dans les relations hôte-pathogène, a apporté quelques réponses.

En effet, les ROPKs sont sécrétées dans le cytoplasme de la cellule hôte au cours de l'invasion par *Toxoplasma gondii*. Au passage, il est primordial de noter que, contrairement à *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii* infecte virtuellement tous les types de cellules nucléées. Il semble donc indispensable qu'il dispose des outils nécessaires pour adapter les relations qu'il met en place à chaque type cellulaire si besoin (Reese and Boyle 2012). Parmi la quarantaine de ROPKs exprimées par les différentes souches de *T. gondii*, 14 sont prédites pour être des pseudokinases (Talevich, Mirza, and Kannan 2011). Deux d'entre elles ont été caractérisées à ce jour :

- ◆ **TgROP5** ne possède pas d'Aspartate dans sa boucle catalytique. Cette pseudokinase lie l'ATP mais ne présente pas d'activité kinase (Reese and Boothroyd 2011). En revanche, elle interagit avec deux kinases, TgROP17 et TgROP18, et le complexe qui en résulte empêche l'accumulation d'IRGs (Immunity-Related GTPases) à la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) (Etheridge et al. 2014; Reese, Shah, and Boothroyd 2014). Leur action favorise ainsi le développement du parasite, les IRGs pouvant détruire la MVP et exposer le parasite à une mort certaine (Khaminets et al. 2010). De manière intéressante, la restitution de l'Aspartate dans la boucle catalytique de TgROP5 réduit la virulence de la souche impactée, et compléter la souche avirulente avec TgROP5 restaure sa virulence (Reese and Boothroyd 2011). De même, empêcher l'expression de TgROP5 dans diverses souches virulentes les rend avirulentes (Behnke et al. 2015).
- ◆ **TgROP54** a été caractérisée plus récemment. Cette pseudokinase s'accumule également à la MVP des parasites en cours d'invasion et empêche l'accumulation de GBP2 (Guanylate Binding Protein 2), mais pas de l'IRGb6, à cette dernière. De manière similaire à TgROP5, TgROP54 empêche la clairance du parasite par sa cellule hôte (E. W. Kim et al. 2016).

Il est plausible que d'autres pseudokinases apicomplexes procèdent par des mécanismes différents pour favoriser le développement du parasite qui les exprime au sein de sa cellule hôte (interférence avec la formation de complexes protéiques, régulation allostérique de certaines activités enzymatiques, etc.). Quoi qu'il en soit, les pseudokinases de *T. gondii* présentent de nombreux polymorphismes, indiquant que l'apicomplexe a bien saisi à quel point leur potentiel de diversification peut représenter un atout contre les mécanismes de défense variés des cellules hôtes qu'il infecte (Reese and Boyle 2012).

En ce qui concerne *Plasmodium*, 5 à 8 pseudokinases ont été prédites *in silico* (P. Ward et al. 2004; Tewari et al. 2010). Aucune d'entre elle n'a été caractérisée à ce jour et les informations disponibles sur leur essentialité au cours du cycle intra-érythrocytaire divergent (Tewari et al. 2010; Bushell et al. 2017; M. Zhang et al. 2018).

Cadre & Objectifs du projet

I. Contexte Scientifique : Étude du régulateur de la PP1 de *Plasmodium*

La Protéine Phosphatase de type 1 (PP1) est la phosphatase majeure de *Plasmodium* (Bhattacharyya et al. 2002). Elle est essentielle pour le développement intra-érythrocytaire du parasite (Bhattacharyya et al. 2002; R. Kumar et al. 2002; Guttery et al. 2014; M. Zhang et al. 2016; Bushell et al. 2017; M. Zhang et al. 2018). PP1 est exprimée sous la forme d'une sous-unité catalytique fixe (PP1c) et particulièrement bien conservée au cours de l'évolution et à travers le règne des eucaryotes (Bhattacharyya et al. 2002; Ceulemans, Stalmans, and Bollen 2002; Verbinen, Ferreira, and Bollen 2017). Fortement exprimée chez tous les eucaryotes, PP1c présente un potentiel enzymatique important (Daher et al. 2006; Verbinen, Ferreira, and Bollen 2017). Sa structure et sa spécificité de substrat, et donc son activité, ainsi que sa localisation subcellulaire sont régulées grâce à des interactions avec un à plusieurs partenaires protéiques qui sont soit des substrats soit des régulateurs de son activité et/ou de sa localisation subcellulaire (Khalife and Pierrot 2016; Verbinen, Ferreira, and Bollen 2017). La caractérisation de cet interactome, ou plutôt de son régulateur, est donc une étape nécessaire à la compréhension de son rôle pour le développement du parasite.

Au sein de l'équipe 2 du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), nous nous attachons à étudier ce régulateur. Des approches de génomique comparative ont tout d'abord permis l'identification et la caractérisation de partenaires de PfPP1c conservés :

- ♦ La protéine Leucine-Rich Repeat 1 (LRR1) de *P. falciparum* interagit directement avec PfPP1c et inhibe son activité (à la fois *in vitro* et dans le modèle de l'ovocyte de Xénope) (Daher et al. 2006). De plus, des peptides mimant des zones d'interaction de PfLRR1 avec PfPP1c sont capables d'occuper les sites de liaison de PfLRR1 sur PfPP1c et impactent la croissance de *P. falciparum* *in vitro*, démontrant l'essentialité de cette interaction pour la (sur)vie du parasite (Pierrot et al. 2012, 2018).
- ♦ L'Inhibiteur 2 (I2) interagit avec PP1c via un motif RVxF et un motif FKK qui agissent de concert pour favoriser une liaison forte entre PfI2 et PfPP1c, ainsi que l'inhibition de l'activité de la phosphatase (Fréville et al. 2013, 2014). Là encore, l'utilisation de peptides mimant les motifs d'interaction de PfI2 avec PfPP1c est délétère pour le parasite, démontrant l'essentialité de l'interaction PfI2-PfPP1c pour le développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum* (Fréville et al. 2013).
- ♦ L'Inhibiteur 3 (I3), qui interagit avec PfPP1c via un motif RVxF est un activateur de l'activité phosphatase, contrairement à PfLRR1 et PfI2, et son interaction avec PfPP1c est essentielle au développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum* (Fréville et al. 2012).
- ♦ La protéine eukaryotic Initiation factor 2 β (eIf2 β) interagit directement avec PfPP1c, via un motif RVxF et un motif FKK, ainsi qu'avec deux partenaires PfeIf2 γ et PfeIF5, avec lesquels elle forme un complexe d'initiation de la traduction des protéines. L'étude de l'impact de l'interaction entre PfeIf2 β et la PP1c de Xénope indique que PfeIf2 β semble être un inhibiteur de PP1c (Tellier et al. 2016).

Plus récemment et dans le but de découvrir des partenaires de PfPP1c qui soient spécifiques de *Plasmodium*, une étude de l'interactome de cette phosphatase a été effectuée en combinant plusieurs approches (double hybride de levure, criblage *in silico* basé sur des séquences consensus du motif d'interaction majeur RVxF, spectrométrie de masse) (Hollin et al. 2016). L'un des hits de cette étude, appelé RCC-PIP (Regulator of Chromosome Condensation – PP1 Interacting Protein) a été caractérisé récemment (Lenne et al. 2018). Cette protéine interagit directement avec PfPP1c via un motif RVxF situé

dans sa région PIP, ainsi qu'avec la kinase *PfCDPK7* via sa région RCC1, ce qui indique qu'elle est potentiellement une plateforme de recrutement d'enzymes impliquées dans la régulation post-traductionnelle (Lenne et al. 2018).

II. Présentation du projet de recherche sur la pTKL de *Plasmodium*

Le projet de recherche sur la pTKL (pseudo-Tyrosine Kinase Like) s'inscrit dans la continuité de l'étude de la Protéine Phosphatase de type 1 (PP1) et de son interactome chez *Plasmodium* par l'équipe 2 (Biologie des Apicomplexes) du CIIL. PF3D7_1106800 a été identifiée lors d'un criblage réalisé *in silico* sur le protéome de *P. falciparum* à l'aide d'une séquence consensus pour RVxF relativement stringente : [KR]-[KR]-[ACHKMNQRSTV]-V-[CHKNQRST]-[FW] (Hollin et al. 2016). C'était la seule kinase putative parmi la cinquantaine de hits retournée par ce criblage. Peu de données étaient disponibles sur PF3D7_1106800 dans la littérature au moment où nous avons entamé ce projet :

- ◆ D'abord laissée de côté en raison de la séquence atypique de son domaine kinase (*P. Ward et al. 2004*), PF3D7_1106800 est ensuite incluse dans l'étude du kinome de *P. falciparum* (*Talevich et al. 2012*), qui démontre qu'elle fait partie de la famille des Tyrosine Kinase-like (TKL). Elle est alors appelée TKL5.
- ◆ Dans leur étude fonctionnelle et systématique du kinome de *P. berghei* de 2010, Tewari et al. confirment que son homologue PBANKA_0940100 est une pseudokinase. Ils ne l'incluent cependant pas dans la famille des TKL de *P. berghei* qui comporte 6 membres de type Hanks. Après 4 tentatives de KO infructueuses, ils concluent que PBANKA_0940100 est probablement essentielle pour le développement des stades sanguins de *P. berghei* (*Tewari et al. 2010*).

Nous avons donc nommé la protéine pTKL (pseudo-Tyrosine Kinase-like) et avons décidé de la caractériser plus en détails. Cette protéine était alors quasiment inconnue ; ses potentiels enzymatique d'une part, et d'interaction avec PP1c d'autre part, ainsi que son rôle pour le parasite restaient donc à explorer. Le fait qu'une kinase putative puisse interagir avec une phosphatase, sachant qu'elles sont toutes deux potentiellement impliquées dans la modification post-traductionnelle des protéines du parasite et, donc, dans la régulation de son cycle de vie, nous a paru particulièrement intéressant.

De plus, les pseudokinases apicomplexes sont peu caractérisées à ce jour alors que les rôles variés de ces protéines sont de mieux en mieux compris, notamment chez l'Homme (*Boudeau et al. 2006; Shaw et al. 2014*), chez qui elles peuvent être à l'origine de pathologies comme le cancer (*H. Zhang et al. 2012*). De plus, la caractérisation des pseudokinases TgROP5 et TgROP54 chez *Toxoplasma gondii* a montré qu'elles jouent un rôle essentiel dans le développement du parasite dans sa cellule hôte en empêchant cette dernière de le rejeter par clairance (*Reese and Boothroyd 2011; Etheridge et al. 2014; Reese, Shah, and Boothroyd 2014; E. W. Kim et al. 2016*). À notre connaissance, TgROP5 et TgROP54 sont pourtant les seules pseudokinases apicomplexes caractérisées à ce jour.

III. Objectifs de recherche et retombées attendues

Les deux objectifs principaux de ce projet de recherche étaient les suivants :

✂ **Effectuer la caractérisation moléculaire de pTKL :**

- ◆ Séquencer et annoter le gène de *PfpTKL*
- ◆ Prédire et étudier *in silico* (comparaison de séquences, étude phylogénétique) les structures primaire, secondaire et tertiaire des domaines protéiques de *PfpTKL*

✂ **Effectuer la caractérisation fonctionnelle de pTKL :**

- ◆ Produire chaque domaine d'intérêt de la protéine sous forme de protéine recombinante et le caractériser *in vitro* ou dans des systèmes hétérologues (en tant que domaine catalytique ou domaine d'interaction)
- ◆ Étudier la protéine native chez *P. falciparum* et *P. berghei* (une des espèces de *Plasmodium* infectant des rongeurs) par Knock-In (étude de sa localisation et de son interactome) et en interférant avec son expression (Knock-Out et Knock-Down inductible) afin d'étudier son essentialité pour le parasite.

À l'aide de ce plan, nous comptons caractériser cette protéine de la manière la plus approfondie possible, sur les plans moléculaire et fonctionnel.

Les retombées attendues de ce projet étaient les suivantes :

- ◆ **Comprendre** pourquoi *Plasmodium* exprime cette pseudokinase (i.e. quel est son rôle pour le développement du parasite ?)
- ◆ **Étayer** les données disponibles actuellement sur le kinome de *Plasmodium*, et en particulier sur les TKL du parasite (dont seules deux ont été étudiées à ce jour chez *P. falciparum* : la TKL2 (A. I. Abdi et al. 2013) et la TKL3 (A. Abdi et al. 2010))
- ◆ **Éveiller l'intérêt** de la communauté scientifique pour les pseudokinases parasitaires et pour les pseudo-enzymes parasitaires en général (i.e. une absence théorique d'activité enzymatique n'est en rien une démonstration d'une absence d'activité aux niveaux moléculaire et cellulaire).

Résultats

I. Séquençage et annotation *in silico* du gène PF3D7_1106800

1. Séquençage

D'après la base de données PlasmoDB (Aurrecochea *et al.* 2009), PF3D7_1106800 est un gène de 5356 pb qui donne, après épissage des 7 introns, un transcrit de 4506 pb encodant une protéine de 1501 acides aminés. Afin de vérifier la séquence disponible sur la base de données, ainsi que l'expression du transcrit, nous avons entrepris de séquencer ce dernier en effectuant des RT-PCR chevauchantes sur l'ARN total de *Pf3D7*. Six régions du transcrit de 500 à 1300 pb ont ainsi été amplifiées et séquencées (cf. Figure 20, Annexe I, Matériel & Méthodes). Une séquence consensus a été élaborée à partir des données obtenues (6 à 12 clones par région ont été séquencés) et traduite. La séquence protéique ainsi déduite a été comparée à celle disponible sur PlasmoDB (Annexe II). Quelques mutations ponctuelles ou gaps, sans conséquence ni pour la continuité du cadre de lecture ni pour l'annotation de la séquence, ont ainsi été relevés entre les deux séquences (Figure 20). Cependant, le gap de la région 4 a également été retrouvé au niveau de l'ADNg, suggérant qu'il s'agit probablement d'une particularité de la souche *Pf3D7* que nous cultivons au laboratoire. De même, le gap minimum (i.e. 24 nucléotides) situé au niveau de la région 2.2 est présent au niveau génomique. Les gaps plus importants relevés au niveau de l'ADNc ne sont probablement pas dus à de l'épissage alternatif ; cette région est particulièrement riche en cytosines, alors que les introns comportent plus de 90% d'A/T chez *P. falciparum* (Gardner *et al.* 2002). De plus, les motifs accepteur/donneur AG/GT ne sont pas présents ici (Long, de Souza, and Gilbert 1995). La raison de la présence des gaps reste donc confuse. Cependant, il est à noter que la région 2.2 du transcrit code pour des répétitions peptidiques ('PSSS'), donnant des régions protéiques déstructurées/peu stables.

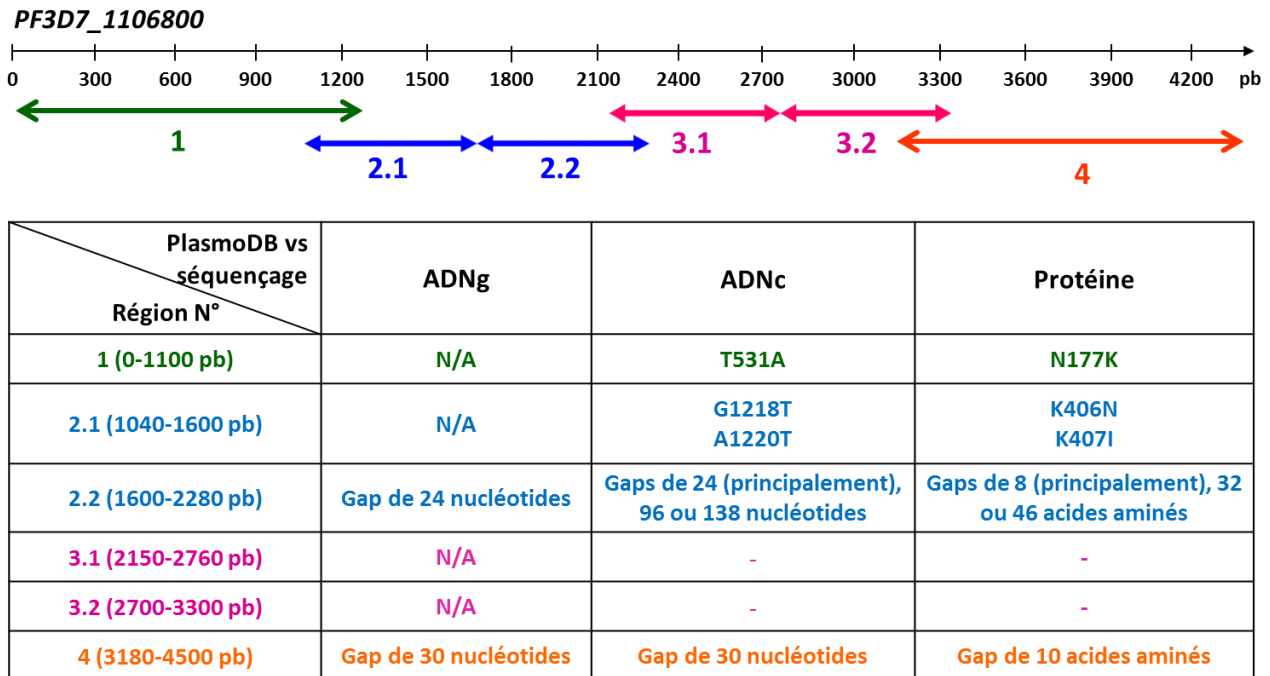


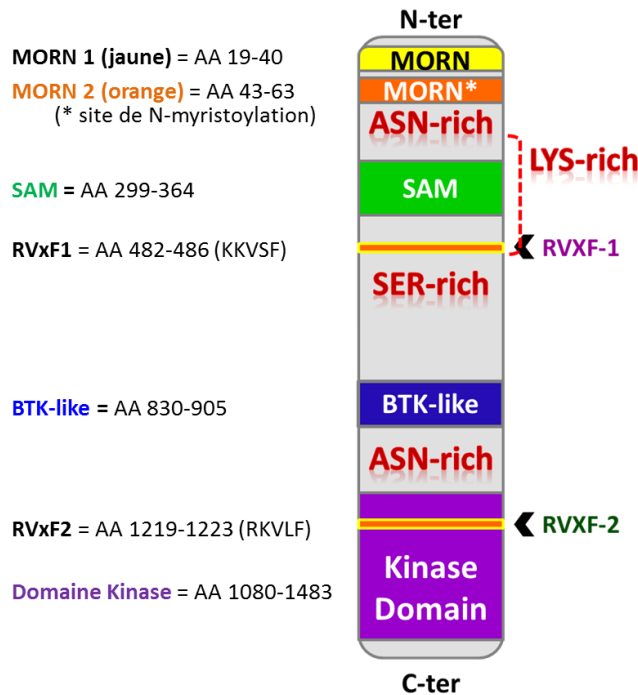
Figure 20 : Séquençage du transcrit PF3D7_1106800 par RT-PCR chevauchantes – Schéma des régions amplifiées directement (fragments 1 et 4) ou via des PCR imbriquées (nested PCR - fragments 2 et 3) (en haut) et résultats de séquençage (tableau du bas).

2. Annotation *in silico*

La prise en compte des données de séquençage nous a amenés à annoter une séquence protéique de 1483 acides aminés (poids moléculaire théorique de la protéine encodée estimé à environ 170 kDa).

L'annotation de la séquence protéique a été effectuée *in silico* (plusieurs outils différents ont été utilisés pour assurer une certaine fiabilité des résultats - cf. Matériel & Méthodes) aux niveaux :

- ◆ Primaire : de manière à prédire les motifs, domaines et régions principaux de la protéine sur la base de consensus, ainsi que les sites de modification post-traductionnelle putatifs ;
- ◆ Tertiaire : de manière à affiner les délimitations des domaines et émettre des hypothèses fonctionnelles à partir de leur repliement.



Elle a permis de prédire, de N-ter en C-ter, deux motifs MORN (Membrane Occupation Recognition Nexus), un domaine SAM (Sterile Alpha Motif), un lobe N-ter de domaine kinase (appelé BTK-like car présentant une similarité importante avec la BTK, Bruton's Tyrosine Kinase) et un domaine kinase. Deux motifs RVxF ont également été prédits : RVxF1 près du domaine SAM et RVxF2 au sein du domaine kinase. Enfin, des régions probablement déstructurées, car composées de répétitions riches en Asparagine, Lysine ou Sérine, relient les différents domaines et motifs (Figure 21, Annexe III).

Figure 21 : Résumé graphique de l'annotation *in silico* de PF3D7_1106800

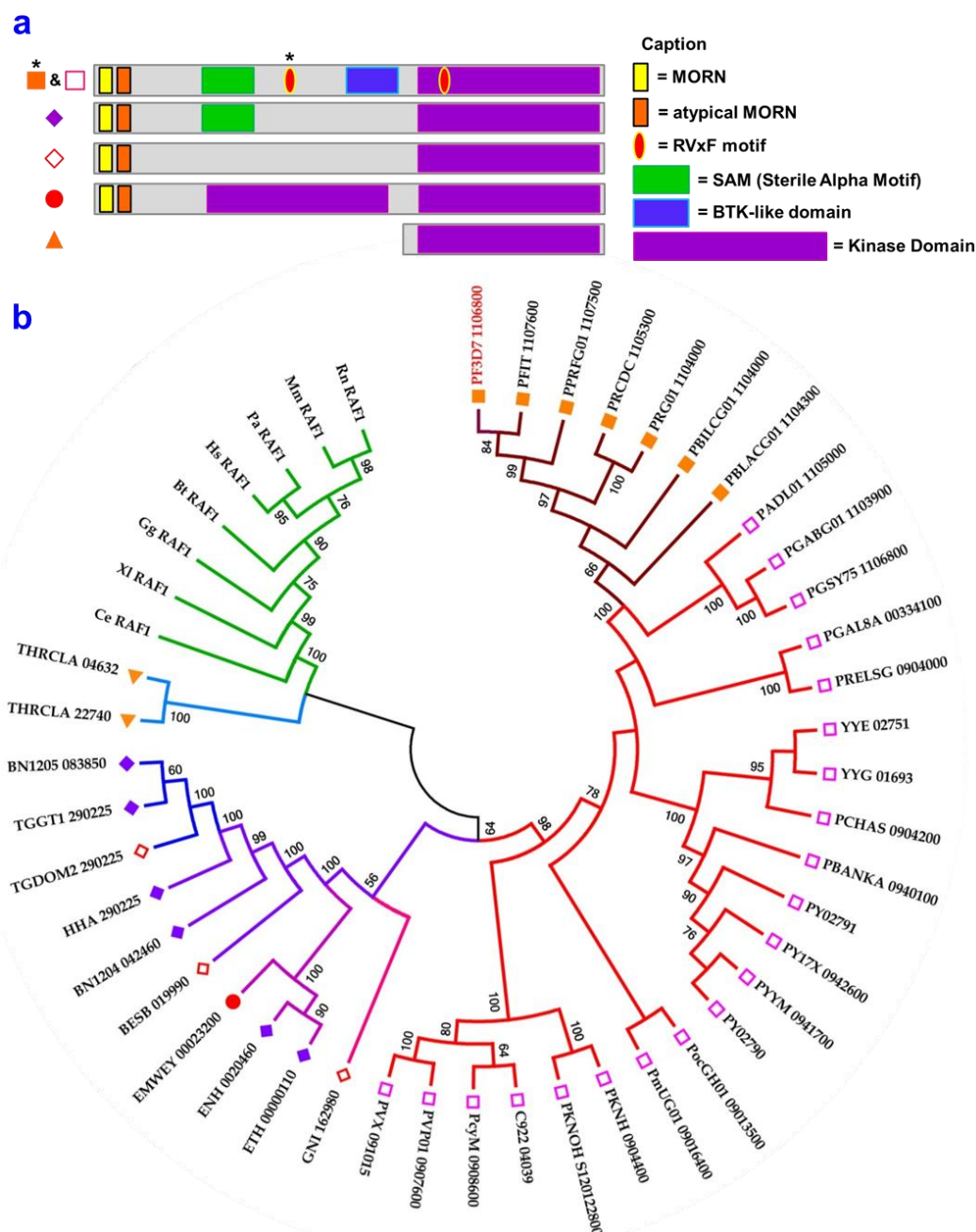
3. Analyse phylogénétique

Post annotation, les homologues de PF3D7_1106800 ont été identifiés par analyse réciproque PSI-BLAST dans des ensembles eucaryotes de plus en plus larges (Apicomplexes, Alvéolates, Eucaryotes, cf. Matériel et Méthodes). Une analyse phylogénétique a ensuite été effectuée sur l'intégralité des séquences des protéines ainsi retenues (Figure 22b). Le résultat de cette analyse est en accord avec la classification du règne des eucaryotes revue par Adl et al. (Adl et al. 2012), notamment parce que les protéines du Straménopile *Thraustotheca clavata* forment un groupe monophylétique proche des protéines RAF1 de métazoaires utilisées ici comme groupe externe, et des protéines d'Alvéolates qui se regroupent en un clade. Au sein de ce dernier se trouvent les protéines d'eucoccidies (*Toxoplasma gondii*, *Neospora*, *Hammondia*, *Eimeria*, *Besnoitia*), d'une part, et d'hémosporidés (diverses espèces de *Plasmodium*) d'autre part. Les données phylogénétiques ont ensuite été reliées aux structures moléculaires des différentes protéines incluses dans l'analyse (voir Figure 22a). Nous observons qu'au moins un domaine kinase est

Figure 22 :
Analyse phylogénétique de
PF3D7_1106800 et de ses
homologues apicomplexes

a) Schéma de la structure moléculaire des protéines incluses dans l'analyse phylogénétique. Les symboles à gauche de chaque structure correspondent à ceux indiqués sur l'arbre de la figure b.

101



II. Caractérisation des domaines de PF3D7_1106800

Après avoir délimité les différents domaines de PF3D7_1106800, nous les avons caractérisés l'un après l'autre à l'aide d'approches *in vitro* et de modèles hétérologues. Les résultats obtenus au moyen de ces différentes approches sont présentés ci-dessous. Nous allons commencer par le domaine kinase, qui tient une place importante dans l'identité de cette protéine. Nous poursuivrons avec les domaines et motifs d'interaction (SAM puis les motifs RVxF).

1. Caractérisation du domaine catalytique de PF3D7_1106800

a. Caractérisation *in silico*

La délimitation du domaine kinase de la protéine s'est révélée délicate. En effet, beaucoup d'outils de prédiction ont été perturbés par la présence d'un lobe N-ter de kinase en amont du domaine kinase en lui-même. De plus, la présence d'insertions et de répétitions riches en acides aminés basiques a complexifié les alignements de séquence. Des outils de prédiction de la structure tertiaire des protéines ont donc été utilisés en parallèle pour prédire le repliement du domaine kinase complet. Les résultats des différentes prédictions ont ensuite été combinés ([Tableau 8](#)) pour réussir à délimiter précisément le domaine kinase de la protéine aux AA 1080-1483, soit à l'extrémité C-ter de la protéine.

Tableau 8 : Résumé des résultats d'annotation du domaine kinase de PF3D7_1106800

Outil de prédiction	Délimitation du domaine kinase	Fiabilité de la prédiction
SMART	AA 1150-1463	9,51 E-8
Interpro	AA 1080-1465	-
CATH	AA 1237-1464	1,2 E-29
ScanProsite	AA 1080-1465	score = 18.238
Phyre2	AA 1144-1483	Template = IKK1 Prediction confidence = 100%
RAPTOR-X	AA 1136-1483	Template = TYK2 from the JAK family Prediction p-value = 4,56 E-11

Un alignement a ensuite été effectué entre la séquence du domaine kinase ainsi délimité et des kinases de référence humaines : la PKAc utilisée comme kinase à S/T de référence, la Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) utilisée comme kinase à Y de référence et RIPK1 en tant que pseudo-TKL. Les 12 sous-domaines classiques de domaine kinase tels que définis par Hanks & Hunter ([Hanks and Hunter 1995](#)) ont ensuite été recherchés ([Figure 23](#)) :

- les acides aminés clés des sous-domaines I (triade de Glycines, AA surlignés en cyan sur la [Figure 23](#)), II (Lysine liant l'ATP), III (Glutamate impliqué avec la Lysine II dans la stabilisation du groupement β de l'ATP), K et E surlignés en rose sur la [Figure 23](#), habituellement impliqués dans la stabilisation de l'ATP au sein du site catalytique, sont absents.

chez tous les homologues de la protéine chez toutes les espèces de *Plasmodium* (Figure 24). Nous avons donc nommé ce domaine BTK-like. De manière intéressante, la lysine du sous-domaine II est cette fois conservée (indiquée par une flèche rouge sur la Figure 24), tout comme les sous-domaines IV et V.

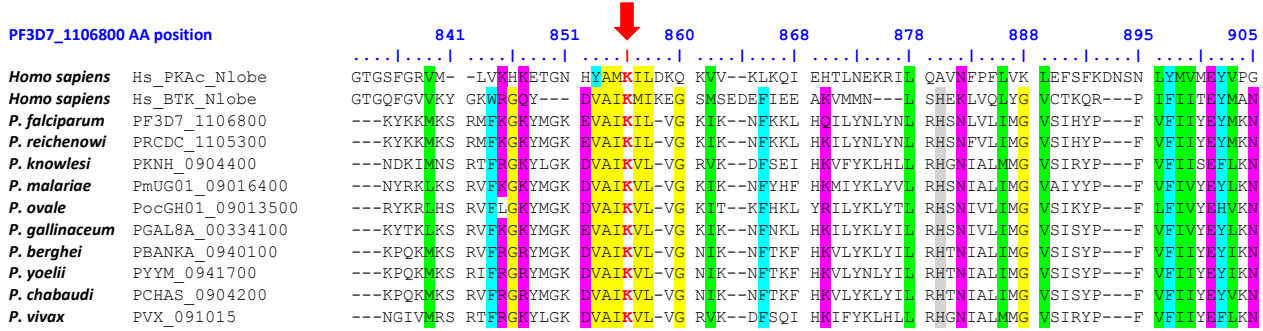


Figure 24 : Alignement des domaines BTK-like de plusieurs pTKL de différentes espèces de *Plasmodium* et de lobes N-ter de la PKAc et de la BTK humaines. La lysine du sous-domaine II est indiquée par une flèche rouge.

b. Caractérisation de l'activité kinase de *PfpTKL*

Production du domaine kinase sous forme de protéine recombinante

Afin d'étudier l'activité kinase de *PfpTKL*, nous avons cherché à produire le domaine kinase (AA 1076-1483) sous forme de protéine recombinante (nous avons essayé de produire la région BTK-like + domaine kinase, sans succès). Nous avons cependant rencontré de grandes difficultés à stabiliser la protéine. Pour limiter la dégradation protéique en bactérie, nous avons utilisé un gène synthétique optimisé (Annexe V.2) pour faciliter la traduction en bactérie et effectué un criblage de différentes souches bactériennes plus ou moins capables de favoriser le repliement des protéines (cf. Matériel & Méthodes). Nous avons également cloné la région encodant le domaine kinase en pMALpIII afin d'étiqueter la protéine à l'aide de la Maltose Binding protein en N-ter pour la stabiliser (Kapust and Waugh 1999; Planson et al. 2003) tout en conservant un tag 6-His en C-ter pour la purifier. Puis, après cette étape de production, nous avons également optimisé les étapes de purification de la protéine, en utilisant des conditions de lyse douces et des kosmotropes comme le $MgSO_4$ (Bondos and Bicknell 2003) - Matériel & Méthodes).

Le domaine kinase natif de la pTKL est appelé pTKL_KD_WT. En parallèle, deux mutants ont été produits sous la forme de protéines recombinantes étiquetées de la même manière que pTKL_KD_WT (Annexe V.2, Figure 25) :

- ◆ Dans le premier mutant, l'asparagine 1272 du sous-domaine VIB a été mutée en aspartate (protéine pTKL_KD_ND) afin d'évaluer si sa « restauration » au sein de la boucle catalytique était suffisante pour rendre le pseudo-domaine kinase actif ou augmenter son activité catalytique putative.
- ◆ Dans le deuxième mutant, le motif $^{1290}DFG^{1292}$ (sous-domaine VII, habituellement impliqué dans la coordination de cations divalents importants pour la stabilisation de l'ATP et la catalyse du transfert de son groupement phosphate γ) a été inactivé par mutation en $^{1290}GFE^{1292}$ afin d'étudier son rôle dans l'activité catalytique putative du pseudo-domaine kinase (protéine pTKL_KD_DG).

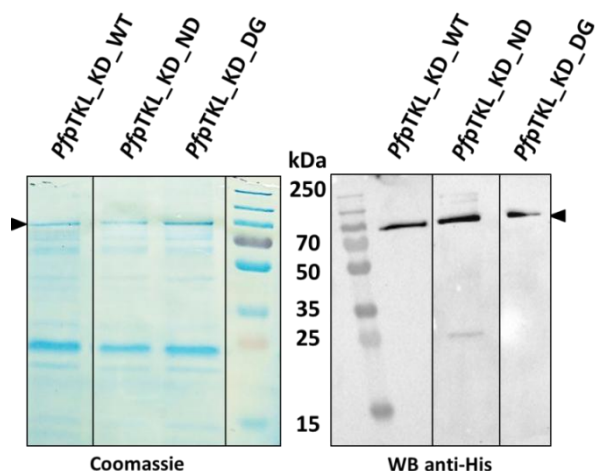


Figure 25 : Production du domaine kinase WT (pTKL_KD_WT) et des mutants (pTKL_KD_ND pour N1272D et pTKL_KD_DG pour ¹²⁹⁰DFG¹²⁹² muté en ¹²⁹⁰GFE¹²⁹²) sous forme de protéines recombinantes étiquetées à l'aide de la Maltose Binding Protein en N-ter et 6-His en C-ter. Les protéines recombinantes ont un poids moléculaire de 100 kDa (têtes de flèche).

Évaluation de la capacité des différents domaines kinase (natif et mutants) à lier l'ATP

Dans un premier temps, la capacité des trois protéines recombinantes à lier l'ATP a été évaluée en effectuant un pull-down avec des billes ATP-agarose où l'ATP est liée à l'agarose par différentes parties : l'adénine, le sucre ou les groupements phosphate (Figure 26a). De manière inattendue, les trois protéines recombinantes se sont spécifiquement fixées aux billes ATP-agarose, quelles qu'elles soient (i.e. pas aux billes d'agarose contrôles, troisième piste des WB de la Figure 26b).

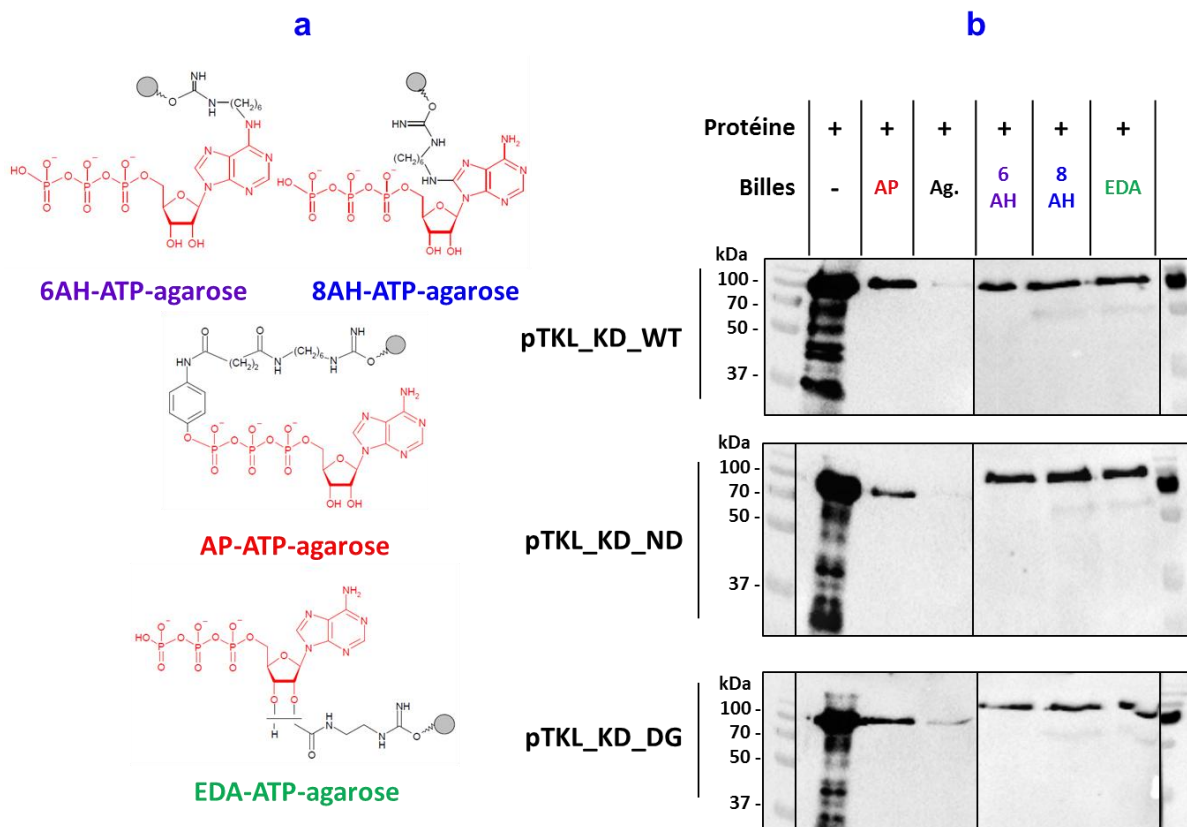


Figure 26 : Test d'affinité à l'ATP effectué par pull-down des protéines pTKL_KD_WT, ND et DG avec des billes ATP-agarose (AP, Ag. = Agarose, 6-AH, 8-AH, EDA – présentées en figure 26a). Les protéines ont été éluées et détectées par WB anti-His (WB présentées en Figure 26b).

Cette expérience a ainsi été révélatrice de plusieurs aspects clés du pseudo-domaine kinase de *PfpTKL* :

- ♦ ce pseudo-domaine kinase est capable de lier l'ATP et ce à priori de manière ion-indépendante puisque la mutation de son sous-domaine VII/motif DFG ne semble pas impacter cette fixation (cette dernière sera testée sur un plan plus quantitatif plus tard). Cela indique que *PfpTKL* est une pseudo-kinase de classe 2 (i.e. nucleotide-binding d'après (Murphy et al. 2014)).
- ♦ la capacité de liaison à l'ATP du pseudo-domaine kinase de *PfpTKL* ne semble également pas nécessiter de modification post-traductionnelle (étant donné que les protéines recombinantes ont été produites en bactérie) ni la présence d'un domaine régulateur (contrairement à ce qui a été démontré avec *PfpTKL3* (A. Abdi et al. 2010)).

Évaluation de l'activité kinase des domaines kinase natif et mutants

Après avoir confirmé la capacité du pseudo-domaine kinase de *PfpTKL* à lier l'ATP, nous avons étudié sa capacité à catalyser des réactions de phosphorylation. Pour cela, nous avons effectué des tests d'activité kinase basés sur l'utilisation d'ATP marqué au ^{33}P (ATP [$\gamma\text{-}^{33}\text{P}$]) en collaboration avec l'UMR8161-M3T. JNK1 ([c-Jun N-terminal Kinase 1](#)) a été utilisée comme contrôle positif et différents types de substrats ont été testés : la Myelin Basic Protein (MBP), des extraits protéiques de *P. falciparum* ou de globules rouges (Figure 27). Dans tous les essais mis en œuvre, seule JNK1 a montré une capacité de phosphorylation (pistes 1 des deux gels de la Figure 27). Afin de compléter ces résultats, nous avons immunoprécipité la protéine native de *P. berghei* (après l'avoir étiquetée AID-HA – construction et obtention des parasites mutés sont présentées en partie IV de la section résultats de ce manuscrit) et avons testé son activité kinase en parallèle des protéines recombinantes. Nous n'avons cependant détecté aucune activité de phosphorylation avec cette protéine non plus. De plus, le mutant N¹²⁷²D (pTKL_KD_ND) est aussi inactif que le domaine kinase natif malgré la restitution de l'aspartate dans la boucle catalytique du domaine. Cela nous a donc amenés à conclure que le domaine kinase de pTKL est inactif dans nos conditions expérimentales. Cette expérience indique également que pTKL n'est pas capable de s'autophosphoryler.

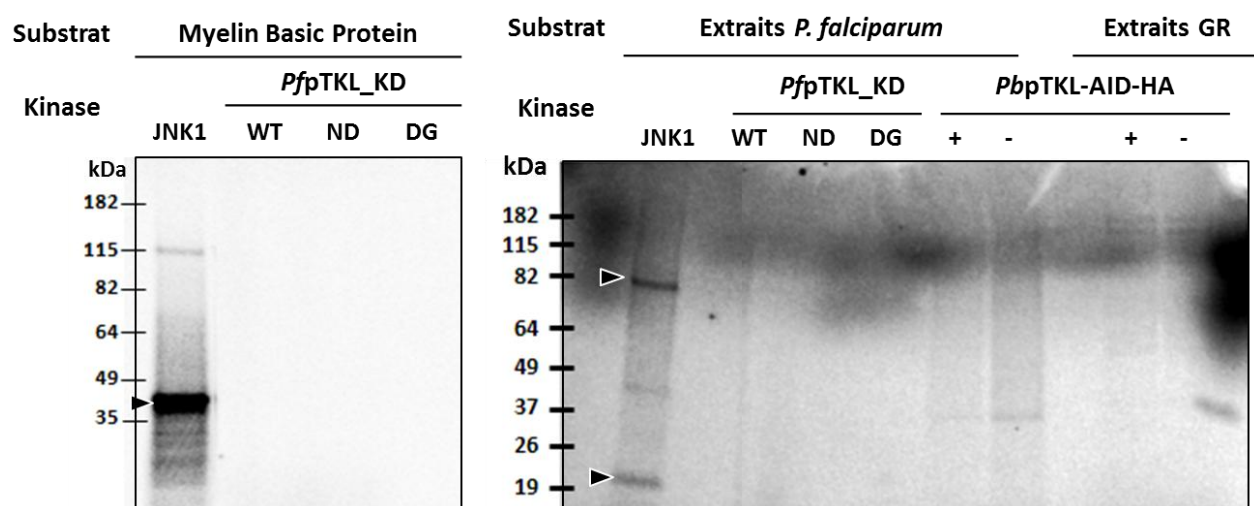


Figure 27 : Analyse de l'activité du domaine kinase de pTKL par incubation avec de l'ATP[$\gamma\text{-}^{33}\text{P}$] – Les substrats (Myelin Basic Protein, Extraits de *P. falciparum* ou de Globules rouges (GR)) ont été incubés avec les kinases recombinantes WT ou mutées ou *PbpTKL-AID-HA* (ajoutée = + ou pas = -) ou JNK1 utilisée comme témoin positif et l'ATP radioactif. Le produit des réactions a ensuite été séparé par SDS-PAGE avant quantification de la radioactivité incorporée.

Une troisième approche nous a permis de confirmer les résultats présentés ci-dessus. Les protéines recombinantes pTKL_KD_WT, ND et DG, aux côtés de JNK1 utilisée de nouveau comme contrôle positif, ont été incubées en présence d'ATP et de Myelin Basic Protein (MBP - l'utilisation d'autres substrats non physiologiques tels que la Caséine α ou l'Histone H1 a conduit à des résultats identiques - données non présentées). La quantité d'ATP restant dans les puits à la fin de cette incubation a été quantifiée à l'aide du kit [Kinase Glo®](#) de Promega par luminescence. La luciférase du ReagentGlo® utilisant l'ATP non consommé/resté libre pour produire de la lumière, la quantité de luminescence mesurée est directement proportionnelle à la quantité d'ATP restant dans les puits ([Figure 28](#)). La capacité de JNK1 à phosphoryler la Myelin Basic Protein a pu être quantifiée (consommation de 922 U.A. en présence de MBP vs 348 sans MBP - Tableau de la [Figure 28](#)). Nous avons attribué les légères variations de quantité d'ATP relevées avec les protéines pTKL_KD à leur capacité de liaison à l'ATP. Nous avons par ailleurs relevé, à quantités de kinase WT ou mutant/puits équivalentes, une capacité de liaison à l'ATP plus importante pour pTKL_KD_ND que pour les deux autres protéines recombinantes (Tableau de la [Figure 28](#)). Cela indique donc que la mutation N¹²⁷²D semble permettre une meilleure stabilisation de l'ATP au sein du site catalytique.

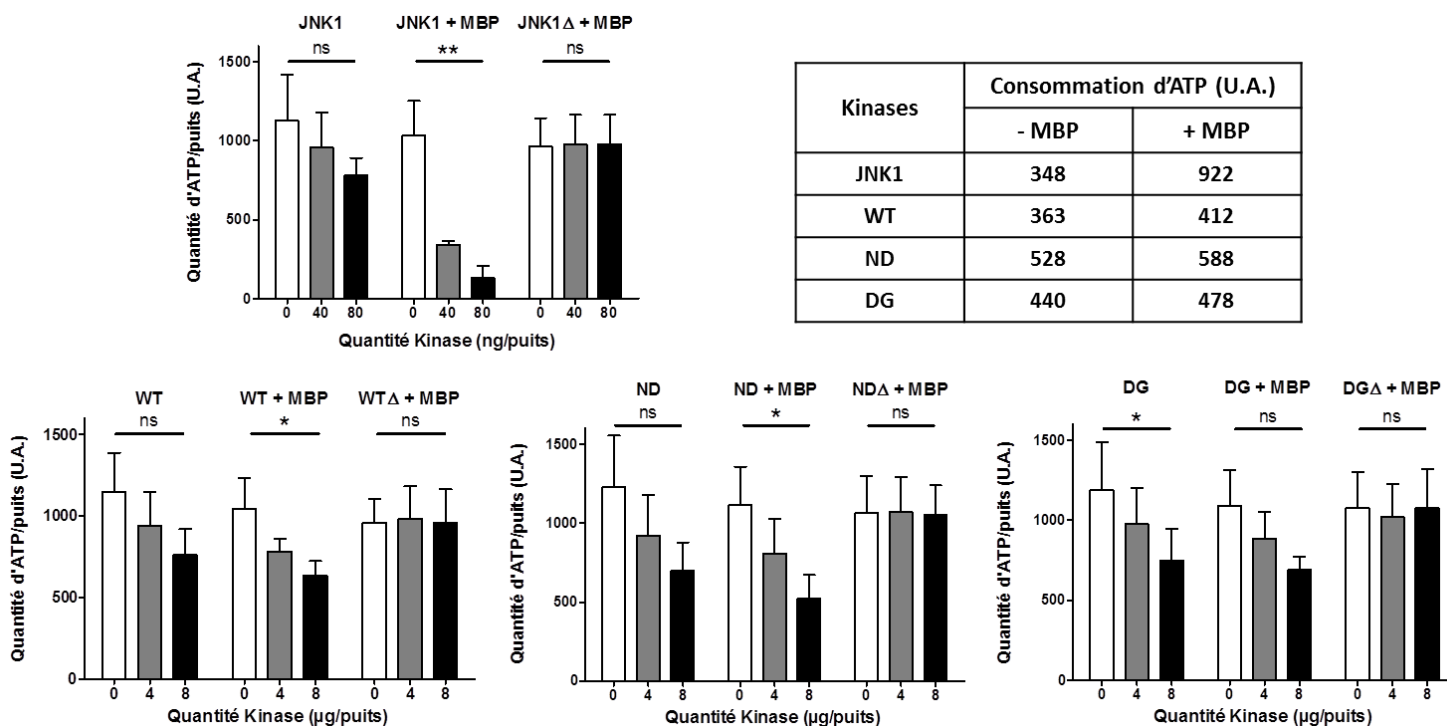


Figure 28 : Quantification de la consommation d'ATP par le domaine kinase de *PfpTKL* en présence de Myelin Basic Protein. Les tests sont effectués à l'aide du kit KinaseGlo® (Promega). Les kinases recombinantes (WT = pTKL_KD_WT, ND = pTKL_KD_ND, DG = pTKL_KD_DG, JNK1 est utilisée comme témoin positif) ont été incubées avec ou sans MBP, parfois après avoir été chauffées (Δ) pour générer des témoins négatifs. La quantité d'ATP restant dans les puits après incubation a ensuite été mesurée par luminescence (U.A. = Unité Arbitraire). La moyenne $\pm$ SD d'expériences effectuées sur 3 réplicats biologiques $\times$ 3 réplicats techniques est représentée ici (test statistique : t-test paramétrique sur les valeurs minimum et maximum de chaque groupe de données ; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Les valeurs de consommation d'ATP reportées dans le tableau ont été obtenues en calculant l'écart entre les valeurs de luminescence mesurées pour chaque kinase à 0 et 80 ng (JNK1) ou 8 μ g (les protéines pTKL recombinantes) par puits.

2. Caractérisation du domaine SAM

a. Introduction aux Sterile Alpha Motifs

Les domaines SAM (Sterile Alpha Motif) sont composés d'environ 70 acides aminés et font partie de la famille des protéines alpha (289 repliements différents d'après la base de données SCOP, <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/> étendue à <https://scop.berkeley.edu/>). Plusieurs études fonctionnelles (effectuées par mutagenèse) de ces domaines chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* ont montré qu'ils jouaient un rôle important dans leur fertilité (Ponting 1995). S'y est ajouté leur repliement caractéristique en 4 à 5 hélices α orthogonales les unes par rapport aux autres (Stapleton et al. 1999). Leur dénomination est donc issue de ces deux données ('Sterile' en raison de leur rôle dans la fertilité des levures et 'Alpha' en raison de leur structure secondaire). Malgré des structures primaire à tertiaire particulièrement bien conservées entre domaines SAM, ils sont présents chez des protéines de diverses familles (protéines de scaffold ou encodées par des gènes homéotiques, régulateurs de la transcription, kinases, etc.) et offrent une surface d'interaction avec des protéines ou de l'ARN (C. A. Kim and Bowie 2003). Des domaines SAM-like (ainsi nommés en raison de leur structure tertiaire proche de celle des domaines SAM) sont également impliqués dans des interactions avec de l'ADN (Devos et al. 2007) et d'autres encore semblent capables d'interagir avec des lipides (Barrera et al. 2003). Cette versatilité de fonctions complexifie leur étude, une des surfaces d'un domaine SAM pouvant être impliquée dans différents types d'interaction, notamment lorsqu'il s'agit de créer des homo- ou hétéro- polymères (Ramachander and Bowie 2004). Certains auteurs ont essayé d'établir des corrélations entre la position des domaines SAM au sein d'une protéine, la fonction et la localisation de cette dernière, et les réseaux d'interaction dans lesquels ils sont impliqués mais cela reste difficile (Qiao and Bowie 2005). Néanmoins et de manière logique, plusieurs études cristallographiques de différents domaines SAM concordent sur le fait que des acides aminés hydrophobes conservés permettent la création d'un cœur hydrophobe après repliement des hélices α les unes par rapport aux autres. Ce cœur hydrophobe joue également un rôle clé dans les phénomènes d'oligomérisation entre domaines SAM (Kwan et al. 2006). La nature des acides aminés situés à la surface du domaine détermine ensuite le type ainsi que la force de l'interaction (protéine-protéine ou protéine-acides nucléiques) dans laquelle il s'impliquera avec ses partenaires (Aviv et al. 2003).

b. Caractérisation *in silico*

Afin de prédire la fonction potentielle du domaine SAM de PfpTKL, nous avons commencé par effectuer un alignement de sa séquence avec celles des trois autres domaines SAM existant chez *Plasmodium*, à savoir PpTKL1, PpTKL3 et la kinase putative PF3D7_0926000 (A. Abdi et al. 2010) ainsi que des domaines de référence (Stapleton et al. 1999) (Figure 29). Les acides aminés hydrophobes constituant le cœur du domaine ont ainsi pu être retrouvés. La structure tertiaire du domaine SAM a également été prédite et a montré, en corrélation avec la délimitation théorique des hélices α de la Figure 29, un repliement classique en 5 hélices α orthogonales les unes par rapport aux autres (Figure 30). Ces données montrent que le domaine SAM de PfpTKL présente toutes les caractéristiques classiques des Sterile Alpha Motifs. Afin de prédire sa capacité à interagir avec des protéines ou des acides nucléiques, nous avons effectué une analyse phylogénétique entre les domaines SAM et SAM-like (motifs HTH de Pfg27, (A. Sharma et al. 2003; Camarda et al. 2010)) de *P. falciparum* ainsi que 122 séquences de domaines SAM et SAM-like décrits sur la

base de données SCOP – Structural Classification of Protein Database - <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/> (Annexe VI). Cette analyse a permis de montrer que les domaines SAM du protéome de *P. falciparum* se regroupent avec des SAM impliqués dans des interactions protéine-protéine.

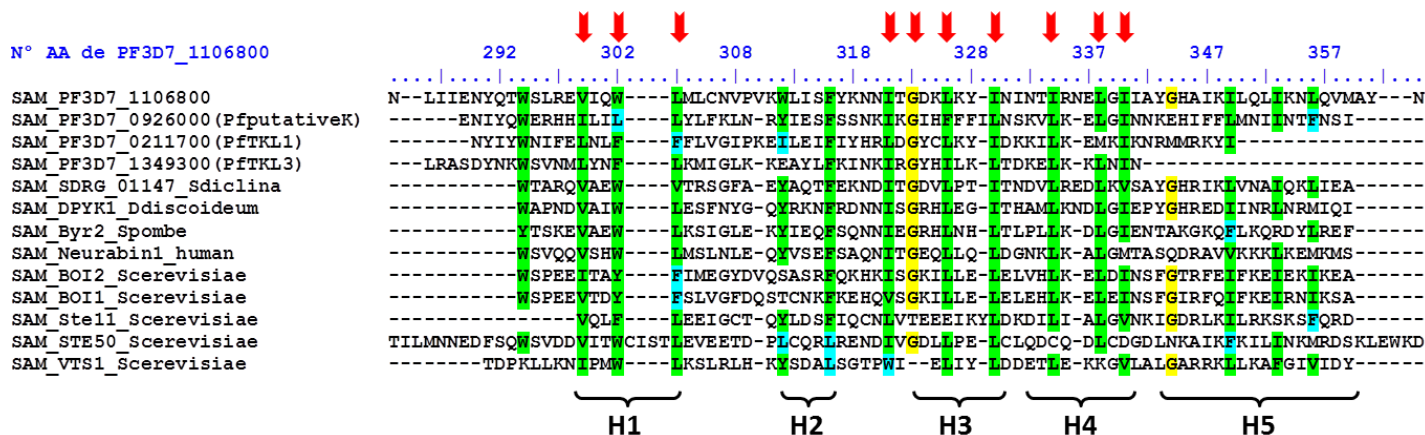


Figure 29 : Alignement de séquences primaires des 4 domaines SAM existant chez *P. falciparum* avec des domaines SAM de référence (Sdiclina = *Saprolegnia diclina*, Ddiscoideum = *Dictyostelium discoideum*, Spombe = *Schizosaccharomyces pombe*, Scerevisiae = *Saccharomyces cerevisiae*). Les acides aminés hydrophobes conservés sont indiqués par des flèches rouges et les hélices α du cœur du domaine (H1 à 5) sont prédites selon (Stapleton et al. 1999).

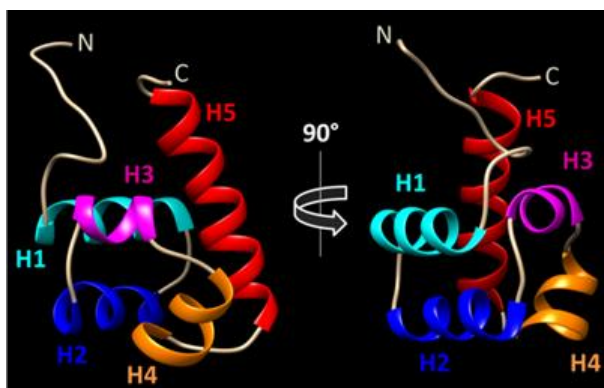


Figure 30 : Résultat de la prédiction de la structure tertiaire du domaine SAM de *PfpTKL* avec le serveur Phyre2 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> (75 résidues (97%) modeled at >90% accuracy). Les 5 hélices α composant le cœur du domaine sont nommées (H1 à 5).

c. Caractérisation de l'interactome du domaine SAM de *PfpTKL* in vitro

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer quel(s) étai(en)t le(s) partenaire(s) protéique(s) potentiel(s) du domaine SAM de *PfpTKL*. Nous avons donc opté pour un criblage d'une banque d'ADNc de *P. falciparum* par double hybride de levure (Y2H, cf. principe de la méthode dans la section Matériel & Méthodes), en utilisant la portion 838–1594 bp du transcrit de *PfpTKL* (encodant le domaine SAM et le motif RVxF1, AA 255–371) clonée en pGBKT7 et transformée en levures Y187. Ces dernières ont été croisées avec des levures Y2Hgold transformées avec la banque ADNc de *P. falciparum* clonée en pGADT7. Les diploïdes obtenus suite au croisement ont été sélectionnés sur des milieux de plus en plus stringents (TDO/A puis QDO/A), dans le but de ne sélectionner que les interactions les plus fortes. Trente-deux diploïdes sur les 6000 repiqués se sont développés sur milieux stringents et 31 ont pu être analysés

par séquençage (cf. [Annexe VII](#)). Seuls les clones comportant une séquence encodant un partenaire de SAM en cadre de lecture avec le domaine GAL4 AD (Activation Domain) du pGADT7 ont été considérés ([Figure 31](#)). Cela a permis d'identifier la pseudo-protéase *PfSERA5* (Serine Repeat Antigen 5, PF3D7_0207600) comme partenaire majeur de SAM (étant donné qu'elle a été détectée chez 65% des diploïdes exprimant l'appât et un partenaire étiqueté AD). À titre informatif, *PfSERA5* est une protéine de 997 acides aminés et la région minimum d'interaction avec SAM est localisée entre les AA 216 et 253 (cf. [Annexe VII](#)). Nous reviendrons sur le rôle de cette protéine et sur la relevance biologique de cette interaction dans la discussion, à la lumière des autres résultats collectés au cours de ce projet.

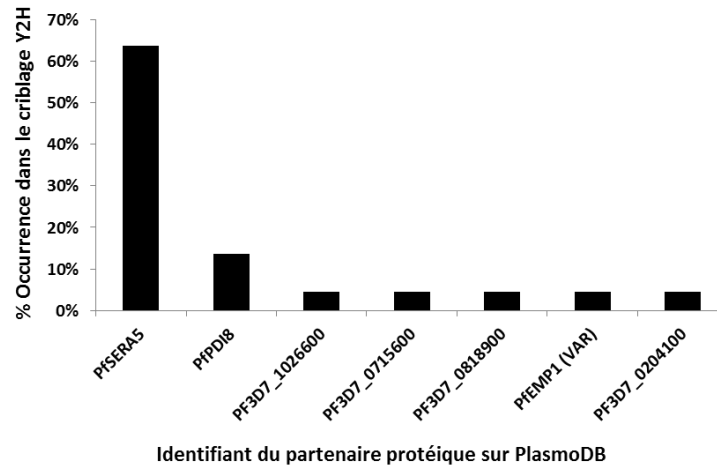


Figure 31 : Graphique présentant les résultats du criblage d'une banque d'ADNc de *P. falciparum* en utilisant la région de *PfpTKL* incluant SAM et RVxF1 comme appât. Trente-et-un clones ont été obtenus, dont 22 en cadre de lecture avec le domaine GAL4 AD (les résultats de séquençage de ces 22 clones sont présentés ici).

Pour confirmer l'interaction entre SAM et *PfSERA5*, nous avons de nouveau transformé puis effectué un croisement entre des levures Y187 transformées avec le pGBKT7 (vide, encodant la laminine comme témoin négatif ou la région SAM+RVxF1 comme précédemment ou le domaine SAM seul) et des levures Y2Hgold transformées avec le pGADT7 (vide ou encodant *PfSERA5*). Les diploïdes ont de nouveau été repiqués sur des milieux de plus en plus stringents. Les seuls capables de s'y développer étaient ceux exprimant au moins le domaine SAM de *PfpTKL* et *PfSERA5*, démontrant la spécificité de l'interaction entre ces deux partenaires ([Figure 32](#)), et excluant un rôle de RVXF1 dans cette interaction. Par ailleurs, ces diploïdes sont parvenus à croître sur le milieu le plus stringent (QDO/A), indiquant que cette interaction entre le domaine SAM de *PfpTKL* et *PfSERA5* est également forte.

Sur milieu TDO/A			Sur milieu QDO/A		
pGADT7 → pGBKT7 ↓	∅	<i>PfSERA5</i>	pGADT7 → pGBKT7 ↓	∅	<i>PfSERA5</i>
∅			∅		
Laminine			Laminine		
Domaine SAM de <i>PfpTKL</i>			Domaine SAM de <i>PfpTKL</i>		
Région SAM+RVxF1 de <i>PfpTKL</i>			Région SAM+RVxF1 de <i>PfpTKL</i>		

Figure 32 : Interaction entre les domaines SAM de *PfpTKL* et *PfSERA5* en double hybride de levure. Sont présentés les résultats des croisements de levures Y187 transformées avec divers construits en pGBKT7 et de Y2Hgold transformées avec divers construits en pGADT7. Les diploïdes résultant de ces croisements ont été repiqués sur des milieux stringents (TDO/A < QDO/A).

Nous n'avons cependant pas réussi à détecter les protéines partenaires (SAM, SERA5, etc.) directement en levure, malgré de nombreux essais d'extraction des protéines employant des techniques variées (tampons : 9% Triton-X100, RIPA ou 0,2M NaOH et techniques de lyse : vortex avec billes de verre, sonication). Pourtant, ces techniques ont fonctionné sur des levures exprimant d'autres protéines.

De ce fait, plutôt que de vérifier l'interaction des deux partenaires protéiques par immunoprécipitation en levures, nous avons opté pour une production des deux partenaires sous forme de protéines recombinantes. Le domaine SAM de *PfpTKL* étant particulièrement hydrophobe, son expression en bactéries s'est révélée complexe. Nous avons finalement opté pour l'utilisation d'un gène synthétique optimisé ([Annexe V.1](#)) et une fusion à la GST en N-ter afin de stabiliser la protéine recombinante. *PfpTKL_SAM-GST* a ensuite été utilisée dans des expériences de GST Pull Down avec le fragment de *PfSERA5* le plus long séquencé lors du criblage en Y2H (AA 145-276 ; protéine recombinante *PfSERA5-6His*). Afin de confirmer que *PfSERA5* interagissait exclusivement avec le domaine SAM de *PfpTKL*, nous avons aussi produit la région contenant uniquement RVxF1 sous forme de protéine recombinante (*PfpTKL_RVxF1-GST*). Trois témoins négatifs (*PfPP1c-GST*, *Pfelf2γ-GST* et la GST seule) ont également été utilisés. Après incubation avec les 5 protéines précédentes fixées à des billes de glutathion et lavages, *PfSERA5-6His* n'a été retrouvée liée qu'aux billes *PfpTKL_SAM-GST* ([Figure 33](#)). Cela a ainsi démontré que l'interaction entre le domaine SAM de *PfpTKL* et *PfSERA5* est directe et spécifique.

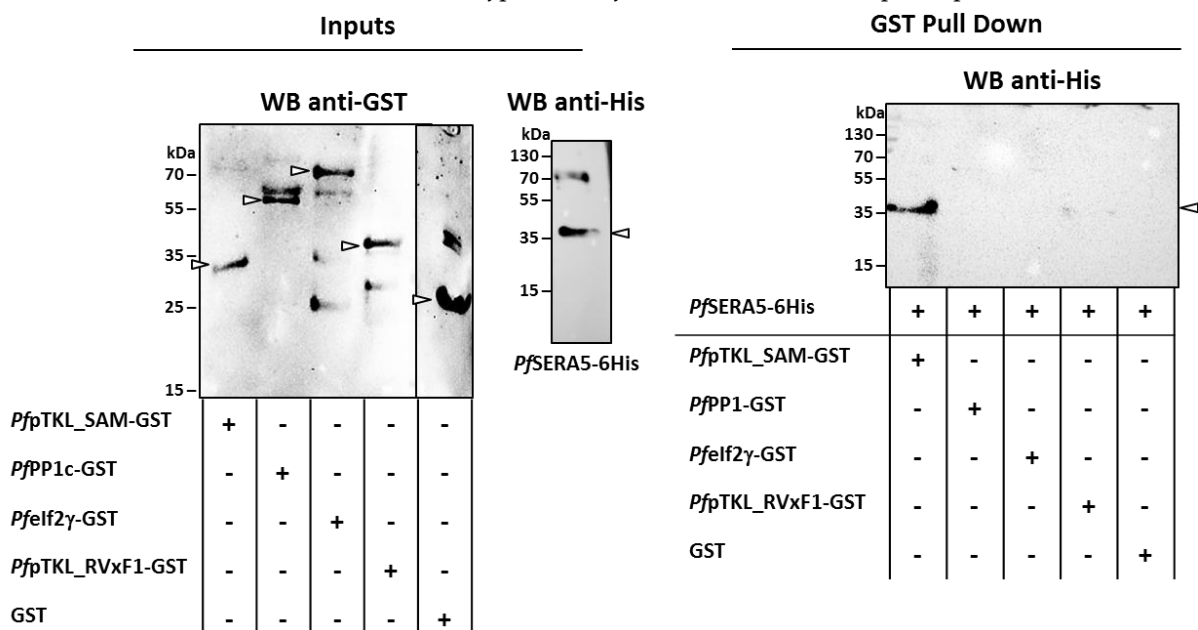


Figure 33 : Analyse par GST Pull Down de l'interaction entre *PfSERA5-6His* et les différents types de billes GST présentées sur le WB anti-GST de gauche. La fixation de *PfSERA5* aux billes a été détectée par WB anti-His (WB de droite ; tête de flèche).

En conclusion, nous avons montré que le domaine SAM de *PfpTKL* comporte toutes les caractéristiques structurales habituelles des domaines SAM (notamment 5 hélices α qui se replient de manière orthogonale les unes par rapport aux autres autour d'un cœur hydrophobe). Nous avons, de plus, démontré que ce domaine interagit de manière directe, spécifique et forte avec *PfSERA5* au moyen de deux approches différentes.

3. Caractérisation des motifs RVxF

a. Introduction aux motifs RVxF

Comme nous l'avons dit plus tôt dans l'introduction, les phosphatases catalysent les réactions de déphosphorylation, permettant de retirer les groupements phosphate ajoutés par les kinases. Elles modulent ainsi la fonction de leurs substrats protéiques selon les besoins de la cellule. Si les sous-unités catalytiques des phosphatases à S/T sont 2 à 10 fois moins nombreuses que les kinases à S/T, leurs interactions avec des partenaires protéiques – faisant également office de sous-unités régulatrices – donnent une pléthore d'holoenzymes (*Ceulemans, Stalmans, and Bollen 2002; Ceulemans and Bollen 2004*). La caractérisation d'une phosphatase, notamment d'une phosphatase de type PPP, inclut donc la recherche de ses partenaires protéiques et la compréhension du rôle de chacune des interactions qui se mettent ainsi en place.

Les motifs d'interaction des partenaires de PP1c avec la sous-unité catalytique sont RVxF, FKK, SILK, MyPhoNE (Myosin Phosphatase N-terminal Element) et $\Phi\Phi$ (*Khalife and Pierrot 2016*). À l'exception de MyPhoNE, ils ont tous été nommés suivant leur séquence consensus. RVxF est l'un des codes de liaison à PP1c les plus importants. Il a été identifié pour la première fois par Egloff et al. (*Egloff et al. 1997*) dans la protéine Glycogen-subunit (G-subunit) par co-cristallisation avec PP1c. Plusieurs études ont ensuite tenté de définir une séquence consensus pour RVxF. Wakula et al. ont tout d'abord défini [RK]-X₀₋₁-[VI]-[P]-[FW] (*Wakula et al. 2003*). En procédant par mutagenèse dirigée pour définir plus précisément les types d'acides aminés importants pour l'interaction avec PP1c à chaque position du motif, Meiselbach et al. définissent une séquence consensus 10 fois plus spécifique mais 40% moins sensible (d'après (*Hendrickx et al. 2009*)) : [HKR]-[ACHKMNRSTV]-[V]-[CHKNQRST]-[FW] (*Meiselbach, Sticht, and Enz 2006*). Hendrickx et al. définissent donc une séquence consensus située à mi-chemin entre les deux séquences citées précédemment : [KR]-[KR]-[VI]-[FIMYDP]-[FW] (*Hendrickx et al. 2009*). Les motifs RVxF sont impliqués dans une interaction forte avec un sillon hydrophobe de PP1c. Cette interaction peut être modulée par phosphorylation du résidu en position x si ce dernier est une Sérine ou une Thréonine (*Nasa et al. 2018*). Les motifs d'interaction comme FKK ou SILK, lorsqu'ils sont présents, interviennent après RVxF pour renforcer l'interaction avec la phosphatase et impliquer le partenaire de la PP1c dans la régulation de son activité enzymatique (*Ceulemans and Bollen 2006; Deveuve et al. 2017*).

b. Étude du potentiel d'interaction des motifs RVxF de PfpTKL avec PP1c

Le motif RVxF1 de PfpTKL a été identifié *in silico* à l'aide d'une séquence consensus stringente, [KR]-[KR]-[ACHKMNRSTV]-V-[CHKNQRST]-[FW], comme détaillé plus haut dans la partie Cadre & Objectifs de ce manuscrit (*Hollin et al. 2016*). Au vu de la grande spécificité de cette séquence consensus, nous avons utilisé ensuite la séquence consensus plus sensible de Wakula pour rechercher d'autres motifs RVxF éventuels. Cela a permis d'identifier un deuxième motif RVxF au sein du domaine kinase de PfpTKL, nommé RVxF2 (Figure 21). Pour rappel, RVxF2 est, au contraire de RVxF1, conservé chez tous les homologues de PfpTKL de la plupart des espèces de *Plasmodium* (Figure 22, Tableau 9). À titre informatif, aucun autre motif d'interaction avec PP1c n'a été identifié dans la séquence de PfpTKL.

Tableau 9 : Alignement (avec MAFFT) des régions contenant RVxF1 et RVxF2 chez des homologues de *Pfp*TKL de différentes espèces de *Plasmodium*

		RVxF-1				RVxF-2			
Numérotation des AA de PF3D7_1106800		477	482	487	492	1213	1218	1223	1228
									
<i>P. falciparum</i>	PF3D7_1106800	SEIKKIMNK	KKVSF	EYDNNE		YLNKEIKRKR	KKVLF	SYLKTH	
<i>P. reichenowi</i>	PRCDC_1105300	SEIKKIVNK	KKVSF	EHDNNE		YLNKEKTKMK	KKVLF	SYLKTH	
<i>P. knowlesi</i>	PKNH_0904400	EE-VPVLTKK	IYNGDAVYQ			YVKKKKKKKK	KYILF	TYPQPK	
<i>P. malariae</i>	PmUG01_09016400	MEKNIINDKKKT	TSTSKPINS			YLK-RKKKKK	KKVLF	SYLKTQ	
<i>P. ovale</i>	PocGH01_09013500	REDKQKGQKKV	SPFIKGP			YVKKKKAKQT	KKVLF	SYLKRK	
<i>P. gallinaceum</i>	PGAL8A_00334100	MENKHINSKDAL	-FLDGINS			YLNKNERKKKK	KKFLF	SYLKTQ	
<i>P. berghei</i>	PBANKA_0940100	NNQKIIMN-QIK	SMIDQKN-			YL--EKKKKK	KKILF	SYLKTH	
<i>P. yoelii</i>	PYYM_0941700	NKKKIMSN-QTK	SMIDQKN-			YL--EKKKKK	KKILF	SYLKTH	
<i>P. chabaudi</i>	PCHAS_0904200	DDQKIIMNKQIK	SMINQKN-			YF--EKKKQK	NKILF	SYLKTH	
<i>P. vivax</i>	PVX_091015	EE-AAVLTEKML	RSGGALYQ			YVKKQKKKKK	KKILF	SYPQTQ	

Afin d'étudier la capacité de chacun de ces motifs à interagir avec *Pf*PP1c, la région de *Pfp*TKL comprise entre les AA 371-531 contenant RVxF1 a été produite sous forme de protéine recombinante (6His-*Pfp*TKL_RVxF1) et le domaine kinase recombinant fusionné à 6His, pTKL_KD_WT présenté plus haut a été utilisé pour étudier la capacité de RVxF2 à interagir avec *Pf*PP1c. Un GST Pull Down avec *Pf*PP1c-GST a ensuite été effectué en utilisant des billes *Pf*elF2γ-GST et GST comme témoins négatifs d'interaction. L'analyse par western blot avec un anticorps anti-6His montre que seules les billes *Pf*PP1c-GST permettent de précipiter les protéines recombinantes contenant RVxF1 et RVxF2 (Figure 34, pistes 1 et 4 sur le WB de droite). Ceci indique une interaction directe et spécifique entre les régions contenant RVxF1 et RVxF2 d'une part, et la PP1c d'autre part.

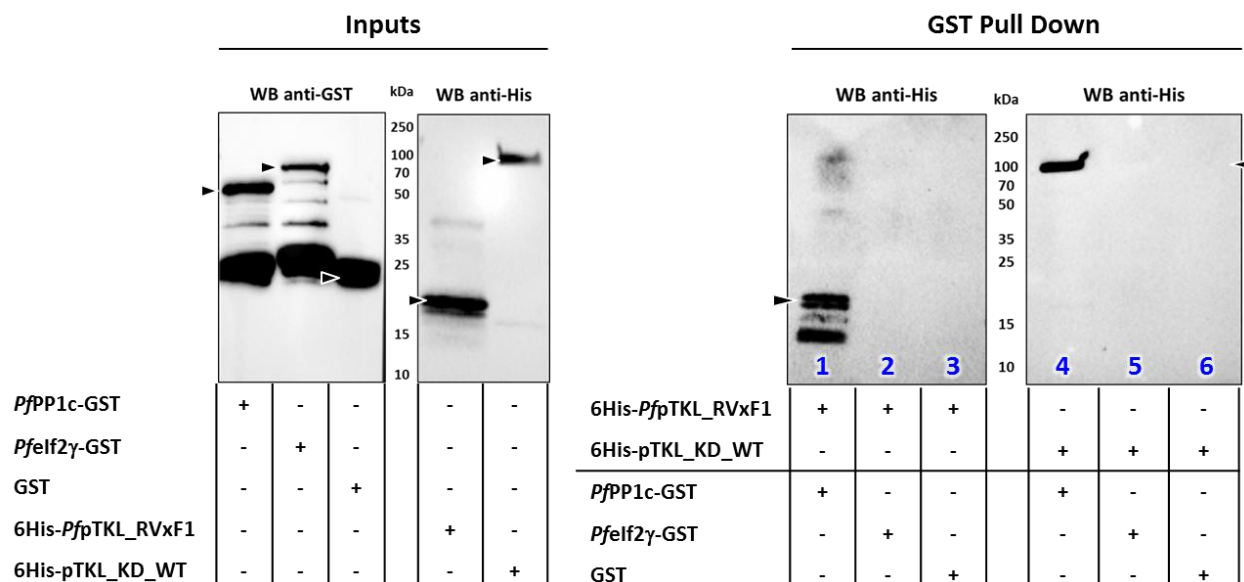


Figure 34 : Analyse par GST Pull Down de l'interaction entre RVxF1 et RVxF2 d'une part, et différentes protéines étiquetées GST et fixées à des billes de glutathion (présentées sur le WB anti-GST de gauche). La présence des protéines étiquetées 6-His liées aux billes a été révélée par WB anti-His (droite).

Afin d'étudier ces interactions et leur potentiel de modulation de l'activité de PP1c dans un contexte *in vivo*, nous avons opté pour l'utilisation du modèle de l'ovocyte de Xénope. Brièvement, dans ce modèle, la PP1c de Xénope contribue à empêcher l'entrée en méiose (Germinal Vesicle Breakdown - GVBD) des ovocytes bloqués en Prophase I. De ce fait, l'injection d'un inhibiteur de PP1c déclenche la GVBD, alors qu'un activateur de PP1c freine la GVBD induite par la progestérone (voir principe et méthodes plus détaillés dans la section Matériel & Méthodes). L'utilisation de ce modèle pour étudier les interactions de partenaires potentiels de PP1c avec la phosphatase, ainsi que leur impact sur son activité enzymatique, est pertinente du fait de la grande conservation de la sous-unité catalytique PP1c dans le règne des eucaryotes (80% d'identité entre *Pf*PP1c et *Xe*PP1c).

Dans une première approche, nous avons micro-injecté les protéines recombinantes 6His-*Pfp*TKL_RVxF1 et pTKL_KD_WT dans des ovocytes bloqués en Prophase I. Afin de vérifier que l'interaction entre le domaine kinase de *Pfp*TKL et PP1c était spécifiquement due au motif RVxF2, nous avons muté ce motif ¹²¹⁶KRKVL¹²²¹ en ¹²¹⁶KRIMAS¹²²¹. Le choix des résidus IMAS a été effectué sur la base des travaux de Mesiselbach et al. qui ont démontré le rôle de la nature des AA du cœur du motif dans l'interaction avec PP1c (*Meiselbach, Sticht, and Enz 2006*). Le mutant ainsi obtenu est étiqueté comme les domaines kinase natif et mutants présentés plus tôt et a été appelé pTKL_KD_KRIMAS.

Ensuite, et parce que la micro-injection d'une kinase active dans les ovocytes de Xénope bloqués en Prophase I engendre l'activation de diverses voies de transduction du signal par phosphorylation, nous avons également micro-injecté les mutants du domaine kinase pTKL_KD_ND et pTKL_KD_DG. Aucune des protéines micro-injectées n'a déclenché la GVBD (alors qu'en présence de progestérone, 100% des ovocytes entraient en GVBD – [Tableau 10](#)). Cela indique donc que ces protéines ne sont pas des inhibiteurs de *Xe*PP1c et que les kinases recombinantes sont inactives, en corrélation avec les données présentées dans la partie II.1 de ce manuscrit.

Tableau 10 : Analyse de la GVBD (Germinal Vesicle Breakdown) induite dans des ovocytes de *X. laevis* bloqués en Prophase I après micro injection de différentes régions de *Pfp*TKL exprimées sous forme recombinante. Les protéines proviennent de 2 lots différents et les ovocytes de *X. laevis* de 3 animaux différents. Le tampon d'élution des protéines sert de témoin négatif d'injection et la progestérone de témoin positif de GVBD.

Micro-injection	Pourcentages de GVBD au bout de 15 heures		
	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3
Tampon d'élution (témoin négatif)	10	0	0
6His- <i>Pfp</i> TKL_RVxF1	0	0	0
pTKL_KD_WT	20	20	0
pTKL_KD_KRIMAS	0	0	0
pTKL_KD_ND	0	0	0
pTKL_KD_DG	10	0	0
Incubation en Progestérone 10 μM	100	100	100

Dans une 3^{ème} série d'expériences, les mêmes protéines recombinantes ont été micro-injectées dans des ovocytes de Xénope bloqués en Prophase I, puis ces derniers ont été incubés en progestérone 10 μ M une heure plus tard. Le déclenchement de la GVBD a été suivi pour chaque protéine pendant 15-16 heures ([Figure 36 a-d](#)) et leur capacité à interagir avec *Xe*PP1c a été évaluée au bout de 2 et 15 heures ([Figure 35](#)).

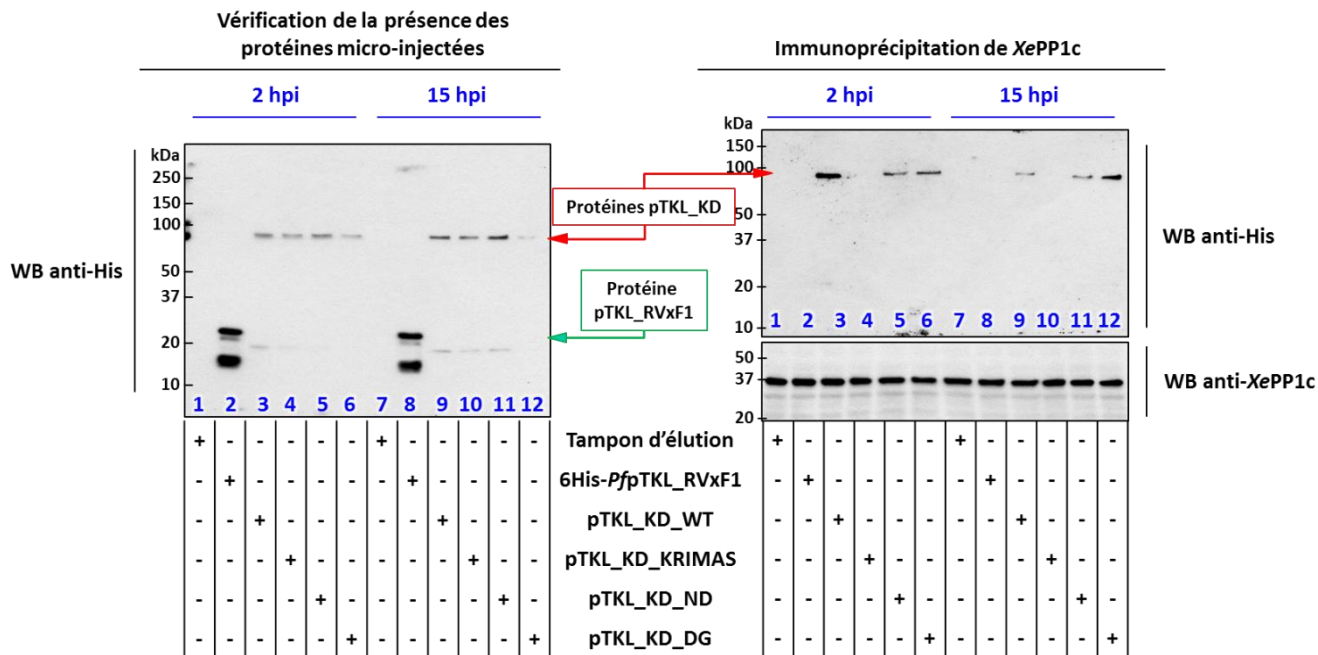


Figure 35 : Analyse de l'interaction des différentes régions de *PfpTKL* avec PP1c en ovocyte de Xénope. Expériences d'immunoprécipitation (IP) de *XePP1c* effectuées 2 et 15 heures après micro-injection de différentes protéines sauvages ou mutées (le tampon d'élution sert de témoin négatif) – hpi = heures post-injection. Les ovocytes ont été incubés en présence de progestérone 10 μ M une heure après micro-injection des protéines étudiées. La présence des protéines micro-injectées a été validée par WB anti-His (WB de gauche). Après IP, les protéines interagissant avec *XePP1c* sont révélées par WB anti-His (WB de droite, panel du haut).

Figure 36 (page suivante) : Suivi du déclenchement de la GVBD pendant 15 à 16 heures après micro-injection des protéines étudiées (pour chaque protéine, 3 expériences ont été réalisées avec deux lots indépendants de protéines et 3 réplicats biologiques d'ovocyte). Une heure après micro-injection, les ovocytes sont incubés en présence de progestérone 10 μ M. Les ovocytes recevant le tampon d'élution sont les témoins positifs de chaque expérience.

(a, b) Graphiques présentant le pourcentage de GVBD obtenu (en examinant l'apparition d'une tache de maturation à la surface des ovocytes) suite à la micro-injection de protéines contenant un motif RVxF WT ou muté (a), ou contenant le domaine kinase de *PfpTKL* WT ou muté (b) (moyenne $\pm$ SD). Le contrôle positif de GVBD est apporté par la micro-injection du tampon d'élution en présence de progestérone.

(c) Suivi du déclenchement de la GVBD à l'échelle moléculaire : la déphosphorylation de *XeCDC2* est un marqueur de l'activation des voies de transduction du signal nécessaire à la GVBD et la phosphorylation de *XeH3* est un marqueur de la condensation des chromosomes. La micro-injection du tampon d'élution des protéines suivie d'une incubation des ovocytes en progestérone 10 μ M ou non servent respectivement de témoin de déclenchement de la GVBD positif ou négatif. Les lysats d'ovocytes de Xénope, collectés 15 heures après micro-injection, sont analysés en western blot révélé à l'aide d'un anti-His (détection des protéines micro-injectées, panel du haut), d'un mélange d'anticorps anti Phospho-*XeCDC2* et anti Phospho-*XeH3* (détection de *XeCDC2* et *XeH3* phosphorylées, panel du milieu), ou d'un mélange d'anticorps anti-*XeCDC2* et anti *XeH3* (contrôle de la présence de *XeCDC2* et *XeH3*, panel du bas).

(d) Planche photographique montrant l'état des ovocytes (vue extérieure et ou hémisection) micro-injectés avec les protéines étudiées ou les témoins 15 ou 24 heures post micro-injection. En l'absence de progestérone on observe en hémisection la présence de la vésicule germinale. En présence de progestérone (+ tampon d'élution), la vue extérieure (15h et 24h) montre l'apparition au pôle animal de la tache blanche caractéristique de la GVBD, et correspondant à une rupture de la vésicule germinale comme attesté sur le cliché après hémisection (disparition de la vésicule).

Ces expériences ont montré que :

- ◆ 6His-*Pfp*TKL_RVxF1 n'interagit pas avec *XePP1c* (Figure 35 – Pistes 2 et 8). La région de *Pfp*TKL contenant RVxF1 n'a pas non plus d'impact sur la GVBD (les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec le contrôle positif, i.e. des ovocytes micro-injectés avec le tampon d'élution des protéines et incubés en progestérone – Figure 36 a, c – Piste 2, d). Il est donc très probable que RVxF1 n'ait pas d'impact sur la GVBD du fait de son incapacité à interagir avec *XePP1c*.
- ◆ pTKL_KD_WT interagit avec *XePP1c* (Figure 35 – Pistes 3 et 9) et semble également l'activer puisque seulement 20 à 40% des ovocytes micro-injectés avec pTKL_KD_WT et incubés en progestérone déclenchent leur GVBD (contre 100% des ovocytes du contrôle positif – Figure 36 a, b, d). Ces données sont renforcées par le fait que les ovocytes micro-injectés avec pTKL_KD_WT présentent une absence de phosphorylation de *XeH3* (Figure 36 c – Piste 3). Ces ovocytes présentent les mêmes caractéristiques que les ovocytes contrôles (tampon d'élution sans progestérone, Figure 36 c – Piste 7)) : leurs voies de transduction du signal n'ont pas été activées et leur ADN ne s'est pas condensé (marqueur : absence de phosphorylation de *XeH3*). Ces ovocytes sont donc bloqués en Prophase I. Afin de confirmer que l'impact sur la GVBD était bien lié à l'interaction avec *XePP1c* via RVxF2, nous avons effectué des micro-injections avec la protéine recombinante pTKL_KD_KRIMAS. Cette dernière s'est avérée incapable d'interagir avec *XePP1c* (Figure 35 – Pistes 4 et 10) et 100% des ovocytes micro-injectés avec pTKL_KD_KRIMAS et incubés en progestérone ont déclenché leur GVBD (Figure 36 a, c, d). Ces expériences indiquent donc que *Pfp*TKL interagit avec *PP1c* via son motif RVxF2 et semble activer la phosphatase, probablement de manière allostérique, via ce motif.
- ◆ pTKL_KD_ND présente un profil d'activation des ovocytes de Xénope similaire à pTKL_KD_WT lorsque seule l'apparition de la tache de maturation à la surface des ovocytes est utilisée comme marqueur de GVBD (Figure 36 b). En revanche, lorsque des hémisections sont effectuées, l'on constate que la membrane nucléaire s'est rompue, indiquant qu'il y a bien eu GVBD (Figure 36 d). Cette observation est renforcée par le fait que *XeCDC2* est déphosphorylée et *XeH3* phosphorylée comme dans le contrôle positif (Figure 36 c – Piste 5). Pourtant, pTKL_KD_ND, malgré les observations faites ci-dessus, est toujours capable d'interagir avec *XePP1c* (Figure 35 – Pistes 5 et 11). Le déclenchement de la GVBD a cependant lieu malgré cette interaction, mais le noyau de l'ovocyte ne parvient pas à monter à la surface de la cellule.
- ◆ pTKL_KD_DG présente un profil d'activation des ovocytes de Xénope similaire au contrôle positif, aussi bien en termes de déclenchement de la GVBD que de montée du noyau à la surface des ovocytes (Figure 36 b-d). Pourtant, cette protéine est, comme pTKL_KD_ND, capable d'interagir avec *XePP1c* (Figure 35 – Pistes 6 et 12).

Ainsi, les protéines pTKL_KD_ND et pTKL_KD_DG interagissent avec *XePP1c*. Pourtant, malgré cette interaction, la GVBD se produit dans les deux cas. Cela indique donc potentiellement que ces interactions n'impactent pas l'activité de la phosphatase. L'autre possibilité serait que les deux interactions soient capables d'activer *XePP1c* (freinant ainsi la GVBD), puis que d'autres phénomènes d'activation des voies de transduction du signal viennent contrebalancer cet effet (i.e. en favorisant l'entrée en GVBD). De plus, nous avons constaté une lyse prématurée des ovocytes micro-injectés avec ces deux protéines, pTKL_KD_ND et DG (Figure 36d). Ce phénomène n'est observé avec aucune autre protéine (avec lesquelles la lyse des ovocytes a lieu deux fois plus longtemps après, de manière « naturelle », comme

pour tout ovocyte non fécondé). Nous avons émis l'hypothèse que les différentes observations faites avec ces deux protéines pourraient s'expliquer par leur capacité de liaison à l'ATP qui serait plus importante que pTKL_KD_WT (Figure 28). Nous avons donc collecté des lysats d'ovocytes de Xénope micro-injectés avec les différentes protéines étudiées et avons effectué un dosage de l'ATP à l'aide du kit KinaseGlo® de Promega. Nous n'avons cependant pas mesuré de valeurs significativement différentes avec pTKL_KD_ND et DG comparé au contrôle (les taux d'ATP mesurés étaient respectivement équivalents à 1,03 et 0,96 fois ceux mesurés dans des lysats d'ovocytes suite à la micro-injection de tampon d'élution).

En conclusion, nos résultats montrent que la région de *Pfp*TKL contenant RVxF1 interagit avec *Pf*PP1c *in vitro* mais ne semble pas capable de faire de même avec *Xe*PP1c *in vivo*. Dans le même temps, le motif RVxF2 de *Pfp*TKL est directement impliqué dans une interaction forte et spécifique avec PP1c qui permet d'activer la phosphatase *in vivo*.

Nous discuterons des résultats obtenus avec les domaines kinases mutés pTKL_KD_ND et pTKL_KD_DG d'une part, et les motifs RVxF1 et 2 d'autre part, dans la section Discussion & Perspectives de ce manuscrit.

III. Étude de *PfpTKL* chez le parasite

Au sein de l'équipe 2, nous utilisons diverses approches de génétique inverse pour étudier la localisation subcellulaire et l'essentialité des protéines étudiées, à la fois chez *P. falciparum* et *P. berghei* (l'une des espèces de *Plasmodium* capable d'infecter des rongeurs). Nous avons initialement envisagé d'effectuer diverses expériences de génétique inverse sur *PfpTKL* (cf. ci-dessous). Nous avons cependant rencontré de nombreux problèmes de transfection et de clonage des parasites en raison desquels nous n'avons pu obtenir de souche viable et stable. Voici néanmoins brièvement ce qui a été réalisé chez *P. falciparum* (l'obtention et l'étude de souches *P. berghei* modifiées par génétique inverse sera présentée en partie IV) :

- ♦ **Générer des parasites exprimant *PfpTKL*-HA** : plusieurs tentatives de KI-HA ont été effectuées à l'aide du pCAM-BSD-double HA, en clonant l'extrémité 3' de *PfpTKL* en amont de l'étiquette double-HA du vecteur (Figure 37a). Dans trois transfections sur six, nous avons obtenu des parasites résistants à la blasticidine (BSD) (Tableau 11). Ils ont été analysés par génotypage afin de détecter l'intégration (Figure 37b). Avant de cloner les parasites, des levées de BSD ont été effectuées afin de favoriser la sélection de parasites ayant intégré la construction (Tableau 11). Cependant, malgré ces levées de l'antibiotique de sélection, nous n'avons pas réussi à obtenir de parasites clonés (clonage par dilution limite). Pour finir, l'intégration a été perdue au bout de la troisième levée de BSD (Tableau 11). En l'absence d'un antisérum anti-*PfpTKL* performant, obtenir ces souches aurait permis d'étudier l'expression de *PfpTKL*, sa localisation subcellulaire et d'identifier ses partenaires protéiques par immunoprécipitation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse.

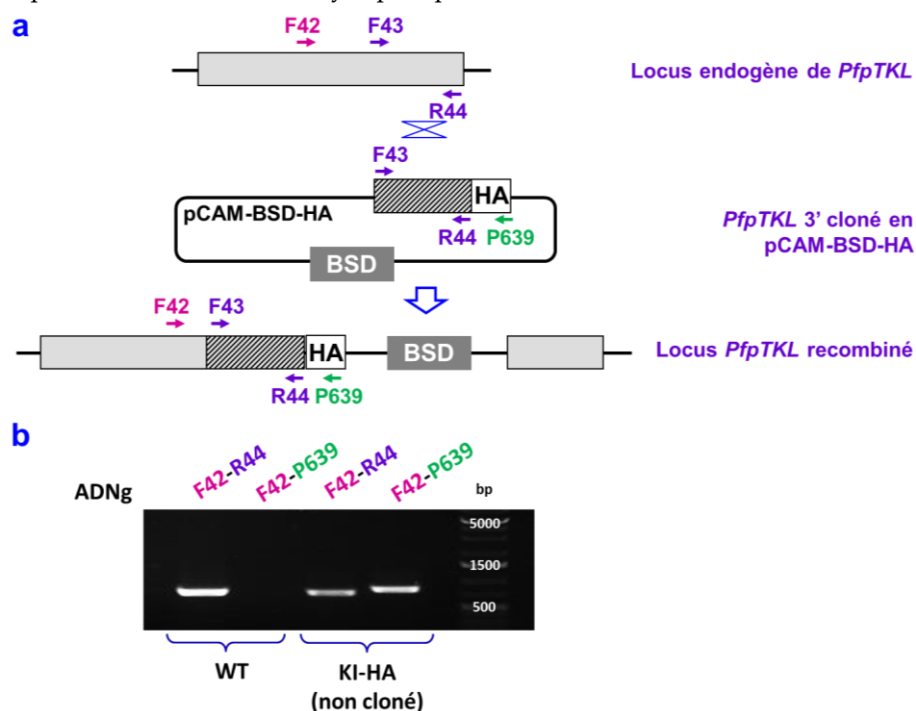


Figure 37 : Knock In HA de *PfpTKL*

(a) Présentation du système de KI-HA à l'aide du pCAM-BSD-HA

(b) Résultats de génotypage obtenus sur la souche transfectée (non clonée) versus la souche WT utilisée pour les transfections. Les PCR de contrôle ont été amplifiées à l'aide du couple F42-R44 (pistes 1 et 3). Les PCR d'intégration ont été amplifiées à l'aide du couple F42-P639 (pistes 2 et 4).

Tableau 11: Résumé des essais d'obtention d'une souche clonée exprimant *PfpTKL*-HA

Construction (drogue de sélection)	Obtention de parasites résistants à la pression de sélection	Levées et clonages	Remarques
pCAM-BSD-double HA (Blasticidine, BSD)	Oui – trois fois/six transfections	1 levée de 3 semaines + 1 levée de 4 semaines + 1 levée de 5 semaines 3 essais de clonage à partir des parasites issus de la 2 ^{ème} levée	Détection puis perte de l'intégration entre la 2 ^{ème} et la 3 ^{ème} levée Échec des 3 tentatives de clonage par dilution limite

- ♦ Générer des parasites où *PfpTKL* est interrompu (à l'aide du pCAM-BSD puis du pSLI-TGD (*Birnbaum et al. 2017*), [Figure 38](#), [Tableau 12](#)) afin d'étudier l'essentialité de *PfpTKL* pour le développement des stades sanguins et la production des gamétocytes de *P. falciparum*. Cela devait nous permettre de confirmer ou non les données de Zhang et al. collectées par mutagenèse par saturation (13 transposons PiggyBac ont pu être insérés dans et autour du gène *PfpTKL*, indiquant que *PfpTKL* est certainement dispensable pour la complétion du cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum*) (*M. Zhang et al. 2018*). Les deux systèmes utilisés ici sont présentés dans la légende de la [Figure 38](#).

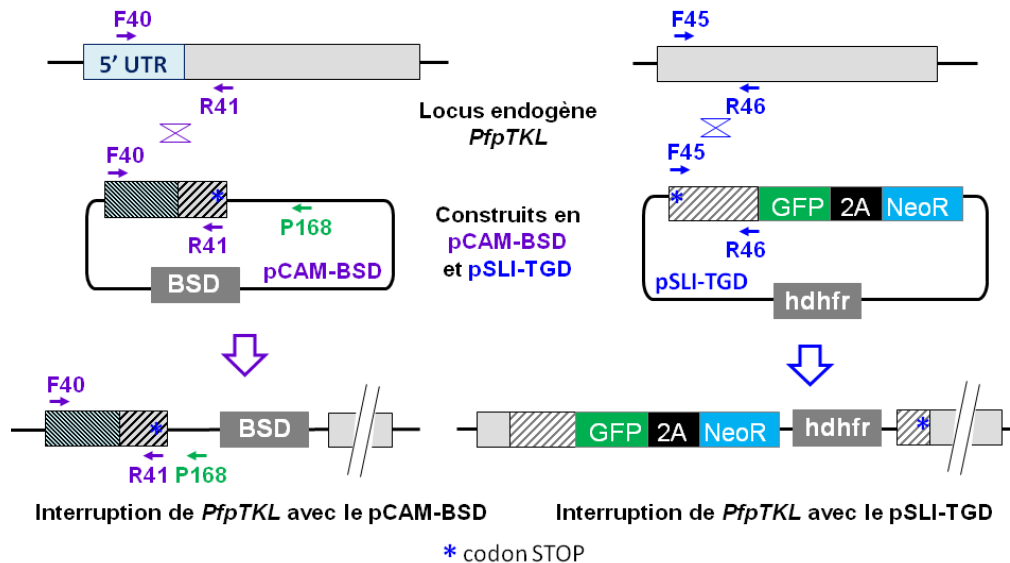


Figure 38 : Présentation des systèmes de KO chez *P. falciparum* basés sur le pCAM-BSD (schéma de gauche) et le pSLI-TGD (schéma de droite). Avec le pCAM-BSD, une partie de la région encodant la 5'UTR de *PfpTKL* et le tout début du gène (suivi d'un codon STOP) ont été clonés dans le plasmide de manière à interrompre *PfpTKL* au plus tôt avec une cassette de résistance à la blasticidine (BSD). Dans le cas du SLI-TGD (Selection-Linked Integration – Targeted Gene Disruption), l'extrémité 5' du gène est clonée dans le plasmide et un codon STOP est inséré dans l'amorce Forward de clonage (F45 ici). Il vise à empêcher l'expression d'une protéine de manière épisomale par le construit transfecté. Après recombinaison, le gène d'intérêt est interrompu par la séquence de la GFP séparée d'une cassette de résistance à la Néomycine G418 (NeoR) par un peptide linker (2A). Ainsi, après sélection des parasites transfectés par la WR (en raison de la présence de la cassette de résistance *hdhfr*), il est possible de sélectionner les intégrants puisque NeoR se trouve sous le contrôle du promoteur endogène du gène d'intérêt.

Comme avec la construction précédente, plusieurs essais de transfection (quatre à six – [Tableau 12](#)) ont été effectués avec chaque construction. Aucun parasite résistant à la BSD n’a jamais été obtenu avec le pCAM-BSD, tandis que des parasites résistants à la WR ont été obtenus après une transfection sur les quatre effectuées avec le pSLI-TGD. Ces derniers ont été traités à la Néomycine (G418) afin de sélectionner les intégrants, ce qui a pu être effectué sans problème avec 3 réplicats techniques. En revanche, ces parasites résistants à la G418 n’ont pas pu être remis en culture sous pression avec la WR (probablement en raison d’un problème de préparation du milieu de culture) et aucun des aliquots cryoconservés suite à cette transfection n’a permis de relancer l’étude des parasites issus de cette transfection.

Tableau 12 : Résumé des essais effectués pour obtenir des parasites KO pour *PfpTKL*

Construction (drogue de sélection)	Obtention de parasites résistants à la sélection	Levées et clonages	Remarques
pCAM-BSD (BSD)	Non (six fois/six)	-	-
pSLI-TGD (WR99120, WR)	Oui (une fois/quatre)	Parasites mis sous pression à la G418 (sélection des intégrants) = développement OK	Remise en culture sous WR létale pour les parasites (problème de préparation du milieu)

- ♦ **Étudier le rôle des motifs MORN dans la localisation de *PfpTKL*** en utilisant le système épisomal pARL-2-GFP ([Figure 39](#), [Tableau 13](#)). En effet, l’épisome pARL-2-GFP permet l’expression de la GFP dans le cytosol du parasite. Plusieurs études de peptides signal ont déjà été effectuées à l’aide du pARL-2-GFP ([Przyborski et al. 2005](#); [Thavayogarajah et al. 2015](#)). Ainsi, en clonant des portions de gènes encodant des motifs (PEXEL, peptide signal, etc.) ou domaines (transmembranaires par exemple) impliqués dans l’export des protéines en pARL-2-GFP, l’on peut en déduire, selon la localisation de la GFP fusionnée à ces motifs ou domaines, le rôle de ces derniers dans la localisation des protéines parasitaires au sein du globule rouge infecté (GRi). Notre objectif était donc, en fonction des résultats de localisation obtenus avec la protéine entière fusionnée HA par KI, de cloner les motifs MORN, puis différentes régions encodant les divers domaines de *PfpTKL* à la suite des motifs MORN, afin de savoir quels domaines sont impliqués dans la localisation de *PfpTKL*.

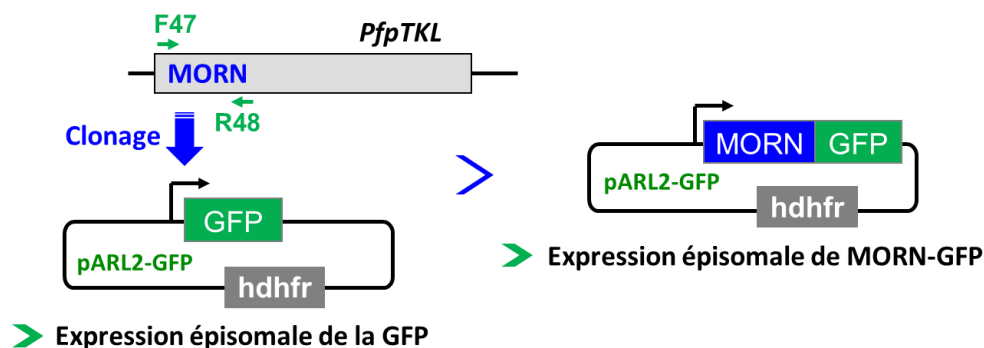


Figure 39 : Présentation du pARL-2-GFP et du construit effectué pour étudier le rôle des domaines MORN dans la localisation de *PfpTKL*

Six essais de transfections ont été effectués avec ces deux constructions. Bien que ces deux constructions soient épisomales, et ne nécessitent donc pas d'intégration au niveau du génome du parasite, nous n'avons obtenu des parasites résistants à la WR qu'une à deux fois sur six essais (Tableau 13). Chez les parasites transfectés avec le pARL-2-GFP, la GFP était exprimée comme attendu (i.e. détectable dans le cytosol des parasites). En revanche, avec les parasites transfectés avec la construction MORN-pARL-2-GFP, la GFP n'était pas détectable au microscope à fluorescence. Afin de vérifier que les parasites sous pression détenaient l'épisme, une extraction d'ADN plasmidique a été effectuée et analysée par séquençage ; la présence et la séquence de la construction ont ainsi été validées.

Tableau 13 : Résumé des essais d'obtention de souches transfectées avec des construits en pARL-2-GFP

Construction (drogue de sélection)	Obtention de parasites résistants à la pression de sélection	Levées et clonages	Remarques
pARL-2-GFP (WR)	Oui (deux fois/six)	Non (système épisomal)	Détection de la GFP dans le cytosol des parasites
Motifs MORN (région 4-558 pb de <i>PfpTKL</i>) en pARL-2-GFP (WR)	Oui (une fois/six)		Aucun signal GFP détecté en direct mais le plasmide a pu être détecté et séquencé à partir des parasites

Pendant deux ans d'essais et d'échanges avec des chercheurs effectuant des transfections sur *P. falciparum* en routine, comme le Dr Jude Przyborski (Malaria Team 9, Centre for Infectious Diseases, Heidelberg, Allemagne), nous avons optimisé le protocole de transfection des parasites *P. falciparum*. Cependant, l'électroporateur utilisé pour les transfections s'est révélé être défectueux (temps d'électroporation très longs), et nous avons dû le faire réviser. Les transfections ont recommencé à « fonctionner » (i.e. temps d'électroporation inférieurs à 12 ms, détection de parasites résistants dans le mois suivant la transfection) fin 2018, ce qui était trop tard pour obtenir des parasites qui puissent être étudiés dans le temps imparti pour ce projet de thèse.

En parallèle de ces essais chez *P. falciparum*, nous avons entrepris de réaliser l'étude de la protéine pTKL chez *P. berghei*, étude qui s'est révélée être plus fructueuse et qui est présentée ci-dessous.

IV. Étude de *PbpTKL*

Au vu des difficultés évoquées plus haut avec les transfections chez *P. falciparum*, nous avons décidé d'étudier l'homologue de *PfpTKL* chez *P. berghei* (*PbpTKL* – PBANKA_0940100). En effet, les séquences des deux protéines présentent globalement un taux d'identité de 36% et un taux de similarité de 51%, avec un taux d'identité situé entre 50 et 70% localement pour les différents motifs et domaines, indiquant que les deux protéines sont très probablement orthologues ([Annexe VIII](#)).

1. Étude de l'expression et de la localisation de *PbpTKL* (KI-mCherry)

Obtention d'une lignée *P. berghei* exprimant *PbpTKL*-mCherry

Pour générer une lignée de parasites *P. berghei* exprimant *PbpTKL*-mCherry, un KI-mCherry a été réalisé en transfectant des parasites WT avec la construction présentée en [Figure 40a](#). L'extrémité 3' de *PbpTKL* a été clonée en amont du tag mCherry du pL1886, la construction obtenue a été validée par séquençage puis linéarisée par *BsaBI* avant transfection. Des parasites résistants à la pyriméthamine (antibiotique de sélection) ont été obtenus et analysés par génotypage sur l'ADNg ([Figure 40b](#)) ainsi que sur l'ADNc ([Figure 40c](#)).

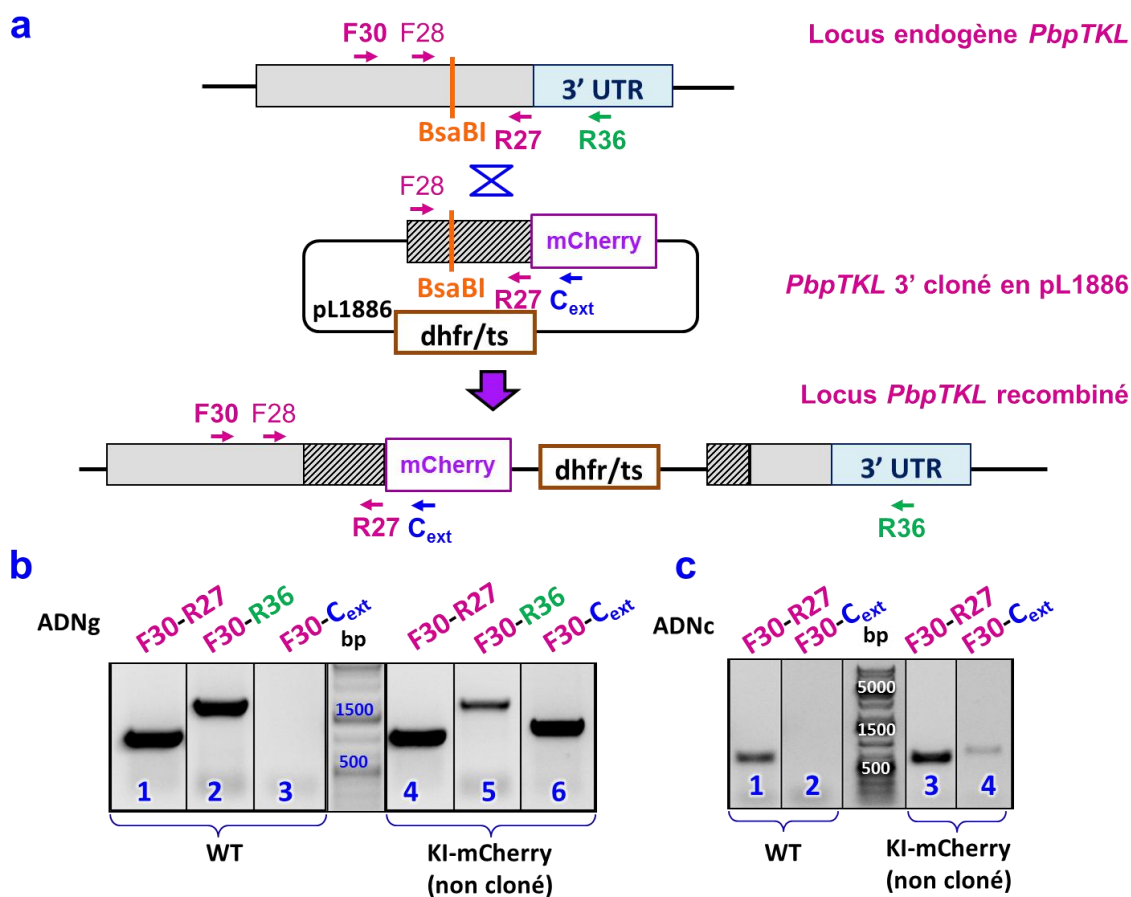


Figure 40 : Knock In mCherry de *PbpTKL* à l'aide du pL1886. (a) Schéma de la construction et du locus *PbpTKL* après recombinaison. (b) PCR et (c) RT-PCR de génotypage effectuées sur les parasites résistants pour vérifier l'intégration du construit (b, piste 6) et l'expression du transcrit *PbpTKL*-mCherry (c, piste 4).

Étude de la localisation de *PbpTKL*-mCherry

Après avoir vérifié l'intégration de notre construction en pL1886 et l'expression du transcrit *PbpTKL*-mCherry par RT-PCR (cf. Figure 40), nous avons cherché à suivre l'expression et la localisation de *PbpTKL*-mCherry au cours du développement intra-érythrocytaire du parasite. Le signal étant faible lorsqu'observé directement au microscope à fluorescence, nous avons effectué des IFA anti-mCherry (Figure 41). Par cette approche, nous avons pu observer l'expression de la protéine aux stades trophozoïte et schizonte. *PbpTKL*-mCherry est exprimée de manière forte dans les trophozoïtes, stade auquel elle n'est pas détectée dans le cytosol du parasite mais plutôt dans celui du GRi (aussi bien chez les GR mono- que poly-parasités – Figure 41). Au stade schizonte, le marquage est plus faible et semble plus diffus.

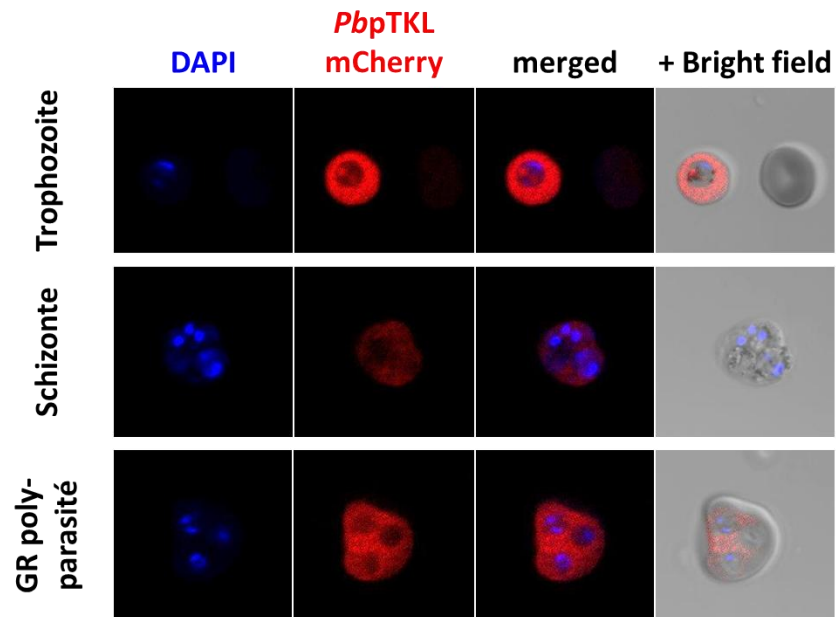


Figure 41 : Expériences d'Immunofluorescence effectuées sur des parasites exprimant *PbpTKL*-mCherry. Les noyaux des parasites sont marqués au DAPI (bleu) et *PbpTKL* est détectée via des anticorps anti-mCherry révélés par des anticorps secondaires marqués à l'AlexaFluor 594 (rouge).

Malgré l'intensité du signal mCherry détecté par IFA aux stades trophozoïtes, nous ne sommes pas parvenus à détecter la protéine de manière reproductible par WB (anti-mCherry ou en utilisant des anticorps polyclonaux de souris dirigés contre le domaine kinase de *PfpTKL*), que ce soit directement à partir d'un lysat cellulaire ou après immunoprécipitation anti-mCherry. Nous avons donc décidé d'utiliser une autre souche KI de manière à confirmer, puis affiner, les données de localisation présentées ci-dessus.

2. Étude de l'expression et de la localisation de *PbpTKL* (KI-AID-HA)

Génération d'une lignée *P. berghei* exprimant *PbpTKL*-AID-HA

Le système de KI-AID-HA est un système de knock-down par dégradation conditionnelle de protéines étiquetées Auxin-Induced Degradation (AID) (Philip and Waters 2015). Dans le cadre de ce système de knockdown, il est nécessaire d'utiliser des souches de *P. berghei* exprimant TIR1 (cette F-box protein permet la formation d'un complexe SKBP1-CUL1-F-box, SCF – Figure 42a). En présence d'auxine (3-Indoleacetic Acid, IAA), qui agit comme une colle moléculaire entre le domaine AID de la protéine étiquetée et TIR1, le complexe SCF devient capable d'interagir avec la protéine cible et une ubiquitine-ligase. Cette dernière ubiquitinye alors la protéine d'intérêt, permettant ainsi sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome. Deux souches de *P. berghei* exprimant TIR1 ont été générées par Philip & Waters : la première, pG230, est utilisée pour l'étude des stades sanguins et des gamétocytes (de leur émergence à leur fertilisation) et la deuxième, pG402, est utilisée pour l'étude des parasites après la fertilisation des gamètes (c'est-à-dire pour de la conversion des ookinètes aux stades hépatiques) (Philip and Waters 2015). Après clonage de l'extrémité 3' du gène *PbpTKL* en pG362 et validation de la construction, elle a été digérée par *BsaBI* avant transfection dans des parasites pG230 (Figure 42b). Après sélection des parasites résistants à la pyriméthamine, et clonage par dilution limite, la lignée clonée de *P. berghei* pG230 exprimant *PbpTKL*-AID-HA a été analysée par génotypage sur ADNg (Figure 42c) et ADNc (Figure 42d).

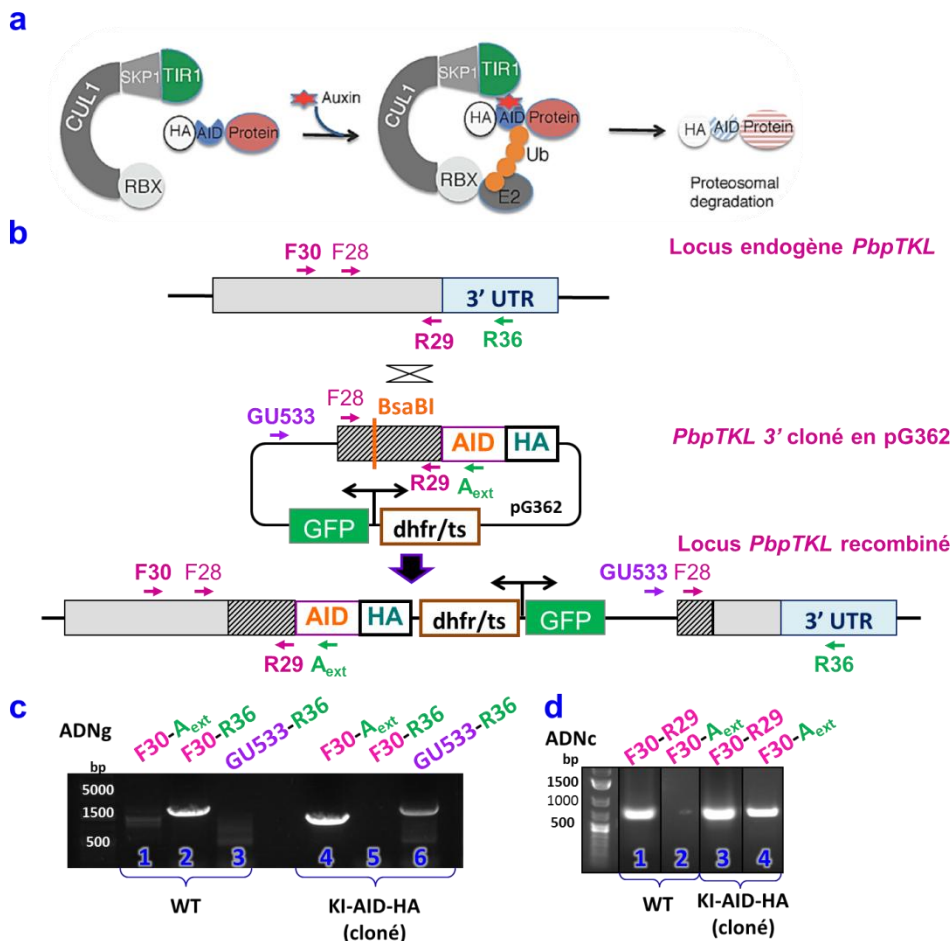


Figure 42 : Knock In AID-HA de *PbpTKL*. • AID = Auxin - Induced Degradation.

(a) Présentation du système de dégradation AID : l'auxine (étoile rouge) permet la formation du complexe SCF avec la protéine d'intérêt taggée AID-HA, permettant l'ubiquitination de cette dernière par l'enzyme E2 (ubiquitine = cercle orange). Schéma publié par (Philip and Waters 2015).

(b) Schéma de la construction et du locus *PbpTKL* recombiné après intégration

(c) PCR et (d) RT-PCR de génotypage des parasites clonés par dilution limite pour vérifier l'intégration du construit (c – pistes 4 et 6) et l'expression du transcrit (d – piste 4).

Étude de l'expression et de la localisation de *PbpTKL-AID-HA* (IFA)

Dans un premier temps, nous avons utilisé la lignée parasitaire exprimant *PbpTKL* étiquetée AID-HA afin d'analyser la localisation de la protéine en réalisant des IFAs à l'aide d'anticorps anti-HA. Les parasites pG230 transfectés avec le plasmide pG362 expriment la GFP (Figure 42b), qui marque ainsi le cytosol des parasites. Le TER119, anticorps ciblant la protéine Ly-76, marqueur des érythroïdes, a été utilisé pour marquer la membrane du GR. Après synchronisation du cycle intra-érythrocytaire des parasites, l'expression et la localisation de *PbpTKL-AID-HA* ont été étudiées à chaque stade (anneau, trophozoïte, schizonte, Figure 43a). Nous avons ainsi observé que *PbpTKL-AID-HA* est exprimée à partir des stades trophozoïtes jeunes, en petite quantité et détectée à proximité du parasite, puis est largement exportée dans le GRI aux stades trophozoïtes âgés. Afin de confirmer cet export, nous avons traité des trophozoïtes à la Brefeldine A (BFA) pendant 6 à 12 heures. La BFA lie et bloque le complexe ARF1•GDP•Sec7 dans sa conformation inactive ; or, le membre ARF (ADP-ribosylation Factor) de ce complexe joue un rôle clé dans la formation des vésicules de transport et, donc, dans les phénomènes de « budding » de l'appareil de Golgi (*Mossessova, Corpina, and Goldberg 2003*). La BFA engendre ainsi la dislocation de l'appareil de Golgi et du TGN (*trans-Golgi Network*) (*Ito et al. 2017*), où les protéines parasitaires destinées à un export vers les organites du parasite ou la cellule hôte sont préparées (par protéolyse du peptide signal puis, parfois, acétylation, pour les protéines comportant un motif d'export PEXEL (*Przyborski, Nyboer, and Lanzer 2016*)). Nous avons observé qu'après traitement à la BFA, *PbpTKL-AID-HA* était principalement localisée dans le cytosol du parasite, où les agrégats dus à la BFA sont facilement observables (Figure 43b). Cela montre donc que *PbpTKL* est bien activement exportée par le parasite vers la cellule hôte au stade trophozoïte.

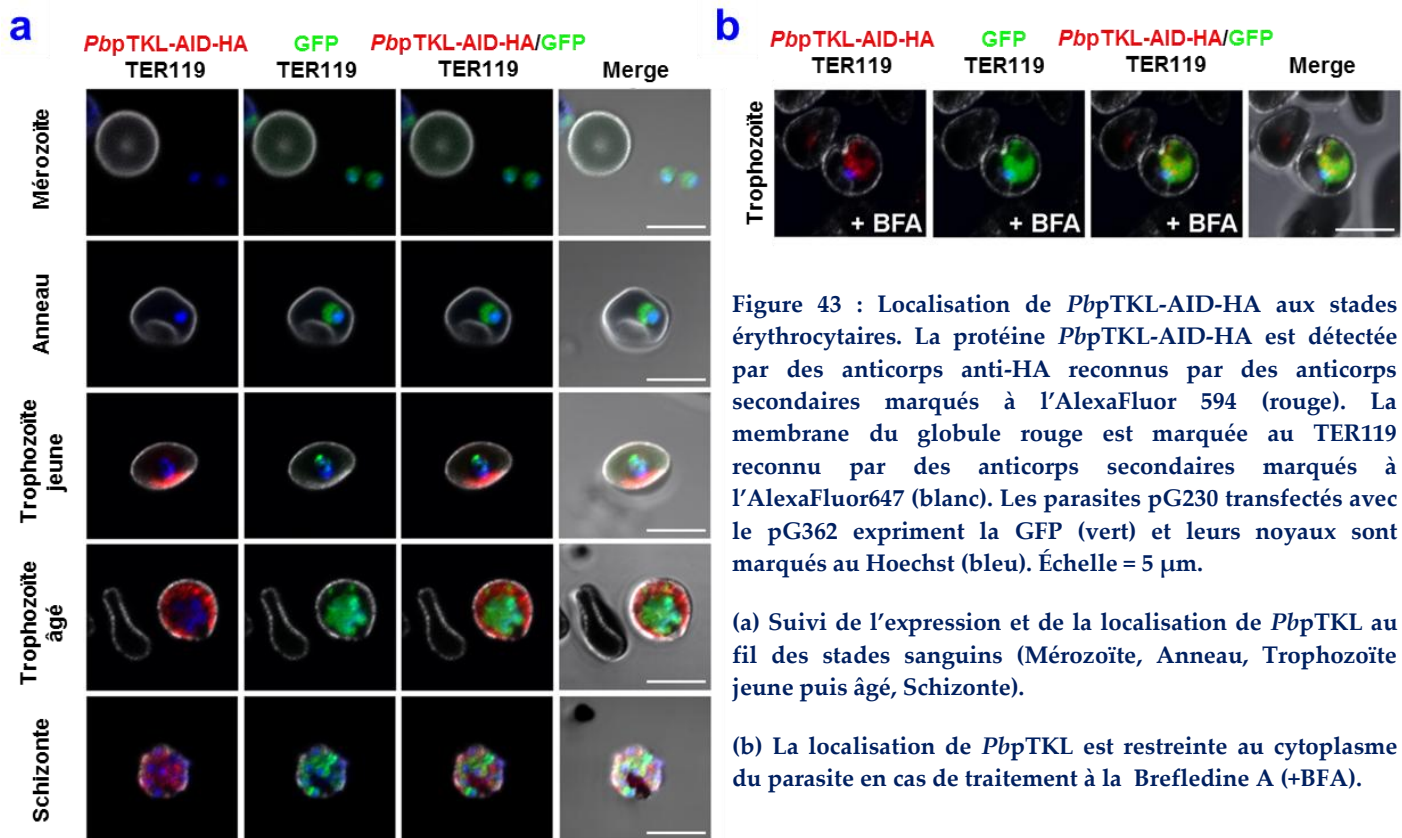


Figure 43 : Localisation de *PbpTKL-AID-HA* aux stades érythrocytaires. La protéine *PbpTKL-AID-HA* est détectée par des anticorps anti-HA reconnus par des anticorps secondaires marqués à l'AlexaFluor 594 (rouge). La membrane du globule rouge est marquée au TER119 reconnu par des anticorps secondaires marqués à l'AlexaFluor647 (blanc). Les parasites pG230 transfectés avec le pG362 expriment la GFP (vert) et leurs noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Échelle = 5 μ m.

(a) Suivi de l'expression et de la localisation de *PbpTKL* au fil des stades sanguins (Mérozoïte, Anneau, Trophozoïte jeune puis âgé, Schizonte).

(b) La localisation de *PbpTKL* est restreinte au cytoplasme du parasite en cas de traitement à la Brefeldine A (+BFA).

Confirmation de l'expression et de la localisation de *PbpTKL-AID-HA* (fractionnement cellulaire)

Au vu des difficultés à détecter *PbpTKL* par WB (ainsi que cela a été soulevé plus haut avec les parasites *P. berghei* KI-mCherry non clonés), nous avons entrepris de détecter la protéine *PbpTKL-AID-HA* dans la lignée pG230 clonée par WB anti-HA. Une lyse totale de globules rouges infectés (GRi) a été effectuée (cf. Matériel & Méthodes) et la protéine *PbpTKL-AID-HA* a pu être détectée, à la taille attendue, par immunoprécipitation anti-HA suivie d'un WB anti-HA (Figure 44).

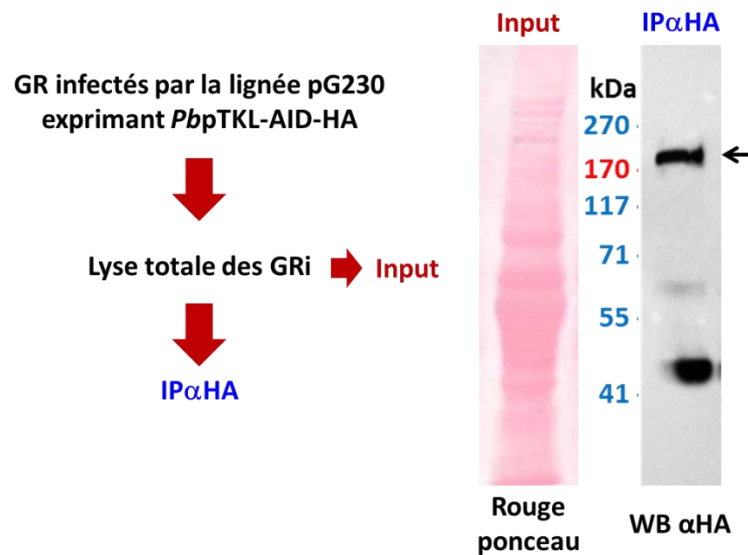


Figure 44 : Détection de *PbpTKL-AID-HA* par IP anti-HA et WB anti-HA (flèche)
GRi = Globules Rouges infectés

Ensuite, afin de connaître les compartiments précis dans lesquels *PbpTKL* était exportée, et n'ayant pas de marqueurs de la membrane de la vacuole parasitophore (VP) fonctionnant correctement en IFA, nous avons opté pour une lyse séquentielle des GRi (Figure 45a – Matériel & Méthodes). Dans un premier temps, nous avons utilisé l'Equinatoxine II, une toxine isolée à l'origine à partir de l'anémone de mer *Actinia equina* et capable de créer des pores dans les membranes des GR (Anderluh *et al.* 1996) afin de collecter le cytosol du globule rouge. Puis la saponine 0,07% a permis de lyser spécifiquement la membrane de la VP. La dernière étape de ce fractionnement cellulaire a consisté à lyser les ghosts (i.e. la membrane et le cytosquelette du GR) et les parasites dans un tampon de lyse contenant du triton X-100. La présence de *PbpTKL-AID-HA* a ensuite été analysée dans chaque fraction par Western blot après immunoprécipitation anti-HA (Figure 45b). *PbpTKL-AID-HA* a ainsi été détectée dans la VP et dans les ghosts (et non dans le cytosol des GR) au stade trophozoïte. Au stade schizonte, la protéine a été détectée dans le parasite et dans la VP (Figure 45b). Lorsque les GRi sont traités à la BFA, *PbpTKL-AID-HA* est détectée dans le parasite et la VP (Figure 45c), confirmant ainsi les résultats obtenus en IFA et soulignant une nouvelle fois le fait que *PbpTKL* est activement exportée par le parasite vers la cellule hôte.

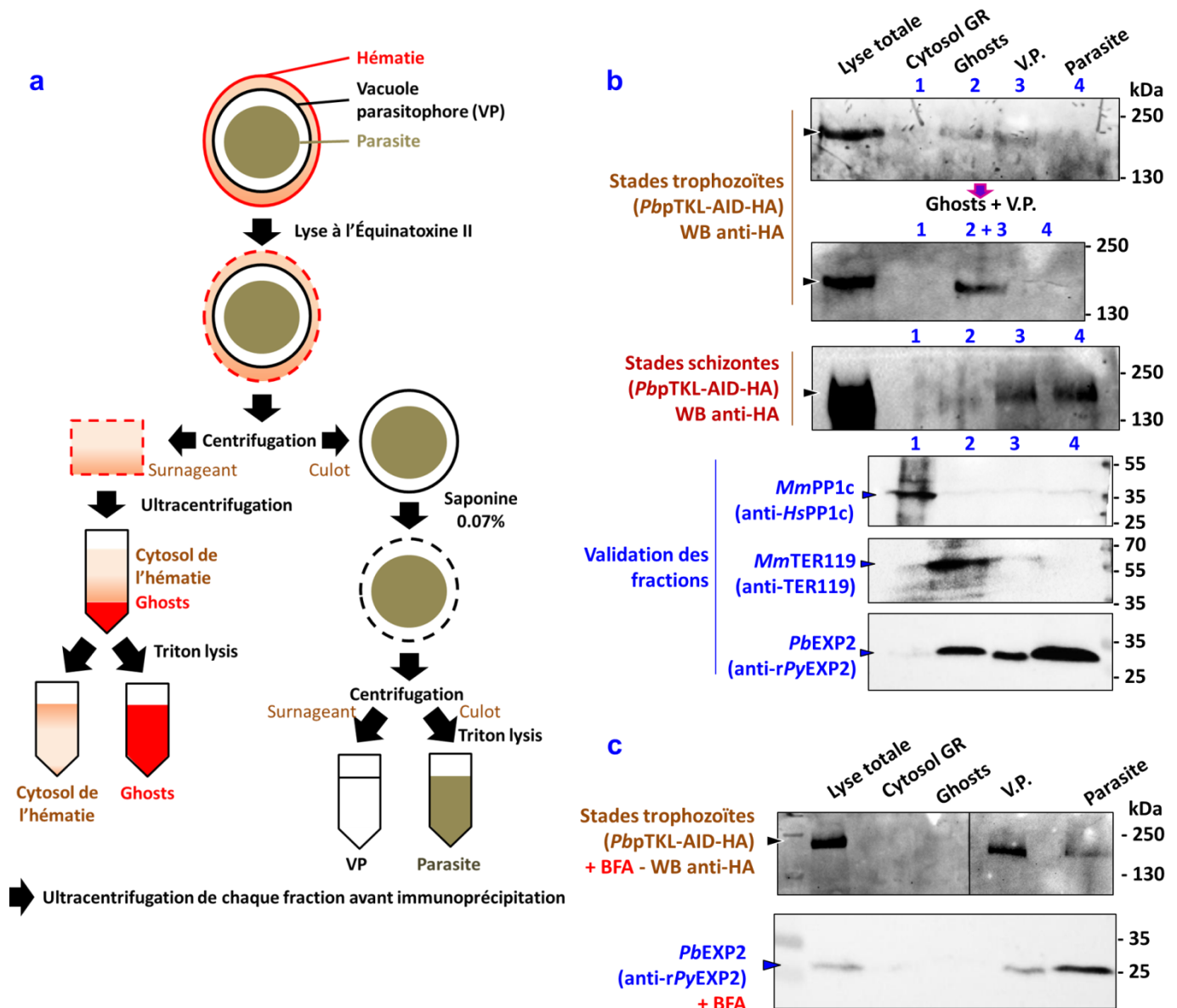


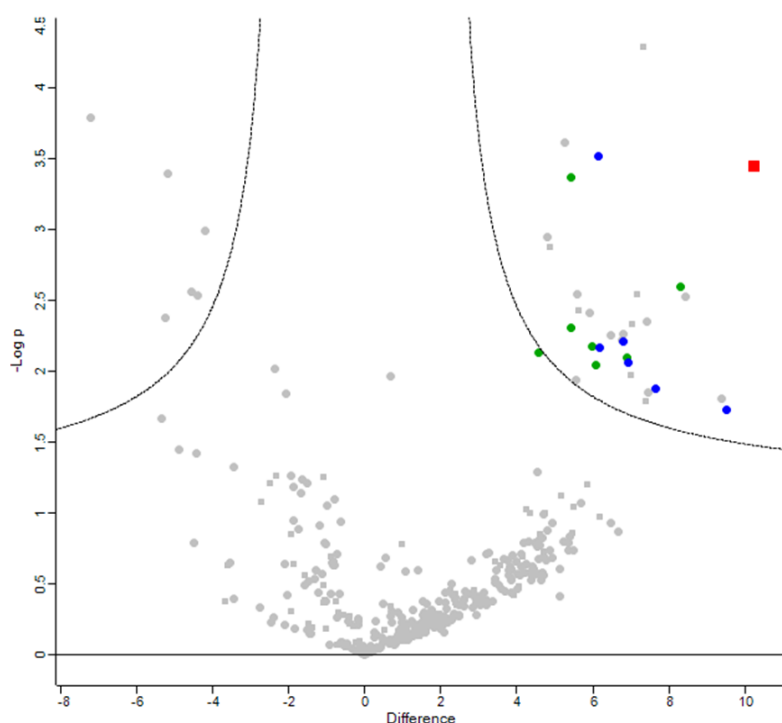
Figure 45 : Étude de la localisation de *PbpTKL* au sein du GRi par fractionnement cellulaire

a) Schéma des étapes du protocole de fractionnement cellulaire du GRi visant à étudier chacun de ses compartiments (cytosol de l'hématie, ghosts de l'hématie, vacuole parasitophore = VP, parasite)
 (b, c) Analyse par western blot de l'expression de *PbpTKL-AID-HA* après lyse séquentielle de GR infectés (b) et traités à la BFA (c). Les différentes fractions – 1 = Cytosol des GR, 2 = Ghosts des GR, 3 = Vacuole Parasitophore (V.P.), 4 = Extraits parasitaires – sont respectivement validées par un anti-*HsPP1c* qui reconnaît la *MmPP1c* (1), l'anti-*TER119* qui reconnaît les ghosts (2) et un anti-*rPyEXP2* qui reconnaît *PbEXP2* dans des vésicules exportées dans le GRi, la VP (3) et le cytosol du parasite (4) d'après Meibalan et al. (Elamarian Meibalan et al. 2015). *PbpTKL-AID-HA* est détectée par WB anti-HA après immunoprécipitation anti-HA sur chaque fraction de GR infecté par des trophozoïtes ou des schizontes.

3. Étude de l'interactome de *PbpTKL*

Dans le but de mieux comprendre le rôle potentiel de la TKL de *Plasmodium*, nous avons étudié son interactome chez le parasite. Cette étude devait nous permettre notamment de confirmer les partenaires identifiés *in vitro* ou à l'aide de modèles hétérologues. Nous avons donc utilisé la lignée de *P. berghei* exprimant *PbpTKL*-AID-HA afin de réaliser des immunoprécipitations à partir d'extraits parasitaires, suivies d'une analyse en spectrométrie de masse (MS) (Collaboration avec le Dr Chiara Guerrera, Plateforme protéomique 3P5-Necker, Université Paris Descartes). Dans un premier temps, cette étude a été réalisée au stade schizonte (auquel *PbpTKL* est localisée dans le cytosol du parasite, comme *PbPP1c*, et dans la VP, comme les protéines de la famille SERA). Cependant, l'analyse en MS n'a permis de détecter la protéine appât que dans un échantillon sur trois, rendant ainsi l'étude non pertinente.

Par ailleurs, nos études de localisation ont montré que *PbpTKL*-AID-HA s'associe aux ghosts du GRi lorsqu'elle est exportée dans la cellule hôte. Nous avons donc décidé d'étudier son interactome dans les ghosts et la VP au stade trophozoïte. Des immunoprécipitations anti-HA ont donc été réalisées sur des



Légende :

- *PbpTKL*-AID-HA
- Liaison à l'actine et organisation du cytosquelette
- Modification post-traductionnelle (ubiquitination, protéolyse) et érythropoïèse

Figure 46 : Volcano plot des résultats de l'étude d'interactome de *PbpTKL* par IP/MS. Ordonnée = $-\log(p\text{-value})$, Abscisse = Différence de détection des protéines entre les échantillons *PbpTKL*-AID-HA et WT.

PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) (Tableau 14, Annexe X). Cela nous a permis de répartir les protéines partenaires d'origine murine dans 5 classes : liaison à l'actine et organisation du cytosquelette de la cellule, modification post-traductionnelle par ubiquitination ou protéolyse, transport intracellulaire (vésicules, ions, etc.), traduction de l'ARN, régulation du stress oxydatif. Quant aux protéines de

extraits de ghosts et de VP de GR infectés par des trophozoïtes exprimant *PbpTKL*-AID-HA, les contrôles négatifs étant apportés par des immunoprécipitations anti-HA réalisées sur des lysats de GR infectés par la souche *P. berghei* pG230 parentale (WT). Après analyse par spectrométrie de masse (3 réplicats biologiques par échantillon), nous avons décidé de ne prendre en compte que les protéines présentes dans au moins 2 échantillons *PbpTKL*-AID-HA et absentes des échantillons WT (Figure 46, points situés en haut à droite de la courbe). Pour déterminer la fonction de ces 26 protéines, nous avons pris en compte les informations disponibles sur chacune d'entre elles sur les bases de données Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), STRING (<https://string-db.org/>), QuickGO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) et, pour les protéines de *P. berghei*,

Plasmodium, PBANKA_0524300 (Tryptophan-rich protein) dont l'homologue chez *P. yoelii*, une autre espèce de *Plasmodium* infectante des rongeurs, est exportée à la surface du GRi (Burns *et al.* 2000), et PBANKA_0826700 (Parasitophorous vacuolar protein 5) sont respectivement des marqueurs parasitaires des ghosts et de la VP et ont été détectées spécifiquement dans les échantillons PbpTKL-AID-HA. Trois autres protéines se sont avérées être impliquées dans l'épissage de l'ARNm ou dans sa traduction, et la/les dernière(s) protéine(s) de *P. berghei* comporte(nt) un domaine ubiquitine. La présence de ces cinq protéines est surprenante, car elles ne sont pas connues pour être exportées dans le GRi. Elle est probablement due à des fuites du cytosol parasite dans les lysats utilisés en IP/MS au cours du protocole de lyse séquentielle des GRi.

Tableau 14 : Présentation des protéines partenaires de PbpTKL identifiées par IP/MS (données brutes - Annexe X)

Protéine	Organisme	Rôle
Four and a Half LIM domains protein 3 (FHL3)	<i>Mus musculus</i>	Liaison à l'actine et/ou organisation du cytosquelette (formation de structures riches en actine, connexion de différentes structures du cytosquelette à la membrane plasmique)
Cysteine and Glycine-Rich Protein 1 (CSR1)	<i>Mus musculus</i>	
Zyxin (Zyx)	<i>Mus musculus</i>	
LIM and SH3 domain protein 1 (LASP1)	<i>Mus musculus</i>	
Calponin 2 (CNN2)	<i>Mus musculus</i>	
Talin 1 (TLN1)	<i>Mus musculus</i>	
Methionine aminopeptidase 1 (MAP11)	<i>Mus musculus</i>	Modification post-traductionnelle des protéines par protéolyse (formation du protéasome) ou ubiquitination → différenciation des érythroïdes (uniquement pour les protéines de <i>M. musculus</i>)
E3 ubiquitin-protein ligase (RNF31)	<i>Mus musculus</i>	
Poly(rC)-binding protein 2 et 3 (PCBP2 et 3)	<i>Mus musculus</i>	
TNF Receptor-Associated Factor 5 (TRAF5)	<i>Mus musculus</i>	
Protein S100-A (S10AE)	<i>Mus musculus</i>	
Ubiquitin-like Protein ISG15 (ISG15)	<i>Mus musculus</i>	
Proteasome subunit beta type-5 (PSB5)	<i>Mus musculus</i>	
Polyubiquitin (PBANKA_0610300) or ubiquitin-60S ribosomal protein L40, putative (PBANKA_1141700)	<i>P. berghei</i>	Transport intracellulaire (vésicules, ions)
Cysteine-rich protein 1 (Crip1)	<i>Mus musculus</i>	
Optineurin (OPTN)	<i>Mus musculus</i>	
AP-2 complex subunits alpha 1 et 2 (AP2A 1 et 2)	<i>Mus musculus</i>	
Thioredoxin-dependent peroxide reductase (PRDX3)	<i>Mus musculus</i>	Gestion du stress oxydatif (détoxification des peroxides et conjugaison du glutathion)
Microsomal glutathione S-transferase (MGST3)	<i>Mus musculus</i>	
40S Ribosomal Protein S7 (RS7)	<i>Mus musculus</i>	Transcription et traduction de l'ARN
40S ribosomal protein S7, putative (PBANKA_1401300)	<i>P. berghei</i>	
60S Ribosomal Protein L29 (RL29)	<i>Mus musculus</i>	
40S Ribosomal Protein S10, putative (PBANKA_0617200)	<i>P. berghei</i>	
pre-mRNA-splicing factor RDS3, putative (PBANKA_0502700)	<i>P. berghei</i>	
Tryptophan-rich protein (PBANKA_0524300)	<i>P. berghei</i>	Surface du GRi (<i>P. yoelii</i>)
Parasitophorous vacuolar protein 5 (PBANKA_0826700)	<i>P. berghei</i>	Protéine de la vacuole parasitophore

4. Étude de l'essentialité de *PbpTKL*

Génération de lignées de *P. berghei* KO pour *pTKL*

Au moment où nous avons démarré le projet de thèse sur la *pTKL* de *Plasmodium*, les seules informations que nous avions sur l'essentialité de *PbpTKL* provenaient de l'étude systématique de l'essentialité des kinases de *P. berghei* de (Tewari et al. 2010). Dans cette étude, les UTR 3' et 5' de *PbpTKL* ont été clonées en pBS-DHFR et 4 essais de transfection ont été effectués, sans qu'aucun parasite viable n'ait été obtenu. Cela indiquait donc que *PbpTKL* était vraisemblablement essentiel au développement intra-érythrocytaire du parasite. Nous avons donc, au début de ce projet de thèse, envisagé d'effectuer notre construit pBS-DHFR pour réaliser un KO de *PbpTKL* et confirmer ou non les résultats de Tewari et al. (Figure 47a) (Tewari et al. 2010). À ce moment-là, la souche WT *P. berghei* du laboratoire avait dérivé au point de ne plus produire de gamétocytes. Nous avons donc utilisé la souche pG230 que nous venions de recevoir de la part du Dr N. Philip (Philip and Waters 2015). Sur deux transfections indépendantes, nous avons obtenu des parasites et réussi à détecter l'intégration du construit au niveau des régions UTR 5' et 3' du gène *PbpTKL* (Figure 47b). Cette intégration s'est avérée stable au fil des passages effectués de souris à souris. Trois tentatives de clonage par dilution limite ont été effectuées mais n'ont pas permis de générer une souche KO pour *PbpTKL* clonée (soit aucune souris n'était parasitée, soit quelques souris étaient infectées et un mélange de parasites WT et KO était détecté par génotypage).

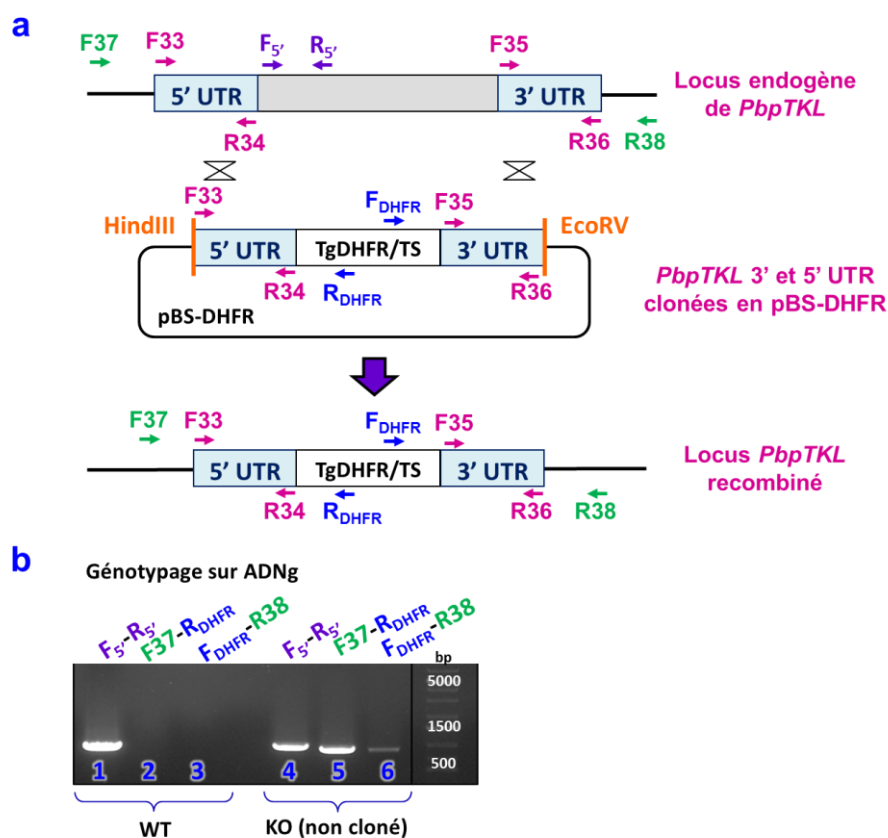


Figure 47 : Knock Out de *PbpTKL*

(a) Présentation du construit réalisé pour effectuer le KO de *PbpTKL* à l'aide du pBS-DHFR et du locus recombinaison. Les UTR 5' et 3' du gène sont clonées de part et d'autre de la cassette de résistance à la pyriméthamine *TgDHFR/TS*. La construction est linéarisée par HindIII et EcoRV avant transfection.

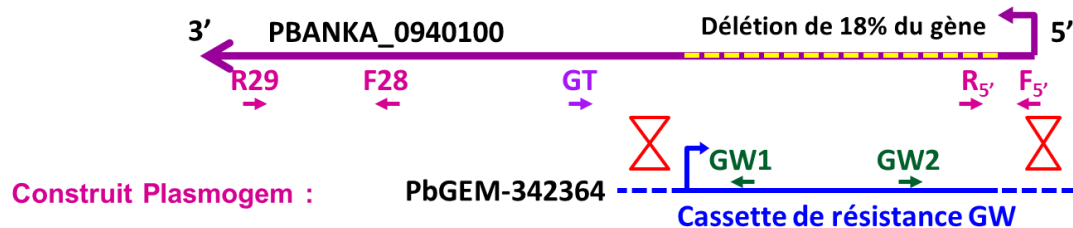
(b) Les PCR de génotypage effectuées sur une souche KO non clonée montrent l'intégration du construit en 5' et en 3' du gène (pistes 5 et 6 respectivement), et la présence de parasites sauvages (pistes 1 et 4).

L'étude Plasmogem a ensuite été publiée (Bushell *et al.* 2017). Dans cette étude, des construits ont été générés de manière à effectuer des KO sur plus de la moitié des gènes de *P. berghei*. Ces construits présentent de grandes régions homologues qui favorisent les recombinaisons aux locus ciblés. Ils ont été transfectés par groupes de 90 à 120 construits et la croissance des différentes populations de parasites a ensuite été suivie par séquençage (chaque construit étant doté d'un code barre ADN). Le taux de croissance de chaque population de parasites a ensuite été évalué et le niveau d'essentialité des gènes (essentiel, taux de croissance faible, normal ou accéléré) en a été déduit. Modifier le locus de *PbpTKL* avec le construit PbGEM342364 présenté en Figure 48a n'a pas impacté la croissance des populations de *P. berghei* transfectées. Ainsi donc, d'après cette étude Plasmogem, *PbpTKL* ne semblait donc pas essentiel au développement intra-érythrocytaire de *P. berghei* (Bushell *et al.* 2017).

Le construit PbGEM342364 étant disponible (Wellcome Trust Sanger Institute, Royaume-Uni), nous avons décidé de le transfecter afin de générer une lignée pGEM (ainsi nommée pour la distinguer de la lignée KO obtenue avec le pBS-DHFR). Nous souhaitons effectuer une analyse phénotypique complète avec une souche clonée afin de confirmer les données de Plasmogem obtenues sur des populations non clonées de parasites, d'une part, et de poursuivre l'analyse phénotypique à d'autres stades de développement que celui intra-érythrocytaire. Nous avons donc transfecté PbGEM342364 dans une souche *P. berghei* WT exprimant la GFP (sporozoïte-induite, Dr Olivier Silvie, CIMI Paris). Nous avons obtenu des parasites résistants, les avons clonés par dilution limite et analysés par génotypage puis RT-PCR (Figure 48b et c).

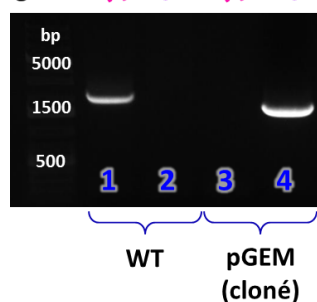
a

Locus endogène *PbpTKL*



b

ADNg



c

ADNc

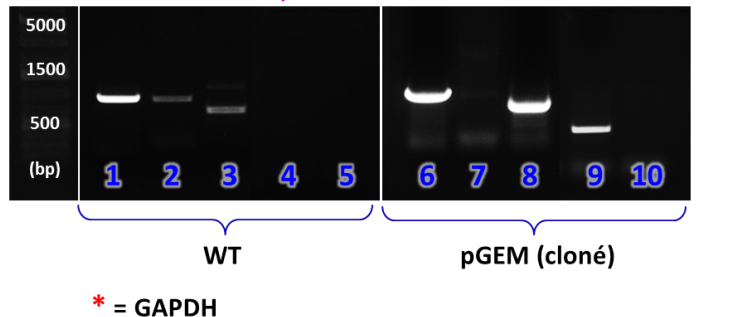


Figure 48 : Délétion de 18% de *PbpTKL* à l'aide du PbGEM-342364. (a) Présentation du construit Plasmogem342364 tel qu'il est schématisé en ligne (<https://plasmogem.sanger.ac.uk/>) et du mode de recombinaison de ce construit avec le locus endogène de *PbpTKL*. (b) PCR et (c) RT-PCR de génotypage valident l'intégration de ce construit dans les souches pGEM clonées (b – piste 4, c – piste 9) et l'absence de parasites WT (b – piste 3, c – piste 7).

Nous avons confirmé sans peine l'intégration de la cassette de résistance (engendrant une délétion de 18% à l'extrémité 5' de *PbpTKL* ; [Figure 48b – piste 4](#) et [48c – piste 9](#)). Dans le même temps, nous avons également détecté l'extrémité 3' du transcrit de *PbpTKL* (amplifiée à l'aide des amorces F28/R29, [Figure 48c – pistes 3 et 8](#)). Cependant, le fait que nous n'ayons pas pu amplifier la région GT-GW1 sur le transcrit ([Figure 48c – piste 10](#)) alors que cette PCR fonctionne sur l'ADNg ([Figure 48b – piste 4](#)) démontre l'absence d'un transcrit chimérique comprenant l'extrémité 5' de *PbpTKL* (i.e. la région encodant les domaines MORN), la cassette de résistance GW et l'extrémité 3' de *PbpTKL* (i.e. au moins le domaine kinase). L'absence de ce transcrit chimérique est certainement due à la force du promoteur de la cassette GW. Enfin, le promoteur de *PbpTKL* étant toujours présent et non modifié post-intégration du PbGEM342364, il y a probablement expression des domaines MORN de *PbpTKL* sous le contrôle du promoteur endogène de *PbpTKL* (seuls ces domaines sont exprimés car il y a un codon STOP à l'extrémité 3' de la cassette de résistance GW). En conclusion, la lignée pGEM exprime probablement les domaines MORN de *PbpTKL* d'une part, et tout ou une partie de son domaine kinase d'autre part. Il ne s'agit donc pas d'une souche KO pour *PbpTKL* au sens classique mais plutôt d'une souche où l'expression de *PbpTKL* est désorganisée. Au vu des problèmes de clonage évoqués plus haut avec la souche KO obtenue avec le pBS-DHFR, nous avons décidé d'effectuer l'analyse phénotypique la plus complète possible de la souche pGEM et d'utiliser également la lignée pG230 exprimant *PbpTKL*-AID-HA (cette fois non plus en tant que KI mais en tant que knockdown inductible – [Figure 42a](#)).

Étude du rôle de *PbpTKL* au cours du cycle intra-érythrocytaire (pGEM vs WT)

Nous avons commencé par effectuer un suivi de parasitémie de souris infectées avec 10^6 parasites de la souche parentale versus pGEM (Figure 49a). Nous avons, par la même occasion, suivi la gamétocytemie (Figure 49c) ainsi que le rapport entre le nombre de gamétocytes mâles versus femelles (Figure 49d). La mortalité des souris infectées par l'une ou l'autre des deux souches a également été suivie (Figure 49b). Dans aucune de ces expériences, nous n'avons constaté de différence entre les deux souches, quel que soit le paramètre considéré, confirmant ainsi les données publiées dans le cadre de l'étude Plasmogem. De plus, nous montrons ici que *PbpTKL* est dispensable pour l'expression des gamétocytes et pour la différenciation en gamétocytes mâles et femelles.

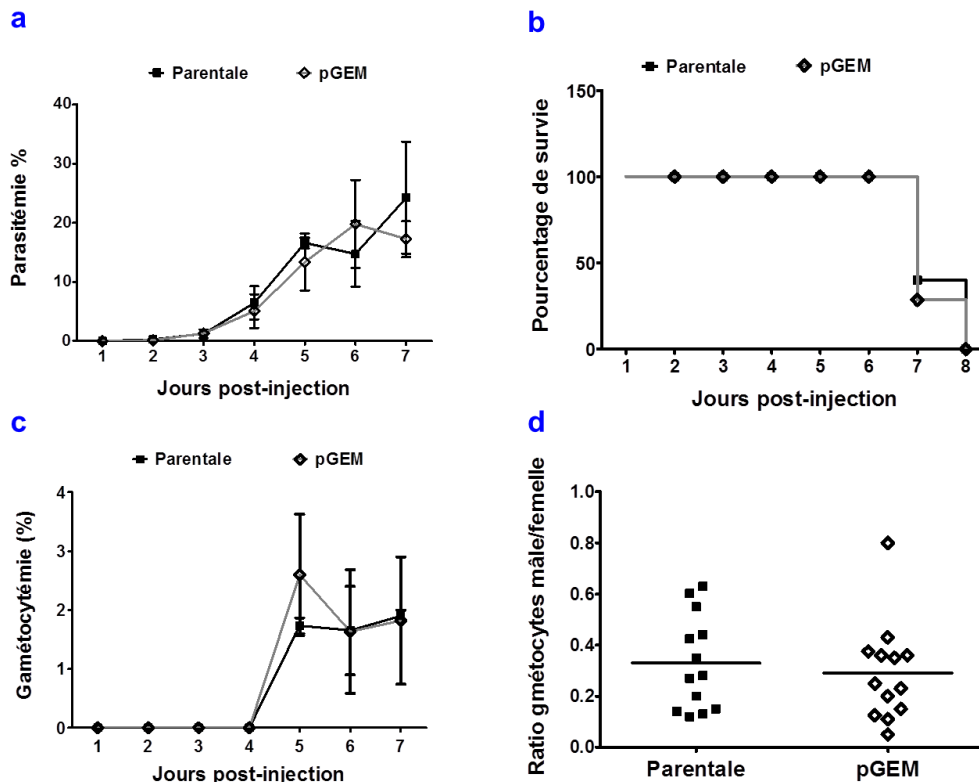


Figure 49 : Analyse phénotypique aux stades sanguins de la souche pGEM clonée versus la souche *PbGFP* parentale. Sept souris CD1 mâles ont été infectées par groupe avec 10^6 parasites puis suivies pendant 7 à 8 jours par frottis sanguin.

(a) Suivi de la parasitémie des souris des deux groupes (moyenne $\pm$ SD).

(b) Pourcentage de survie des souris des deux groupes.

(c) Suivi de la gamétocytemie des souris des deux groupes (moyenne $\pm$ SEM).

(d) Ratio des nombres de gamétocytes mâles versus femelles chez les souris des deux groupes.

Étude du rôle de *PbpTKL* au cours du cycle intra-érythrocytaire (utilisation du système AID)

Afin de confirmer ces données, nous avons utilisé le système AID pour étudier la complétion du cycle intra-érythrocytaire de *P. berghei* *in vitro*. Nous avons, dans un premier temps, confirmé la dégradation de la protéine en présence d'auxine (IAA). Pour cela, des GR infectés par des trophozoïtes exprimant *PbpTKL*-AID-HA ont été incubés en présence ou d'IAA $0,5 \mu\text{M}$ pendant 30 minutes à 37°C , puis lysés suivant le protocole de lyse totale des GRi (Matériel & Méthodes). Des immunoprécipitations anti-HA ont ensuite été effectuées sur les deux lysats et *PbpTKL*-AID-HA n'a été détectée par WB anti-HA que dans les lysats non traités à l'IAA, démontrant ainsi la dégradation de la protéine d'intérêt en présence d'IAA (Figure 50a).

Nous avons ensuite injecté des souris naïves en IV avec des schizontes exprimant *PbpTKL*-AID-HA et traités ou non à l'auxine (IAA). Après 3 à 4 heures (au bout desquelles des stades anneaux ont commencé à être détectés par frottis sanguin), le sang des souris infectées a été récupéré et mis en culture avec et sans

IAA 0,5 μ M. Le suivi de la maturation des stades sanguins a été effectué par frottis pendant 45 heures, et aucune différence n'a été notée entre la souche traitée et celle non traitée (Figure 50b). Nous avons ensuite essayé d'utiliser le système AID *in vivo* ainsi que décrit par Brown & Sibley (Brown and Sibley 2018). Des souris ont été infectées avec la souche pG230 WT et la souche exprimant *PbpTKL-AID-HA* puis traitées ou non à l'IAA (eau de boisson et gavages – Matériel & Méthodes). Cependant, le suivi scrupuleux du protocole de Brown & Sibley n'a pas permis la dégradation de *PbpTKL-AID-HA* (Figure 50c) ; nous n'avons donc détecté aucune différence de parasitémie ou de taux de mortalité entre les souris infectées et traitées ou non à l'IAA (Figure 50d). Les données collectées *in vitro* à l'aide du système AID restent cependant en corrélation avec celles obtenues avec la souche pGEM et confirment que *PbpTKL* est dispensable pour la complétion du cycle intra-érythrocytaire de *P. berghei*.

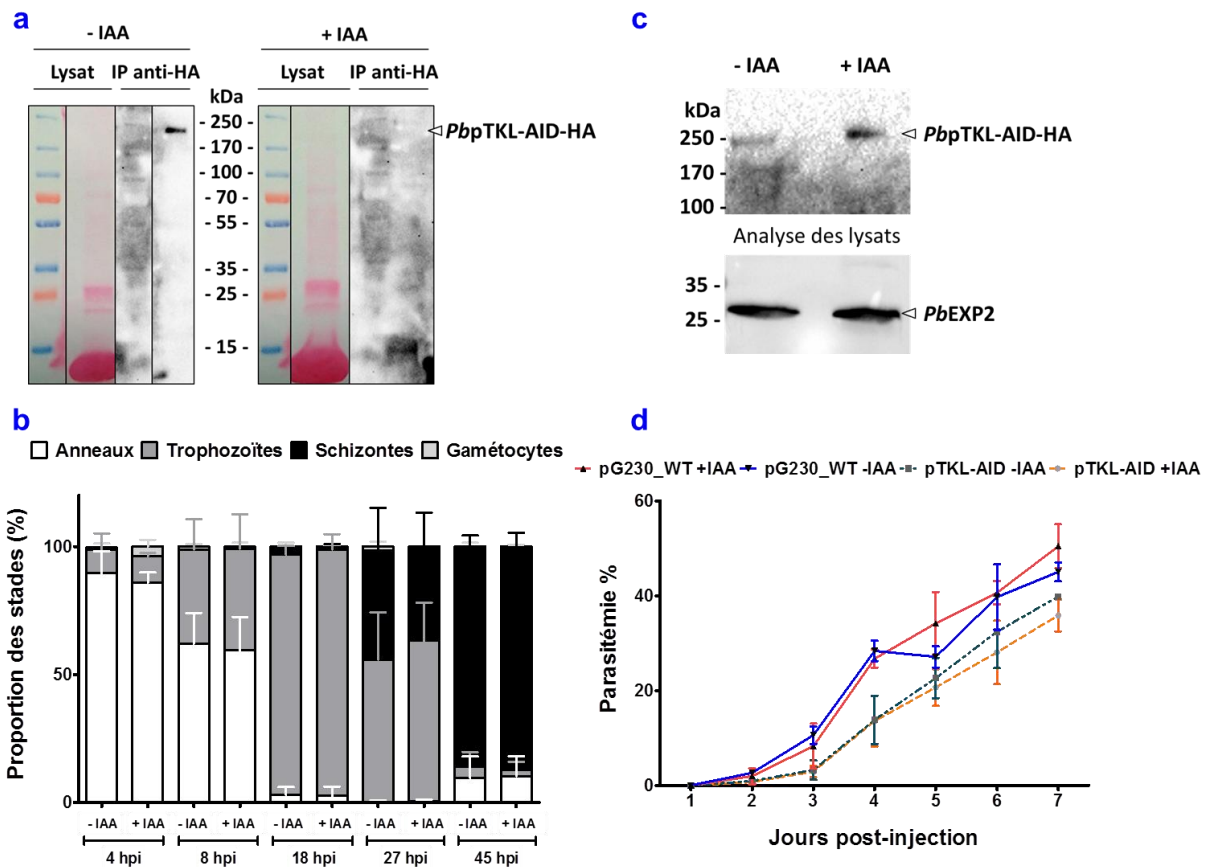


Figure 50 : Analyses phénotypiques effectuées *in vitro* et *in vivo* avec la souche pG230 exprimant *PbpTKL-AID-HA* avec des souris CD1 mâles. (a) Des GRi (stades trophozoïtes) ont été incubés avec ou sans auxine (IAA) avant lyse totale et immunoprécipitation puis WB anti-HA pour détecter *PbpTKL-AID-HA*. (b) Suivi *in vitro* des stades sanguins après synchronisation de l'infection puis mise en culture avec ou sans IAA (5 souris par groupe, moyenne $\pm$ SD). (c) Des GRi ont été récupérés chez des souris infectées avec la souche pG230 exprimant *PbpTKL-AID-HA* et traitées ou non à l'auxine. Ils ont été lysés (les lysats ont été analysés à l'aide de l'anti-rPyEXP2) et des immunoprécipitations et WB anti-HA ont été effectués pour détecter *PbpTKL-AID-HA*. (d) Des souris (6 par groupe) ont été infectées avec la souche pG230 WT ou celle exprimant *PbpTKL-AID-HA*. Elles ont ensuite été traitées ou non à l'IAA et la parasitémie a été suivie par frottis sanguin (moyenne $\pm$ SD).

Étude du rôle de *PbpTKL* dans l'activation des gamétocytes mâles (exflagellation)

Nous nous sommes ensuite attachés à étudier le rôle de *PbpTKL* dans l'activation (i.e. l'exflagellation) des gamétocytes mâles (cf. Matériel & Méthodes). Comme précédemment, nous avons comparé la capacité des gamétocytes mâles des souches *PbGFP* parentale et pGEM à exflageller (Figure 51a). Pour renforcer ces résultats, nous avons évalué la capacité des gamétocytes mâles de la souche pG230 exprimant *PbpTKL*-AID-HA à exflageller en présence ou non d'IAA (Figure 51b). Dans les deux cas, nous n'avons pas observé de différence entre les souches comparées ou traitée versus non traitée. Cela indique donc que *PbpTKL* est vraisemblablement dispensable pour l'activation des gamétocytes mâles.

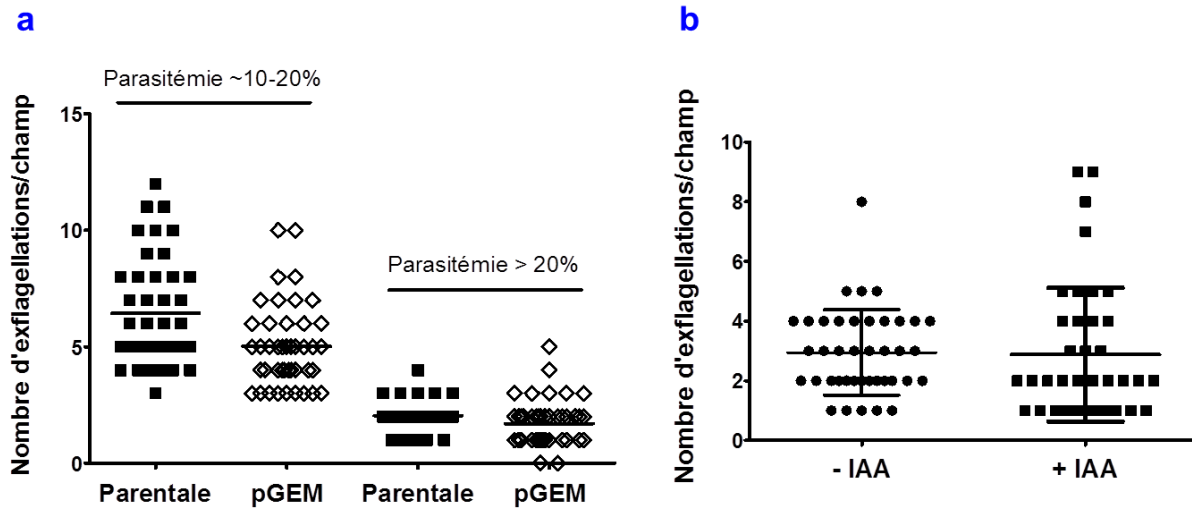


Figure 51 : Tests d'exflagellation effectués avec la souche *PbGFP* parentale versus pGEM (a) ou la souche pG230 exprimant *PbpTKL*-AID-HA traitée ou non à l'IAA pendant 30 minutes (b).

Étude du rôle de *PbpTKL* chez les ookinètes, sporozoïtes et stades hépatiques

Afin de poursuivre l'étude du rôle de *PbpTKL* tout au long du cycle de vie de *P. berghei*, une collaboration a été mise en place avec l'équipe du Dr Silvie au CIMI Paris (le Dr Silvie et sa postdoc Priyanka Fernandes ont effectué les expériences). Une seule première expérience a été effectuée et a donné les résultats préliminaires qui sont présentés en Figure 52.

Des moustiques (*Anopheles stephensi*) ont été mis en présence de souris infectées à partir d'échantillons cryoconservés de la souche pGEM (note importante : cette souche n'avait jamais été transmise au moustique avant la mise en place de cette collaboration, contrairement à la souche *PbGFP* WT qui est maintenue par passages réguliers chez le moustique au CIMI Paris). Il est à noter que les infections ont été effectuées avec 4 jours d'écart entre *PbGFP* WT et pGEM. Le nombre d'oocystes par moustique a été évalué à J14 pour la souche WT (prévalence de l'infection des moustiques évaluée à 96%) et à J10 pour la souche pGEM (prévalence d'infection des moustiques évaluée à 63%) – Figure 52a). Des photos des estomacs des moustiques ont également été prises (les deux souches exprimant toutes deux la GFP, les parasites étaient faciles à visualiser à l'aide d'un microscope à fluorescence – Figure 52b). Les différences de nombre d'oocystes par estomac ont été jugées non significatives, au vu de la variabilité de ce nombre d'un moustique à un autre avec la souche WT ainsi que du fait que la souche pGEM passait pour la première fois chez l'hôte définitif de *P. berghei*. Le nombre moyen de sporozoïtes par moustique (glandes

salivaires) a été évalué 21 jours après repas sanguin (Figure 52c). Il s'est avéré être 10 fois moins important avec la souche pGEM qu'avec la souche WT. Par la suite, des souris C57BL/6 ont été infectées avec 1000 sporozoïtes de la souche WT ou de la souche pGEM chacune, et le cours de l'infection a été suivi (Figure 52c). Contrairement à la souche WT avec laquelle toutes les souris ont déclaré une infection (stades sanguins) en 3 à 4 jours après injection des sporozoïtes, des parasites pGEM (stades sanguins) n'ont été détectés que chez une seule des cinq souris 5 jours après injection des sporozoïtes. En parallèle, afin d'évaluer la capacité des sporozoïtes pGEM à infecter des hépatocytes, une expérience d'invasion a été effectuée *in vitro* sur des HepG2 (Figure 52d). Le nombre de stades hépatiques par puits a ensuite été évalué 24 et 48 heures après dépôt des sporozoïtes sur les hépatocytes ; les différences notées entre les deux souches n'ont pas été jugées significatives et le développement de ces stades hépatiques a semblé normal (données non présentées). Les différentes données collectées avec les sporozoïtes sont à prendre avec précaution car le nombre de sporozoïtes par moustique étant drastiquement différent entre les deux souches, les injections de sporozoïtes pGEM contenaient plus de contaminants en provenance des glandes salivaires que pour les sporozoïtes WT 10 fois plus nombreux. Ces différentes expériences sont actuellement réitérées, avec un clone pGEM différent et avec la souche pGEM sporozoïte-induite issue de ce premier passage chez le moustique. Cela devrait permettre d'accroître la fiabilité des données et d'évaluer leur reproductibilité.

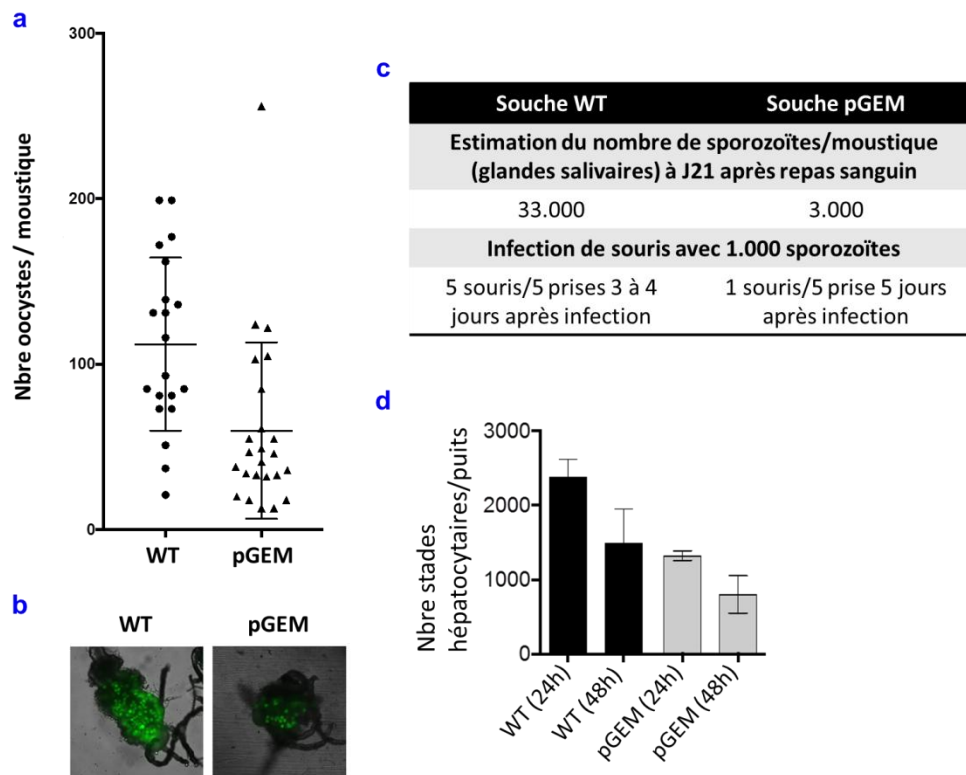


Figure 52 : Étude du rôle de *PbpTKL* au cours du développement de *P. berghei* chez le moustique et dans les hépatocytes. (a) Évaluation du nombre d'oocystes par estomac de moustique infecté avec des parasites *PfGFP* WT ou pGEM (Moyenne $\pm$ SD). (b) Photographies d'un estomac de moustique contenant des oocystes *PbGFP* WT (à gauche) ou pGEM (à droite). (c) Tableau reprenant les données d'infectiosité des moustiques infectés par les parasites *PbGFP* WT ou pGEM ainsi que les résultats d'une expérience d'infection de souris C57BL/6 avec 1000 sporozoïtes WT ou pGEM. (d) Graphique représentant le nombre de stades hépatiques 24 ou 48 heures après dépôt *in vitro* de sporozoïtes WT ou pGEM sur des cellules HepG2 (10.000 sporozoïtes par puits – moyenne $\pm$ SD).

Matériels & Méthodes

I. Matériels

1. Plasmides

Nom du plasmide	Origine du plasmide	Utilisation
pETDuet-1	Novagen	(Co)Production d'une (à deux) protéine(s) recombinante(s) en bactéries (<i>E. coli</i>)
pGEX-6-P3	GE Healthcare Life Sciences	Production en bactérie (<i>E. coli</i>) d'une protéine recombinante étiquetée GST en Nter
pMALpIII	Qiagen	Production en bactérie (<i>E. coli</i>) d'une protéine recombinante étiquetée MBP en Nter
pGBKT7	Clontech	Production de protéines fusionnées au GAL4-DBD en levure (<i>S. cerevisiae</i>)
pGADT7	Clontech	Production de protéines fusionnées au GAL4-AD en levure (<i>S. cerevisiae</i>)
Tous les plasmides utilisés chez <i>P. berghei</i> comportent une cassette de résistance à la pyriméthamine (<i>dhfr/ts</i>)		
PbGem-342364	Wellcome Sanger Institute	Construction utilisée dans l'étude PlasmoGEM (<i>Bushell et al. 2017</i>) pour interrompre <i>PbpTKL</i>
pG362	Dr Nisha Philip	Knock-In AID-HA (Auxin-induced Degradation) pour induire la dégradation de la protéine ainsi encodée par l'auxine chez des souches <i>P. berghei</i> exprimant TIR1 (<i>Philip and Waters 2015</i>)
pL1886-mCherry	Dr Blandine Franke-Fayard	Système de Knock-In mCherry en 3' chez <i>P. berghei</i>
pCAM-BSD (BSD)	Dr Christian Doerig	Système de Knock Out chez <i>P. falciparum</i>
pCAM-BSD-HA (BSD)	Dr Christian Doerig	Système de Knock-In HA en 3' chez <i>P. falciparum</i>
pARL-2-GFP (WR)	Dr Michael Lanzer	Construction épisomale exprimant la GFP chez <i>P. falciparum</i>
pSLI-TGD (WR)	Dr Tobias Spielmann	Selection-linked Integration – Targeted Gene Disruption Knock-out chez <i>P. falciparum</i> (<i>Birnbaum et al. 2017</i>)

2. Souches

Nom de la souche	Origine	Utilisation
Souches de bactérie (<i>Escherichia coli</i>)		
DH5α	ThermoFisher	Transformation post-clonage et propagation de plasmides
TOP10™	Invitrogen	
Stellar™	Clontech	Transformation après clonage par InFusion (Clontech) ou mutagénèse dirigée
XL10gold®	Agilent Technologies	
BL21	Life Technologies	Production de protéines recombinantes en bactérie
JM109	Promega	
AD494	Dr Elisabeth Pradel	
C41		
Souches de levure (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
Y2Hgold (Y2Hg)	Clontech	Transformation de la banque d’ADNc de <i>P. falciparum</i> ou des construits de gènes clonés en pGADT7
Y187		Transformation avec des construits de gènes clonés en pGBKT7
Souches de <i>Plasmodium</i>		
<i>PbGFP (P. berghei)</i>	Dr Olivier Silvie	Souche parentale (WT)
<i>pG230 (P. berghei)</i>	Dr Nisha Philip	Souche exprimant TIR1 utilisée avec le système AID pour caractériser les stades sanguins et les gamétocytes
<i>pG402 (P. berghei)</i>	Dr Nisha Philip	Souche exprimant TIR1 utilisée avec le système AID pour étudier les stades de <i>P. berghei</i> chez le moustique ainsi que les stades hépatiques
<i>Pf3D7 (P. falciparum)</i>	Dr Pietro Alano	Souche parentale (WT)

3. Amorces

Nom	Séquence (5'→3')	Utilisation
Amorces utilisées pour les études <i>in vitro</i> et à l'aide de modèles hétérologues		
F1	ATGGGCAACACCCCTTGATAG	Amplification de la région 0-1100pb du transcrit de <i>PfpTKL</i>
R2	TCTACAAGTTATGGCATATAAT	
F3	ATTGCTTATGGACATGCAATCA	Amplification de la région 1040-1600pb du transcrit de <i>PfpTKL</i>
R4	AAAATATGCTATCACTACATATACC	
F5	GGTATATGTAGTGATAGCATATTTT	Amplification de la région 1600-2280pb du transcrit de <i>PfpTKL</i>
R6	TCATGTATATATTGTTGCAATACT	
F7	ATAGTATATCTTCAACATGTTCTTC	Amplification de la région 2150-2760pb du transcrit de <i>PfpTKL</i>
R8	ATGTAGATATGAAAAGAGACACTTA	
F9	ATGGGAGTATCTATTCATTATCC	Amplification de la région 2700-3300pb du transcrit de <i>PfpTKL</i>
R10	TCGTATGCTCCACATAATACAT	
F11	CAAGTACACTTTCTGATCATAG	Amplification de la région 3180-4500pb du transcrit de <i>PfpTKL</i>
R12	TTATGTTCCATCCATAAATGAAAT	
F13	GCCAGGATCCGAATTCTTCAATAACTTAATACAAATAGAAG	Clonage de la région <i>PfpTKL</i> ₃₇₁₋₅₃₁ en pETduET (pTKL_RVxF1)
R14	AAGCATTATGCGGCCGCTATGCTATCACTACATATACC	
F15	CATGGAGGCCGAATTCGACAAAATGAATATATCCCTTCAT	Clonage de la région <i>PfpTKL</i> ₂₅₅₋₅₃₁ en pGBKT7 (SAM&RVxF1, Y2H)
R16	GCAGGTCGACGGATCCTATGCTATCACTACATATACC	
F17	ATGGCATATAATAAATAATTCAATAACTTAATA	Mutagenèse dirigée pour insérer un codon STOP dans le construit SAM+RVxF1_pGBKT7 (Y2H)
R18	TATTAAGTTATTGAATTATTTATTATATGCCAT	
F19	ACCACAGCCAGGATCCGGATACAGAAGATACTAATATCGAA	Clonage de la région <i>PfSERA5</i> ₁₄₄₋₃₆₃ en pETduET (<i>PfSERA5</i> -6His)
R20	CGCCGAGCTCGAATTCTACTAAAAGAGCACATTGAAAGCA	
F21	GGAGAAAATGAGCCCCATTGATCTG	Mutagenèse dirigée N1272D pour générer pTKL_KD_ND
R22	CAGATCAATGGGGCTCATTTTCTCC	
F23	CGAATCTCTGAATGCCAAAATTAGCGGTTTCGAAATCAGC	Mutagenèse dirigée ¹²⁹⁰ DFG ¹²⁹² – ¹²⁹⁰ GFE ¹²⁹² pour générer pTKL_KD_DG
R24	GCTGATTTTCGAAACCGCTAATTTTGGCATTTCAGAGATTTCG	
F25	GATCAAACGGAAACGCATAATGGCGTCTTCCTACCTGA	Mutagenèse dirigée sur RVxF2 ¹²¹⁶ KRKVL ^{F1221} – ¹²¹⁶ KRIMAS ¹²²¹
R26	TCAGGTAGGAAGACGCCATTATGCGTTTCCGTTTGATC	

Amorces utilisées pour générer des souches KI, KO et iKD chez <i>P. berghei</i>		
F28	ACCGCGGTGGCGGCCGCCGATTTTGAATTAAAGAAATAG	Clonage des dernières 1126pb de <i>PbpTKL</i> en pL1886-mCherry (F28/R27) et en pG362 (F28/R29)
R27	CACCTCCACCGGATCCTCCATCCATAAAAGACATTAAAGC	
R29	TCATTCTAGTCTCGAGTCCATCCATAAAAGACATTAAAGC	
F30	GGACATTACCCTAGCTTGCTCTT	Génotypage des parasites KI mCherry ou AID-HA
GU533	GATTAAGTTGGGTAACGCC	
A _{ext}	CCGTCTCTGAGAACCCTCT	
C _{ext}	CTCGCCCTCGATCTCGAACTC	
F31	GTAAGGCTAAATTGGATATCAATCAAATAT	Mutagenèse dirigée pour insérer le site de linéarisation BsaBI dans les construits pG362 et pL1886-mCherry
R32	ATATTGATTGATATCCAATTTAGCCTTAC	
GT	TGCCAAACTGCTATTGATGT	Génotypage des parasites transfectés avec le construit PbGem-342364 de Plasmogem (Wellcome Sanger Institute)
GW1	CATACTAGCCATTTTATGTG	
GW2	CTTTGGTGACAGATACTAC	
F _{5'}	CGTGCCCGATTATGCCGGCATGGGAAATATAAATTCTATTCAAAC	Amplification des 964 premières pb du gène <i>PbpTKL</i>
R _{5'}	CCAAAATTTTAACGCTAGCCGCTTAAAGCCCATTTCATAGG	
F33	AGCTGGGTACCGGGCCCCGTCGGTATGTTTCATCTCAAAC	Clonage de 595 pb de la 5'UTR de <i>PbpTKL</i> en pBS-DHFR
R34	GCAGGCATGCAAGCTTCTACAAATATAATTTAGTATATAACATG	
F35	TTTCGATATCGAATTCTACAAATATCACATTGGAATTTGCTT	Clonage de 621 pb de la 3' UTR de <i>PbpTKL</i> en pBS-DHFR
R36	GGCGGCCGCTCTAGATTTCATGATTAACAGTGTTAATTAAACA	
F37	TCGGCGGAAGCGTATGTATCA	Génotypage des parasites transfectés avec le construit pBS-DHFR
R38	GTTTGCTACTTCAGCTAATTCGG	
R _{DHFR}	GCCTTCAGCTTGAGGCTTC	
F _{DHFR}	GAACGCAAACCATCTTTCTGAG	
Amorces utilisées pour générer des souches KI et KO chez <i>P. falciparum</i>		
F40	ATTTATTAAACTGCAGGGGAAGGCAAAATAATTTTATAGGT	Clonage de 600 pb de 5'UTR + 100 1 ^{ères} pb de <i>PfpTKL</i> en pCAM-BSD
R41	TAGAACTAGTGGATCCTGATACCTATCCCATGATGTTCCG	
F42	GCTTTCGGAATCATACTTTGGGA	Génotypage des parasites transfectés avec le pCAM-BSD-HA
P639	GCCATATCCAAGCTTTTAAGCATAATCTGG	
F43	ATTTATTAAACTGCAGGCTATCTAATGATATTCCATACAATT	Clonage des 587 dernières pb de <i>PfpTKL</i> en pCAM-BSD-HA
R44	CATATGGATAGGATCCTGTTCCATCCATAAATGAAATTAATG	
F45	CTATAGAATACTCGCGCCGCTGAAACACCCTTGATAGTAACAAACCC	Clonage des 580 pb à 6 pb du début du codon START de <i>PfpTKL</i> en pSLI-TGD
R46	GCACCTCTAGCACGCGTTGTAGAGTGAATATAATTGGATAGATC	
F47	TTACATATAACTCGAGATGGGCAACACCCTTGATAGTAAC	Clonage des 550 1 ^{ères} pb de <i>PfpTKL</i> en pARL-2-GFP
R48	TCTCCTTTACTCATGGTACCGCTGAGGGATGAGGAAAAAATATTATATT CATTATC	

4. Anticorps

Anticorps	Origine	Utilisation (dilution) WB = Western Blot & IFA = Immunofluorescence
Anticorps primaires		
Anti-Histidine (souris)	Invitrogen	Détection de l'étiquette 6-Histidines en WB (1/1000)
Anti-GST (souris)	Life Technologies	Détection de la GST en WB (1/2500)
Anti-MBP (rat)	BioLegend	Détection de la MBP en WB (1/1000)
Anti-RFP (lapin)	MBL Life Science	Détection de la RFP en WB (1/1000) et en IFA (1/150)
Anti-HA (rat)	Roche	Détection de l'étiquette HA en WB (1/1000)
Anti-HA (lapin)	Cell Signaling Technologies	Détection de l'étiquette HA en IFA (1/150)
Anti-cdc2 (POH1, souris)		Détection de la cdc2 de <i>X. laevis</i> en WB (1/1000)
Anti-phospho cdc2 (Y15, souris)		Détection de la Tyrosine 15 phosphorylée de la cdc2 de <i>X. laevis</i> en WB (1/1500)
Anti-phospho Histone H3 (S10, souris)		Détection de la Sérine 10 phosphorylée de l'Histone H3 de <i>X. laevis</i> en WB (1/1000)
Anti-Histone H3 (souris)	Novus Biological	Détection de l'Histone H3 de <i>X. laevis</i> en WB (1/1000)
Anti-rPyEXP2 (lapin)	Dr James Burns	Détection d'EXP2 de <i>P. yoelii</i> et <i>berghei</i> en WB (1/1000)
TER119 (rat)	Stemcell	Détection de Ly76 (marqueur de la membrane des globules rouges) de <i>Mus musculus</i> en WB (1/1000) et en IFA (1/500)
Anti-HsPP1c (E9, souris)	Santa Cruz Technologies	Détection de la PP1c de <i>Mus musculus</i> en WB (1/1000)
Anti-XePP1c (souris)		Détection de la PP1c de <i>X. laevis</i> en WB (1/1000)
Anticorps secondaires		
Anticorps Highly cross-adsorbed AlexaFluor® 594 (red) ou 647 (far-red)	Invitrogen	Anticorps secondaires (lapin, rat) marqués à l'aide d'un fluorochrome (AlexaFluor®594 ou 647) utilisés en IFA (1/1000)
Anticorps marqués à la peroxydase	Sigma Aldrich	Anticorps secondaires (souris, rat, lapin) utilisés en WB (1/50.000 pour la souris et 1/10.000 pour les autres)

5. Kits commerciaux

Nom du kit	Origine du kit	Utilisation
Kits de clonage		
TOPO TA Cloning	ThermoFisher	Clonage de fragments d'ADN amplifiés par PCR (s'ils comportent une Adénine en simple brin en plus en 3' et en 5') en TOPO
InFusion® HD Cloning	Clontech Takara	Clonage par recombinaison homologue d'un à plusieurs fragments d'ADN dans un plasmide linéarisé
T4 DNA Ligase	Invitrogen	Ligation classique d'un insert d'ADN dans un vecteur linéarisé
Kits d'extraction		
Miniprep/Midiprep	Macherey Nagel	Extraction d'ADN plasmidique à partir de bactéries (<i>E. coli</i>) ou de levures (<i>S. cerevisiae</i>)
Gel extraction	Macherey Nagel	Extraction d'ADN post migration sur gel d'agarose ou PCR
KAPA Express Extract kit	Clinisciences	Extraction d'ADN génomique de <i>P. berghei</i> et <i>P. falciparum</i>
Kits pour les tests d'activité		
Test pNPP (<i>p</i> -Nitrophényl Phosphate)	Sigma Aldrich	Le pNPP est déphosphorylé par PP1c, donnant le <i>p</i> -nitrophénol, composé jaune dont la concentration peut être évaluée par mesure de l'absorbance.
Kinase Glo®	Promega	Détection de la quantité d'ATP restant après une réaction d'hydrolyse d'ATP (par une kinase) à l'aide de luciférase qui va hydrolyser l'ATP restant pour produire de la lumière (quantité évaluée par luminescence).
Autres		
SuperScript™ III first strand synthesis	Thermo Fisher	Kit utilisé pour synthétiser de l'ADNc à partir d'une extraction d'ARN total traité à la DNase
SuperSignal™	Thermo Fisher	Gamme de kits (West Dura Extended Duration, West femto) utilisés pour révéler les Western Blot
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher	Kit utilisé pour évaluer la quantité de protéines dans un échantillon selon la technique de l'acide bicinchonique
Amaya Transfection kit	Lonza	Préparation de schizontes <i>P. berghei</i> pour une transfection

II. Méthodes

1. Culture de *Plasmodium falciparum*

La souche Pf3D7 entretenue au laboratoire est cultivée en RPMI1640 contenant de l'Hepes 25mM, de l'Albumax 0,4%, de l'Hypoxanthine 0,2 mM et de la Gentamycine 20 µg/mL, en présence d'érythrocytes humains (groupe O+, EFS, conservés à 50% en RPMI1640, Hepes 25 mM, sérum humain 10 %, utilisés à 3-6% d'hématocrite). La culture est effectuée en atmosphère humide et à 5% CO₂ (Trager and Jensen 1976). Les cultures sont suivies (parasitémie, stades) par frottis sanguins colorés au giemsa.

2. Entretien et suivi de *Plasmodium berghei*

Les souches *P. berghei* utilisées au laboratoire (cf. tableau des souches) ont été maintenues en souris. Ces dernières ont été infectées par injection intra-péritonéale à partir d'échantillons cryo-conservés ou de sang provenant d'un autre rongeur infecté. Pour les expériences de synchronisation ou les transfections, des schizontes purifiés ont été injectés en intraveineuse.

Les souris infectées ont été suivies quotidiennement et les parasites (état, stades, parasitémie, gamétocytémie) ont été suivis par frottis sanguin coloré au DiffQuick™.

3. Extraction d'ADN et d'ARN de *P. berghei* (Pb) et de *P. falciparum* (Pf)

L'extraction d'ADN génomique de *P. berghei* et de *P. falciparum* a été effectuée en fonction de l'utilisation prévue. Ainsi, pour des PCR de génotypage (effectuées en routine), le kit KAPA Express Extract (KK7103, Clinisciences) a été employé, suivant le protocole du fournisseur :

- sur un culot de parasites *P. berghei* obtenus après prélèvement sur héparine d'environ 50 µL de sang sur une souris infectée (parasitémie minimum 5%), puis lyse des globules rouges à l'aide du Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max™ (Sigma Aldrich).
- sur un culot de parasites *P. falciparum* après centrifugation (sans frein) de quelques mL de culture synchronisée ou non (parasitémie > 3%) et lyse des globules rouges à la saponine 0,07%. En revanche, pour une extraction optimale, il convient de n'utiliser qu'un culot de parasites de la taille d'une tête d'épingle.

Lorsqu'une quantité d'ADNg plus importante ou de qualité supérieure à celle obtenue avec une extraction KAPA était requise, une extraction au Phénol/Chloroforme était préconisée.

L'extraction d'ARN total a été effectuée sur des culots de parasites (soit un mélange de stades de *P. berghei*, soit des schizontes de *P. falciparum*) au TRIzol™ (ThermoFisher, 15596026) selon le protocole du fabricant.

4. Extraits protéiques *P. falciparum* utilisés pour les tests d'activité kinase

Afin de générer un extrait de parasites *P. falciparum* dans le but de l'utiliser pour les tests d'activité kinase, des culots de parasite issus d'une lyse à la saponine 0,07% ont été repris dans un tampon de lyse (Tris 50 mM – pH 8,0, Triton X-100 0,5%, cocktail anti-protéase cOmplete EDTA-free de Roche). Après 10 cycles de congélation (azote liquide)/décongélation (bain-marie à 37°C), les extraits ont été centrifugés à 16.000 g à 4°C pendant au moins deux heures. Le surnageant obtenu a ensuite été utilisé comme substrat dans les tests d'activité kinase par radioactivité (utilisation d'ATP marqué [γ -³³P]).

5. Lyse des GRi par *P. berghei* et immunoprécipitations

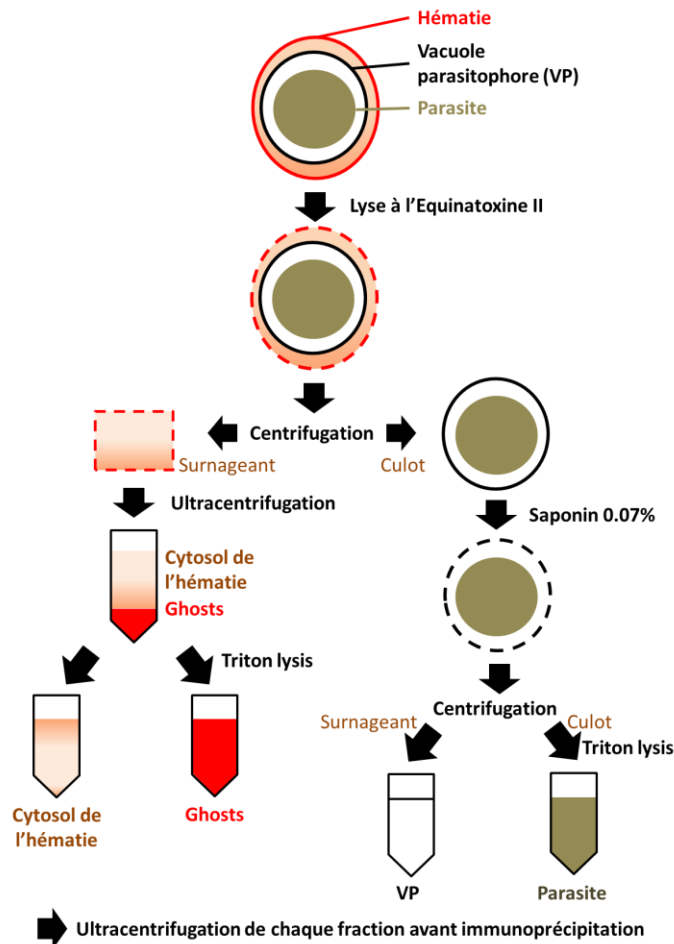


Figure 53 : Principe de la lyse séquentielle des GRi

centrifugation, le contenu de la VP (surnageant) et le culot de parasites. Les ghosts et les parasites sont lysés par sonication légère, à 4°C, dans un tampon contenant du triton (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 9%, EDTA 5 mM, cocktail anti-protéase – cOmplete EDTA-free de Roche). Les volumes de toutes les fractions ont été ajustés à 5 mL avec du tampon de lyse totale des GR avant ultracentrifugation (41.657 g – 4°C – 15 min) et les surnageants conservés sur glace.

Pour immunoprécipiter *PbpTKL-AID-HA*, les différents surnageants sont mis en contact avec des billes HA-agarose (HA Epitope Tag Antibody, agarose conjugate 2-2.2.14, Invitrogen). Après 1 heure d'incubation sur roue à 4°C, les billes sont lavées (Tris 20 mM – pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 0,5%) 3 fois, éluées en tampon de Laemmli et les protéines ainsi récupérées sont séparées par SDS-PAGE et *PbpTKL-AID-HA* est détectée par WB anti-HA (cf. tableau des anticorps).

6. Clonages moléculaires

Les fragments d'ADN à cloner ont été amplifiés sur de l'ADNg ou de l'ADNc de *P. falciparum* (cf. tableau des amorces) à l'aide de la Taq Advantage® 2 Polymerase Mix (Clontech Takara, 639201), ou obtenus par digestion enzymatique à partir de constructions plasmidiques déjà disponibles.

La lyse totale de GRi enrichis sur Nycodenz® s'effectue dans un tampon (Tris 50 mM – pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 1%, EDTA 0,5 mM, DNase, anti-protéase cocktail – cOmplete EDTA-free de Roche) pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu après ultracentrifugation (18.000 rpm – 4°C – 15minutes) est utilisé en immunoprécipitation.

La lyse séquentielle (Figure 53) vise à étudier chaque compartiment du globule rouge infecté (GRi). Les GRi enrichis sur Nycodenz® sont incubés sur roue pendant 15 minutes à température ambiante avec de l'Équinoxine II (Anderluh *et al.* 1996) (3 mL de Tris 20 mM – pH 7,4, NaCl 130 mM, MgSO₄ 1 mM, Équinoxine II 6µg/mL pour un culot sec de 500 µL de GR). Après centrifugation, le surnageant est ultracentrifugé (18.000 rpm – 4°C – 15 min) pour récupérer les ghosts et le cytosol du GR, tandis que le culot (parasites + VP) est traité à la saponine 0.07% pendant 10 minutes sur glace. Cette dernière lyse la membrane de la VP, permettant de récupérer, après

Les plasmides (cf. tableau des plasmides) ont été préparés par digestion enzymatique (enzymes achetées chez NEB ou ThermoFisher).

Après confirmation de la pureté des fragments à cloner par migration sur gel, et purification sur gel si nécessaire (cf. tableau des kits), les clonages ont été effectués à l'aide du kit InFusion ou de ligation classique (T4 DNA Ligase, cf. tableau des kits) ; les résultats des clonages ont ensuite été transformés respectivement en Stellar ou TOP10 (cf. tableau des souches). Il est à noter que dans le cas de l'InFusion, les amorces ont été synthétisées de manière à inclure une région homologue avec celle du plasmide sur 15-20 pb après le site de restriction pour faciliter la recombinaison du fragment dans le vecteur. Par ailleurs, dans le cas de la ligation classique, une digestion enzymatique des produits PCR était nécessaire avant ligation.

7. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été effectuée de deux manières différentes (cf. tableau des amorces) :

- soit de manière « classique », c'est-à-dire en utilisant des amorces reverse-complémentaires comportant la mutation souhaitée et en effectuant une PCR visant à amplifier intégralement la construction plasmidique avec la mutation. La Taq Isis High Fidelity Polymerase (MP Biomedicals, 11EPSIS100) a été utilisée pour effectuer ce genre de PCR. Le résultat de PCR a ensuite été traité à la DpnI, afin de digérer l'ADN méthylé (seul l'ADN utilisé comme matrice est méthylé puisqu'il provient de la bactérie, tandis que l'ADN nouvellement synthétisé n'est pas méthylé), puis transformé en bactéries (de préférence hautement compétentes, comme les Stellar ou les XL10gold – cf. tableau des souches).

- soit en effectuant une PCR-DOE (Driven Overlap Extension, (Heckman and Pease 2007)) avec la Taq Advantage® 2 Polymerase Mix. Pour cela, des amorces encadrant le fragment d'ADN à muter étaient utilisées en plus des amorces de mutagenèse. Par exemple, dans le cas de l'insertion du site de linéarisation BsaBI dans le fragment correspondant aux 1126 dernières pb de *PbpTKL* pour son clonage en pG362, les amorces encadrant l'insert sont F28/R29 et les amorces de mutagenèse sont F31/R32 (voir Figure 54). Les deux parties du fragment situées de part et d'autre du site de mutagenèse ont été amplifiées (en utilisant F28/R32 et F31/R29). Après purification sur gel, une quantité molaire équivalente de chaque partie a été utilisée comme matrice dans une PCR avec F28/R29 afin d'amplifier l'insert muté entièrement avant clonage. Cette technique s'est avérée être une alternative intéressante à plusieurs mutagenèses dirigées classiques compliquées (notamment pour muter ¹²⁹⁰DFG¹²⁹² en ¹²⁹⁰GFE¹²⁹² et RVxF2 : ¹²¹⁶KRKVL¹²²¹ en ¹²¹⁶KRIMAS¹²²¹).

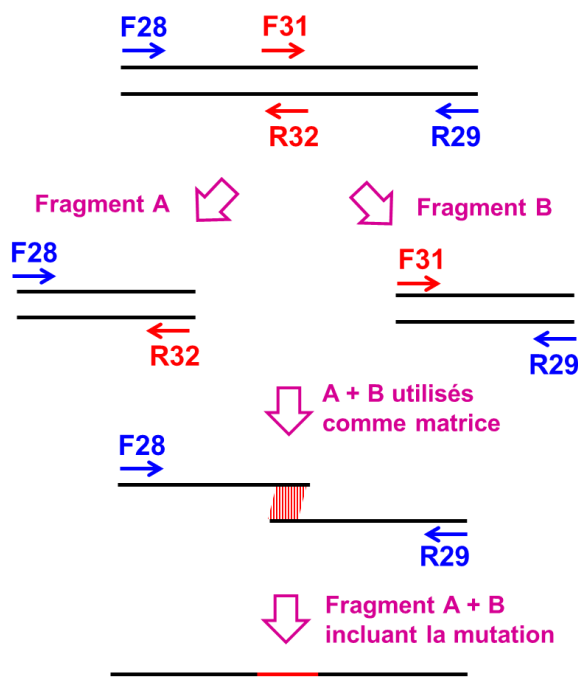


Figure 54 : Schéma présentant la SOE-PCR

8. Séquençage du transcrit de *PfpTKL* (PF3D7_1106800)

Un à cinq µg d'ARN total de *Pf3D7* extrait comme précisé ci-dessus a été traité à la DNaseI (ThermoFisher, 18068015) pendant 14 minutes à 25°C pour dégrader toute trace d'ADN contaminant, puis rétro-transcrit en ADNc en suivant les préconisations du fournisseur (SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix kit, Invitrogen, 18080-400).

La pureté de l'ADNc (i.e. l'absence d'ADNg contaminant) ainsi obtenu a ensuite été validée. Pour cela, des régions d'ADN comprenant des introns ont été amplifiées sur ADNg (fragment de référence) et ADNc (pour vérifier l'absence d'intron, i.e. par amplification d'un fragment d'ADN d'une taille moindre qu'en utilisant l'ADNg comme matrice). Différentes régions du transcrit de *PfpTKL* ont ensuite été amplifiées en utilisant les couples d'amorces F1/R2 à F11/R12 (cf. tableau des amorces et schéma en annexe I). Après clonage en vecteur TOPO à l'aide du kit TOPO TA Cloning (cf. tableau des kits), les construits ont été transformés en TOP10 (cf. tableau des souches) puis analysés par séquençage.

Les résultats de séquençage (6 à 12 clones séquencés par région du transcrit de *PfpTKL*) ont ensuite été compilés en une séquence consensus qui a été comparée aux données de PlasmoDB.

9. Annotation *in silico* de la séquence protéique *PfpTKL*

La séquence protéique prédite à partir du consensus obtenu par séquençage a été analysée à l'aide de divers outils et programmes de prédiction afin d'identifier et de délimiter les domaines de la protéine. Le but de multiplier les outils d'analyse était d'obtenir les prédictions les plus fiables possibles.

La séquence primaire de *PfpTKL* a été analysée à l'aide de SMART, Interpro, CATH et ScanProsite. Les motifs RVxF ont été prédits sur la base de séquences consensus publiées (*Wakula et al. 2003; Meiselbach, Sticht, and Enz 2006*) en utilisant l'outil Protein Motif Pattern de PlasmoDB. La séquence tertiaire de *PfpTKL* a également été étudiée avec Phyre2, M4T et RAPTOR (ces outils ont été sélectionnés en raison du fait qu'ils sont bien évalués par CAMEO). Les régions potentiellement déstructurées (principalement composées de répétitions enrichies en acides aminés chargés comme la Sérine ou basiques comme l'Asparagine ou la Lysine) ont été prédites à l'aide de ScanProsite. Les prédictions de peptide signal et de domaine transmembranaire ont été effectuées avec SignalP 4.1 Server et SignalHmms d'une part, et HMMTOP et TMHMM d'autre part.

10. Analyses phylogénétiques

Divers potentiels homologues de *PfpTKL* ont identifiés par analyse PSI-BLAST dans le règne des eucaryotes en utilisant la séquence protéique de *PfpTKL*. Trente-neuf d'entre eux ont été validés comme étant des homologues de *PfpTKL* lorsque la pseudokinase était le premier résultat retourné par l'analyse inverse par PSI-BLAST sur le protéome de *P. falciparum*. Les séquences de 8 protéines RAF1 ont été utilisées comme groupe externe dans l'analyse phylogénétique. Toutes les séquences ont été extraites des bases PlasmoDB ou Uniprot.

Les 128 séquences de domaines SAM ont été sélectionnées de manière à représenter les différentes familles de domaines SAM et SAM-like présentées sur la base de données SCOP. Elles ont été extraites de la base de données Uniprot.

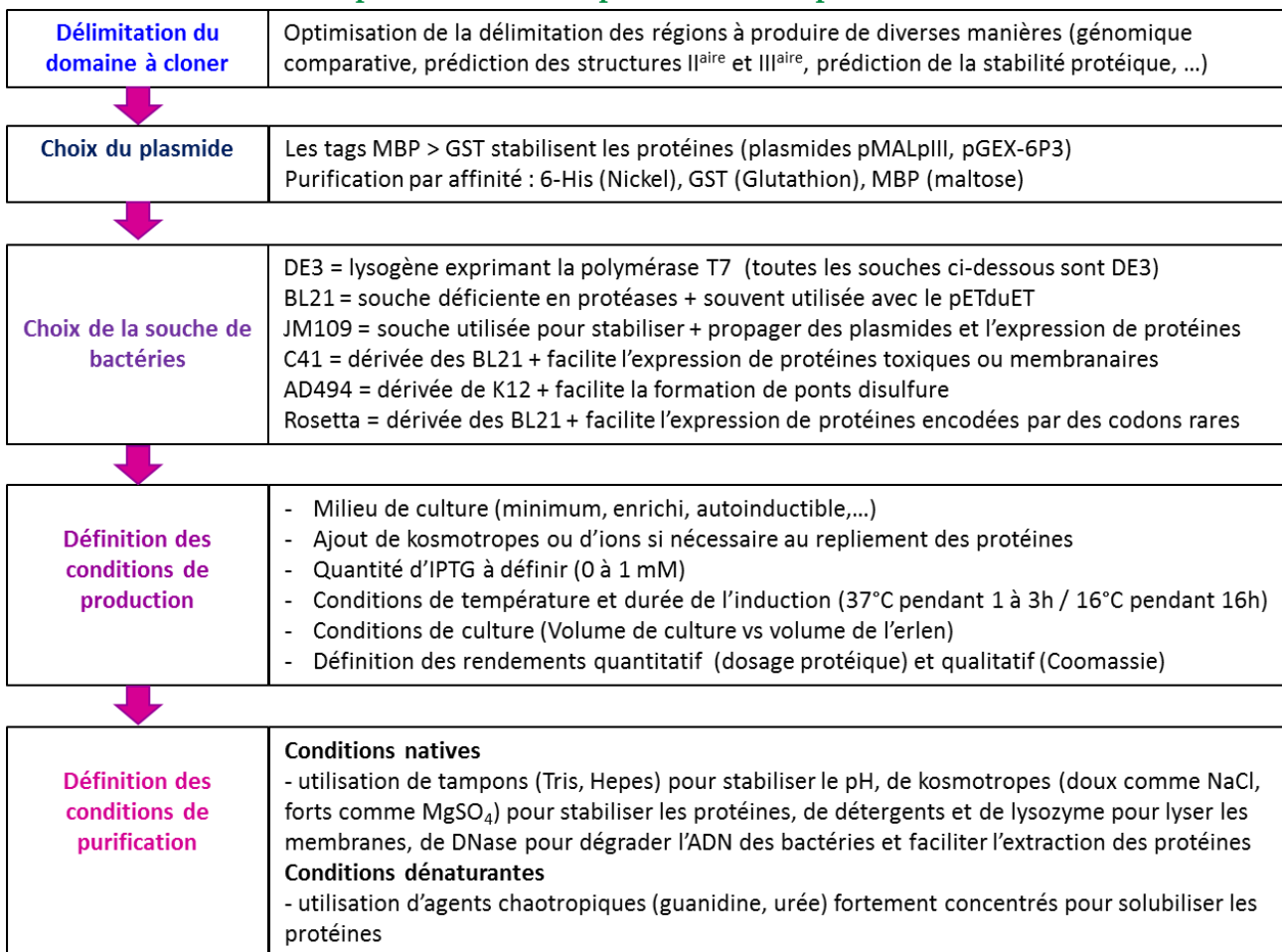
Les 117 séquences de domaines kinase ont été sélectionnées d'après l'étude du kinome de *Plasmodium falciparum* menée par Talevich (*Talevich et al. 2012*) et récupérées sur Uniprot. L'objectif était d'inclure des

kinases de diverses classes, en enrichissant celle des TKL, et issues de différents organismes eucaryotes (alvéolates, métazoaires, archaeplastida).

Pour chaque analyse phylogénétique, les séquences sélectionnées ont été alignées avec MAFFT et l'histoire évolutionniste a été déduite en utilisant la méthode Maximum Likelihood basé sur le modèle matriciel JTT (*D. T. Jones, Taylor, and Thornton 1992*) en utilisant la version 6.0 du logiciel Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA6). Toutes les positions auxquelles le pourcentage de recouvrement entre toutes les séquences était inférieur à 80% (70% pour l'arbre des kinases) ont été éliminées. Un total de 598, 64 et 229 positions a été comptabilisé respectivement pour chaque analyse. Le premier arbre a été construit avec la méthode Neighbor-Joining avant d'appliquer de l'heuristique basée sur une matrice de paires de distances estimées à l'aide du modèle JTT. Dans le cas de l'analyse phylogénétique des homologues de *PfpTKL*, les taux d'évolution des différences entre les différentes positions ont été modélisés sur la base d'une distribution Gamma. L'histoire évolutionniste des différents taxons a été représentée sur un arbre consensus résultant de 1000 bootstraps. La mise en forme des différents arbres a été effectuée avec MEGA6 et Inkscape 0.92 (<https://inkscape.org>).

11. Production et purification des protéines recombinantes

a. Processus d'optimisation de la production des protéines recombinantes



b. Conditions de production et de purification des protéines recombinantes

La production et la purification de *PfPP1c*-GST, *Pfelf2β*-GST et de la GST a déjà été décrite précédemment (Fréville et al. 2013; Tellier et al. 2016).

La production et la purification des protéines produites exclusivement dans le cadre de la caractérisation de la pTKL de *Plasmodium* ont été optimisées suivant le processus présenté ci-dessus. Elles sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 15, Annexe V). Après induction de l'expression de la protéine d'intérêt, la collecte des bactéries se fait à 4°C. Après centrifugation, les culots de bactéries induits sont conservés à -80°C. Au moment de la purification, ils sont décongelés sur glace, repris en tampon de lyse (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, DNase, cocktail anti-protéase cOmplete EDTA-free de Roche, lysozyme 1mg/50 mL, Triton X-100 1%, pH adapté à la protéine d'intérêt). De l'Imidazole 20mM a été ajoutée aux tampons de lyse destinés à des protéines comportant un tag 6-His afin de prévenir les fixations aspécifiques aux billes de Nickel. Après sonication, les lysats sont ultracentrifugés (41.657 g – 4°C – 30min) puis les surnageants sont mis en contact avec des billes Ni-NTA (pour les protéines comportant un tag 6-His, Jena Bioscience, AC-501-25) ou de glutathion (pour les protéines comportant un tag GST, Sigma, G4510). Après trois heures sur roue à 4°C, les billes sont récupérées par centrifugation et lavées en tampon de lavage (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazole 20 mM et MgSO₄ 1 mM ou d'ions le cas échéant, pH adapté à la protéine d'intérêt). Elles sont ensuite conservées telles quelles ou certaines protéines comportant un tag 6-His sont éluées (tampon de lavage + 300 mM Imidazole pendant 30 minutes sur roue à 4°C, pH adapté à la protéine d'intérêt), puis les éluats sont dialysés (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, MgSO₄ 1 mM ou ions le cas échéant, pH adapté à la protéine d'intérêt) sur la nuit à 4°C. Les protéines fixées sur billes ou éluées ont ensuite été dosées à l'aide de la technique BCA (rendement quantitatif - cf. tableau des kits). Le rendement qualitatif de la purification des protéines a été évalué par migration sur gel (SDS-PAGE) et coloration de ce dernier au SimplyBlue™ Safe stain (Thermo Fisher, LC6060) ou au Coomassie.

Tableau 15 : Récapitulatif des protéines recombinantes produites dans le cadre de ce projet

Protéine (cf. tableau des amorces)	Plasmide	Souche de bactérie	Conditions d'induction	Conditions de purification
pTKL_KD_WT	pMALpIII + ajout d'un tag 6-His en C-ter	JM109	0,5 mM IPTG à 16°C 200 rpm – 16 heures + 1 mM MgSO ₄	Conditions natives en présence d'1mM MgSO ₄ (kosmotrope)
pTKL_KD_ND				
pTKL_KD_DG				
pTKL_KD_KRIMAS				
6His-pTKL_RVxF1	pETduET	C41	0,5 mM IPTG à 16°C 200 rpm – 16 heures	Conditions natives à pH 7,5
GST-pTKL_RVxF1	pGEX-6P3	BL21		
GST-pTKL_SAM	pGEX-6P3	AD494		
6His- <i>Pf</i> SERA5	pETduET	BL21		Conditions natives à pH 8,0

12. Test d'activité kinase par radioactivité

Les protéines pTKL_KD_WT, ND et DG ont été purifiées sur billes de Nickel comme indiqué ci-dessus. Après resuspension en tampon de purification (Tris 20 mM – pH7,5, NaCl 300 mM, Imidazole 20 mM, MgSO₄ 1 mM) et dosage, 400 à 800 µg de chaque protéine (purifiés sur environ 20 µL de billes Ni-NTA à partir de 10-12 litres de culture de bactéries par protéine) ont été utilisés par test d'activité. La protéine PbpTKL native a également été immunoprécipitée à partir de 6 souris infectées (parasitémie >10%) par une souche pG230 de *P. berghei* exprimant PbpTKL-AID-HA (cf. ci-dessous). Les tests dont le protocole est détaillé ci-dessous ont été effectués en collaboration avec le Dr David Tulasne et l'ingénieure Catherine Leroy de l'UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Target Therapies de l'Institut de Biologie de Lille.

Les billes ont été lavées et équilibrées en tampon de lavage (Tris 20 mM – pH7,5, DTT 1 mM, Sodium orthovanadate activé 200 µM, cocktail anti-protéase cOmplete EDTA-free de Roche). JNK1 (Sigma Aldrich – J2455) a été utilisée comme kinase contrôle active à raison de 1 µg par test. Vingt µL de kinase ont été mis en contact avec 5 µg de substrat (Myelin basic protein, extraits protéiques de *P. falciparum* ou extraits de globules rouges sains de souris) et 10 µL d'un mix contenant de l'ATP et de l'ATP marqué [γ -³³P] (10 µCi; PerkinElmer Life Sciences) à une concentration finale de 50 µM, qsp 40 µL en tampon de lavage. Après une heure d'incubation à 37°C, les réactions kinases ont été stoppées par ajout de tampon de Laemmli. Les échantillons ont été séparés sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE). Le gel obtenu a été fixé en acide acétique 10% et en méthanol 10% puis séché. Après une nuit d'exposition, l'incorporation d'ATP marqué [γ -³³P] a été visualisée et quantifiée en utilisant un imageur PharosFX Plus Molecular.

13. Tests de liaison à l'ATP (billes ATP-agarose – Jena Bioscience)

Les protéines recombinantes pTKL_KD_WT, ND et DG ont été purifiées sur billes Ni-NTA puis éluées comme détaillé ci-dessus. Après dialyse et dosage, elles ont été préparées pour le test d'affinité à l'ATP par pull down avec des billes ATP-agarose (modes de fixation de l'ATP à l'agarose schématisés ci-dessous) selon les recommandations du fournisseur et en utilisant exclusivement les réactifs fournis dans le kit (Jena Biosciences - AK102, Figure 55).

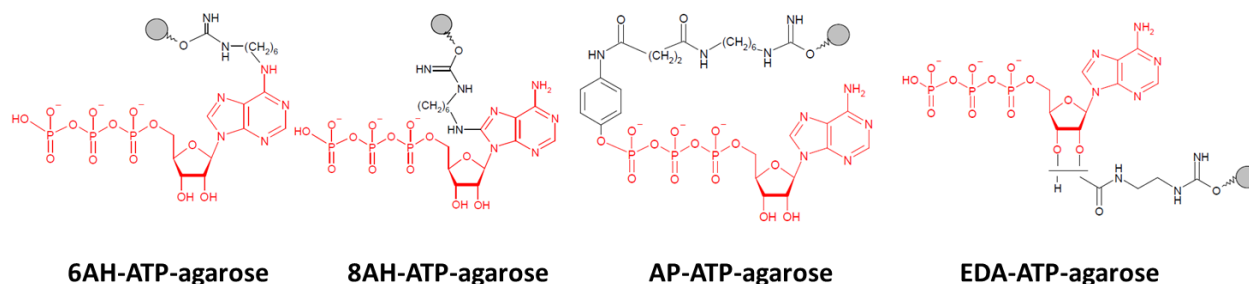


Figure 55 : Présentation des différentes billes ATP-agarose contenues dans le kit AK102 de Jena Bioscience (l'ATP est en rouge et le linker entre l'ATP et les billes est en bleu)

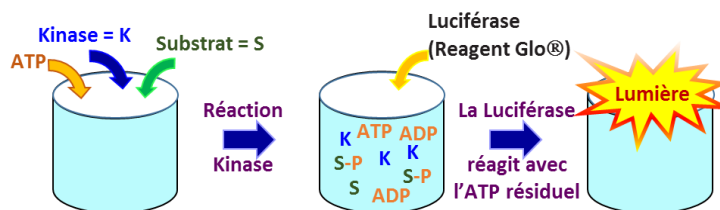
Les protéines ont été dialysées en PBS contenant 1 mM de DTT et 1 mM d'EDTA (ratio des volumes de protéine/tampon = 1/1000) pendant une nuit à 4°C afin d'éliminer tout ATP présent dans les échantillons. Chaque volume de protéine dialysée a été complété avec du binding buffer 5x, du DTT (concentration

finale 1 mM) et des inhibiteurs de protéase fournis dans le kit, puis mis en contact avec des billes ATP-agarose (de type AP, 6-AH, 8-AH et EDA – voir schéma ci-dessus ; des billes agarose seules sont utilisées comme contrôle négatif) pendant 3 heures à 4°C sous agitation lente. Après 3 lavages (tampon de lavage préparé selon le protocole et avec les produits fournis par le fournisseur), les protéines restées fixées aux billes sont éluées (tampon d'éluion préparé de la même manière que le tampon de lavage) pendant 30 minutes sur roue à 4°C. Les éluats sont ensuite préparés avec du tampon de Laemmli et séparés sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE). Les protéines sont ensuite détectées par Western Blot (WB) anti-His.

14. Test de consommation d'ATP (Kinase Glo® – Promega)

a. Principe du Kinase Glo® (Promega, V6714)

Figure 56 : Schéma du principe du KinaseGlo® de Promega. Après la réaction kinase (i.e. la consommation d'ATP pour phosphoryler un substrat), le ReagentGlo® est ajouté.



La luciférase qu'il contient utilise l'ATP restant dans le puits pour produire de la lumière. La quantité de lumière émise est donc inversement proportionnelle à la consommation d'ATP effectuée par la kinase.

b. Protocole Expérimental

Les protéines pTKL_KD_WT, ND et DG ont été purifiées sur billes Ni-NTA comme précisé ci-dessus. Après dosage, elles ont été équilibrées en tampon de lavage (Tris 20 mM – pH7,5, DTT 1 mM, Sodium orthovanadate activé 200 µM, anti-protéase cOmplete EDTA-free cocktail de Roche) et reprises de manière à ce que toutes les suspensions soient à des concentrations protéiques identiques. JNK1 (Sigma Aldrich – J2455) a été utilisée comme contrôle positif et préparée en tampon de lavage de manière identique. Les différentes suspensions ont été distribuées en plaques 96 puits blanches, en quantité croissante de protéine et qsp 20µL/puits. Trente µL de tampon ATP (tampon de lavage précédant contenant de l'ATP 3,3 µM, Myelin Basic Protein 16,7 µg/mL et MgCl₂ 3,3 mM) ont ensuite été ajoutés par puits. Après deux heures d'incubation à 54-200 rpm à l'abri de la lumière, la plaque est équilibrée à température ambiante. Le Reagent Glo® (Figure 56) équilibré à température ambiante est ajouté à 50 µL par puits puis la plaque est incubée à environ 100 rpm pendant 10 minutes à l'abri de la lumière. La lumière émise est ensuite quantifiée à l'aide d'un luminomètre (TECAN Spark 10M).

15. Études d'interaction par GST Pull Down

Les expériences de GST Pull Down visent à étudier l'interaction directe entre une protéine étiquetée GST et fixée à des billes de glutathion et une protéine libre étiquetée 6-His. Les différents échantillons (1 à 3) sont préparés comme ci-dessous (Tableau 16).

Tableau 16 : Récapitulatif des expériences de GST Pull Down effectuées dans le cadre de ce projet

N° test	1	2	3
Objectif du test	Test de l'interaction entre les deux protéines d'intérêt	Témoin négatif (protéine-6His) pour vérifier la spécificité de l'interaction 1	Témoin négatif pour vérifier que la protéine-6His n'interagit pas avec la GST
Tampon de binding	500 µL		
BSA (2 mg/ml)	12,5 µL		
Protéine-6His	1 à 2 µg		
Protéine-GST ou GST fixée sur billes de glutathion	20 µL (protéine-GST/billes)		10 µL (GST/billes)

Étude de l'interaction de *PfPP1c* avec les motifs RVxF de *PfpTKL* : Les préparations ci-dessus sont incubées en tampon de binding (Tris-HCl 20 mM – pH7,4, NaCl 500 mM, Hepes 20 mM, EDTA 0,2 mM, Triton X-100 0.1%, DTT 1 mM, anti-protéase cOmplete EDTA-free cocktail de Roche, MnCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 50 µM) pendant 2 heures sur roue à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 3 fois en tampon de binding.

Étude de l'interaction de *PfSERA5* avec le domaine SAM de *PfpTKL* : Les billes, la BSA et le tampon de binding (Tris-HCl 20 mM – pH8,0, NaCl 500 mM, MnCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 50 µM) sont incubés pendant 1 heure sur roue à 4°C pour saturer les billes et prévenir les fixations aspécifiques. *PfSERA5*-6His est ensuite ajoutée à 1 µg par tube. Après incubation sur roue à 4°C pendant 30 minutes, les billes sont lavées 3 fois en tampon de binding.

Dans les 2 cas, les billes sont ensuite reprises en tampon de Laemmli (élution). Les éluats sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE) puis les protéines fixées aux billes sont identifiées par WB anti-His.

16. Expérimentation animale

Toutes les expériences conduites sur des animaux au cours de ce projet ont été effectuées dans le respect de la réglementation européenne concernant l'expérimentation animale à des fins de recherche (86/609/EEC). Toutes les procédures animales ont été approuvées et supervisées par le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale du Nord - Pas de Calais (CEEA-75).

Les souris mâles (CD1, 22-24 g, Charles River Laboratories) ont été manipulées à l'animalerie centrale du campus de l'Institut Pasteur de Lille (N° d'agrément : 00527.04).

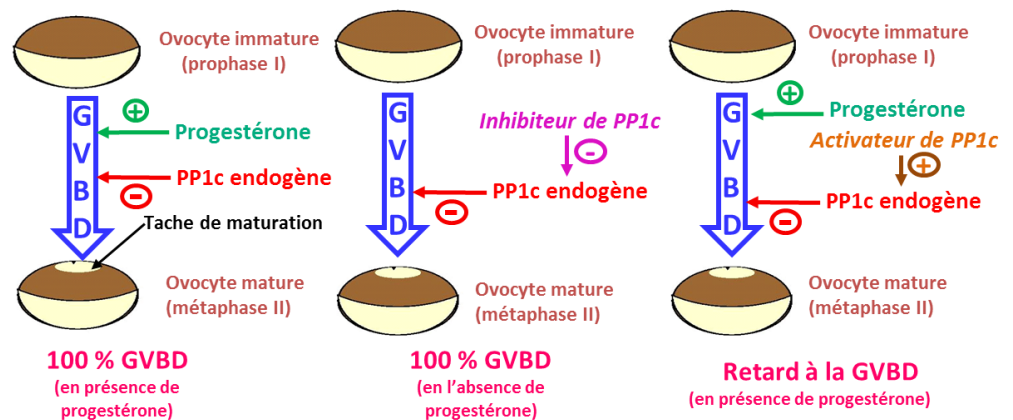
Les Xénopes (*Xenopus laevis*, achetés à l'Université de Rennes, UMS 3387) ont été manipulés au sein de l'UMR 8576-UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université de Lille (N° d'agrément : CEEA 07/2010).

17. Expériences en ovocyte de Xénope

a. Présentation du Modèle de l'Ovocyte de Xénope

Le modèle d'ovocyte de Xénope a été utilisé de manière à étudier le rôle de régulateurs de PP1c dans la progression du cycle cellulaire (*Daher et al. 2006*), et notamment dans le passage de la phase de Prophase I à la Métaphase II de la méiose. Il est relevant car *PfPP1c* et *XePP1c* sont identiques à 80%. Incuber des ovocytes de Xénope bloqués en Prophase I avec de la progestérone déclenche la Germinal Vesicle Breakdown (GVBD), facilement détectée par l'apparition d'une tache de maturation blanche au niveau du pôle animal de l'ovocyte (Figure 57). Cette tache de maturation correspond en réalité à la montée du noyau après rupture de la membrane nucléaire (d'où le nom de GVBD) et mise en place du fuseau mitotique. En termes fonctionnels, la GVBD est freinée par la PP1c et induite par la Progestérone. Micro-injecter l'ARNm codant pour (ou directement) une protéine inhibitrice de PP1c déclenche la GVBD en l'absence de progestérone. Cela se traduit par l'apparition d'une tache de maturation au pôle animal de l'ovocyte et, au niveau moléculaire, par l'activation par déphosphorylation de *cdc2*, une kinase impliquée dans la transduction du signal de la maturation des ovocytes. La condensation des chromosomes peut, quant à elle, être confirmée par vérification de la phosphorylation de l'Histone H3. À l'inverse, la micro-injection d'un activateur de PP1c (ou de son ARNm codant) dans un ovocyte bloqué en Prophase I, et incubé en progestérone, freine la GVBD (i.e. l'activateur de PP1c augmente son activité et inhibe la GVBD induite par la Progestérone). Cela se traduit par l'absence de condensation des chromosomes (et donc l'absence de phosphorylation de l'Histone H3).

Figure 57 : Présentation du principe des expériences effectuées en ovocyte de Xénope bloqué en Prophase I. *XePP1c* bloque la GVBD tandis que la Progestérone la déclenche (gauche). Un inhibiteur de *XePP1c* déclenche donc la GVBD sans progestérone (milieu) alors qu'un activateur de *XePP1c* retarde la GVBD induite par la progestérone (droite).



Pour vérifier que l'impact des protéines injectées dans les ovocytes bloqués en Prophase I est bien lié à l'interaction avec PP1c, des immunoprécipitations de *XePP1c* sont réalisées et les protéines liées aux billes *XePP1c* sont détectées par Western Blot.

b. Protocole expérimental

Les expériences sur les ovocytes de Xénope ont été réalisées à l'UMR 8576 UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (Université de Lille) par les Drs Katia Cailliau et Alain Martoriati. Toutes les expériences de micro-injection ont été effectuées sur des groupes de 10 ovocytes bloqués en Prophase I. Elles ont été répétées en utilisant des groupes d'ovocytes en provenance de 3 animaux différents.

Les protéines 6-His-pTKL_RVxF1, pTKL_KD_WT (contenant RVxF2) et pTKL_KD_KRIMAS (contenant RVxF2 inactivé par mutation) ont été micro-injectées (60 ng/ovocyte) dans des ovocytes de Xénope afin

d'évaluer leur capacité à déclencher la GVBD en l'absence de progestérone. En l'absence d'effet, des ovocytes ont été micro-injectés avec 60 ng de protéines puis incubés en progestérone 10 μ M une heure plus tard. Le pourcentage de GVBD (c'est-à-dire le nombre d'ovocytes dont la GVBD s'est déclenchée divisé par le nombre d'ovocytes total dans chaque groupe) a été suivi toutes les 2 heures pendant 15 heures. Pour confirmer ces résultats, des ovocytes ont été récupérés après incubation en progestérone pendant 15 heures et fixés au formaldéhyde 10%. Des hémisections ont été effectuées le long de la séparation entre les pôles animal et végétal afin d'évaluer la présence et l'intégrité du noyau au centre de l'ovocyte. Afin de confirmer les données ainsi collectées d'un point de vue moléculaire, 10 ovocytes micro-injectés ont été lysés (Hepes 50 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, SDS 0,05%, Triton X100 0.5%, MgCl₂ 5 mM, BSA 1 mg/mL, leupeptin 10 μ g/mL, aprotinin 10 μ g/mL, soybean trypsin inhibitor 10 μ g/mL, benzamidine 10 μ g/mL, PMSF 1 mM, sodium vanadate 1 mM) et ultracentrifugés à 10.000 g pendant 15 minutes à 4°C. Une partie des lysats a été conservée pour vérifier la présence des protéines micro-injectées, ainsi que les niveaux de phosphorylation de Xecd2 et de XeH3 par Western Blot (cf. tableau des anticorps) ; l'autre partie a été utilisée pour immunoprécipiter XePP1c à l'aide d'anticorps anti-XePP1c en présence de billes de Protéine G-Sépharose. Après élution en tampon de Laemmli, les protéines restées fixées aux billes ont été détectées par Western Blot (cf. tableau des anticorps).

18. Double Hybride de levure (Y2H)

a. Principe du Double Hybride de levure

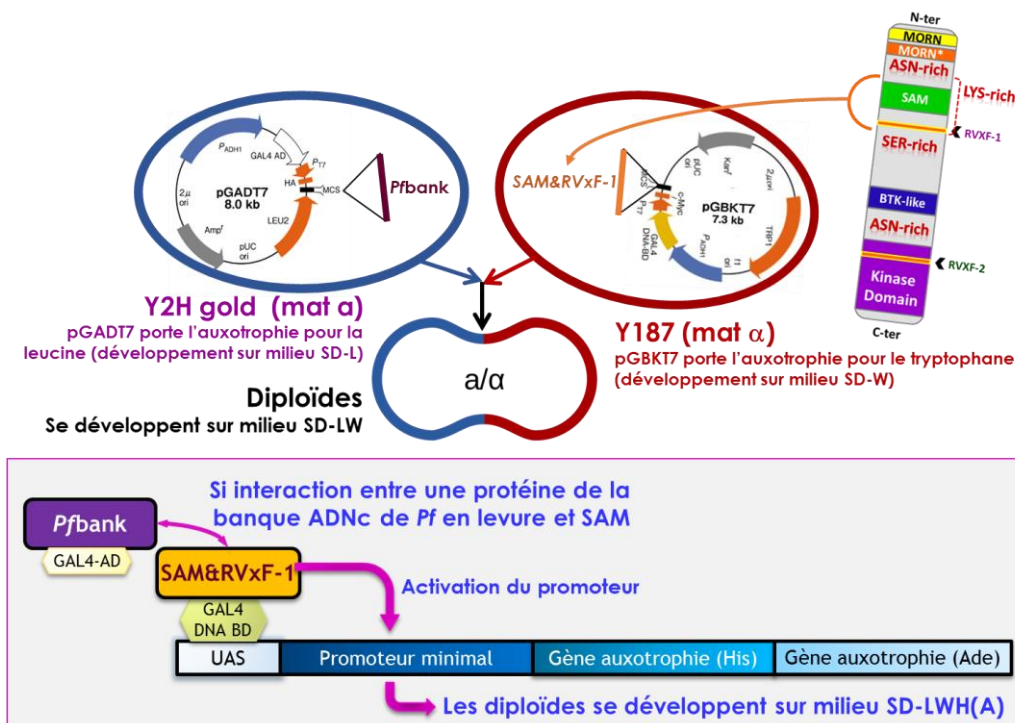


Figure 58 : Schéma du principe du criblage d'une banque d'ADNc de *Plasmodium falciparum* à l'aide du double hybride de levures de polarité sexuelle opposée (mata versus mata).

Des levures de polarité sexuelle opposée sont transformées de manière à exprimer une protéine d'intérêt (appât) fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN (DNA BD) d'une part et des partenaires potentiels (ici

encodés par une banque d'ADNc de *P. falciparum*) fusionnés à un domaine d'activation du promoteur (AD). Au sein des diploïdes obtenus post-croisement, l'appât se fixe au promoteur. Sa capacité d'interaction avec une protéine étiquetée AD va accroître la proximité entre le domaine d'activation et le promoteur régulant l'expression de gènes d'auxotrophie pour l'Histidine et l'Adénine. Plus l'interaction entre les deux partenaires sera forte, plus l'activation du promoteur sera maintenue suffisamment longtemps pour permettre l'expression des gènes d'auxotrophie en aval (Figure 58).

b. Protocole expérimental

Les protocoles de transformation et de croisement des levures sont issus respectivement des manuels Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 et Matchmaker® Gold Y2H de Clontech.

La portion de l'ADNc de *PfpTKL* codant pour la région AA 255-371 contenant SAM et RVxF1a été clonée en pGBKT7 (cf. tableau des amorces) en utilisant le système InFusion. Des levures Y187 (polarité sexuelle mata) ont été transformées avec le construit obtenu et sélectionnées sur milieu dépourvu de Tryptophane (SD-W). Une banque d'ADNc de *P. falciparum* a été préparée (Hollin *et al.* 2016), clonée en pGADT7 et transformée en levures Y2Hgold (polarité sexuelle mata, sélection sur milieu dépourvu de Leucine, SD-L).

Un croisement a été effectué entre les deux souches de levures (de polarité sexuelle opposée) en YPD (milieu de culture enrichi), puis les diploïdes ont été sélectionnés sur milieu SD-LW. L'efficacité du croisement (pourcentage de diploïdes) a été calculée (16,17%) ainsi que le nombre de clones pouvant être criblés (35.100.000). Six mille diploïdes ont été repiqués sur milieu SD-LWH (Triple Dropout medium, TDO) + Auréobasidine (A, le gène de résistance à l'Auréobasidine est présent chez les levures Y2Hgold mais ne s'exprime qu'en cas d'interaction entre des protéines étiquetées GAL4-DBD et GAL4-AD) puis deux fois sur SD-LWHA (Quadruple Dropout medium, QDO) + Auréobasidine (QDO/A). Trente-deux diploïdes sur 6000 ont ainsi été sélectionnés (les résultats du criblage sont en annexe VII) puis cultivés en milieu liquide SD-L (l'objectif étant que les diploïdes se débarrassent du construit en pGBKT7). Après extraction de l'ADN plasmidique de ces levures et transformation en bactéries DH5α (voir tableau des souches) pour 31 diploïdes, les partenaires ont été analysés par séquençage et BLAST sur PlasmoDB.

Pour confirmer l'interaction entre le domaine SAM de *PfpTKL* et *PfSERA5*, un codon STOP a été inséré en 3' de la séquence codant pour SAM dans le construit SAM&RVxF1 en pGBKT7 par mutagenèse dirigée (cf. tableau des amorces). Le construit ainsi obtenu a été transformé en Y187 en parallèle de SAM&RVxF1 en pGBKT7. Des levures Y187 ont été transformées avec le pGBKT7 vide ou des construits pGBKT7 codant pour SAM seul, SAM&RVxF1 ou la laminine (utilisée comme contrôle négatif). Des levures Y2Hgold ont été transformées avec le construit en pGADT7 encodant la portion AA 145-276 *PfSERA5* provenant du diploïde 3457 issu du criblage ou le pGADT7 vide. Les croisements ont été effectués suivant un protocole similaire à celui décrit ci-dessus et les diploïdes en résultant ont été sélectionnés sur milieu TDO/A et QDO/A.

19. Transfection de *P. falciparum*

Des cultures riches en stades jeunes (parasitémie entre 4 et 8%) sont synchronisées par un double traitement au sorbitol/glucose puis remises en culture. La parasitémie et la proportion de stades jeunes sont estimés par frottis sanguin 40 heures plus tard. Les transfections sont réalisées si la parasitémie est $\geq 10\%$ et la proportion d'anneaux par rapport aux autres stades $\geq 90\%$. Les cultures sont centrifugées et lavées en Cytomix 1X (KCl 120 mM, CaCl₂ 0,15 mM, EGTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM, K₂HPO₄/KH₂PO₄ 10 mM, Hepes 25 mM – pH 7,6). L'ADN (50 à 100 µg) est solubilisé dans 210 µL de cytomix 1,43X et placés dans une cuvette d'électroporation (2 mm, Biorad). Minimum 100 M de parasites préparés qsp 100 µL en cytomix 1X sont ajoutés dans la cuvette d'électroporation. L'électroporation est effectuée à l'aide d'un Gene Pulser 2005 (Biorad) avec les paramètres suivants : 310 V, 950 µF, résistance infinie ($\infty \Omega$), 2 mm (Fidock and Wellem's 1997). Les parasites sont récupérés et remis en culture sous Trigas (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂). Le milieu de culture est changé 4 heures après transfection.

La présence de stades anneaux est constatée par frottis 48 heures après transfection et la sélection des transfectants est effectuée en ajoutant des antibiotiques adéquats (Blasticidine, BSD, Invivogen, 2,5 µg/mL ou WR99210, WR, Jacobus Pharmaceutical Company Inc., 2,25 nM). Les milieux sont changés tous les jours pendant 1 semaine puis 2 fois par semaine jusqu'à apparition de parasites résistants à la sélection appliquée (suivie et confirmée par frottis sanguin). Une fois que les parasites commencent à pousser, les cultures sont multipliées, les parasites cryoconservés et les cultures sont placées en incubateur à CO₂ en atmosphère humide.

20. Purification de stades chez *P. berghei*

Les stades parasitaires ont été purifiés selon les protocoles de Janse et al. (Janse and Waters 1995). Pour obtenir des schizontes, le sang de souris infectées (parasitémie~5%) a été mis en culture (1 mL de sang dans 50 mL de milieu : RPMI1640 contenant de l'Hepes 25 mM, Albumax 0,4%, Hypoxanthine 0.2 mM, Gentamycine 20 µg/mL) à 37°C pendant 20 heures à 54 rpm. Les schizontes ainsi maturés sont séparés des globules rouges sains sur Nycodenz® 60% (27,6% w/v Nycodenz® dans du Tris-HCl 5 mM – pH 7,20, KCl 3 mM, EDTA 0,3 mM). Lorsque nécessaire, des globules rouges infectés sont enrichis sur Nycodenz® de la même manière (directement à partir de sang prélevé, i.e. sans maturation à 37°C).

Pour synchroniser une infection à *P. berghei*, des schizontes sont injectés par voie intraveineuse à des souris naïves. Au bout de 3 à 4 heures, après confirmation de la présence de stades anneaux par frottis, le sang de la souris infectée a été mis en culture (cf. ci-dessus) et les stades suivis au cours du temps par frottis sanguin.

21. Génération des souches *P. berghei* transgéniques

Le Knock-out de *PbpTKL* a été effectué par double recombinaison homologue en transfectant des parasites *PbGFP* (cf. tableau des souches) avec la construction PlasmogEM (PbGem-342364, cf. tableau des plasmides) digérée par NotI ou des parasites pG230 (cf. tableau des souches) avec le construit *PbpTKL* en pBS-DHFR (cf. tableau des plasmides et des amorces) digéré par ApaI et XbaI.

Pour étiqueter *PbpTKL* AID-HA ou mCherry en C-ter, une stratégie de simple recombinaison homologue a été employée. Les 1126 dernières paires de bases (codon STOP exclu) de *PbpTKL* ont été clonées en

pG362 ou pL1886 (cf. tableau des plasmides et des amorces) et les constructions obtenues ont été linéarisées à l'aide de BsaBI puis transfectées dans les souches de parasites pG230 ou *PbGFP*.

Les transfections ont été effectuées comme décrit précédemment (*Janse, Ramesar, and Waters 2006*) : des schizontes ont été électroporés avec 5 µg d'ADN linéarisé à l'aide du kit Nucleofector™ de Lonza et d'un électroporateur de type Amaxa et injectés immédiatement par voie intraveineuse à des souris naïves. Les transfectants ont été sélectionnés 30 heures après la transfection (pyriméthamine, Sigma Aldrich, à 10 mg/L dans l'eau de boisson des animaux) pendant une semaine. Après un minimum de 2 passages, les parasites ont été clonés par dilution limite (2 à 50 parasites injectés par voie intrapéritonéale selon les constructions) et maintenus sous pression à la pyriméthamine sauf pour les analyses phénotypiques.

Les différentes souches parasitaires ainsi générées ont été validées par génotypage et RT-PCR.

22. Analyse de l'interactome de *PbpTKL* dans des GRi (globules rouges infectés) par LC-MS/MS

Des immunoprécipitations anti-HA ont été effectuées sur un lysat des ghosts de GRi par la souche exprimant *PbpTKL*-AID-HA (ghosts) ou sur un lysat total de GRi par la souche *P. berghei* pG230 parentale (WT). Les éluats des billes anti-HA ont été analysés par WB anti-HA pour confirmer la présence de *PbpTKL*-AID-HA dans les échantillons 'ghosts' et son absence dans les échantillons WT. Trois réplicats biologiques de chaque échantillon ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse au sein de l'équipe du Dr Chiara Guerrera (Plateforme 3P5-Necker - Protéomique Necker - Université Paris Descartes).

Les protéines ont été identifiées et quantifiées par NanoLC-MS/MS (les données de spectrométrie brutes ont été déposées auprès du consortium ProteomeXchange via <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/> (PXD011986). Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel MaxQuant (version 1.5.8.3) et en effectuant des recherches dans les bases de données *Mus musculus* de SwissProt 07/2017 et *P. berghei* ANKA de PlasmoDB (v37, enrichie avec la séquence chimère de *PbpTKL*-AID-HA) à l'aide du moteur de recherche Andromeda. Les réplicats de chaque échantillon ont été analysés à l'aide du logiciel Perseus (version 1.6.2.3) disponible à <https://maxquant.net/perseus/>. Les données LFQ (Label-Free Quantification) ont été représentées en log2. Les protéines identifiées dans au moins 2 des 3 réplicats biologiques des ghosts (et absentes des échantillons WT) ont été retenues comme partenaires putatifs de *PbpTKL*.

23. Immunofluorescence sur des globules rouges infectés (GRi) par *P. berghei*

Des GR infectés par des parasites *P. berghei* synchronisés ont été collectés à chaque stade de développement et fixés en PBS, paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0,075% pendant au moins 10 minutes sur glace. Après incubation sur des lamelles coâtées à la poly-L-lysine pendant une nuit à 4°C et 3 lavages au PBS, les GRi ont été perméabilisés et saturés (PBS, 1% BSA, 0,5% Triton-X100) à température ambiante pendant 30 minutes. Les lamelles ont ensuite été incubées dans une chambre humide pendant 1 heure à 37°C avec les anticorps primaires [anti-HA ou anti-RFP de lapin (1:150 en PBS, 1% BSA), TER119 (1:500 en PBS, 1% BSA)]. Après 3 lavages en PBS, les lamelles ont été incubées en chambre humide avec les anticorps secondaires [anti-lapin-AF594 1:1000, anti-rat-AF647 1:1000, et Hoechst 1:500 en PBS 1%BSA] pendant 30 minutes à 37°C. Le montage des lames a été effectué avec du Mowiol 4-88 (Sigma Aldrich) à 4°C pendant une nuit. Les images ont été prises au microscope confocal (Zeiss LSM880) à l'aide d'un objectif à huile Apochromatique 63x (1.4 NA). Elles ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel Zen.

24. Analyse phénotypique des lignées *P. berghei* *PbpTKL_KO* vs WT

Les souris ont été infectées par des souches *P. berghei* parentales (WT) ou KO pour *PbpTKL* (pGEM pour Plasmogem et KO pour la construction en pBS-DHFR - 10^6 parasites par souris). La parasitémie et la gamétocythémie ont été suivies par frottis sanguin pendant 7 à 8 jours. Pour suivre la progression du cycle intra-érythrocytaire, l'infection a été synchronisée comme décrit ci-dessus et l'évolution des stades parasites a été suivie par frottis pendant 48 heures. Les tests d'exflagellation ont été effectués 3 à 4 jours après infection synchronisée de souris traitées à la phénylhydrazine (4 mg par souris ; 2 jours avant infection). Après évaluation de la gamétocythémie et du ratio mâle/femelle par frottis sanguin, 10 μ L de sang infecté ont été ajoutés à 50 μ L de milieu ookinète (RPMI1640 contenant de l'Hepes 25mM, FCS 10%, pH 8, (Janse and Waters 1995)). Après 15 minutes d'incubation à 21°C, les centres d'exflagellation ont été comptés à l'aide d'un microscope optique sur au moins 10 champs.

25. Induction conditionnelle de la dégradation de *PbpTKL-AID-HA*

a. Présentation du système AID (Auxin-Induced Degradation)

Ce système de Knock-down inductible est basé sur l'induction de la dégradation de la protéine encodée par le gène d'intérêt. Cette dernière est étiquetée AID par KI. Pour que le système soit fonctionnel, des souches *P. berghei* exprimant la protéine TIR1 ont été élaborées : pG230 est donc utilisable pour étudier les stades sanguins et les gamétocytes (émergence et activation), tandis que pG402 est préconisée pour l'étude des stades de développement chez le moustique et des stades hépatiques. La présence de TIR1 permet la formation d'un complexe SCF : SKP1-CUL1-F-box protein (comme TIR1). Lorsque les parasites sont incubés en auxine (3-Indole-acetic Acid, IAA), cette dernière agit comme une colle moléculaire permettant l'interaction entre le domaine AID et TIR1. Le complexe ainsi formé recrute une ubiquitine-ligase qui ubiquitinyne la protéine d'intérêt, la rendant détectable par le protéasome (Figure 59 - (Philip and Waters 2015)).

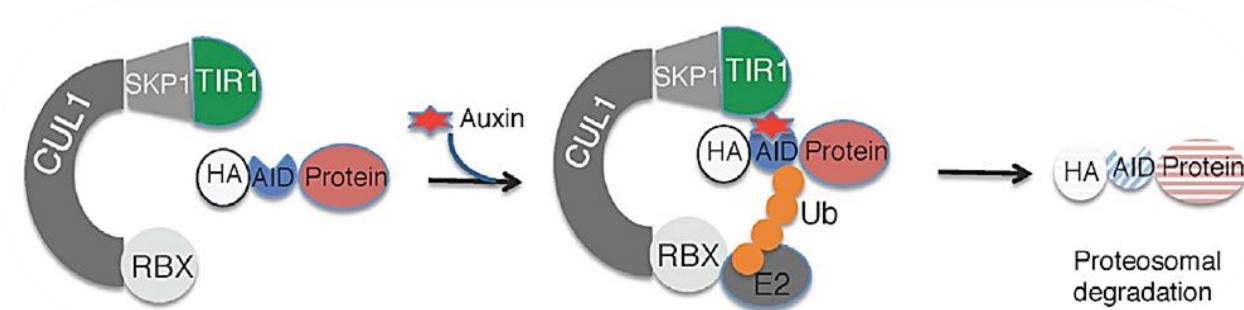


Figure 59 : Schéma du système AID publié par Philip & Waters (Philip and Waters 2015). Les souches pG230 et pG402 expriment TIR1, permettant la formation du complexe SCF (SKP1-CUL1-TIR1). La protéine encodée par le gène d'intérêt est étiquetée AID-HA par KI. L'auxine (IAA, étoile rouge) est une colle moléculaire entre l'AID et TIR1 et permet le recrutement de l'ubiquitine-ligase E2. Cette dernière ubiquitinyne donc la protéine étiquetée AID (ubiquitine = rond orange), permettant sa détection et sa dégradation par le protéasome.

b. Utilisation du système AID *in vitro*

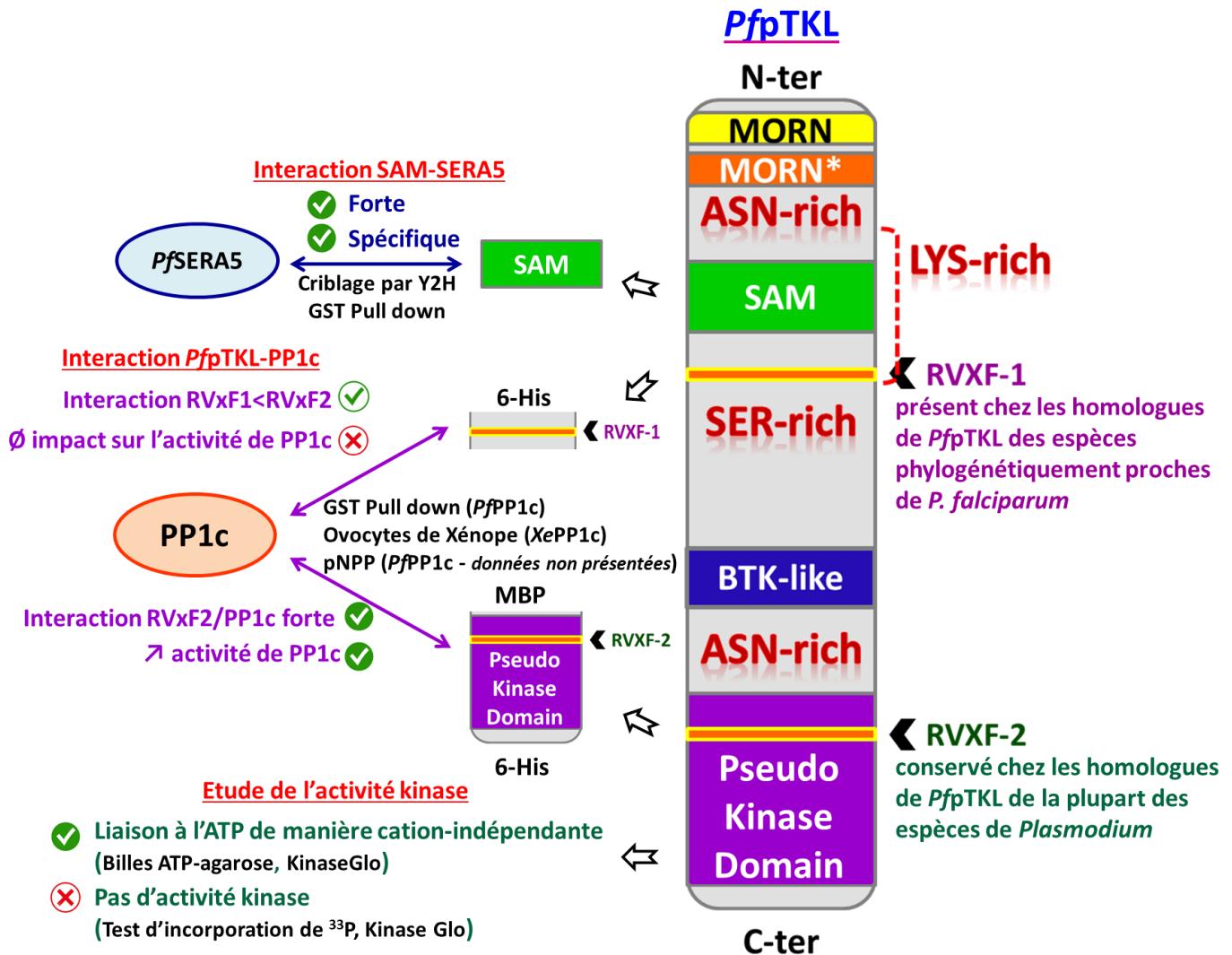
La dégradation de *PbpTKL-AID-HA* en présence de 3-Indoleacetic acid (IAA, Sigma I2886) a été analysée par WB. Des GRi (essentiellement par des trophozoïtes) enrichis sur Nycodenz® ont été incubés à 37°C pendant 30 minutes en présence ou non d'IAA 0,5 µM. Ils ont été lysés (protocole de lyse totale ci-dessus) et une immunoprécipitation anti-HA a ensuite été effectuée sur les lysats, avant WB anti-HA pour détecter *PbpTKL-AID-HA*. La dégradation de *PbpTKL-AID-HA* dans les stades sanguins incubés en présence d'IAA a ainsi été confirmée. Le rôle de *PbpTKL* au cours du cycle intra-érythrocytaire a ensuite été évalué en synchronisant l'infection à *P. berghei* chez des souris (à l'aide de schizontes traités ou non à l'IAA 0,5 µM) comme décrit ci-dessus, puis en mettant le sang en culture pendant 48 heures en présence ou non d'IAA 0,5 µM (*Philip and Waters 2015*).

c. Utilisation du système AID *in vivo*

Douze souris ont été infectées avec 10⁶ parasites de la souche pG230 parentale ou exprimant *PbpTKL-AID-HA*. Elles ont ensuite été réparties en 2 groupes (6 souris par groupe) : traitement à l'IAA ou traitement au tampon véhicule de l'IAA (suivant le protocole publié par Brown & Sibley (*Brown and Sibley 2018*)). Le traitement a été effectué par voie orale par l'eau de boisson (NaOH 3 mM, sucrose 5%, Cherry Kool-AID 2 mg/mL, pH 7,4 avec ou sans IAA 0,5 mg/mL) et par gavage (NaOH 3 mM, pH 7,4 avec ou sans IAA 12,5 mg/mL). L'eau de boisson a été protégée de la lumière et changée tous les 2 jours (car l'IAA se dégrade assez rapidement). Les gavages ont été faits deux fois par jour (2x300 µL par souris de 30 g). La parasitémie a été suivie par frottis sanguin pendant 7 à 8 jours.

Discussion & Perspectives

I. Résumé des résultats obtenus *in vitro* ou avec des modèles hétérologues



II. Le pseudo-domaine kinase de *Pfp*TKL lie l'ATP mais ne présente pas d'activité catalytique

1. Étude du pseudo-domaine kinase

Nous avons démontré que le pseudo-domaine kinase WT de *Pfp*TKL (pTKL_KD_WT) est capable de lier l'ATP au moyen d'un pull down avec des billes ATP-agarose. Néanmoins, son incapacité à incorporer le phosphate γ de l'ATP marqué au ^{33}P à des substrats de diverses origines et le fait que son injection en Ovocyte de Xénope ne déclenche pas la GVBD en l'absence de progestérone indiquent tous deux qu'il est dénué d'activité kinase. Les données collectées à l'aide du kit Kinase Glo® confirment ces interprétations.

En parallèle de l'étude de ce domaine kinase WT, nous avons étudié deux mutants. Dans le premier, nous avons restitué l'Aspartate du sous-domaine VIb dans la boucle catalytique de la kinase (N1272D, pTKL_KD_ND). Dans le deuxième, nous avons muté le sous-domaine VII « DFG » en « GFE » (¹²⁹⁰DFG¹²⁹²→¹²⁹⁰GFE¹²⁹², pTKL_KD_DG). L'étude de ces deux mutants a révélé qu'ils sont capables de lier l'ATP comme pTKL_KD_WT et qu'ils sont tous les deux dénués d'activité enzymatique. Les données collectées avec pTKL_KD_DG indiquent par ailleurs que la fixation de l'ATP par le pseudo-domaine kinase de pTKL se fait de manière cation-indépendante, puisque le motif DFG est impliqué dans la stabilisation des cations Mg^{2+} cofacteurs de l'activité kinase (*Eyers and Murphy 2013; Leroy et al. 2016*). Cela indique donc que pTKL est une pseudokinase de classe 2, c'est-à-dire capable de lier un nucléotide sans lier de cations (*Murphy et al. 2014*).

Au vu des résultats de pull-down obtenus avec les billes ATP-agarose, il est difficile de déterminer si le pseudo-domaine kinase de *Pfp*TKL adopte une conformation particulière pour lier l'ATP. En effet, une kinase classique ne se fixe qu'aux billes AP (d'après [les données du fabricant Jena Bioscience](#)). Cela est dû au fait que, chez ce type de billes, l'ATP est fixée à l'agarose au moyen d'un linker par son groupement phosphate γ . L'adénine et le ribose peuvent donc s'accommoder sans peine dans le site catalytique suivant les changements de conformation ON/OFF, et la création des colonnes R et C qui stabilisent la conformation ON, habituellement effectués par les kinases de type Hanks (*Taylor et al. 2012*). L'adoption de la conformation active requiert la présence d'un substrat, d'un cofacteur ou une modification post-traductionnelle selon les kinases (*Möbitz 2015*). Concernant les billes 6-AH et 8-AH (sur lesquelles l'ATP est fixée à l'agarose par l'adénine), il reste imaginable que l'ATP s'accommode dans le site catalytique du pseudo-domaine kinase de *Pfp*TKL comme décrit ci-dessus avec les billes AP, la chaîne aliphatique située entre l'ATP et l'agarose étant suffisamment longue et, probablement, flexible pour le permettre. Pour finir, concernant les billes EDA sur lesquelles l'ATP est liée à l'agarose par sa partie sucre, le linker entre le ribose et l'agarose est plus court qu'avec les autres des billes. Il est possible que la fixation du pseudo-domaine kinase de *Pfp*TKL ne se fasse que sur une partie de l'ATP ou que la poche catalytique du domaine présente suffisamment de flexibilité pour se replier autour de la molécule. Cette flexibilité pourrait être favorisée par la présence d'insertions dans le lobe N-ter du pseudo-domaine kinase qui se replieraient en boucles, plutôt qu'en feuillets β plus rigides. Quoi qu'il en soit, l'absence de tous les motifs et résidus importants pour la stabilisation de l'ATP dans le site actif de la pseudokinase, c'est-à-dire la triade de Glycines, la Lysine du sous-domaine II et l'Aspartate du sous-domaine III, laisse présager que le mode de liaison et de stabilisation de l'ATP dans le site actif de pTKL lui est probablement propre. La

richesse du lobe N-ter du domaine kinase de pTKL en acides aminés chargés (principalement des Lysines et des Asparagines) abonde par ailleurs en ce sens.

La cristallographie aux rayons X ou la Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) font partie des techniques qui permettent d'en apprendre plus sur les conformations des sites catalytiques d'enzymes, à fortiori de kinases. Elles ont fait leurs preuves dans le cadre d'études visant à caractériser des pseudokinases ou des kinases atypiques (Min *et al.* 2004; Lecointre *et al.* 2018). Cependant, au vu des rendements quantitatifs et qualitatifs de production obtenus avec les domaines kinase recombinants WT ou mutés de pTKL, il semble difficilement envisageable de procéder ainsi pour la caractérisation de cette pseudokinase.

En revanche, des expériences de compétition avec des inhibiteurs de kinase ou d'autres nucléotides que l'ATP (comme l'ADP ou le GTP) pourraient être envisagées (Lucet, Babon, and Murphy 2013). L'on pourrait imaginer faire un criblage de ces molécules à l'aide des billes ATP-agarose. Ces molécules seraient utilisées pour éluer le pseudo-domaine kinase de pTKL des billes, et l'ATP serait utilisée comme témoin positif. L'analyse des éluats par WB est suffisamment sensible pour permettre la détection des protéines qui auraient été décrochées des billes parce que présentant une affinité aussi ou plus forte pour les molécules du criblage que pour l'ATP. Cette expérience permettrait de savoir si pTKL est capable de lier d'autres nucléotides que l'ATP et, potentiellement, d'obtenir des informations sur la configuration de son site catalytique selon la taille et la structure chimique des molécules/inhibiteurs de kinase qui seraient capables de se fixer.

Une approche similaire pourrait être utilisée pour évaluer l'affinité des protéines pTKL_KD WT ou mutantes pour l'ATP (Lucet, Babon, and Murphy 2013). Cela consisterait à fixer les différentes protéines aux billes ATP-agarose, puis les éluer à l'aide de solutions contenant des concentrations d'ATP différentes. Cela permettrait d'en déduire les différences d'affinité des trois pseudo-domaines kinase entre eux et avec les différents types de billes. Nous pourrions ainsi étayer les données qui ont été collectées au cours de ce projet de thèse.

Enfin, et nous y reviendrons plus bas, nous avons montré que pTKL_KD_WT est capable d'interagir avec P/PP1c ainsi qu'avec XcPP1c et nous nous sommes principalement focalisés sur le rôle de cette interaction sur l'activité phosphatase de PP1c. Cela est dû au fait que suite à la confirmation de cette interaction, une expérience Kinase Glo® a été effectuée avec pTKL_KD_WT en présence ou non de P/PP1c et qu'aucune différence de consommation d'ATP n'a été constatée entre les deux types de test. Néanmoins, l'impact de l'interaction pTKL_KD_WT/PP1c sur la capacité du pseudo-domaine kinase à lier l'ATP pourrait être étudié, encore une fois à l'aide des billes ATP-agarose. Cela permettrait de savoir si cette interaction induit des changements conformationnels dans le pseudo-domaine kinase et altère sa capacité à lier l'ATP.

La recherche d'autres partenaires de ce domaine kinase pourrait également fournir des informations intéressantes. Pour cela, un criblage de banque par le système du double hybride de levure pourrait être envisagé, tout comme l'incubation de pTKL_KD_WT fixé sur des billes de Nickel avec des extraits parasitaires de *P. falciparum* ou du lysat de globules rouges infectés, puis d'identifier les protéines capables d'interagir avec pTKL_KD_WT par spectrométrie de masse. Il serait alors intéressant de croiser ces données avec celles collectées avec PbpTKL-AID-HA afin de voir si certaines protéines sont présentes dans les deux cas et sont donc des régulateurs ou des protéines régulées/chaperonnées par pTKL.

2. Étude du rôle du domaine BTK-like

Le domaine BTK-like de pTKL est, comme cela a été argumenté précédemment, un lobe N-ter de kinase présentant 25% d'identité (40% de similarité) avec le lobe N-ter de la BTK (Figure 24). De manière intéressante, la Lysine du sous-domaine II de ce lobe N-ter est conservée, contrairement à ce qui a été démontré pour le pseudo-domaine kinase de PfpTKL (Figure 60 – la Lysine de la BTK est colorée en vert et celle du domaine BTK-like en rouge). De plus, ce domaine BTK-like est conservé chez tous les homologues de PfpTKL de toutes les espèces de *Plasmodium* avec un taux d'identité avoisinant les 70% (Annexe VIII). Cela indique donc que ce domaine joue certainement un rôle important pour pTKL.

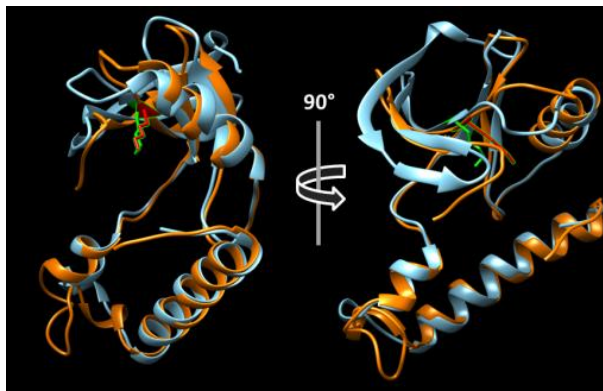


Figure 60 : Le domaine BTK-like de pTKL se replie de la même manière que le lobe N-ter de la Bruton's Tyrosine Kinase (BTK). Le repliement du domaine BTK-like de PfpTKL (en orange) a été prédit à l'aide de [Phyre 2](#) (120 résidus (98%) modelés avec un indice de confiance >90%). La structure ainsi prédite a été superposée avec celle du lobe N-ter de la BTK humaine (PDB ID: 4RFZ, AA 396–519, en bleu) à l'aide de l'outil MatchMaker du logiciel Chimera v1.10.1. La Lysine du sous-domaine II est colorée en vert pour la BTK et en rouge pour le domaine BTK-like.

Pourquoi donc la pTKL a-t-elle deux lobes N-ter de kinase (i.e. le domaine BTK-like et le lobe N-ter de son pseudo-domaine kinase) ? Voici quelques éléments de discussion :

- ◆ Tous les introns des gènes PF3D7_1106800 (*PfpTKL*) et PBANKA_0940100 (*PbpTKL*) sont situés à l'extrémité 3' du gène ([Annexe IX](#)), dans la région du gène codant pour le lobe C-ter du pseudo-domaine kinase. En cas d'épissage alternatif, seul celui-ci serait impacté. Les deux lobes N-ter de kinase de pTKL, ainsi que toute la moitié N-ter de la protéine, sont donc exprimés quel que soit le résultat de l'épissage alternatif.
- ◆ La conservation de la région BTK-like et du motif RVxF2 entre tous les homologues de PfpTKL chez toutes les espèces de *Plasmodium* indique qu'ils sont certainement tous les deux importants pour la fonction de la protéine chez le parasite (et pour la relation parasite/hôte, au moins au cycle intra-érythrocytaire).
- ◆ La région BTK-like de la pTKL, outre le fait qu'elle comporte la lysine du sous-domaine II, présente globalement une certaine similarité avec les lobes N-ter de la PKA et de la BTK ([Figure 61](#)). Au contraire, la séquence du lobe N-ter du pseudo-domaine kinase de pTKL semble plus dégénérée et comporte plusieurs régions riches en Lysine et en Arginine. De plus, ces deux domaines sont séparés par des régions comportant des répétitions de motifs très riches en Asparagine (répétitions 'NNNN' entre le domaine BTK-like et le domaine kinase – [Annexe III](#)).

Or, l'Asparagine et la Lysine sont encodées par des codons riches en Adénine : AAT, AAC, AAA, AAG. Dans le même temps, il a été démontré chez *Plasmodium*, et tout particulièrement *P. falciparum*, que l'accumulation de mutations dans certaines régions du génome s'accompagnent également de transitions GC>AT, sans que les mécanismes à l'origine de ces transitions ne soient connus, ce qui génère des biais dans la composition du génome (Hamilton et al. 2017). Ainsi, l'on pourrait émettre l'hypothèse que le lobe N-ter du pseudo-domaine kinase est issu d'une insertion au sein d'un gène encodant une pseudo-kinase (l'absence de l'Aspartate du sous-domaine VIb étant la raison majeure de l'appellation « pseudo-kinase », puisque le lobe N-ter BTK-like comporte la Lysine du sous-domaine II et que le motif DFG du sous-domaine VII est conservé). Le but de cette insertion pourrait être expliqué par la présence du motif RVxF2, qui confère à la protéine obtenue post-remaniement du gène la capacité à interagir avec PP1c.

- ◆ Enfin, la région qui sépare les deux lobes N-ter est, comme nous l'avons vu ci-dessus, très riche en Asparagines et, donc, déstructurée. De plus, le lobe N-ter du pseudo-domaine kinase contient diverses insertions qui se replient probablement en boucles non structurées. Toutes ces régions sont donc certainement flexibles. Cela nous amène à une autre hypothèse : les deux lobes N-ter pourraient-ils être interchangeables ? Autrement dit, le lobe C-ter la pTKL pourrait-il être s'associer soit au domaine BTK-like soit au lobe N-ter du pseudo-domaine kinase pour donner deux domaines kinases différents ? Si oui, dans quelles conditions ? Quel pourrait être le rôle de PP1c dans la transition d'un lobe à un autre ?

Hs_BTK	GTGQFG---VVKYGKWRGQY---DVAIKMIKEGSMSEDEFIEEA---KVMNLSHEKLV
Pf_pTKL_BTK-lik	NINNFgkyKkMksRMfKGyMGKEVAIKIL-VGKIKNFKKLHQIL---YNLYNLRHSNLV
Hs_PKA	GTGSFGRVMLVKHKETGNHY----AMKILDQKVVVKLKQIEHTLNEKRILQAVNFPFLV
	. . . * : * : * : * : : : : : : : : : : *
Hs_BTK	QLYGVCTKQRPFIITEYMANGCLLNLYLREMRH-----RFQTQQ---
Pf_pTKL_BTK-lik	LIMGVSIHYPFVFIIYEMKNKCLFSYLHCIKYKHVYISTFLQRY---
Hs_PKA	KLEFSFKDNSNLYMVMEYVPGGEMFSLRRIGRFSEPHARFYAAQIVL
	: . : : : * : : : : : *



+ Séquence du lobe N-ter du pseudo-domaine kinase de *PfpTKL*

Hs_BTK	-----GTGQFG---VVKYGKWRGQY---DVAIKMIKE---GSMSEDEFIEEAKVMMN
Pf_pTKL_BTK-lik	-----NINNFgkyKkMksRMfKGyMGKEVAIKILVG---KIKNFKKLHQILYNLYN
Hs_PKA	-----GTGSFGRVMLVKHKETGNHY----AMKILDQKVVVKLKQIEHTLNEKRILQA
Pf_pTKL_pseudoK	DNHIYCNNIYDHHKNTSLNSKEQNTDH----NIEQINE--CNKYASETKYNIKKSNLKN
	. . : : : : : . :
Hs_BTK	--LSHEKLVQLYGVCTKQRPFIITEYMANGCLLNLYLREMRHRFQTQQ---
Pf_pTKL_BTK-lik	--LRHSNLVLIMGVSIHYPFVFIIYEMKNKCLFSYLH--CIKYKHVYISTFLQRY---
Hs_PKA	--VNFPFLVKLEFSFKDNSNLYMVMEYVPGGEMFSLR--RIGRFSEPHARFYAAQIVL
Pf_pTKL_pseudoK	NIISHKNFQCNQIQMNQPYTFPPYQ---KELSSYLKNEKIKRKRKVLFSYLKTHI--
	: . : . : : : : : : :

Figure 61 : Alignements des lobes N-ter de la PKA humaine (Hs_PKA), la BTK humaine (Hs_BTK), de la région BTK-like (Pf_pTKL_BTK-lik) et/ou du pseudo-domaine kinase de *PfpTKL* (Pf_pTKL_pseudoK). Les alignements ont été effectués avec [MAFFT](#). Les acides aminés identiques entre les séquences alignées sont indiqués par des étoiles et ceux similaires par des points (: ou .).

Afin d'en apprendre plus sur la région BTK-like, il pourrait être intéressant de suivre la démarche suivante :

- ♦ La production d'une protéine recombinante comprenant le domaine BTK-like et le pseudo-domaine kinase de *PfpTKL* n'a pas été possible (protéine très instable). Afin d'étudier le rôle de la potentielle interchangeabilité des lobes N-ter, il pourrait être intéressant de produire des protéines recombinantes en plaçant le domaine BTK-like à la place du lobe N-ter du pseudo-domaine kinase dans les différentes protéines pTKL_KD WT et mutantes. Cela est possible si les régions interlobes sont choisies comme points de repère pour délimiter les régions à cloner/remplacer.
- ♦ Une fois les protéines produites, leur capacité à lier l'ATP pourra être évaluée à l'aide des billes ATP-agarose. Leur potentiel enzymatique pourra quant à lui être évalué à l'aide d'ATP marqué au ³³P sur les mêmes substrats que ceux qui ont été utilisés pour les protéines recombinantes pTKL_KD. Si ces protéines sont plus faciles à produire et à purifier que celles présentées dans ce manuscrit, il sera même envisageable d'utiliser des techniques de mesure de l'affinité de liaison à l'ATP (avec ou sans ions) plus poussées comme le Thermal Shift Assay ([Murphy et al. 2014](#)).
- ♦ Ensuite, il pourra être instructif de comparer les protéines pTKL_KD comportant le lobe N-ter du pseudo-domaine kinase avec celles comportant la région BTK-like en guise de lobe N-ter, notamment en termes de liaison à l'ATP et d'activité kinase, particulièrement pour les protéines N1272D.

Il pourra également être judicieux d'examiner la capacité des deux lobes N-ter à interagir l'un avec l'autre. Cela permettra, le cas échéant, de statuer sur le potentiel de régulation des activités de liaison ou de phosphorylation des différents domaines kinases (i.e. l'un ou l'autre des lobes N-ter + le lobe C-ter WT ou muté ND ou DG versus l'autre lobe N-ter). L'on pourra potentiellement faire de même avec le domaine SAM. En effet, chez la TKL3 de *P. falciparum*, le domaine SAM joue un rôle clé dans la régulation de l'activité kinase de manière allostérique ([A. Abdi et al. 2010](#)). Pour cela, les différentes protéines (i.e. les pTKL_KD_WT et mutantes, les pseudo-domaines kinase issus de l'association BTK-like/lobe C-ter WT ou muté, le domaine SAM de la pTKL) devront être produites et étiquetées GST ou 6-His, avant d'effectuer des expériences de Pull down pour étudier les différentes interactions putatives. Le principal facteur limitant de ces expériences sera lié aux rendements quantitatifs et qualitatifs des diverses protéines.

Ces différentes expériences pourraient permettre de comprendre le rôle des différents domaines de la pTKL au sein de la protéine, ce qui compléterait les données obtenues au cours de ce projet de thèse.

3. *Pfp*TKL interagit avec PP1c et module son activité via le motif RVxF2

*Pfp*TKL comporte deux motifs RVxF. Le premier, RVxF1, se situe en aval du domaine SAM (voir le résumé graphique en partie I de cette discussion). Il n'est conservé que chez les homologues de *Pfp*TKL proches de *P. falciparum* infectant, notamment, des singes. Nous n'avons pu démontrer l'interaction entre la région contenant RVxF1 et *Pf*PP1c que par GST Pull Down, et cette région ne semble pas capable de faire de même en ovocyte de Xénope. De même, cette région a été incluse avec le domaine SAM dans l'appât utilisé dans le criblage par double hybride de levure, mais PP1c n'a pas été retrouvée parmi les hits de ce criblage. La région contenant RVxF1 présente pourtant plusieurs caractéristiques qui devraient augmenter son potentiel d'interaction avec PP1c, du moins en théorie. Ainsi, en amont du motif RVxF1, se trouve une région riche en acides aminés basiques et chargés, comme la Lysine et l'Arginine, qui sont souvent conservées en amont des motifs RVxF chez *P. falciparum* et qui pourraient favoriser l'interaction avec la phosphatase (Hollin *et al.* 2016). De plus, la séquence du motif RVxF1 suit la séquence consensus proposée par Meiselbach qui est l'une des séquences consensus les plus spécifiques pour les motifs RVxF (Meiselbach, Sticht, and Enz 2006; Hendrickx *et al.* 2009). Enfin, RVxF1 se trouve dans une région de la *Pfp*TKL qui est non structurée, en amont d'une suite de répétitions riches en Sérine et en Proline, ce qui est assez courant chez les motifs d'interaction avec *Pf*PP1c qui se structurent après avoir interagit avec la phosphatase (Verbinnen, Ferreira, and Bollen 2017). Au-delà de ces considérations plutôt théoriques, il est nécessaire de prendre également en compte le fait que la région contenant RVxF1 a été produite sous la forme d'une protéine recombinante. Son repliement est donc potentiellement différent de celui qu'elle adopterait au sein de la protéine entière. Enfin, les expériences effectuées *in vitro* ont peut-être « forcé » l'interaction, d'autant plus que 2 µg de protéine recombinante contenant RVxF1 étaient nécessaires pour détecter l'interaction avec *Pf*PP1c, contre 1 µg de pTKL_KD_WT contenant RVxF2. L'interaction ainsi détectée était cependant spécifique, RVxF1 n'interagissant avec aucun des témoins négatifs utilisés.

Quant à RVxF2, il se situe dans le domaine kinase de *Pfp*TKL, à priori dans une boucle située entre deux brins β du lobe N-ter qui est accessible (Figure 62). La protéine pTKL_KD_WT, qui contient le motif RVxF2, est capable d'interagir avec *Pf*PP1c *in vitro* et avec *Xe*PP1c lorsqu'elle est micro-injectée en ovocyte de Xénope. Lorsque le motif RVxF2 est muté (¹²¹⁶KRKVL¹²²¹ – ¹²¹⁶KRIMAS¹²²¹), donnant la protéine pTKL_KD_KRIMAS, le pseudo-domaine kinase de *Pfp*TKL n'est plus capable d'interagir avec PP1c (aussi bien *in vitro* avec *Pf*PP1c – données non présentées – qu'avec *Xe*PP1c lorsque micro-injectée en ovocyte de Xénope).

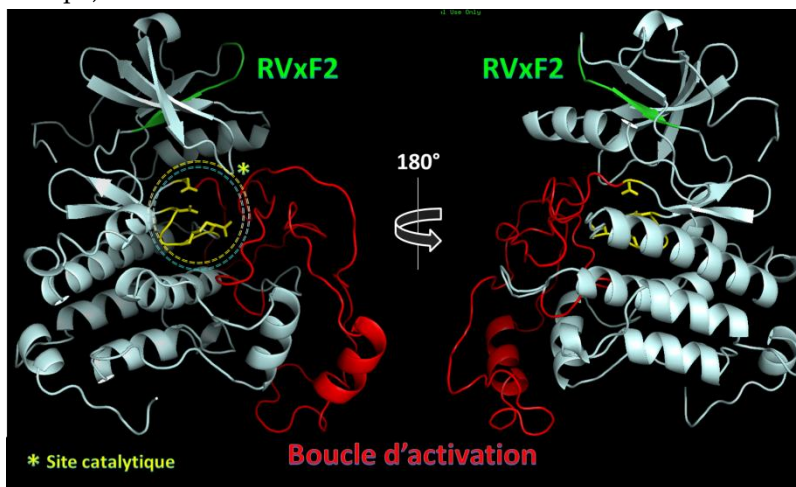


Figure 62 : Modèle de la structure tertiaire du pseudo-domaine kinase de *Pfp*TKL réalisé avec [le serveur Phyre 2](#) (78% des AA modelés avec >90% de fiabilité). La structure prédite a été manipulée et colorée avec le logiciel PyMOL Viewer 1.3.

Le motif RVxF2 est coloré en vert, les acides aminés de la boucle catalytique et l'Aspartate du DFG en jaune, la boucle d'activation en rouge.

Les expériences effectuées en ovocyte de Xénope ont également permis d'observer l'impact de cette interaction sur l'activité de la phosphatase. Ainsi, aucune des micro-injections des différentes protéines chez des ovocytes bloqués en Prophase I n'a déclenché spontanément la GVBD. Cela indique donc qu'elles ne sont pas des inhibiteurs de XePP1c. En revanche, lorsque la GVBD est induite à l'aide de progestérone, elle est freinée suite à la micro-injection de pTKL_KD_WT, ce qui n'est pas le cas avec pTKL_KD_KRIMAS. Cela indique donc que le motif RVxF2 joue un rôle clé dans l'interaction du pseudo-domaine kinase avec PP1c et dans le rôle de cette interaction sur l'activité phosphatase.

Nous avons par ailleurs obtenu des résultats plus difficiles à analyser/interpréter avec les protéines pTKL_KD_ND et DG. Ces deux protéines sont capables d'interagir avec XePP1c. Pourtant, dans les deux cas, la GVBD induite par la progestérone n'est pas freinée comme elle l'est pour pTKL_KD_WT. Cela n'est par ailleurs pas visible de la même manière pour les deux protéines. En effet, avec pTKL_KD_DG, la GVBD a lieu de manière similaire au contrôle négatif, i.e. le noyau monte à la surface des ovocytes micro-injectés. En revanche, chez les ovocytes micro-injectés avec la pTKL_KD_ND et incubés en progestérone, la GVBD a lieu, comme en témoignent la déphosphorylation de cdc2 et la phosphorylation de l'Histone H3, mais le noyau ne monte à la surface de l'ovocyte que dans 30 à 60% des cas. De plus, avec ces deux protéines, les ovocytes micro-injectés entrent dans une phase de lyse au bout de 24 heures, soit deux fois plus vite que des ovocytes de Xénope non fécondés (communication avec le Dr Katia Cailliau qui a réalisé les expériences en ovocyte de Xénope).

Voici quelques hypothèses pour tenter d'expliquer ces phénomènes :

- ◆ Le fait que l'activité de la PP1c de Xénope ne soit pas impactée dans les deux cas, et ce bien que l'interaction avec RVxF2 soit toujours détectée, indique une potentielle perturbation de cette interaction. En effet, les sous-unités régulatrices de PP1c s'ancrent parfois sur la sous-unité catalytique au moyen de deux à trois motifs d'interaction, ce qui leur permet de recouvrir toute une surface de la sous-unité catalytique et d'y induire des modifications conformationnelles qui peuvent moduler son activité enzymatique et/ou sa spécificité de substrat. Cela a été démontré au laboratoire avec plusieurs partenaires de PP1c. Avec *PfI2*, les motifs RVxF et HYNE permettent chacun l'interaction avec PP1c, mais la présence des deux motifs est nécessaire pour l'inhibition de l'activité phosphatase (Fréville *et al.* 2013, 2014). I2 a également été caractérisé chez *Toxoplasma gondii*. TgI2 comporte trois motifs d'interaction avec TgPP1c qui sont SILK-like, RVxF et HYNE. Le motif RVxF de TgI2 suffit pour l'interaction avec la phosphatase, mais la présence de RVxF et du motif SILK-like est requise pour conférer à TgI2 sa capacité d'inhibition de l'activité de PP1c (Deveuve *et al.* 2017). En ce qui concerne maintenant les protéines pTKL_KD_ND et DG, les mutations effectuées ciblent des acides aminés qui sont très proches (du point de vue de la structure tertiaire – voir AA en jaune sur la Figure 62) dans le site catalytique du domaine kinase. En effet, dans la protéine pTKL_KD_ND, c'est la boucle catalytique qui est modifiée, et dans la protéine pTKL_KD_DG, c'est le motif DFG, qui se situe au-dessus de la boucle catalytique et qui stabilise les cations cofacteurs de l'activité kinase, qui est ciblé. Il est donc possible que, dans les deux cas, les mutations, à l'origine effectuées pour la caractérisation de l'activité kinase, perturbent l'environnement autour du site catalytique et engendrent des changements de configuration de certains éléments du lobe N-ter ou de la boucle d'activation qui pourraient être impliqués dans la régulation de PP1c.

- ◆ L'hypothèse évoquée ci-dessus n'est pas valable pour tous les régulateurs de PP1c. Ainsi, *Pfelf2β*, qui comporte deux motifs d'interaction avec PP1c (FKK et RVxF), n'a besoin que de l'un de ces deux motifs pour interagir avec PP1c et moduler son activité (*Tellier et al. 2016*). De plus, certains partenaires de *PfPP1c*, comme *Pfβ3* et *PfRCC-PIP*, ne comportent qu'un seul motif d'interaction de type RVxF, qui est directement impliqué dans l'interaction et la modulation de l'activité phosphatase (*Fréville et al. 2012; Lenne et al. 2018*). Ainsi, si le motif RVxF2 est suffisant pour l'interaction et la modulation de l'activité phosphatase, cela implique donc que *XePP1c* serait activée, freinant la GVBD, mais que d'autres phénomènes se déclencheraient ensuite pour activer la GVBD et contrebalancer l'effet de PP1c. La présence de ces deux effets contradictoires pourrait être toxique pour les cellules, ce qui pourrait potentiellement expliquer pourquoi nous avons observé une lyse précoce des ovocytes micro-injectés avec ces deux protéines-là en particulier.

Afin de distinguer l'hypothèse la plus plausible entre les deux, il pourrait être envisageable d'utiliser la RMN afin de cartographier les différents sites d'interaction des trois protéines avec PP1c, comme cela a été fait avec *Pf2* (*Fréville et al. 2014*). Cela permettrait de voir si d'autres régions du domaine kinase sont impliquées dans l'interaction avec la phosphatase. Néanmoins, avant d'utiliser cette technique, il est auparavant primordial d'améliorer les rendements quantitatif et qualitatif de la production des protéines recombinantes pTKL_KD, sans lesquels il ne sera pas possible d'obtenir des résultats interprétables.

Par ailleurs, il conviendra de vérifier si cette interaction a bien lieu *in vivo*, avec la PP1c du parasite. Nous n'avons pas retrouvé la PP1c de l'hôte dans l'étude de l'interactome de *PbpTKL-AID-HA* au stade trophozoïte, ce qui indique potentiellement que l'interaction avec *MmPP1c* est peut-être transitoire si elle a lieu. Bien que nous ayons montré que *PbpTKL-AID-HA* est localisée dans le cytoplasme du parasite au stade schizonte, nous n'avons pas pu démontrer si elle était ou non capable d'interagir avec *PbPP1c* faute de matériel. Nous pourrions donc immunoprécipiter *PbpTKL-AID-HA* et incuber les billes HA avec des extraits parasitaires de stades schizontes exprimant *PbPP1c* étiquetée mCherry ou autre, avant de les analyser par WB.

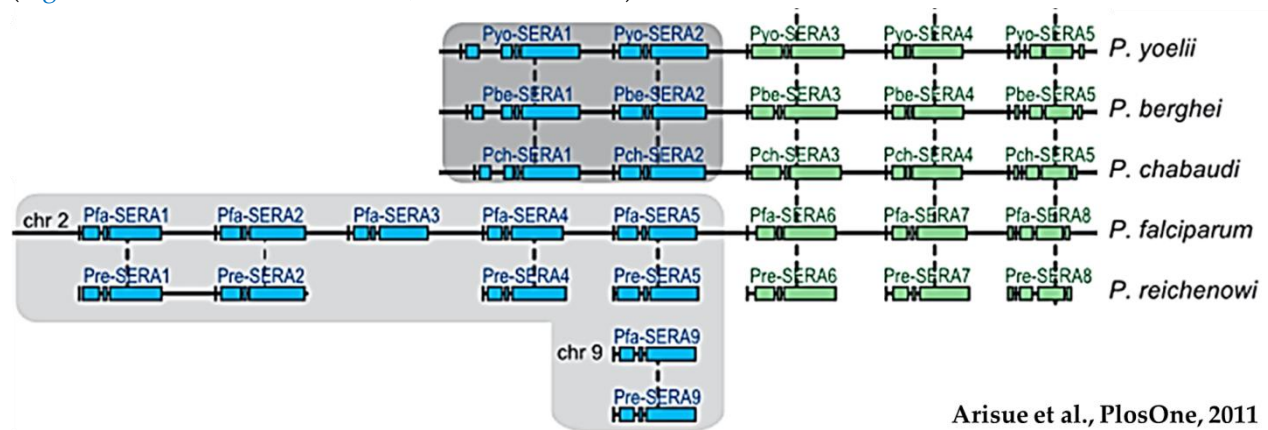
Enfin, il ne faut pas oublier que la capacité de la pTKL à interagir avec diverses protéines peut être impactée par des MPTs. Des données de phosphoprotéomique disponibles sur [PlasmoDB](#) indiquent la présence de 7 peptides phosphorylés situés entre le motif RVxF1 et le domaine BTK-like de *PfpTKL* (*Annexe III*). Aucun autre peptide de la protéine n'a été identifié ailleurs sur la protéine, donc aucun autre site de phosphorylation n'a été détecté en-dehors de ceux qui sont répertoriés en *Annexe III*. La *PfpTKL* est également méthylée au stade trophozoïte, d'après Kaur et al. (*Annexe III - (Kaur et al. 2016)*). Il est intéressant de remarquer que les sites de méthylation et de phosphorylation sont présents dans la région située entre RVxF1 et le domaine BTK-like, alors que leurs impacts respectifs sur le repliement de la protéine sont certainement opposés, au vu notamment de leur composition chimique. Nous manquons néanmoins d'informations concernant l'évolution de l'abondance et des types de MPT qui ciblent la pTKL au cours du cycle intra-érythrocytaire. Il serait intéressant de regarder si pTKL est impactée par des MPTs différentes tout au long du cycle intra-érythrocytaire de *Plasmodium*, et si ces MPTs sont différentes selon les compartiments dans lesquels elle se trouve (par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-méthyllysine ou anti-phosphosérine puis révélation par WB anti-HA, par exemple). Le niveau d'expression de la protéine ne le permettra peut-être cependant pas, notamment au stade schizonte.

4. *PfpTKL* interagit avec *PfSERA5* via son domaine SAM

Nous avons démontré, au moyen d'un criblage d'une banque d'ADNc de *P. falciparum*, que *PfSERA5* est le partenaire principal du domaine SAM de *PfpTKL*. Nous avons ensuite confirmé la spécificité de cette interaction, ainsi que le fait qu'elle soit directe, par GST Pull Down.

a. Présentation de *PfSERA5* (Serine Repeat Antigen 5)

Les SERA sont une famille de protéases, les unes à Cystéine et les autres à Sérine, selon l'acide aminé qui se trouve dans le site catalytique et qui est responsable de l'activité protéase de l'enzyme. L'on dénombre 9 protéines SERA chez *P. falciparum* et 5 chez *P. berghei*. Les gènes encodant ces SERA sont pour la plupart situés les uns à côté des autres sur le même chromosome. Ainsi, chez *P. falciparum*, 8 SERA sont encodées par des gènes situés sur le chromosome 2. Seul le gène encodant *PfSERA9* se trouve sur le chromosome 9 (Figure 63 – (S. K. Miller et al. 2002; Arisue et al. 2011)).



Arisue et al., PlosOne, 2011

Figure 63 : Représentation des différents loci encodant des protéines SERA chez plusieurs espèces de *Plasmodium*. Les lignes en pointillés indiquent des relations d'orthologie. Les loci colorés en bleu encodent des protéases à Sérine et les loci colorés en vert des protéases à Cystéine. Image tirée de Arisue et al. 2011.

Chez *P. falciparum*, les SERA sont exprimées à partir de 16 à 32 heures après invasion des érythrocytes, et *PfSERA4* et *PfSERA5* sont adressées à la vacuole parasitophore (S. K. Miller et al. 2002). *PfSERA5* est la protéine la plus abondante de la vacuole parasitophore. Elle est exprimée sous la forme d'une protéine d'environ 120 kDa qui est ensuite activée par trois étapes de protéolyse impliquant les protéases SUB1 et Protéase X (Figure 64). Après l'action de ces deux protéases, l'extrémité C-ter de *PfSERA5* est séparée en trois entités : la protéine P50 qui comprend le domaine catalytique et un domaine de régulation, les protéines P18 et P6. Il est à noter que des peptides issus de la P6 inhibent l'activité de la protéase, induisant un retard du développement du parasite (Kanodia et al. 2014). La partie N-ter de la protéine, qui contient les répétitions de Sérine auxquelles la famille des SERA doit son nom, est quant à elle protéolysée en deux protéines d'environ 25 kDa chacune (Li et al. 2002; Palacpac et al. 2011). Ces deux protéines font partie d'un complexe protéique avec *Pfs38*, qui reconnaît la glycophorine A, une protéine transmembranaire des érythrocytes dont le domaine extracellulaire est fortement glycosylé. Le complexe *Pfs38* est également composé de protéines comportant un domaine de 6 Cystéines (*Pfs12* et *Pfs41*) et de la *PfMSP1* (Merozoite Surface Protein 1) et est impliqué dans la liaison des mérozoïtes aux érythrocytes (Paul et al. 2017). Au contraire, les protéines issues de la protéolyse de la région C-ter de *PfSERA5* ne se fixent pas à la surface des mérozoïtes mais se répandent dans la circulation sanguine en même temps que les

mérozoïtes et le contenu des globules rouges (Figure 64 – (Palacpac et al. 2011)). Le potentiel d'activité protéase de *PfSERA5* a longtemps été controversé, principalement parce que des peptides substrats différents ont été utilisés dans les études d'activité (Kanodia et al. 2014; Stallmach et al. 2015). Il a récemment été démontré que *PfCDPK1*, qui est localisée dans la vacuole parasitophore au stade schizonte, phosphoryle *PfSERA5_P50* sur 7 sites différents, ce qui active la protéase. L'inhibition de *PfCDPK1* à l'aide d'un inhibiteur spécifique, la Purfalcamine, empêche l'activation de *PfSERA5* et inhibe la sortie des mérozoïtes de l'érythrocyte de manière dose-dépendante (Iyer et al. 2018).

Malgré les rôles variés joués par les différentes protéines issues de la protéolyse de *PfSERA5*, une étude récente a montré, au moyen d'un système de KDi, qu'elle est importante mais non essentielle pour le développement des stades sanguins de *P. falciparum* (C. R. Collins et al. 2017). En effet, en son absence, les phénomènes de rupture de la membrane de la vacuole parasitophore se déroulent comme chez les parasites WT, mais la membrane de l'érythrocyte se rompt plus tôt. Les mérozoïtes ainsi libérés de la membrane de l'érythrocyte ne sont cependant pas correctement séparés les uns des autres, ce qui impacte leur capacité à envahir de nouveaux érythrocytes. Cela a pour effet de réduire la parasitémie des cultures de parasites $\Delta PfSERA5$ de près de moitié. En revanche, le phénotype observé est amélioré si les cultures sont mises sous agitation. Collins et al. en ont donc conclu que *PfSERA5* retarde la rupture de la membrane de l'érythrocyte infecté, permettant de contrôler la sortie des mérozoïtes de l'érythrocyte infecté (C. R. Collins et al. 2017). Enfin, plusieurs études ont démontré que des anticorps dirigés contre la région P47 de *PfSERA5* inhibent l'invasion des érythrocytes (Pang and Horii 1998; Pang, Mitamura, and Horii 1999; Horii et al. 2010). Par ailleurs, les adultes vivant dans des régions où le paludisme est endémique expriment des anticorps dirigés contre *PfMSP1* et *PfSERA5*, alors que les enfants vivant dans ces mêmes régions ne produisent des anticorps que contre *PfMSP1* (Horii et al. 2010). Un vaccin avec SE36, protéine issue de P47 après excision de la région riche en Sérines, est donc en cours d'étude clinique pour induire l'expression d'anticorps contre *PfSERA5* chez les enfants vivant en zone d'endémie (Palacpac et al. 2013; Yagi et al. 2014, 2016; Draper et al. 2018).

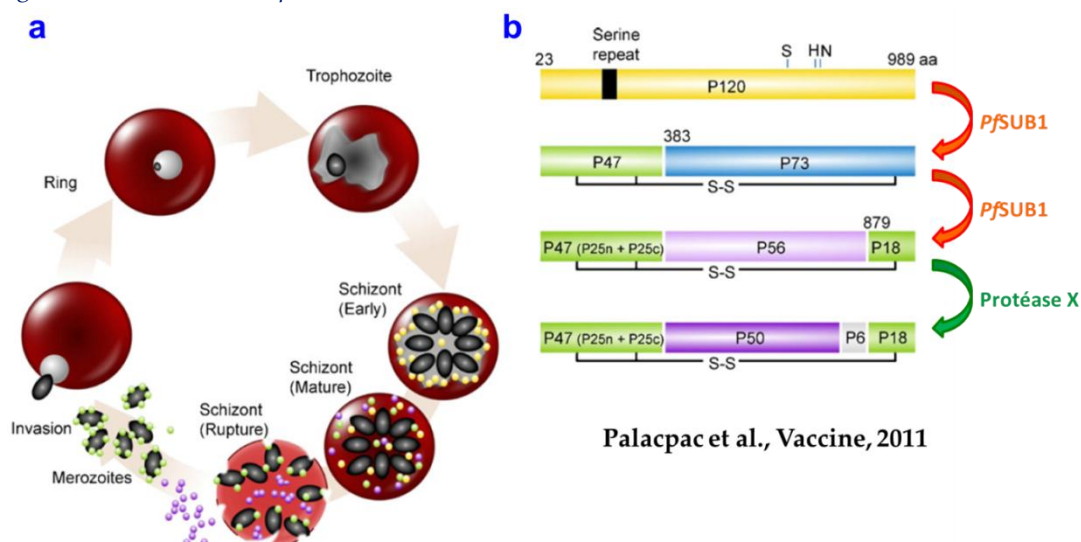


Figure 64 : Protéolyse de *PfSERA5* et localisation des différentes régions issues de cette protéolyse. Image adaptée de Palacpac et al. 2011

b. Discussion et perspectives autour de l'interaction SAM/PfSERA5

Nous avons démontré que l'interaction entre le domaine SAM de *PfpTKL* et *PfSERA5* était forte, directe et spécifique. Par ailleurs, la région minimum d'interaction avec *PfSERA5* est située entre les AA 216 et 253 de la protéase, donc dans la région P25c issue de la protéolyse de la région N-ter.

Nous n'avons pas retrouvé de protéines SERA dans notre étude de l'interactome de *PbpTKL*-AID-HA. Il y a plusieurs explications à cela :

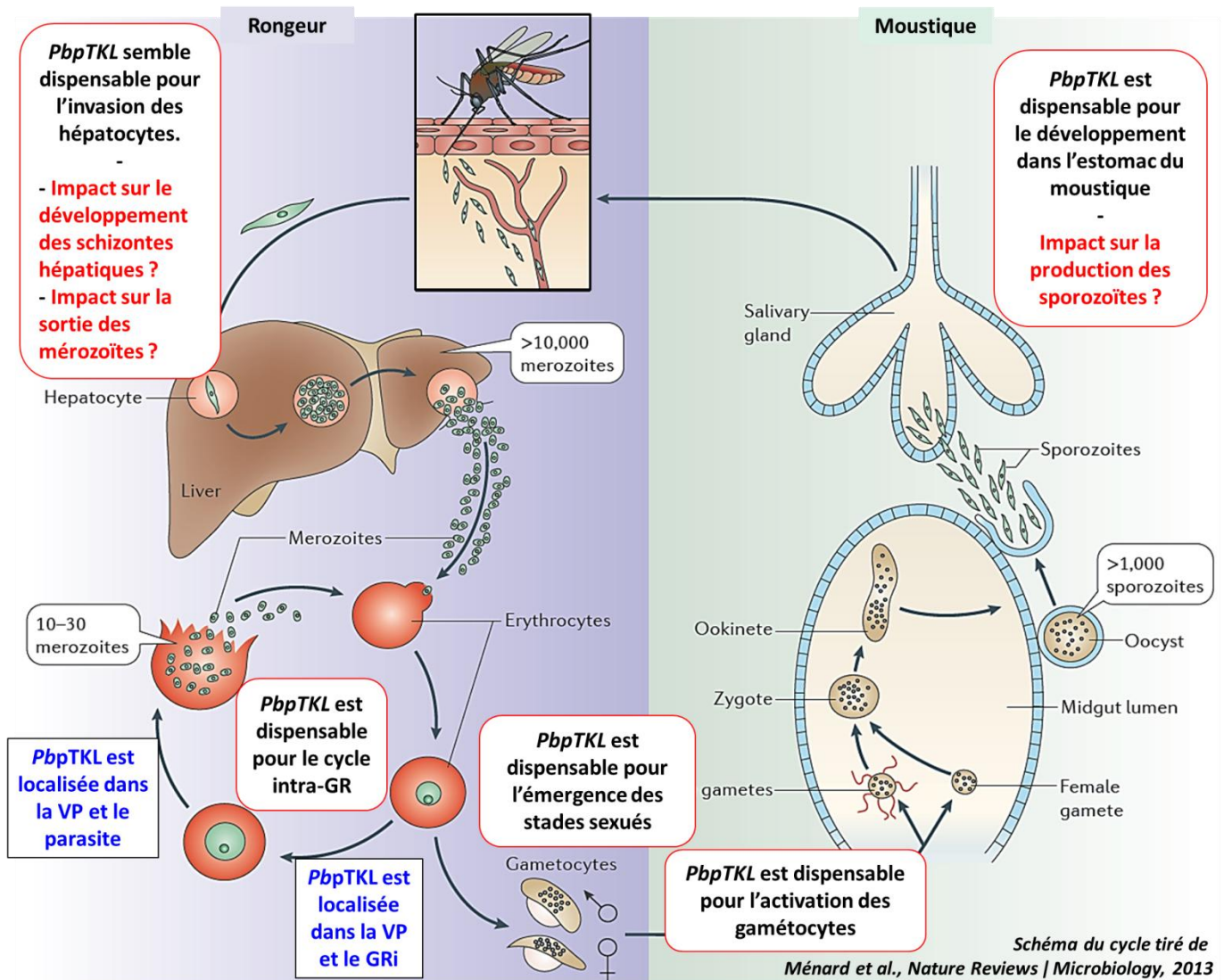
- ◆ Tout d'abord, *PfSERA5* n'a pas d'orthologue chez *P. berghei*, i.e. *PbSERA5* n'est pas l'orthologue de *PfSERA5* (Figure 63). Le rôle de quelques-unes des 5 SERA de *P. berghei* a été étudié par génétique inverse. Ainsi, *PbSERA5* (aussi appelée ECP1 pour Egress Cystein Protease 1) est nécessaire à la sortie des sporozoïtes des oocystes dans l'estomac du moustique (Aly and Matuschewski 2005). Par ailleurs, les SERA 1 et 2 de *P. berghei* ont été étudiées tout le long du cycle de vie du parasite. Cependant, bien qu'elles soient exprimées aux stades hépatiques les plus avancés ainsi qu'aux stades sanguins, elles ne semblent jouer de rôle essentiel à aucun moment du cycle de vie du parasite. Par ailleurs, effectuer un double KO de *PbSERA1* et *PbSERA2* (qui encodent deux protéases à Sérine) engendre une surexpression de *PbSERA3* (qui est une protéase à Cystéine) au stade schizonte (sanguin). Cela indique donc potentiellement que les différentes SERA se suppléent les unes aux autres (Putrianti et al. 2010). Lorsque la région minimum d'interaction SAM/*PfSERA5* est blastée sur le protéome de *P. berghei*, trois hits sont retournés (mais les scores d'alignement sont mauvais, $E > 2$) : PBANKA_1224400 (ferlin-like), *PbMSP1* et *PbSERA1*, qui est une protéase à Sérine comme *PfSERA5* (Figure 63).
- ◆ La deuxième explication est que, les protéines SERA étant généralement impliquées dans les phénomènes de sortie du parasite de sa cellule hôte à différents stades de développement, elles sont exprimées aux stades où le parasite en a besoin, i.e. les schizontes aux stades sanguins et hépatiques et les oocystes dans l'estomac du moustique. Au vu du niveau d'expression de *PbpTKL* au stade schizonte et des difficultés que nous avons rencontrées avec l'analyse de l'interactome par IP/MS au stade schizonte, il nous aurait été difficile d'identifier des partenaires de *PbpTKL* avec fiabilité.

Enfin, il est intéressant de prendre en compte les informations issues des études réalisées sur *PfSERA5*. Ainsi, en 2017, Collins et al. ont rapporté le fait qu'ils n'avaient pas réussi à effectuer d'étude d'interaction de *PfSERA5* avec des partenaires potentiels, ni même à caractériser son interactome par IP/MS au stade schizonte. Ils suggèrent alors que *PfSERA5* ne met en place que des interactions transitoires avec ses partenaires putatifs (C. R. Collins et al. 2017). Plus récemment, Iyer et al. ont effectué une étude de l'analyse de l'interactome de *PfSERA5* au stade schizonte (en ajoutant une étape de cross-linking afin de résoudre le problème soulevé par Collins et al.). Cela leur a permis de démontrer que *PfSERA5* interagit avec plusieurs kinases, dont *PfCDPK1*. *PfpTKL* ne faisait pas partie de la liste des partenaires de *PfSERA5* ainsi identifiés (Iyer et al. 2018). Avec la réserve que nous ne connaissons ni le niveau d'expression ni la localisation de *PfpTKL* au stade schizonte, les difficultés rapportées par d'autres doivent être prises en compte afin d'orienter l'étude de l'interaction *PfpTKL*/*PfSERA5* chez le parasite.

Afin d'approfondir les données disponibles sur le domaine SAM de pTKL, il pourrait être judicieux de :

- ◆ Rechercher les acides aminés de SAM, d'une part, et de PfSERA5 d'autre part, qui sont impliqués dans l'interaction directe et spécifique que nous avons démontrée au cours de ce projet de recherche. Cela faciliterait la recherche *in silico* de motifs d'interaction similaires dans les protéomes de *P. falciparum* et de *P. berghei*. Afin d'y parvenir, la méthode de cartographie des régions d'interaction par RMN qui a été évoquée plus haut avec les motifs RVxF serait adaptée, étant donné que les rendements de production, et surtout de purification, de PfSERA5-6His et de PfpTKL_SAM-GST sont bien meilleurs qu'avec les domaines kinase. Une fois les AA impliqués dans l'interaction identifiés, ils pourraient être validés par mutagenèse dirigée.
- ◆ Produire le domaine SAM de PbpTKL sous forme de protéine recombinante stabilisée par la GST. Après avoir fixé cette protéine sur billes de glutathion, l'on pourrait l'incuber en présence d'extraits de vacuole parasitophore et parasites de *P. berghei*, effectuer un cross-linking, puis analyser les protéines qui se seraient fixées par spectrométrie de masse. Cela permettrait peut-être de détecter une protéine de la famille des SERA, voire d'identifier d'autres partenaires protéiques potentiels. Nous pourrions procéder de même chez *P. falciparum*, d'autant plus que nous disposons d'anticorps anti-PfSERA5 qui nous permettraient de détecter PfSERA5 par WB plutôt que d'utiliser la spectrométrie de masse moins sensible et plus coûteuse.
- ◆ Les domaines SAM sont versatiles et peuvent être impliqués dans des interactions très variées (C. A. Kim and Bowie 2003). Le domaine SAM de la PfTKL3, qui est le seul domaine SAM à avoir été caractérisé chez *Plasmodium* en-dehors de celui de la pTKL, est capable de s'homodimériser (A. Abdi et al. 2010). Il pourrait être intéressant de vérifier si le domaine SAM de la pTKL est capable de faire de même, et, le cas échéant, si les surfaces impliquées dans cette interaction sont ou non distinctes de celle impliquée dans l'interaction SAM/PfSERA5. Pour cela, au vu de la nature hydrophobe du domaine SAM de PfpTKL, il serait nécessaire, pour le stabiliser, de l'exprimer fusionné à une étiquette Maltose Binding Protein. Puis, l'on pourrait, par GST Pull Down, examiner la capacité de SAM-GST à interagir avec SAM-MBP. Des études de compétition entre les domaines SAM étiquetés différemment et PfSERA5-6His pourraient ensuite être envisagées, afin d'approcher la manière dont le domaine SAM de la pTKL s'engage dans des interactions destinées à générer des dimérisations de la pTKL ou plutôt la formation de complexes protéiques. Cela pourrait peut-être donner quelques indices quant au retard instauré par l'expression de PfSERA5 dans les phénomènes de rupture de la membrane de l'érythrocyte infecté au stade schizonte.
- ◆ Enfin, et cela a déjà été évoqué plus haut, le potentiel de régulation de l'activité kinase de la pTKL par son domaine SAM pourrait être exploré en parallèle des rôles des deux lobes N-ter de la pTKL.
- ◆ Plus largement, il est intéressant de noter qu'il n'y a que 4 domaines SAM chez *Plasmodium* et qu'ils se trouvent tous dans des kinases (PfTKL1, PfTKL3, PfpTKL, PF3D7_0926000) qui comportent toutes également des motifs MORN en N-ter (A. Abdi et al. 2010). Il pourrait être intéressant de caractériser puis de comparer la localisation, l'interactome et le rôle de ces protéines afin d'approcher la fonction des domaines SAM et leur combinaison avec d'autres domaines et motifs.

III. Résumé graphique des résultats collectés *in vivo* (uniquement chez *P. berghei*)



IV. Étude de *PfpTKL*

Au cours de ce projet de thèse, nous avons été confrontés à des problèmes principalement d'ordre technique en raison desquels nous n'avons pas pu générer de souches de *P. falciparum* transgéniques. Cependant, les efforts d'optimisation fournis ces deux dernières années ont permis de résoudre les problèmes de transfection. Cela permet ainsi d'établir quelques perspectives de travail pour effectuer l'étude de la localisation et du rôle de *PfpTKL*.

1. Étude de la localisation de *PfpTKL*

Pour étudier la localisation de *PfpTKL*, nous avons opté pour le pCAM-HA. Quand bien même nous avons réussi à obtenir des parasites où l'intégration de la construction avait bien eu lieu, nous avons ensuite rencontré des problèmes de clonage par dilution limite. Afin de surmonter ces différents problèmes, nous pourrions utiliser d'autres dispositifs de KI, dont certains sont disponibles depuis peu au laboratoire :

- ♦ **Le pCAM-BSD-GFP** permettrait d'effectuer un KI-GFP. Bien qu'en termes de levée de l'antibiotique de sélection, et donc de sélection des intégrants, ce système ne présente pas de différence avec le pCAM-BSD-HA, le fait d'étiqueter la protéine à l'aide de la GFP permettrait d'obtenir des parasites fluorescents qu'il serait possible de trier, ce qui faciliterait grandement l'étape de clonage. Néanmoins, au vu de l'expérience que nous avons eue avec le pCAM-BSD-HA, minimum 3 à 4 mois seraient nécessaires avant que les parasites ayant intégré la construction ne soient détectables au FACS.
- ♦ **L'utilisation du système SLI** (Selection Linked Integration) constituerait une alternative intéressante. Le plasmide pSLI-TGD que nous avons utilisé pour générer des parasites où le gène *PfpTKL* est interrompu par une cassette de résistance pourrait être de nouveau utilisé, cette fois en y clonant l'extrémité 3' du gène afin de faire un KI-GFP (Figure 65). Les parasites ayant intégré la construction pourraient ensuite être sélectionnés à l'aide de Néomycine (Birnbbaum *et al.* 2017).

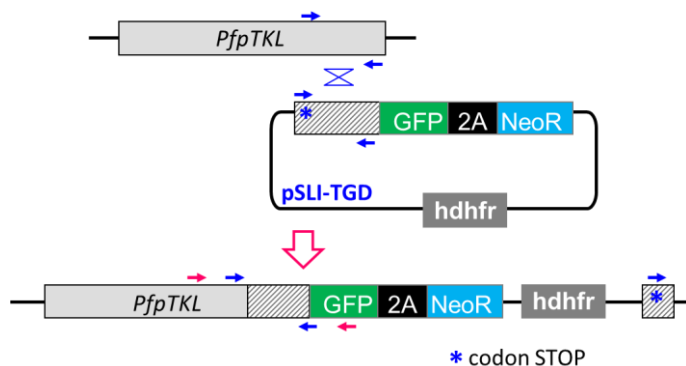


Figure 65 : Présentation du système de SLI-KI-GFP à l'aide du plasmide initialement prévu pour faire du SLI-TGD. Les flèches bleues indiquent les amorces de clonage et les flèches roses les amorces à utiliser pour vérifier l'intégration de la construction au locus d'intérêt.

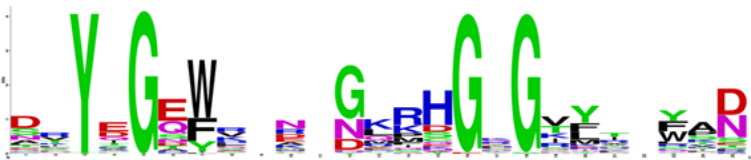
Ces deux approches de KI devraient nous permettre d'en apprendre plus sur la localisation de *PfpTKL* tout le long du cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum* ; nous pourrions alors la comparer avec celle de *PbpTKL*. De plus, étant donné que nous disposons d'un antisérum dirigé contre *PfSERA5* en IFA, nous pourrions également effectuer des études de co-localisation au stade schizonte.

2. Étude des motifs MORN de *PfpTKL*

Les motifs MORN ont été découverts chez les Junctophilines de plantes. Ces protéines forment des complexes reliant le réticulum endoplasmique à la membrane plasmique, et leurs répétitions de motifs MORN leur permet d'interagir avec la membrane du réticulum endoplasmique (*Takeshima et al. 2000*). Ces motifs ont également été retrouvés chez les PIPK (Phosphatidylinositol monophosphate protein kinase) de plantes, dont ils régulent la localisation subcellulaire, notamment leur association à la membrane plasmique, et leur activité (*Ma et al. 2006*). Les motifs MORN sont également retrouvés chez les apicomplexes. La protéine MORN1 est constituée de 14-15 motifs MORN. Elle est particulièrement bien conservée chez tous les apicomplexes, et son rôle dans leur division cellulaire a été bien caractérisé (*Gubbels et al. 2006; Ferguson et al. 2008; Lorestani et al. 2010, 2012; Kono et al. 2016*). L'expression de différentes portions de TgMORN1 étiquetées GFP dans des parasites *T. gondii* WT a permis de montrer que le nombre de motifs MORN et la présence et la palmitoylation d'un linker situé entre les motifs MORN 6 et 7 de la protéine jouent un rôle important dans sa localisation subcellulaire ainsi que, potentiellement, dans son rôle de protéine plateforme (« scaffold ») (*Lorestani et al. 2010*).

Les motifs MORN n'ont donc pas été étudiés en-dehors de la protéine MORN1 chez différents apicomplexes. L'étude de leur implication dans l'adressage d'une protéine dans différents compartiments de la cellule infectée, ainsi que dans sa capacité à interagir avec d'autres protéines, mériterait pourtant d'être approfondie afin d'étayer les données disponibles actuellement sur les phénomènes de trafic intracellulaire chez *Plasmodium*, notamment pour les protéines ne comportant ni peptide signal ni domaine transmembranaire comme *PfpTKL* (*K. M. Matthews, Pitman, and de Koning-Ward 2019*). Cette dernière comporte deux motifs MORN, le premier comportant la signature YxGx₁₀GxG présentée en Figure 66a, contrairement au second. Certains serveurs prédisent un site de N-myristoylation au sein de ce deuxième motif MORN (Figure 66b).

a



b

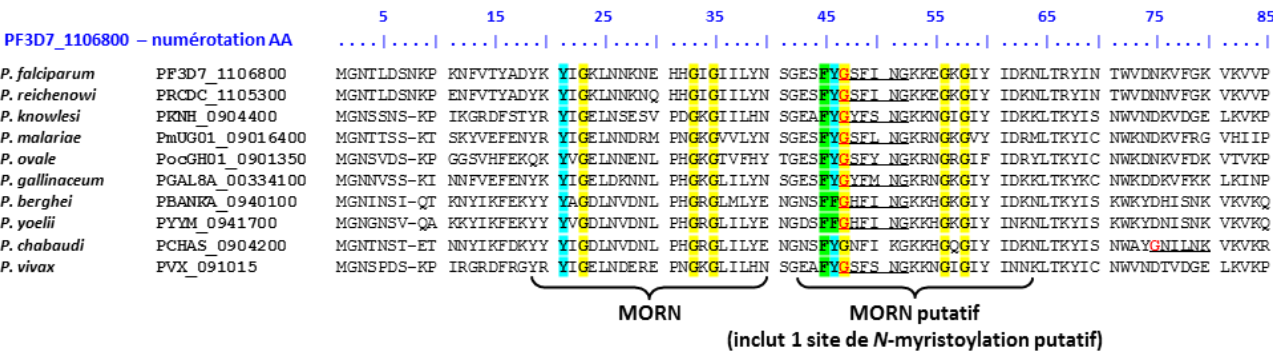


Figure 66 : Présentation des motifs MORN de la pTKL de plusieurs espèces de *Plasmodium*. a) Signature des motifs MORN obtenue à l'aide WebLogo à partir d'un alignement consensus disponible sur la base de données SMART b) Position et délimitation des deux motifs MORN de la pTKL de *Plasmodium*.

Pour étudier le rôle des motifs MORN de *PfpTKL* dans la localisation subcellulaire de la protéine, nous avons envisagé d'utiliser le pARL-2-GFP, qui permet l'expression épisomale de la GFP. Outre les problèmes de transfection que nous avons rencontrés, nous ne sommes pas parvenus à détecter de signal GFP chez les parasites que nous avons transfectés avec le construit issu du clonage du début du gène *PfpTKL*, incluant les deux motifs MORN de *PfpTKL*, en amont de la séquence encodant la GFP. Pourtant, après extraction d'ADN, nous avons démontré la présence de l'épisome et sa séquence a été validée par séquençage. Nous n'avons donc pas d'explication au fait que nous n'avons détecté aucun signal.

Selon les résultats de localisation de la protéine entière (i.e. si elle est exportée, associée à des membranes, etc.) le plus simple serait sans doute de recommencer la transfection et d'en effectuer d'autres en parallèle avec les constructions suivantes :

- ◆ Le début du gène encodant les 20 premiers acides aminés de la protéine afin de vérifier l'absence de peptide signal dans cette région de la protéine (i.e. le début de *PfpTKL* fusionné à la GFP sera localisé dans le cytoplasme du parasite s'il ne contient pas de peptide signal),
- ◆ MORN1 seul en pARL-2-GFP,
- ◆ MORN2 seul en pARL-2-GFP (entier, portion du motif débutant par la Glycine prédite pour être *N*-myristoylée – puisque cette Glycine doit être le premier AA en *N*-ter pour être *N*-myristoylée (Doerig et al. 2015) – et comportant une mutation de la Glycine prédite pour être *N*-myristoylée en Méthionine, par exemple).

Après transfection et sélection des parasites à l'aide de la WR, ils pourraient être analysés par génotypage puis examinés au microscope à fluorescence. Si les génotypages valident la présence de la construction, des IFA anti-GFP pourraient être effectuées et analysées par microscopie confocale afin de maximiser la détection de signaux potentiellement faibles. En fonction des résultats de localisation ainsi obtenus, des combinaisons des motifs MORN, voire l'ajout successif des autres domaines de *PfpTKL*, pourraient être effectués afin d'évaluer leur rôle dans la localisation de la protéine.

3. Étude du rôle de *PfpTKL* dans le développement du parasite

Au cours de ce projet de thèse, nous avons tenté d'utiliser le pCAM-BSD et le pSLI-TGD afin d'interrompre *PfpTKL* au moyen d'une cassette de résistance. Dans le premier cas, nous n'avons jamais réussi à obtenir de parasites et dans le second cas, nous avons réussi à sélectionner des parasites résistants à la Néomycine (indiquant à priori l'intégration de la construction). Néanmoins, les trois réplicats techniques issus de la transfection suite à laquelle nous avons obtenu des parasites viables ont été perdus, et nous n'avons pas réussi à en obtenir d'autres. Il est donc nécessaire de refaire la transfection à l'aide du construit en pSLI-TGD disponible, de les sélectionner à la WR puis à la Néomycine et de les analyser par génotypage afin de vérifier l'intégration de la construction. Nous pourrions ensuite envisager d'effectuer des analyses phénotypiques en comparant les parasites TGD pour *PfpTKL* avec des parasites WT (suivi de parasitémie, examen des différents stades, suivi de la stabilité de l'intégration par génotypage, etc.).

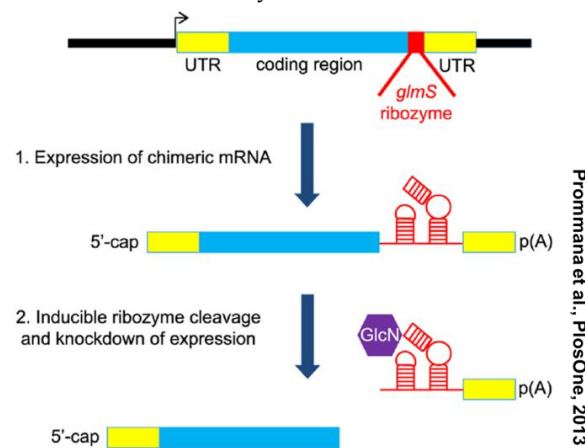
Le fait que nous ayons obtenu des parasites TGD pour *PfpTKL* (à priori) sans difficulté concorde avec les données de Zhang et al. qui ont pu insérer 13 transposons PiggyBac dans le gène et ses environs, indiquant que *PfpTKL* est probablement dispensable pour la complétion du cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum* (M. Zhang et al. 2018). Le fait que nous n'ayons en revanche pas pu obtenir de parasites

résistants à la BSD avec le pCAM-BSD est plus difficile à expliquer, mais cela s'est déjà produit plusieurs fois dans la communauté scientifique qui travaille à caractériser les gènes de *Plasmodium* (i.e. des gènes ont été annoncés comme étant essentiels car aucun parasite n'avait pu être obtenu après transfection avec le pCAM-BSD, puis l'utilisation de systèmes différents, notamment des knockdown inductibles, sont venus contredire les données collectées à l'aide du pCAM-BSD).

Afin cependant d'étayer les données disponibles sur l'essentialité de *PfpTKL*, ainsi que le rôle de ses différents domaines, il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres systèmes de KO ou de KDi :

- ♦ **Le système KDi employant le ribozyme *glmS*** (glucosamine-6-phosphate riboswitch) a été mis au point et publié par Prommana et al. (Prommana et al. 2013). Il consiste à effectuer un KI du gène d'intérêt afin de rajouter, entre la fin du gène et la région 3'UTR, une séquence encodant pour le ribozyme *glmS*. Ce dernier sera transcrit en même temps que le gène d'intérêt. En présence de glucosamine, le ribozyme est activé et clive l'ARNm auquel il est lié, le destinant à être dégradé (Figure 67). Bien que les auteurs de cette publication aient mis la spécificité de leur système en avant, Birnbaum et al. ont récemment signalé que la glucosamine est toxique pour *Plasmodium* et que son dosage doit être fait avec soin afin d'éviter de déclarer un gène essentiel alors que la mort des parasites est due à un problème de préparation du milieu de culture (Birnbaum et al. 2017). Quoi qu'il en soit, l'intérêt de ce système est double : étant donné qu'il s'agit d'un KI, il est possible de rajouter une étiquette HA ou GFP en amont du ribozyme afin d'étudier l'expression et la localisation de la protéine d'intérêt avant d'induire le KD. De plus, la présence de cette étiquette faciliterait la confirmation de l'absence de l'expression de la protéine une fois que les parasites auraient été mis en présence de glucosamine. Afin de perfectionner encore ce système et de faciliter la sélection des parasites ayant intégré la construction, l'on pourrait envisager de rajouter une cassette SLI (i.e. étiquette HA ou GFP – linker 2A – cassette de résistance à la Néomycine) entre l'extrémité 3' du gène et la séquence encodant le ribozyme.

Figure 67 :
Présentation du
système *glmS*



- ♦ **Le système KDi Crelox** peut également être envisagé. Pour qu'il fonctionne, il est nécessaire d'effectuer les transfections dans une souche de *P. falciparum* exprimant la recombinase Dicre. Cette dernière est exprimée sous la forme de deux entités : Cre60 fusionnée à FRB, une protéine capable de lier la rapamycine, et Cre59 fusionnée à FKBP, elle aussi capable de lier la rapamycine. Ainsi, en présence de rapamycine, les protéines FRB et FKBP interagissent ensemble, permettant à Cre59 et Cre60 de former la recombinase active Dicre. Cette dernière est alors capable d'exciser

des régions d'ADN flanquées des fragments *loxP* (C. R. Collins *et al.* 2013). Un système de flanquement basé sur l'utilisation d'introns synthétiques silencieux contenant un fragment *loxP* (appelés *loxPint*) a récemment été mis au point et pourrait permettre d'exciser des domaines entiers sans impacter l'expression de la protéine entière en l'absence de rapamycine (Figure 68 – (M. L. Jones *et al.* 2016)).

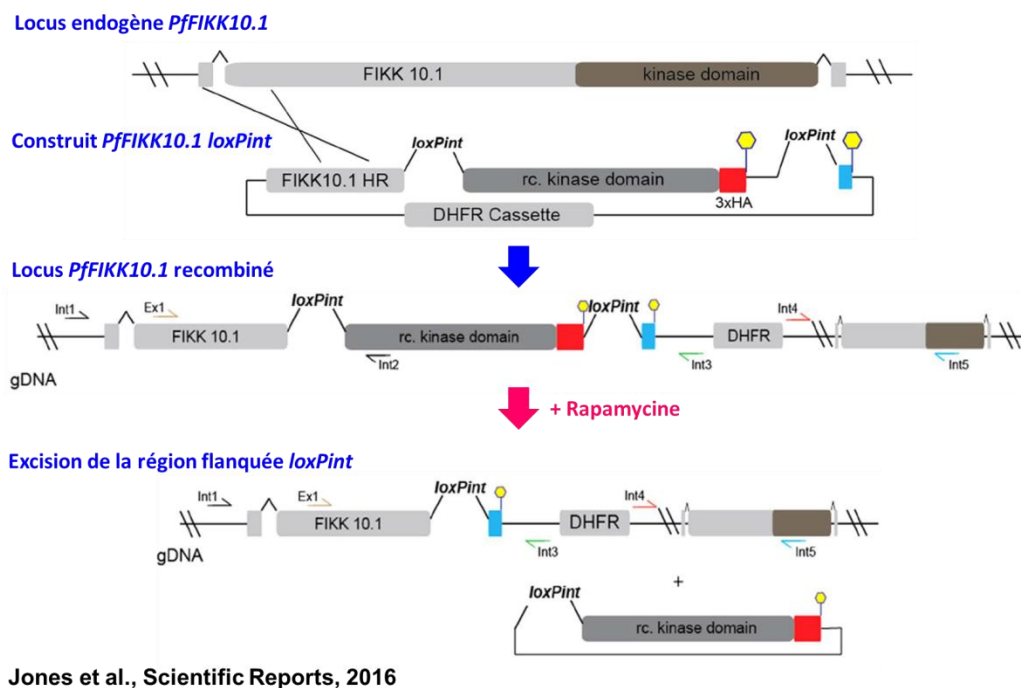


Figure 68 : Présentation du système *loxPint* avec le domaine kinase de la FIKK 10.1. L'extrémité 5' du gène *PfFIKK10.1* est clonée dans le plasmide qui sera transfecté par la suite et permet l'intégration dudit construit par simple recombinaison homologue. La région à flanquer *loxPint* est synthétisée (cela est nécessaire pour éviter que des événements de recombinaison n'aient lieu dans cette région du gène, ce qui compromettrait le flanquement de la région d'intérêt) et est appelée 'rc. kinase domain'. Après sélection de clones de parasites ayant intégré le construit décrit précédemment, il est possible d'activer la recombinaise Dicre par incubation en Rapamycine. La recombinaise excise alors la région 'floxée'.

Dans le cas de *PfpTKL*, l'on pourrait imaginer différentes stratégies d'étude des domaines de la protéine :

- ◆ Placer un *loxPint* en amont du pseudo-domaine kinase (ou en amont du domaine BTK-like) et un autre en 3' du gène, de manière à l'exciser et à étudier le rôle du pseudo-domaine kinase au cours du cycle intra-érythrocytaire du parasite. Ce système pourrait par ailleurs permettre de disséquer le rôle de différents motifs de *PfpTKL*. En effet, la synthèse d'un gène synthétique étant nécessaire pour la région à flanquer de fragments *loxP* (Figure 68), l'on pourrait générer des mutations dans le pseudo-domaine kinase afin de comprendre le rôle des différents motifs de cette région dans le développement du parasite (N1272D, afin de voir si la restauration de l'Aspartate dans le site catalytique du domaine kinase impacte la croissance du parasite, inactivation du motif RVxF2, domaine kinase composé de la région BTK-like et du lobe C-ter du pseudo-domaine kinase, etc.).

- ◆ Placer un *loxPint* en amont et en aval du domaine SAM afin de l'exciser pour étudier son rôle au cours du développement du parasite.
- ◆ Envisager, de manière plus large, l'étude du rôle des domaines SAM chez *P. falciparum*. En effet, ainsi que cela a été évoqué plus haut, ils ne sont qu'au nombre de 4 chez *Plasmodium* et sont présents uniquement chez des kinases comportant également des motifs MORN. Afin de compléter l'étude *in vitro* de ces domaines qui a été évoquée dans les perspectives ci-dessus, la stratégie de l'excision de chacun des 4 domaines SAM pourrait être envisagée à l'aide du système *Crelox*.
- ◆ **Le CRISPR/Cas9** (Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)/(CRISPR associated protein 9) vise à guider une endonucléase (Cas9) vers un site précis. Pour ce faire, il est nécessaire de déclencher l'expression d'un ARN guide (ARNg) qui reconnaît le site à éditer et qui comporte un motif de liaison à la Cas9. Le site à éditer est quant à lui composé d'une région d'une vingtaine de nucléotides, qui sera reconnue par l'ARN guide, en amont d'un motif PAM (Protospacer Adjacent Motif), dont la séquence est du type : 5'-nGG-3'. La Cas9 guidée par l'ARNg effectuera une coupure 3 paires de bases en amont du motif PAM (*Wagner et al. 2014*). Différents plasmides ont été créés pour favoriser l'expression de tous les éléments nécessaires au fonctionnement de ce système : l'ARN T7 Polymérase qui permettra l'expression de l'ARN guide, la séquence d'ADN encodant l'ARN guide, la Cas9 et la ou les région(s) homologue(s) qui permettront d'insérer des fragments d'ADN au niveau du locus du gène d'intérêt. La force de ce système, en théorie, est qu'elle permet de cibler précisément le site que l'on souhaite modifier. L'induction d'une coupure sur les deux brins de l'ADN favorise également les événements de recombinaison. Cependant, en pratique sur *P. falciparum*, l'obtention de parasites résistants aux antibiotiques de sélection prend jusqu'à 4 à 6 semaines, ce qui n'est pas différent d'une transfection sans CRISPR/Cas9 (*J. Lu et al. 2016*). Par ailleurs, nous n'avons pas encore réussi à faire fonctionner ce système au laboratoire. Néanmoins, lorsque nous aurons trouvé le moyen de faire fonctionner ce système, nous pourrions envisager de :
 - ◆ L'utiliser afin de réaliser un vrai KO de *PfpTKL* ; en effet, en clonant des régions homologues avec les régions 5' et 3' UTR du gène autour d'une cassette de résistance et en induisant une coupure au sein du locus endogène de *PfpTKL*, nous pourrions favoriser le remplacement du gène par une cassette de résistance (*Ghorbal et al. 2014*). Cela nous permettrait de valider les résultats obtenus avec les systèmes de KDi cités ci-dessus, ainsi que les données de Zhang et al. (*M. Zhang et al. 2018*).
 - ◆ L'utiliser afin d'insérer des mutations à un site précis du gène, comme cela a été décrit par Ghorbal et al. (*Ghorbal et al. 2014*). Nous pourrions ainsi envisager de muter l'Asparagine 1272 du site catalytique en Aspartate, afin d'étudier son impact sur le développement du parasite. Une stratégie similaire pourrait être envisagée pour muter le motif RVxF2, le site de N-myristoylation en N-ter de la *PfpTKL*, etc. afin de compléter les différentes études listées dans les perspectives ci-dessus. De plus, l'utilisation du CRISPR/Cas9 serait moins onéreuse que le *Crelox* qui requiert l'utilisation d'un gène de synthèse.
 - ◆ Enfin, au vu de la précision théorique du CRISPR/Cas9, il pourrait être utilisé en renfort des systèmes de recombinaison homologue afin de favoriser les événements de recombinaison et, donc, l'obtention de parasites ayant intégré les constructions souhaitées.

V. Étude de *PbpTKL*

1. *PbpTKL* est exportée dans la cellule-hôte au stade trophozoïte

Au cours de ce projet de recherche, nous avons montré par IFA et fractionnement cellulaire que *PbpTKL* est exportée dans l'érythrocyte infecté au stade trophozoïte, puis qu'elle est détectée uniquement dans la VP et dans le cytoplasme du parasite au stade schizonte.

Après avoir infecté un érythrocyte, *Plasmodium* y exporte plusieurs protéines (l'on estime que 10% de son protéome est exporté dans la cellule hôte (De Koning-Ward et al. 2016)) dans le but de le remodeler de façon à ce qu'il supporte son développement. Certaines protéines sont exportées à la surface de l'érythrocyte et jouent un rôle dans sa cytoadhérence, d'autres interagissent avec son cytosquelette afin de rigidifier la cellule, d'autres encore modulent la perméabilité de l'érythrocyte et facilitent l'entrée de nutriments et la sortie de déchets et, enfin, certaines protéines parasitaires sont exportées hors de la cellule infectée dans la circulation sanguine (Desai 2014; Spillman, Beck, and Goldberg 2015). Les processus d'export des protéines de *Plasmodium* sont de mieux en mieux compris, bien qu'il reste encore des zones d'ombre. C'est notamment le cas concernant les motifs ou domaines responsables de discriminer les protéines à exporter des autres. Ainsi, actuellement, l'on sait que (K. M. Matthews, Pitman, and de Koning-Ward 2019) :

- ◆ Certaines protéines comportent un motif PEXEL (RXLxE/Q/D) en N-ter qui les destine à être exportées. Le motif PEXEL est clivé dans le réticulum endoplasmique et la nouvelle extrémité N-ter de la protéine est acétylée, avant d'être envoyée dans la VP.
- ◆ Il a été démontré que chez certaines protéines, la présence d'un domaine transmembranaire est nécessaire et suffisante pour permettre leur envoi dans la VP avant export.
- ◆ Enfin, les mécanismes d'export des protéines ne comportant ni PEXEL (qui sont qualifiées de PNEPs – PEXEL-negative Exported Proteins) ni domaine transmembranaire sont moins compris à l'heure actuelle.

La *pTKL* ne comporte ni motif PEXEL ni domaine transmembranaire. Il s'agit donc d'une PNEP. Ainsi que nous l'avons souligné plus haut, il serait intéressant d'étudier le rôle des motifs MORN de *pTKL* dans son export. Nous avons démontré au cours de ce projet de thèse que *PbpTKL* est exportée dans la cellule hôte au stade trophozoïte et qu'elle est localisée dans le cytoplasme de l'érythrocyte infecté et dans la VP. Ensuite, au stade schizonte, elle est localisée dans la VP et dans le cytoplasme des parasites. Ce type de localisation est relativement rare, les protéines exportées décrites à l'heure actuelle étant généralement localisées dans des vésicules ou structures mises en place par le parasite au sein de sa cellule hôte, comme les sillons de Maurer qui sont des modifications de la surface des érythrocytes induites par le parasite (Mundwiler-Pachlatko and Beck 2013). Par ailleurs, le fait que *PbpTKL* n'ait pas été détectée dans le cytosol de l'érythrocyte au stade schizonte peut être dû à différents paramètres :

- ◆ Le niveau d'expression de *PbpTKL* est faible au stade schizonte et l'analyse par fractionnement n'a permis de détecter la protéine que dans les compartiments où elle est la plus abondante. Par ailleurs, la VP croît au fur et à mesure du développement intra-érythrocytaire du parasite et occupe un volume important de l'érythrocyte lorsque le parasite est au stade schizonte. Néanmoins, sans un anticorps fonctionnel en IFA et capable de marquer la MVP et, il n'est pas possible de visualiser cette membrane et, donc, de délimiter la taille de la VP dans l'érythrocyte.

Refaire les IFA présentées dans ce manuscrit avec un anticorps marquant la MVP nous permettrait de confirmer les données que nous avons collectées par fractionnement cellulaire.

- ◆ Ensuite, et cela reste à démontrer, notamment chez *P. berghei*, le fait que le domaine SAM de *PfpTKL* soit capable d'interagir avec *PfSERA5*, qui est la protéine la plus abondante de la VP chez *P. falciparum*, permet d'établir une hypothèse : cette interaction pourrait retenir la pTKL dans la VP au stade schizonte. Examiner la localisation de *PfpTKL*, notamment sa potentielle co-localisation avec *PfSERA5* dans la VP au stade schizonte, et son interaction avec *PfSERA5* *in vivo* pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse. Si l'hypothèse évoquée ci-avant s'avérait ainsi être plausible, cela étayerait les données disponibles sur le rôle de *PfSERA5* et *PfpTKL* au stade schizonte ; pTKL serait-elle retenue dans la VP parce que sa présence dans le cytosol de l'érythrocyte n'est plus importante pour le parasite ?

Par ailleurs, le fait que nous ayons retrouvé *PbpTKL* dans la fraction des ghosts (membrane de l'érythrocyte et cytosquelette) suite au fractionnement cellulaire est quelque peu étrange car cela n'est pas vraiment en corrélation avec les résultats de l'immunofluorescence qui montrent que *PbpTKL* est localisée dans tout le cytoplasme de l'érythrocyte et non à sa membrane plasmique. Néanmoins, le fait que *PbpTKL* présente des répétitions internes riches en acides aminés basiques et chargés, surtout dans les régions reliant les différents domaines structurés, est à considérer. En effet, ce type de région augmente la propension de la protéine à former des agrégats, impactant sa solubilité et l'amenant peut-être à précipiter au cours du protocole d'extraction (*H. M. Davies et al. 2017*).

L'interactome de *PbpTKL* a pu être caractérisé au stade trophozoïte, i.e. au moment où la pseudo-kinase est exportée dans la cellule hôte ([Tableau 14](#), [Annexe X](#)). En-dehors d'une Tryptophan-rich protein homologue d'une protéine exportée à la membrane de l'érythrocyte chez *P. yoelii* et d'une protéine de la vacuole parasitophore (PVP5), aucune des protéines de *P. berghei* identifiées n'étaient pertinentes, du moins à notre connaissance. Par ailleurs, 20 protéines de la cellule hôte ont été identifiées comme étant capables d'interagir, directement ou indirectement, avec *PbpTKL* :

- ◆ Six protéines capables d'interagir avec le cytosquelette d'actine de l'érythrocyte et de participer à son organisation. Cela est intéressant, car le cytosquelette de l'érythrocyte est en modulation constante pour permettre à la cellule de changer constamment de forme, notamment pour s'adapter au diamètre de chacun des vaisseaux sanguins au sein desquels elle circule (*Lodish et al. 2000*). Il pourrait être intéressant d'examiner la rigidité des globules rouges infectés par des parasites KO, versus des parasites WT et des érythrocytes sains, pour voir si *PbpTKL* est impliquée dans sa modulation au stade trophozoïte. La mesure du module de cisaillement (indicateur de l'élasticité) de l'érythrocyte, par aspiration à l'aide d'une micropipette pourrait fournir quelques informations à ce sujet (*Nunes et al. 2010*).
- ◆ Sept protéines impliquées dans des MPTs, notamment par ubiquitination ou par protéolyse (Méthionine aminopeptidase, composants du protéasome). Ces protéines sont importantes pour la maturation du réticulocyte en érythrocyte mature, car cette maturation requiert la simplification du protéome de l'érythroïde. L'érythrocyte mature sera composé à plus de 98% d'hémoglobine (*Alessandro, Righetti, and Zolla 2010*). La présence de deux protéines ribosomales murines dans les résultats de l'interactome de *PbpTKL* s'explique de la même manière, car les ribosomes marquent la différenciation

des réticulocytes. Ils sont massivement ubiquitinylés en vue de la simplification du protéome pendant la transition réticulocyte/érythrocyte mature (Nguyen *et al.* 2017). La présence de ces protéines s'explique entre autres par le fait que les souris infectées pour réaliser l'étude de l'interactome de *PbpTKL* ont été traitées à la phénylhydrazine pour stimuler la réticulocytémie, *P. berghei* infectant préférentiellement les réticulocytes. Il serait intéressant, si *PfpTK* est exportée de la même manière que son homologue, d'effectuer une étude d'interactome similaire chez *P. falciparum*, qui est cultivé en érythrocytes matures, afin de voir si les interactomes des protéines diffèrent selon le niveau de maturité de la cellule hôte. Par ailleurs, la capacité de *PbpTKL* à interagir avec un complexe impliqué dans la protéolyse est peut-être un moyen pour le parasite de moduler cette protéolyse afin de récupérer les acides aminés qui en résultent pour son développement. À moins que *PbpTKL* ne soit protéolysée, ce qui expliquerait pourquoi elle n'est plus détectée dans la fraction des ghosts au stade schizonte.

- ◆ Trois protéines (Cysteine-rich protein 1, Optineurin, AP2 complex subunit alpha) sont potentiellement impliquées dans des processus de transport intracellulaire, à priori d'ions et de vésicules. Il a été démontré que *Plasmodium* module les flux d'ions de sa cellule hôte, bien que les mécanismes de cette régulation soient loin d'être compris (Kirk and Lehane 2014). Par ailleurs, les érythrocytes sécrètent des vésicules diverses qui seraient impliquées dans les communications intercellulaires (Colombo, Raposo, and Théry 2014). Il a également été démontré que des vésicules produites par les érythrocytes infectés peuvent être internalisées par des cellules de l'endothélium des vaisseaux sanguins, potentiellement pour stimuler la production de leurs protéines de surface et faciliter la cytoadhérence des érythrocytes infectés. *Plasmodium* détourne ainsi à son avantage les dispositifs de communication de l'érythrocyte (Rivkin, Ben-Hur, and Regev-Rudzki 2017; Sampaio, Cheng, and Eriksson 2017). *PbpTKL* pourrait être impliquée dans ces processus, en interférant avec des interactions protéine-protéine de l'hôte, par exemple. Il pourrait être intéressant d'étudier l'exportome d'érythrocytes infectés avec des parasites WT versus KO pour *PbpTKL*, afin de valider ou non le rôle de *PbpTKL* dans cette communication intercellulaire.

- ◆ Enfin, deux protéines impliquées dans la gestion du stress oxydatif (glutathion-S-transférase, thioredoxin-dependent peroxide reductase) ont également été identifiées dans l'interactome de *PbpTKL*. Ces enzymes sont particulièrement importantes pour l'homéostasie de l'érythrocyte qui, du fait de sa fonction, est sujet à un stress oxydatif intense (Alessandro, Righetti, and Zolla 2010). Par ailleurs, il a récemment été démontré qu'une baisse du niveau de S-glutathionylation du cytosquelette des érythrocytes réduit également leur déformabilité (Diederich *et al.* 2018). Nous rejoignons donc les deux premiers points : il pourrait être intéressant de mesurer la déformabilité d'érythrocytes infectés par des parasites *P. berghei* ou *P. falciparum* WT versus KO pour *PbpTKL* ou *PfpTKL* respectivement, afin de voir si l'hypothèse reliant l'export de pTKL à la rigidité de l'érythrocyte est ou non valide.

Ainsi, *PbpTKL* est capable d'interagir avec des protéines de l'hôte impliquées dans des processus variés. Afin de clarifier son rôle, il pourrait être intéressant de déterminer avec quelles protéines elle interagit directement. Cela pourrait permettre de savoir si ce sont préférentiellement des enzymes dont elle pourrait réguler l'activité, ou des protéines qu'elle lie parce qu'elle rentre en compétition avec leurs partenaires. Néanmoins, étant donné que nous ne disposons pas de la protéine pTKL entière purifiée, nous pourrions, soit envisager de la produire dans son intégralité dans des cellules d'insecte (par exemple), soit effectuer des Pull downs avec les domaines SAM et pseudo-kinase dont nous disposons déjà.

2. Étude du rôle de *PbpTKL* pour le développement de *P. berghei*

Au cours de ce projet de thèse, nous avons utilisé des approches variées pour étudier l'essentialité de *PbpTKL* pour le développement de *P. berghei*. Après obtention de parasites rendus KO pour *PbpTKL* au moyen du pBS-DHFR, nous ne sommes pas parvenus à les cloner et avons préféré nous tourner vers les constructions issues du projet PlasmoGEM (*Bushell et al. 2017*). Grâce aux grandes régions homologues présentes dans le construit PbGEM-342364, le clonage des parasites a été plus simple. En revanche, l'examen des parasites clonés (pGEM) par génotypage et RT-PCR a indiqué que, malgré l'intégration correcte de la construction et, donc, la présence du promoteur fort de la cassette de résistance opposé au promoteur endogène de *PbpTKL*, la fin du gène *PbpTKL* était toujours transcrite. L'antisérum de souris dirigé contre le pseudo-domaine kinase de *PfpTKL* ne fonctionnant pas sur des extraits parasitaires, nous n'avons pas les moyens de vérifier la présence ou l'absence de l'expression de la région C-ter de *PbpTKL* chez les parasites pGEM clonés. Quoi qu'il en soit, l'expression de *PbpTKL* est désorganisée chez les parasites pGEM :

- ◆ Les domaines MORN situés en N-ter de la protéine sont exprimés sous l'action du promoteur de *PbpTKL*, puisque la région délétée commence juste en aval des domaines MORN et qu'elle comporte un codon STOP à son extrémité 3', dans le sens de lecture de *PbpTKL*.
- ◆ Le domaine SAM se trouvant dans la région délétée, il n'est plus exprimé chez les parasites pGEM.
- ◆ En ce qui concerne le pseudo-domaine kinase, s'il est exprimé au niveau protéique, étant donné qu'il est séparé du reste de la protéine (et notamment des domaines MORN qui jouent peut-être un rôle dans la localisation de la protéine), il n'est probablement plus exporté et s'accumule dans le cytoplasme du parasite.

En complément de cette approche, nous avons utilisé le système conditionnel AID (Auxin-Induced Degradation) publié par Philip et al. (*Philip and Waters 2015*). Ce dernier nous a permis de collecter quelques informations *in vitro* sur le déroulement du cycle intra-érythrocytaire et l'exflagellation des gamétocytes mâles après induction de la dégradation de *PbpTKL* en présence d'auxine.

Les informations que nous avons collectées avec les parasites pGEM et ceux KI-AID-HA pour *PbpTKL* indiquent que *PbpTKL* est dispensable pour la complétion du cycle intra-érythrocytaire, l'expression des gamétocytes et l'activation des gamétocytes mâles. Nous avons ensuite pu effectuer une première analyse phénotypique des parasites pGEM chez le moustique et dans les stades hépatiques en collaboration avec le Dr Olivier Silvie, CIMI, Paris. Ces analyses ont montré que *PbpTKL* est probablement dispensable pour le développement du parasite dans l'estomac du moustique. Une réduction (division par 10) du nombre de sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique a été constatée chez les parasites pGEM comparés à des parasites *PbGFP* WT. Par la suite, les sporozoïtes pGEM ont été étudiés. Si leur développement *in vitro*, i.e. leur capacité à infecter des hépatocytes et à s'y développer, semblait « normal » (communication avec le Dr Silvie), l'injection de 1000 sporozoïtes en IV à des souris n'a déclenché d'infection que chez une souris sur cinq. Ces expériences doivent être répétées avec les parasites issus du passage chez le moustique et un clone pGEM indépendant afin de confirmer ou non les phénotypes notés ici au niveau de la production des sporozoïtes et de leur capacité à générer des infections *in vivo*.

Ces différentes données peuvent être rapprochées de celles du [Malaria Cell Atlas](#). Un projet de séquençage de l'ARN sur cellule unique (single cell RNA sequencing) est en cours et permet de collecter des informations sur le transcriptome de *P. berghei*, *P. falciparum* et *P. knowlesi* tout le long de leur cycle de vie. Cela permet de quantifier puis de cartographier l'expression de chacun des gènes de ces parasites au niveau transcriptomique (Reid et al. 2018). Les données qui ont été collectées pour *PbpTKL* sont résumées sur la Figure 69.

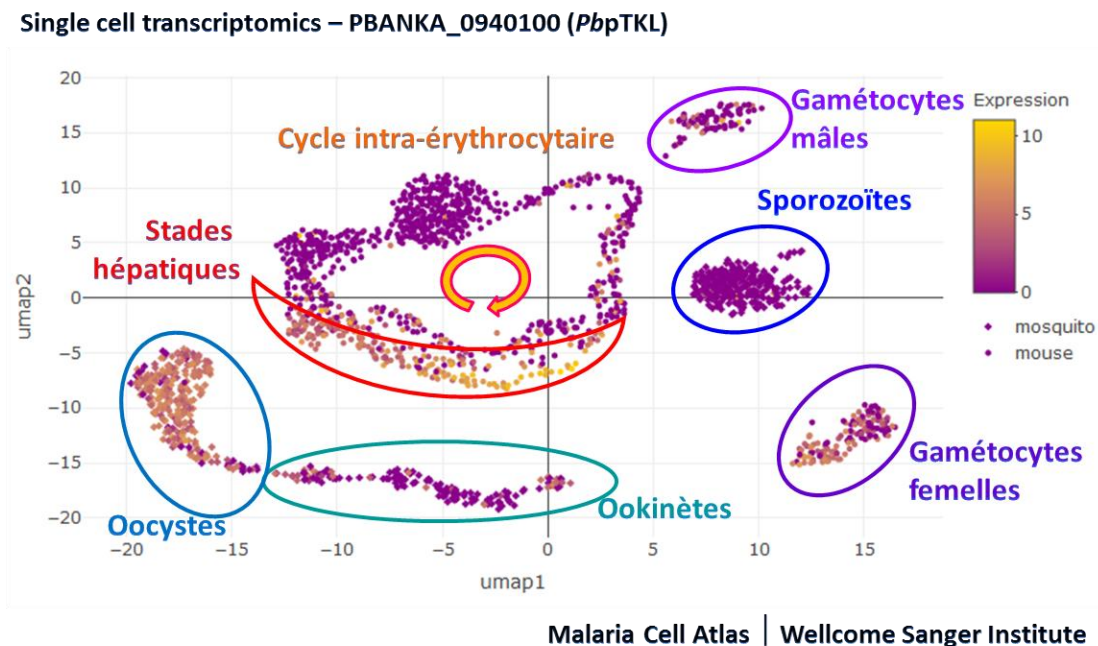


Figure 69 : Données de Single Cell RNA sequencing obtenues pour *PbpTKL* (PBANKA_0940100)

De manière intéressante, ces données indiquent que *PbpTKL* est légèrement transcrit au cours du cycle intra-érythrocytaire, puis de manière plus importante chez les gamétocytes femelles, puis chez les oocystes et, enfin, à son maximum aux stades hépatiques. Sachant qu'il peut y avoir un décalage entre le moment où un gène est transcrit et celui où la protéine est effectivement exprimée (phénomène de « juste-à-temps » (J. Wang et al. 2016)), ces données de transcriptomique sont relativement en corrélation avec celles qui ont été collectées au cours de l'analyse phénotypique de *PbpTKL*. En effet, désorganiser l'expression d'un gène fortement exprimé au stade oocyste peut impacter le développement des sporozoïtes qu'il contient, ce qui pourrait expliquer la diminution de leur nombre dans les glandes salivaires. Ensuite, l'expression de *PbpTKL* étant à son paroxysme depuis les oocystes jusqu'aux stades hépatiques, il est logique que le phénotype le plus sévère soit observé dans les sporozoïtes et les stades hépatiques. Reste maintenant à comprendre quel est exactement ce phénotype et, donc, le rôle de *PbpTKL* aux stades oocyste, sporozoïte et hépatique.

Pour ce faire, voici les différentes souches qui pourraient être étudiées :

- ◆ Effectuer de nouveau le KO de *PbpTKL* à l'aide du pBS-DHFR, cette fois en *PbGFP*, afin de disposer d'un véritable KO dont l'analyse phénotypique pourra être effectuée en parallèle de la souche pGEM à tous les stades de développement du parasite (ce qui n'est pas le cas avec la souche *PbpG230*). De plus, le fait d'avoir une souche exprimant la GFP pourra faciliter son

clonage, puisqu'elle pourra être triée ; au vu, cependant, des problèmes de clonage évoqués précédemment, il sera judicieux d'injecter différentes quantités de parasites par souris, voire de procéder en plusieurs injections pour favoriser la sélection des parasites ayant intégré la construction. Cela dit, sans insectarium, le nombre de passages de souris à souris devra être limité au maximum afin d'éviter que la souche ne dérive (*Janse, Ramesar, and Waters 2004*).

- ◆ Cloner la souche *PbpG402* transfectée à l'aide du construit en pG362 permettant le KI AID-HA de *PbpTKL*. Cela permettra de l'utiliser en tant que KI et système conditionnel afin d'étudier l'expression et la localisation de *PbpTKL* au cours de son développement chez le moustique ainsi qu'au niveau des hépatocytes. De plus, l'incubation des sporozoïtes et des hépatocytes en auxine étant possible *in vitro* (ce qui ne sera judicieux qu'après avoir confirmé l'expression de la protéine à ces stades et sa dégradation en présence d'auxine), il sera possible d'étudier l'impact de la dégradation de *PbpTKL* à toutes les étapes de l'infection et du développement des sporozoïtes puis des stades hépatiques et, enfin, des mérosomes (*Philip and Waters 2015; Kaiser et al. 2017*).
- ◆ L'utilisation du système Crelox a été démontrée récemment chez *P. berghei*, sous la forme d'un système inductible, *in vitro* et *in vivo*, de surexpression d'un gène d'intérêt (en remplaçant son promoteur endogène par le promoteur fort de la Hsp70, dont l'activation est déclenchée en présence de rapamycine) (*Kent et al. 2018*). Ce système pourrait présenter un intérêt pour induire la surexpression de *PbpTKL* notamment au cours du cycle intra-érythrocytaire. Cela permettrait peut-être de comprendre pourquoi *PbpTKL* est exprimée à ce moment du cycle de vie du parasite, et surtout pourquoi si faiblement en comparaison de son niveau d'expression aux stades hépatiques (*Figure 69*). L'impact de cette surexpression de *PbpTKL* sur son export et sur l'érythrocyte serait sûrement instructif. Le système Crelox pourrait par ailleurs être utilisé de la même manière qu'évoqué plus haut chez *P. falciparum*, avec les *loxPint*, pour étudier la raison pour laquelle *Plasmodium* exprime cette pseudo-kinase. Le pseudo-domaine kinase pourrait ainsi être remplacé par un domaine kinase fonctionnel (sur la base de la séquence du lobe N-ter de type BTK-like et du lobe C-ter comportant la mutation N1272D par exemple).

Une fois que les différentes souches évoquées ci-dessus auront été obtenues, les expériences suivantes pourront être envisagées :

- ◆ Étude de l'expression et de la localisation de *PbpTKL* à tous les stades de développement chez le moustique, aux sporozoïtes et aux stades hépatiques. L'on pourra comparer ces données à celles de transcriptomique présentées en *Figure 69* et, surtout, s'en servir pour orienter l'analyse phénotypique de *PbpTKL* à ces différents stades. Il sera par ailleurs intéressant d'étudier l'interactome de *PbpTKL* aux stades où la protéine semble jouer un rôle essentiel.
- ◆ Étude du rôle de *PbpTKL* au cours du développement des oocystes et des sporozoïtes, si le phénotype de la baisse du nombre de sporozoïte est confirmé avec les souches pGEM et KO étudiées en parallèle. Pour cette étude, nous pourrions nous inspirer du travail d'Aly & Matuschewski pour examiner la viabilité et la motilité des sporozoïtes contenus dans les oocystes, ainsi que la résistance de la membrane des oocystes à des détergents (indiquant un potentiel frein à la sortie des sporozoïtes des oocystes), à l'aide d'approches microscopiques (*Aly and Matuschewski 2005*).

- ♦ Étude du rôle de *PbpTKL* chez les sporozoïtes et/ou au cours des stades hépatiques, selon les niveaux d'expression de la protéine dans chacun de ces stades et si le phénotype d'absence d'infection des érythrocytes chez la souris post-injection de sporozoïtes KO pour *PbpTKL* est confirmé. Il sera par ailleurs nécessaire d'évaluer la charge parasitaire dans le foie des souris qui auront été injectées avec des sporozoïtes pGEM ou KO 2 jours auparavant, la phase hépatique durant environ 2 jours chez *P. berghei*. Cela pourrait se faire par qRT-PCR après avoir prélevé l'intégralité du foie (communication avec le Dr O. Silvie). Cela indiquerait si les sporozoïtes KO et pGEM sont capables d'atteindre le foie, et si oui, si leur taux de réplication (schizogonie hépatique) est comparable ou plus faible que celui de sporozoïtes WT. En fonction des résultats de cette estimation de la charge parasitaire au niveau hépatique, nous nous concentrerions sur les sporozoïtes (i.e. leur motilité, leur capacité à traverser plusieurs hépatocytes avant de s'établir dans l'un d'eux, ainsi que cela a été détaillé par Ishino et al., par exemple (*Ishino et al. 2004*)) ou les stades hépatiques (développement dans les hépatocytes, capacité à former *in vitro* des mérosomes contenant des mérozoïtes viables comme décrit par Kaiser et al. (*Kaiser et al. 2017*)). L'étude de son interactome, voire des souches où une kinase active est exprimée en lieu et place de pTKL, au(x) stade(s) où elle semble être importante permettrait peut-être de comprendre pourquoi *Plasmodium* exprime cette pseudokinase.

Bien que pTKL ne semble pas jouer de rôle clé pour le développement de *Plasmodium* au cours de son cycle intra-érythrocytaire, comme beaucoup d'autres protéines exprimées et exportées à ce moment du cycle de vie du parasite (*Bushell et al. 2017*), elle apparaît importante pour les sporozoïtes et/ou la phase hépatique. Cela est d'autant plus intéressant qu'aux stades sanguins, elle semble impliquée dans les relations hôte/pathogène. Il est donc primordial d'étudier si elle tient un rôle similaire aux stades oocystes à hépatiques, auxquels seule une poignée de protéines sont connues pour être exportées vers la cellule hôte (*De Koning-Ward et al. 2016*). Sa fonction à ces étapes du cycle de vie de *Plasmodium* mérite ainsi d'être approfondie, et notamment les raisons pour lesquelles une pseudokinase, plutôt qu'une kinase active, tient un rôle à première vue aussi important à ce moment du cycle de vie de *Plasmodium*.

Références

- Abdi, Abdirahman, Sylvain Eschenlauer, Luc Reininger, and Christian Doerig. 2010. "SAM Domain-Dependent Activity of PfTKL3, an Essential Tyrosine Kinase-like Kinase of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (19): 3355–69. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0434-3>.
- Abdi, Abdirahman I., Teresa Gil Carvalho, Jonathan M. Wilkes, and Christian Doerig. 2013. "A Secreted *Plasmodium Falciparum* Kinase Reveals a Signature Motif for Classification of Tyrosine Kinase-like Kinases." *Microbiology (United Kingdom)* 159 (PART 12): 2533–47. <https://doi.org/10.1099/mic.0.070409-0>.
- Absalon, Sabrina, Jonathan A. Robbins, and Jeffrey D. Dvorin. 2016. "An Essential Malaria Protein Defines the Architecture of Blood-Stage and Transmission-Stage Parasites." *Nature Communications* 7: 11449. <https://doi.org/10.1038/ncomms11449>.
- Adams, John H., and Ivo Mueller. 2017. "The Biology of *Plasmodium Vivax*." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7 (9): 1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025585>.
- Adl, Sina M., Alastair G Simpson, Christopher E Lane, Julius Lukeš, David Bass, Samuel S Bowser, Matt Brown, et al. 2012. "The Revised Classification of Eukaryotes." *J Eukaryot Microbiol* 59 (5): 429–93. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>.
- Aikawa, M., L. H. Miller, J. Johnson, and J. Rabbege. 1978. "Erythrocyte Entry by Malarial Parasites." *Journal of Cell Biology* 77 (1): 72–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.77.1.72>.
- Alessandro, Angelo D, Pier Giorgio Righetti, and Lello Zolla. 2010. "The Red Blood Cell Proteome and Interactome : An Update." *Journal of Proteome Research* 9: 144–63. <https://doi.org/10.1021/pr900831f>.
- Alexander, David L., Shirin Arastu-Kapur, Jean Francois Dubremetz, and John C. Boothroyd. 2006. "*Plasmodium Falciparum* AMA1 Binds a Rhoptry Neck Protein Homologous to TgRON4, a Component of the Moving Junction in *Toxoplasma Gondii*." *Eukaryotic Cell* 5 (7): 1169–73. <https://doi.org/10.1128/EC.00040-06>.
- Alexander, David L., Jeffrey Mital, Gary E. Ward, Peter Bradley, and John C. Boothroyd. 2005. "Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma Gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles." *PLoS Pathogens* 1 (2): 0137–49. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017>.
- Aly, Ahmed S.I., and Kai Matuschewski. 2005. "A Malarial Cysteine Protease Is Necessary for *Plasmodium* Sporozoite Egress from Oocysts." *The Journal of Experimental Medicine* 202 (2): 225–30. <https://doi.org/10.1084/jem.20050545>.
- Amir, Amirah, Fei Wen Cheong, Jeremy R. De Silva, and Yee Ling Lau. 2018. "Diagnostic Tools in Childhood Malaria." *Parasites and Vectors* 11 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2617-y>.
- Ammosova, Tatiana, Maxim Platonov, Venkat R.K. Yedavalli, Yuri Obukhov, Victor R. Gordeuk, Kuan Teh Jeang, Dmytro Kovalskyy, and Sergei Nekhai. 2012. "Small Molecules Targeted to a Non-Catalytic 'RVxF' Binding Site of Protein Phosphatase-1 Inhibit HIV-1." *PLoS ONE* 7 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039481>.
- Anamika, N. Srinivasan, and A. Krupa. 2005. "A Genomic Perspective of Protein Kinases in *Plasmodium Falciparum*." *Proteins: Structure, Function and Genetics* 58 (1): 180–89. <https://doi.org/10.1002/prot.20278>.
- Anderluh, Gregor, Jože Pungerčar, Borut Štrukelj, Peter Maček, and Franc Gubenšek. 1996. "Cloning, Sequencing, and Expression of Equinatoxin II." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220 (2): 437–42. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0391>.

- Antony, Hiasindh Ashmi, and Subhash Chandra Parija. 2016. "Antimalarial Drug Resistance: An Overview." *Tropical Parasitology* 6 (1): 30. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.175081>.
- Araki, T., L. H. Vu, N. Sasaki, T. Kawata, L. Eichinger, and J. G. Williams. 2014. "Two Dictyostelium Tyrosine Kinase-like Kinases Function in Parallel, Stress-Induced STAT Activation Pathways." *Molecular Biology of the Cell* 25 (20): 3222–33. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1182>.
- Arisue, Nobuko, Satoru Kawai, Makoto Hirai, Nirianne M. Q. Palacpac, Mozhi Jia, Akira Kaneko, Kazuyuki Tanabe, and Toshihiro Horii. 2011. "Clues to Evolution of the SERA Multigene Family in 18 Plasmodium Species." Edited by Gordon Langsley. *PLoS ONE* 6 (3): e17775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017775>.
- Atkinson, Sarah C., Jennifer S. Armistead, Derrick K. Mathias, Maurice M. Sandeu, Dingyin Tao, Nahid Borhani-Dizaji, Brian B. Tarimo, Isabelle Morlais, Rhoel R. Dinglasan, and Natalie A. Borg. 2015. "Structural Analysis of Anopheles Midgut Aminopeptidase N Reveals a Novel Malaria Transmission-Blocking Vaccine B-Cell Epitope." *Nat Struct Mol Biol* 22 (7): 532–39. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3048>.
- Aurrecoechea, Cristina, John Brestelli, Brian P. Brunk, Jennifer Dommer, Steve Fischer, Bindu Gajria, Xin Gao, et al. 2009. "PlasmoDB: A Functional Genomic Database for Malaria Parasites." *Nucleic Acids Research* 37 (SUPPL. 1): 539–43. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn814>.
- Aviv, Tzvi, Zhen Lin, Stefanie Lau, Laura M. Rendl, Frank Sicheri, and Craig A. Smibert. 2003. "The RNA-Binding SAM Domain of Smaug Defines a New Family of Post-Transcriptional Regulators." *Nature Structural Biology* 10 (8): 614–21. <https://doi.org/10.1038/nsb956>.
- Balaich, Jared N., Derrick K. Mathias, Baldwyn Torto, Bryan T. Jackson, Dingyin Tao, Babak Ebrahimi, Brian B. Tarimo, Xavier Cheseto, Woodbridge A. Foster, and Rhoel R. Dinglasan. 2016. "The Nonartemisinin Sesquiterpene Lactones Parthenin and Parthenolide Block Plasmodium Falciparum Sexual Stage Transmission." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (4): 2108–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02002-15>.
- Balaji, S., M. Madan Babu, Lakshminarayan M. Iyer, and L. Aravind. 2005. "Discovery of the Principal Specific Transcription Factors of Apicomplexa and Their Implication for the Evolution of the AP2-Integrase DNA Binding Domains." *Nucleic Acids Research* 33 (13): 3994–4006. <https://doi.org/10.1093/nar/gki709>.
- Bannister, Lawrence, and Graham Mitchell. 2003. "The Ins, Outs and Roundabouts of Malaria." *Trends in Parasitology* 19 (5): 209–13. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00086-2).
- Barber, Bridget E., Matthew J. Grigg, Timothy William, Kim A. Piera, Michelle J. Boyle, Tsin W. Yeo, and Nicholas M. Anstey. 2017. "Effects of Aging on Parasite Biomass, Inflammation, Endothelial Activation, Microvascular Dysfunction and Disease Severity in Plasmodium Knowlesi and Plasmodium Falciparum Malaria." *Journal of Infectious Diseases* 215 (12): 1908–17. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix193>.
- Barber, Bridget E., Giri S. Rajahram, Matthew J. Grigg, Timothy William, and Nicholas M. Anstey. 2017. "World Malaria Report: Time to Acknowledge Plasmodium Knowlesi Malaria." *Malaria Journal* 16. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1787-y>.
- Barrera, Francisco N., José A. Poveda, José M. González-Ros, and José L. Neira. 2003. "Binding of the C-Terminal Sterile α Motif (SAM) Domain of Human P73 to Lipid Membranes." *Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 46878–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307846200>.
- Baum, Jake, Anthony T. Papenfuss, Gunnar R. Mair, Chris J. Janse, Dina Vlachou, Andrew P. Waters, Alan

- F. Cowman, Brendan S. Crabb, and Tania F. De Koning-Ward. 2009. "Molecular Genetics and Comparative Genomics Reveal RNAi Is Not Functional in Malaria Parasites." *Nucleic Acids Research* 37 (11): 3788–98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp239>.
- Bechtsi, D.P. P., and Andrew P. Waters. 2017. "Genomics and Epigenetics of Sexual Commitment in Plasmodium." *International Journal for Parasitology* 47 (7): 425–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.03.002>.
- Behnke, Michael S., Asis Khan, Elvin J. Lauron, John R. Jimah, Qiuling Wang, Niraj H. Tolia, and L. David Sibley. 2015. "Rhoptry Proteins ROP5 and ROP18 Are Major Murine Virulence Factors in Genetically Divergent South American Strains of Toxoplasma Gondii." *PLoS Genetics* 11 (8): 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005434>.
- Benelli, Giovanni, and John C. Beier. 2017. "Current Vector Control Challenges in the Fight against Malaria." *Acta Tropica* 174 (June): 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.028>.
- Bennink, Sandra, Meike J. Kiesow, and Gabriele Pradel. 2016. "The Development of Malaria Parasites in the Mosquito Midgut." *Cellular Microbiology* 18 (7): 905–18. <https://doi.org/10.1111/cmi.12604>.
- Bernabeu, M., F. J. Lopez, M. Ferrer, L. Martin-Jaular, A. Razaname, G. Corradin, A. G. Maier, H. A. del Portillo, and C. Fernandez-Becerra. 2012. "Functional Analysis of Plasmodium Vivax VIR Proteins Reveals Different Subcellular Localizations and Cytoadherence to the ICAM-1 Endothelial Receptor." *Cellular Microbiology* 14 (3): 386–400. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01726.x>.
- Besteiro, Sébastien, Jean François Dubremetz, and Maryse Lebrun. 2011. "The Moving Junction of Apicomplexan Parasites: A Key Structure for Invasion." *Cellular Microbiology* 13 (6): 797–805. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x>.
- Bhattacharyya, Mrinal K., Zheng Hong, Darin Kongkasuriyachai, and Nirbhay Kumar. 2002. "Plasmodium Falciparum Protein Phosphatase Type 1 Functionally Complements a Glc7 Mutant in Saccharomyces Cerevisiae." *International Journal for Parasitology* 32 (6): 739–47. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00007-3).
- Birget, Philip L.G., Megan A. Greischar, Sarah E. Reece, and Nicole Mideo. 2018. "Altered Life History Strategies Protect Malaria Parasites against Drugs." *Evolutionary Applications* 11 (4): 442–55. <https://doi.org/10.1111/eva.12516>.
- Birnbaum, Jakob, Sven Flemming, Nick Reichard, Alexandra Blancke Soares, Paolo Mesén-Ramírez, Ernst Jonscher, Bärbel Bergmann, and Tobias Spielmann. 2017. "A Genetic System to Study Plasmodium Falciparum Protein Function." *Nature Methods* 14 (4): 450–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4223>.
- Bischoff, Emmanuel, and Catherine Vaquero. 2010. "In Silico and Biological Survey of Transcription-Associated Proteins Implicated in the Transcriptional Machinery during the Erythrocytic Development of Plasmodium Falciparum." *BMC Genomics* 11 (January): 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-34>.
- Blisnick, Thierry, Laetitia Vincensini, Gamou Fall, and Catherine Braun-Breton. 2006. "Protein Phosphatase 1, a Plasmodium Falciparum Essential Enzyme, Is Exported to the Host Cell and Implicated in the Release of Infectious Merozoites." *Cellular Microbiology* 8 (4): 591–601. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00650.x>.
- Boer, Jetske G. De, Ailie Robinson, Stephen J. Powers, Saskia L.G.E. Burgers, John C. Caulfield, Michael A. Birkett, Renate C. Smallegange, et al. 2017. "Odours of Plasmodium Falciparum-Infected Participants Influence Mosquito-Host Interactions." *Scientific Reports* 7 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08978-9>.

- Bondos, Sarah E., and Alicia Bicknell. 2003. "Detection and Prevention of Protein Aggregation before, during, and after Purification." *Analytical Biochemistry* 316 (2): 223–31. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00059-9).
- Bossemeyer, Dirk. 1994. "The Glycine-Rich Sequence of Protein Kinases: A Multifunctional Element." *Trends in Biochemical Sciences* 19 (5): 201–5. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90022-1).
- Bouchut, Anne, Dante Rotili, Christine Pierrot, Sergio Valente, Sophia Lafitte, Johan Schultz, Urban Hoglund, et al. 2019. "Identification of Novel Quinazoline Derivatives as Potent Antiplasmodial Agents." *European Journal of Medicinal Chemistry* 161 (January): 277–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.041>.
- Boudeau, Jérôme, Diego Miranda-Saavedra, Geoffrey J. Barton, and Dario R. Alessi. 2006. "Emerging Roles of Pseudokinases." *Trends in Cell Biology* 16 (9): 443–52. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.07.003>.
- Brautigan, David L. 2013. "Protein Ser/ Thr Phosphatases - The Ugly Ducklings of Cell Signalling." *FEBS Journal* 280 (2): 324–45. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08609.x>.
- Brock, Aleisha R., Joshua V. Ross, Sunil Parikh, and Adrian Esterman. 2018. "The Role of Antimalarial Quality in the Emergence and Transmission of Resistance." *Medical Hypotheses* 111 (December 2017): 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.12.018>.
- Brown, Kevin M., and L. David Sibley. 2018. "Essential CGMP Signaling in Toxoplasma Is Initiated by a Hybrid P-Type ATPase-Guanylate Cyclase." *Cell Host & Microbe* 24 (6): 804–816.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.015>.
- Bunnik, Evelien M., Gayani Batugedara, Anita Saraf, Jacques Prudhomme, Laurence Florens, and Karine G. Le Roch. 2016. "The MRNA-Bound Proteome of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Genome Biology* 17 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1014-0>.
- Burki, Fabien, Kamran Shalchian-Tabrizi, Marianne Minge, Åsmund Skjæveland, Sergey I. Nikolaev, Kjetill S. Jakobsen, and Jan Pawlowski. 2007. "Phylogenomics Reshuffles the Eukaryotic Supergroups." *PLoS ONE* 2 (8): 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000790>.
- Burki, Fabien, Kamran Shalchian-Tabrizi, and Jan Pawlowski. 2008. "Phylogenomics Reveals a New 'megagroup' Including Most Photosynthetic Eukaryotes." *Biology Letters* 4 (4): 366–69. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0224>.
- Burns, James M., Eric K. Adeeku, Carla C. Belk, and Patricia D. Dunn. 2000. "An Unusual Tryptophan-Rich Domain Characterizes Two Secreted Antigens of Plasmodium Yoelii-Infected Erythrocytes." *Molecular and Biochemical Parasitology* 110 (1): 11–21. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00252-8).
- Bushell, Ellen, Ana Rita Gomes, Theo Sanderson, Burcu Anar, Gareth Girling, Colin Herd, Tom Metcalf, et al. 2017. "Functional Profiling of a Plasmodium Genome Reveals an Abundance of Essential Genes." *Cell* 170 (2): 260–272.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.030>.
- Busula, Annette O., Niels O. Verhulst, Teun Bousema, Willem Takken, and Jetske G. de Boer. 2017. "Mechanisms of Plasmodium-Enhanced Attraction of Mosquito Vectors." *Trends in Parasitology* 33 (12): 961–73. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.010>.
- Butcher, G. A., and G. H. Mitchell. 2016. "The Role of Plasmodium Knowlesi in the History of Malaria Research." *Parasitology* 145 (1): 6–17. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001888>.
- Camarda, Grazia, Lucia Bertuccini, Saurabh Kumar Singh, Anna Maria Salzano, Alessandra Lanfrancotti, Anna Olivieri, Andrea Scaloni, Amit Sharma, and Pietro Alano. 2010. "Regulated Oligomerisation and Molecular Interactions of the Early Gametocyte Protein Pfg27 in Plasmodium Falciparum Sexual Differentiation." *International Journal for Parasitology* 40 (6): 663–73.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.11.006>.

- Camus, Daniel, and Christian Chidiac. 2018. "Recommandations Sanitaires Pour Les Voyageurs, 2018." *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* Hors-série.
- Carreno, R. A., J. C. Kissinger, T. F. McCutchan, and J. R. Barta. 1997. "Phylogenetic Analysis of Haemosporinid Parasites (Apicomplexa: Haemosporina) and Their Coevolution with Vectors and Intermediate Hosts." *Archiv Für Protistenkunde* 148 (3): 245–52. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(97\)80005-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(97)80005-X).
- Carvalho, Teresa Gil, Belinda Morahan, Simona John von Freyend, Philippe Boeuf, Georges Grau, Jose Garcia-Bustos, and Christian Doerig. 2016. "The Ins and Outs of Phosphosignalling in Plasmodium: Parasite Regulation and Host Cell Manipulation." *Molecular and Biochemical Parasitology* 208 (1): 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.05.006>.
- Cavalier-Smith, Tom. 1991. "Alveolates." GBIF. 1991. <https://www.gbif.org/species/113527181>.
- CDC. 2017. "Investing in Malaria in Pregnancy in Sub-Saharan Africa." *Roll Back Malaria*. <https://doi.org/10.1016/SO>.
- Ceulemans, Hugo, and Mathieu Bollen. 2004. "Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button." *Physiological Reviews* 84 (1): 1–39. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2003>.
- — —. 2006. "A Tighter RVxF Motif Makes a Finer Sift." *Chemistry and Biology* 13 (1): 6–8. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.12.004>.
- Ceulemans, Hugo, Willy Stalmans, and Mathieu Bollen. 2002. "Regulator-Driven Functional Diversification of Protein Phosphatase-1 in Eukaryotic Evolution." *BioEssays* 24 (4): 371–81. <https://doi.org/10.1002/bies.10069>.
- Chandler, Clare I.R., and Uli Beisel. 2017. "The Anthropology of Malaria: Locating the Social." *Medical Anthropology: Cross Cultural Studies in Health and Illness* 36 (5): 411–21. <https://doi.org/10.1080/01459740.2017.1306858>.
- Chao, Luke H, and Joseph Avruch. 2019. "Cryo-EM Insight into the Structure of MTOR Complex 1 and Its Interactions with Rheb and Substrates." *F1000Research* 8 (14): 1–10. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16109.1>.
- Charron, Audra J., and L. David Sibley. 2004. "Molecular Partitioning during Host Cell Penetration by *Toxoplasma Gondii*." *Traffic* 5 (11): 855–67. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00228.x>.
- Chatterjee, Jayanta, Monique Beullens, Rasa Sukackaite, Junbin Qian, Bart Lesage, Darren J. Hart, Mathieu Bollen, and Maja Köhn. 2012. "Development of a Peptide That Selectively Activates Protein Phosphatase-1 in Living Cells." *Angewandte Chemie - International Edition* 51 (40): 10054–59. <https://doi.org/10.1002/anie.201204308>.
- Chen, Mark J., Jack E. Dixon, and Gerard Manning. 2017. "Genomics and Evolution of Protein Phosphatases." *Science Signaling* 10 (474): eaag1796. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag1796>.
- Chêne, Arnaud, Shruthi S. Vembar, Loïc Rivière, José Juan Lopez-Rubio, Aurelie Claes, T. Nicolai Siegel, Hiroshi Sakamoto, Christine Scheidig-Benatar, Rosaura Hernandez-Rivas, and Artur Scherf. 2012. "PfAlbas Constitute a New Eukaryotic DNA/RNA-Binding Protein Family in Malaria Parasites." *Nucleic Acids Research* 40 (7): 3066–77. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1215>.
- Cobbold, Simon A., Joana M. Santos, Alejandro Ochoa, David H. Perlman, and Manuel Llinas. 2016. "Proteome-Wide Analysis Reveals Widespread Lysine Acetylation of Major Protein Complexes in

- the Malaria Parasite." *Scientific Reports* 6 (December 2015): 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep19722>.
- Cohen, Nadia R., Michael A. Lobritz, and James J. Collins. 2013. "Microbial Persistence and the Road to Drug Resistance." *Cell Host and Microbe* 13 (6): 632–42. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.009>.
- Collins, Christine R., Sujaan Das, Eleanor H. Wong, Nicole Andenmatten, Robert Stallmach, Fiona Hackett, Jean Paul Herman, Sylke Müller, Markus Meissner, and Michael J. Blackman. 2013. "Robust Inducible Cre Recombinase Activity in the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* Enables Efficient Gene Deletion within a Single Asexual Erythrocytic Growth Cycle." *Molecular Microbiology* 88 (4): 687–701. <https://doi.org/10.1111/mmi.12206>.
- Collins, Christine R., Fiona Hackett, Jonathan Atid, Michele Ser Ying Tan, and Michael J. Blackman. 2017. *The Plasmodium Falciparum Pseudoprotease SERA5 Regulates the Kinetics and Efficiency of Malaria Parasite Egress from Host Erythrocytes. PLoS Pathogens*. Vol. 13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006453>.
- Collins, Mark O., James C. Wright, Matthew Jones, Julian C. Rayner, and Jyoti S. Choudhary. 2014. "Confident and Sensitive Phosphoproteomics Using Combinations of Collision Induced Dissociation and Electron Transfer Dissociation." *Journal of Proteomics* 103: 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.010>.
- Collins, William E., and Geoffrey M. Jeffery. 2007. "Plasmodium Malariae: Parasite and Disease." *Clinical Microbiology Reviews* 20 (4): 579–92. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-07>.
- Colombo, Marina, Graça Raposo, and Clotilde Théry. 2014. "Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (1): 255–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- Cortés, Alfred, and Kirk W. Deitsch. 2017. "Malaria Epigenetics." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7 (7): 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025528>.
- Coulson, Richard M.R., Neil Hall, and Christos A. Ouzounis. 2004. "Comparative Genomics of Transcriptional Control in the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *Genome Research* 14 (8): 1548–54. <https://doi.org/10.1101/gr.2218604>.
- Cova, Marta, João A. Rodrigues, Terry K. Smith, and Luis Izquierdo. 2015. "Sugar Activation and Glycosylation in Plasmodium." *Malaria Journal* 14 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0949-z>.
- Cowman, Alan F., Julie Healer, Danushka Marapana, and Kevin Marsh. 2016. "Malaria: Biology and Disease." *Cell* 167 (3): 610–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>.
- Cox, F. E. G. 2002. "History of Human Parasitology." *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4): 595–612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595>.
- Cox, Francis EG. 2010. "History of the Discovery of the Malaria Parasites and Their Vectors." *Parasites & Vectors* 3 (5): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-5>.
- Crompton, Peter D, Jacqueline Moebius, Michael Waisberg, Lindsey S Garver, Louis H Miller, Carolina Barillas, and Susan K Pierce. 2014. "Malaria Immunity in Man and Mosquito: Insights into Unsolved Mysteries of a Deadly Infectious Disease." *Annu Rev Immunol.* 32: 157–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120220.Malaria>.
- Cunha, Cheston B., and Burke A. Cunha. 2008. "Brief History of the Clinical Diagnosis of Malaria: From Hippocrates to Osler." *Journal of Vector Borne Diseases* 45 (3): 194–99.
- Cyrklaff, Marek, Friedrich Frischknecht, and Mikhail Kudryashev. 2017. "Functional Insights into Pathogen Biology from 3D Electron Microscopy." *FEMS Microbiology Reviews* 41 (6): 828–53.

<https://doi.org/10.1093/femsre/fux041>.

- Daddy, Nsengiyumva Bati, Luc Malemo Kalisya, Pascal Gisenya Bagire, Robert L. Watt, Melissa J. Towler, and Pamela J. Weathers. 2017. "Artemisia Annua Dried Leaf Tablets Treated Malaria Resistant to ACT and i.v. Artesunate: Case Reports." *Phytomedicine* 32 (February): 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.04.006>.
- Daher, Wassim, Edith Browaeys, Christine Pierrot, Hélène Jouin, Daniel Dive, Edwige Meurice, Colette Dissous, et al. 2006. "Regulation of Protein Phosphatase Type 1 and Cell Cycle Progression by PfLRR1, a Novel Leucine-Rich Repeat Protein of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Molecular Microbiology* 60 (3): 578–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05119.x>.
- Dalrymple, Ursula, Rohan Arambepola, Peter W. Gething, and Ewan Cameron. 2018. "How Long Do Rapid Diagnostic Tests Remain Positive after Anti-Malarial Treatment?" *Malaria Journal* 17 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2371-9>.
- Davies, A.J., and M.R.L. Johnston. 2000. "The Biology of Some Intraerythrocytic Parasites of Fishes, Amphibia and Reptiles." *Advances in Parasitology* 45 (5). [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(00\)45003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(00)45003-7).
- Davies, Heledd M., Stephanie D. Nofal, Emilia J. McLaughlin, and Andrew R. Osborne. 2017. "Repetitive Sequences in Malaria Parasite Proteins." *FEMS Microbiology Reviews* 41 (6): 923–40. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux046>.
- Deitsch, Kirk W. 2017. "Parasite Pathogenesis: The Dynamics of Chronic Malaria." *Nature Microbiology* 2 (March): 1–2. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.39>.
- Derbyshire, Emily R., Vanessa Zuzarte-Luís, Andreia D. Magalhães, Nobutaka Kato, Paul C. Sanschagrin, Jinhua Wang, Wenjun Zhou, et al. 2014. "Chemical Interrogation of Malarial Host and Parasite Kinomes." *ChemBioChem* 15 (13): 1920–30. <https://doi.org/10.1002/cbic.201400025>.
- Desai, Sanjay A. 2014. "Why Do Malaria Parasites Increase Host Erythrocyte Permeability?" *Trends in Parasitology* 30 (3): 151–59. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.01.003>.
- Deveuve, Quentin, Kevin Lesage, Thomas Mouveaux, and Mathieu Gissot. 2017. "The Toxoplasma Gondii Inhibitor-2 Regulates Protein Phosphatase 1 Activity through Multiple Motifs." *Parasitology Research* 116 (9): 2417–26. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5543-6>.
- Devos, Juliette M., Stephen J. Tomanicek, Charles E. Jones, Nancy G. Nossal, and Timothy C. Mueser. 2007. "Crystal Structure of Bacteriophage T4 5' Nuclease in Complex with a Branched DNA Reveals How Flap Endonuclease-1 Family Nucleases Bind Their Substrates." *Journal of Biological Chemistry* 282 (43): 31713–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703209200>.
- Diederich, Lukas, Tatsiana Suvorova, Roberto Sansone, T. C. Stevenson Keller, Frederik Barbarino, Thomas R. Sutton, Christian M. Kramer, et al. 2018. "On the Effects of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide on Red Blood Cell Deformability." *Frontiers in Physiology* 9 (May): 332. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00332>.
- Dimala, Christian Akem, Belmond Tse Kika, Benjamin Momo Kadia, and Hannah Blencowe. 2018. "Current Challenges and Proposed Solutions to the Effective Implementation of the RTS, S/AS01 Malaria Vaccine Program in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review." *Plos One* 13 (12): e0209744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209744>.
- Dluzewski, A. R., and C. R. Garcia. 1996. "Inhibition of Invasion and Intraerythrocytic Development of Plasmodium Falciparum by Kinase Inhibitors." *Experientia* 52 (6): 621–23. <https://doi.org/10.1007/BF01969742>.

- Doerig, Christian, Oliver Billker, David Pratt, and Jane Endicott. 2005. "Protein Kinases as Targets for Antimalarial Intervention: Kinomics, Structure-Based Design, Transmission-Blockade, and Targeting Host Cell Enzymes." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1754 (1–2): 132–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.027>.
- Doerig, Christian, Julian C. Rayner, Artur Scherf, and Andrew B. Tobin. 2015. "Post-Translational Protein Modifications in Malaria Parasites." *Nature Reviews Microbiology* 13 (3): 160–72. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3402>.
- Dooren, Giel G. van, and Boris Striepen. 2013. "The Algal Past and Parasite Present of the Apicoplast." *Annual Review of Microbiology* 67 (1): 271–89. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00248.x>.
- Draper, Simon J., Brandon K. Sack, C. Richter King, Carolyn M. Nielsen, Julian C. Rayner, Matthew K. Higgins, Carole A. Long, and Robert A. Seder. 2018. "Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons." *Cell Host and Microbe* 24 (1): 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.008>.
- Drewry, Lisa L., and L. David Sibley. 2015. "Toxoplasma Actin Is Required for Efficient Host Cell Invasion." *MBio* 6 (3): 28. <https://doi.org/10.1128/mBio.00557-15.Editor>.
- Dundas, Kirsten, Melanie J. Shears, Photini Sinnis, and Gavin J. Wright. 2018. "Important Extracellular Interactions between Plasmodium Sporozoites and Host Cells Required for Infection." *Trends in Parasitology* xx: 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2018.11.008>.
- Duraisingh, Manoj T., and Kristen M. Skillman. 2018. "Epigenetic Variation and Regulation in Malaria Parasites." *Annual Review of Microbiology* 72 (1): annurev-micro-090817-062722. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062722>.
- Egan, Elizabeth S. 2018. "Beyond Hemoglobin: Screening for Malaria Host Factors." *Trends in Genetics* 34 (2): 133–41. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.004>.
- Egloff, Marie-Pierre, Deborah F Johnson, Greg Moorhead, Patricia T W Cohen, Philip Cohen, David Barford, and Rex Richards Building. 1997. "Structural Basis for the Recognition of Regulatory Subunits by the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 1 Specific Protein Phosphatases of Eukaryotic Cells (Stralfors Diverse Cellular Functions Including Glycogen Metabolism)." *The EMBO Journal* 16 (8): 1876–87.
- Etheridge, Ronald D., Aditi Alaganan, Keliang Tang, Hua Jane Lou, Benjamin E. Turk, and L. David Sibley. 2014. "The Toxoplasma Pseudokinase ROP5 Forms Complexes with ROP18 and ROP17 Kinases That Synergize to Control Acute Virulence in Mice." *Cell Host and Microbe* 15 (5): 537–50. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.002>.
- Eyers, Patrick A., and James M. Murphy. 2013. "Dawn of the Dead: Protein Pseudokinases Signal New Adventures in Cell Biology." *Biochemical Society Transactions* 41 (4): 969–74. <https://doi.org/10.1042/BST20130115>.
- Ferguson, David J.P., Nivedita Sahoo, Robert A. Pinches, Janene M. Bumstead, Fiona M. Tomley, and Marc Jan Gubbels. 2008. "MORN1 Has a Conserved Role in Asexual and Sexual Development across the Apicomplexa." *Eukaryotic Cell* 7 (4): 698–711. <https://doi.org/10.1128/EC.00021-08>.
- Fidock, D. A., and Thomas E. Wellems. 1997. "Transformation with Human Dihydrofolate Reductase Renders Malaria Parasites Insensitive to WR99210 but Does Not Affect the Intrinsic Activity of Proguanil." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (20): 10931–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10931>.
- Fraisse, Laurent. 2017. "Artefenomel (OZ439) plus Ferroquine." *Medicines for Malaria Venture*. 2017. <https://www.mmv.org/newsroom/interviews/artefenomel-oz439-plus-ferroquine>.

- Frénal, Karine, Chwen L. Tay, Christina Mueller, Ellen S. Bushell, Yonggen Jia, Arnault Graindorge, Oliver Billker, Julian C. Rayner, and Dominique Soldati-Favre. 2013. "Global Analysis of Apicomplexan Protein S-Acyl Transferases Reveals an Enzyme Essential for Invasion." *Traffic* 14 (8): 895–911. <https://doi.org/10.1111/tra.12081>.
- Fréville, Aline, Katia Cailliau-Maggio, Christine Pierrot, Géraldine Tellier, Hadidjatou Kalamou, Sophia Lafitte, Alain Martoriati, Raymond J. Pierce, Jean François Bodart, and Jamal Khalife. 2013. "Plasmodium Falciparum Encodes a Conserved Active Inhibitor-2 for Protein Phosphatase Type 1: Perspectives for Novel Anti-Plasmodial Therapy." *BMC Biology* 11. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-80>.
- Fréville, Aline, Isabelle Landrieu, M. Adelaida García-Gimeno, Jérôme Vicogne, Muriel Montbarbon, Benjamin Bertin, Alexis Verger, et al. 2012. "Plasmodium Falciparum Inhibitor-3 Homolog Increases Protein Phosphatase Type 1 Activity and Is Essential for Parasitic Survival." *Journal of Biological Chemistry* 287 (2): 1306–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.276865>.
- Fréville, Aline, Géraldine Tellier, Audrey Vandomme, Christine Pierrot, Jérôme Vicogne, François Xavier Cantrelle, Alain Martoriati, Katia Cailliau-Maggio, Jamal Khalife, and Isabelle Landrieu. 2014. "Identification of a Plasmodium Falciparum Inhibitor-2 Motif Involved in the Binding and Regulation Activity of Protein Phosphatase Type 1." *FEBS Journal* 281 (19): 4519–34. <https://doi.org/10.1111/febs.12960>.
- Füssy, Zoltán, Petra Masařová, Jitka Kručinská, Heather J. Esson, and Miroslav Oborník. 2017. "Budding of the Alveolate Alga Vitrella Brassicaformis Resembles Sexual and Asexual Processes in Apicomplexan Parasites." *Protist* 168 (1): 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.12.001>.
- Galizi, Roberto, Furio Spano, Maria Angela Giubilei, Barbara Capuccini, Alessandro Magini, Lorena Urbanelli, Tetsuhiro Ogawa, et al. 2013. "Evidence of tRNA Cleavage in Apicomplexan Parasites: Half-tRNAs as New Potential Regulatory Molecules of Toxoplasma Gondii and Plasmodium Berghei." *Molecular and Biochemical Parasitology* 188 (2): 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.03.003>.
- Gallego-Delgado, Julio, and Ana Rodriguez. 2017. "Rupture and Release: A Role for Soluble Erythrocyte Content in the Pathology of Cerebral Malaria" 33 (11). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.06.005>.
- Gantier, Jean-Charles. 1998. "Paludisme et Maîtrise Des Populations Anophéliennes" 110.
- Gao, Han, Zhenke Yang, Xu Wang, Pengge Qian, Renjie Hong, Xin Chen, Xin zhuan Su, Huiting Cui, and Jing Yuan. 2018. "ISP1-Anchored Polarization of GCβ/CDC50A Complex Initiates Malaria Ookinete Gliding Motility." *Current Biology* 28 (17): 2763–2776.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.069>.
- Garcia, Carlos H.S., Delphine Depoix, Rayner M.L. Queiroz, Jaques M.F. Souza, Wagner Fontes, Marcelo V. de Sousa, Marlon D.M. Santos, Paulo C. Carvalho, Philippe Grellier, and Sébastien Charneau. 2018. "Dynamic Molecular Events Associated to Plasmodium Berghei Gametogenesis through Proteomic Approach." *Journal of Proteomics* 180 (November 2017): 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.11.009>.
- Gardner, Malcolm J., Neil Hall, Eula Fung, Owen White, Matthew Berriman, Richard W. Hyman, Jane M. Carlton, et al. 2002. "Genome Sequence of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Nature* 419 (6906): 498–511. <https://doi.org/10.1038/nature01097>.
- Gazzinelli, Ricardo T., Parisa Kalantari, Katherine A. Fitzgerald, and Douglas T. Golenbock. 2014. "Innate Sensing of Malaria Parasites." *Nature Reviews Immunology* 14 (11): 744–57. <https://doi.org/10.1038/nri3742>.

- Ghorbal, Mehdi, Molly Gorman, Cameron Ross MacPherson, Rafael Miyazawa Martins, Artur Scherf, and Jose Juan Lopez-Rubio. 2014. "Genome Editing in the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* Using the CRISPR-Cas9 System." *Nature Biotechnology* 32 (8): 819–21. <https://doi.org/10.1038/nbt.2925>.
- Ghosh, Sreejoyee, Kit Kennedy, Paul Sanders, Kathryn Matthews, Stuart A. Ralph, Natalie A. Counihan, and Tania F. de Koning-Ward. 2017. "The *Plasmodium* Rhoptry Associated Protein Complex Is Important for Parasitophorous Vacuole Membrane Structure and Intraerythrocytic Parasite Growth." *Cellular Microbiology* 19 (8): e12733. <https://doi.org/10.1111/cmi.12733>.
- Gilson, Paul R., Thomas Nebl, Damjan Vukcevic, Robert L. Moritz, Tobias Sargeant, Terence P. Speed, Louis Schofield, and Brendan S. Crabb. 2006. "Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *Molecular & Cellular Proteomics* 5 (7): 1286–99. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600035-MCP200>.
- Gisselberg, Jolyn E., Lichao Zhang, Joshua E. Elias, and Ellen Yeh. 2017. "The Prenylated Proteome of *Plasmodium Falciparum* Reveals Pathogen-Specific Prenylation Activity and Drug Mechanism-of-Action." *Molecular & Cellular Proteomics* 16 (4 suppl 1): S54–64. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.064550>.
- Glover, Barbara, Olalekan Akinbo, Moussa Savadogo, Samuel Timpo, Godwin Lemgo, Woldeyesus Sinebo, Sunday Akile, et al. 2018. "Strengthening Regulatory Capacity for Gene Drives in Africa: Leveraging NEPAD's Experience in Establishing Regulatory Systems for Medicines and GM Crops in Africa." *BMC Proceedings* 12 (Suppl 8). <https://doi.org/10.1186/s12919-018-0108-y>.
- Godet, Angélique N., Julien Guernon, Virginie Maire, Amélie Croset, and Alphonse Garcia. 2010. "The Combinatorial PP1-Binding Consensus Motif (R/K)x(0,1)v/IxFxx(R/K)x(R/K) Is a New Apoptotic Signature." *PLoS ONE* 5 (4): 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009981>.
- Groger, Mirjam, Hannah S. Fischer, Luzia Veletzky, Albert Lalremruata, and Michael Ramharter. 2017. "A Systematic Review of the Clinical Presentation, Treatment and Relapse Characteristics of Human *Plasmodium Ovale* Malaria." *Malaria Journal* 16 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1759-2>.
- Gubbels, Marc-Jan, Shipra Vaishnav, Nico Boot, Jean François Dubremetz, and Boris Striepen. 2006. "A MORN-Repeat Protein Is a Dynamic Component of the *Toxoplasma Gondii* Cell Division Apparatus." *Journal of Cell Science* 119 (11): 2236–45. <https://doi.org/10.1242/jcs.02949>.
- Guernon, Julien, Frédéric Dessauge, Victoria Dominguez, Jean Viallet, Serge Bonnefoy, Victor J. Yuste, Odile Mercereau-Puijalon, et al. 2006. "Use of Penetrating Peptides Interacting with PP1/PP2A Proteins As a General Approach for a Drug Phosphatase Technology." *Molecular Pharmacology* 69 (4): 1115–24. <https://doi.org/10.1124/mol.105.019364>.
- Guérin, Amandine, Rosa Milagros Corrales, Michele L. Parker, Mauld H. Lamarque, Damien Jacot, Hiba El Hajj, Dominique Soldati-Favre, Martin J. Boulanger, and Maryse Lebrun. 2017. "Efficient Invasion by *Toxoplasma* Depends on the Subversion of Host Protein Networks." *Nature Microbiology* 2 (10): 1358–66. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0018-1>.
- Guggisberg, Ann M., Jooyoung Park, Rachel L. Edwards, Megan L. Kelly, Dana M. Hodge, Niraj H. Tolia, and Audrey R. Odom. 2014. "A Sugar Phosphatase Regulates the Methylerythritol Phosphate (MEP) Pathway in Malaria Parasites." *Nature Communications* 5: 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms5467>.
- Gupta, Archana P., and Zbynek Bozdech. 2017. "Epigenetic Landscapes Underlining Global Patterns of Gene Expression in the Human Malaria Parasite, *Plasmodium Falciparum*." *International Journal for Parasitology* 47 (7): 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.10.008>.

- Guttery, David S., Benoit Poulin, Abhinay Ramaprasad, Richard J. Wall, David J.P. Ferguson, Declan Brady, Eva Maria Patzewitz, et al. 2014. "Genome-Wide Functional Analysis of Plasmodium Protein Phosphatases Reveals Key Regulators of Parasite Development and Differentiation." *Cell Host and Microbe* 16 (1): 128–40. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.020>.
- Hadariová, Lucia, Matej Vesteg, Vladimír Hampl, and Juraj Krajčovič. 2018. "Reductive Evolution of Chloroplasts in Non-Photosynthetic Plants, Algae and Protists." *Current Genetics* 64 (2): 365–87. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0761-0>.
- Hakimi, Mohamed Ali, Philipp Olias, and David L. Sibley. 2017. "Toxoplasma Effectors Targeting Host Signaling and Transcription." *Clinical Microbiology Reviews* 30 (3): 615–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-17CE>.
- Haldar, Kasturi, Souvik Bhattacharjee, and Innocent Safeukui. 2018. "Drug Resistance in Plasmodium." *Nature Reviews Microbiology* 16 (3): 156–70. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.161>.
- Hallée, Stéphanie, Natalie A. Counihan, Kathryn Matthews, Tania F. de Koning-Ward, and Dave Richard. 2018. "The Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* Sortilin Is Essential for Merozoite Formation and Apical Complex Biogenesis." *Cellular Microbiology*, no. January: e12844. <https://doi.org/10.1111/cmi.12844>.
- Hallyburton, Irene, Raffaella Grimaldi, Andrew Woodland, Beatriz Baragaña, Torsten Luksch, Daniel Spinks, Daniel James, et al. 2017. "Screening a Protein Kinase Inhibitor Library against Plasmodium Falciparum." *Malaria Journal* 16 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2085-4>.
- Hamilton, William L., Antoine Claessens, Thomas D. Otto, Mihir Kekre, Rick M. Fairhurst, Julian C. Rayner, and Dominic Kwiatkowski. 2017. "Extreme Mutation Bias and High AT Content in Plasmodium Falciparum." *Nucleic Acids Research* 45 (4): 1889–1901. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1259>.
- Hanks, Steven K. 2003. "Genomic Analysis of the Eukaryotic Protein Kinase Superfamily: A Perspective." *Genome Biology* 4 (5): 111. <https://doi.org/10.1186/GB-2003-4-5-111>.
- Hanks, Steven K, and Tony Hunter. 1995. "The Eukaryotic Protein Kinase Superfamily: Kinase (Catalytic) Domain Structure and Classification." *FASEB* 9: 576–96. <http://www.fasebj.org/content/9/8/576.long%5Cnpapers3://publication/uuid/A354235A-05E4-433C-A0D4-CBB89AC07201>.
- Hanks, Steven K, Anne Marie Quinn, and Tony Hunter. 1988. "The Protein Kinase Family : Conserved Protein Phylogeny Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains." *Science* 241 (4861): 42–52. <https://doi.org/10.1126/science.3291115>.
- Heckman, Karin L., and Larry R. Pease. 2007. "Gene Splicing and Mutagenesis by PCR-Driven Overlap Extension." *Nature Protocols* 2 (4): 924–32. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>.
- Hempelmann, Ernst, and Kristine Krafts. 2013. "Bad Air, Amulets and Mosquitoes: 2,000 Years of Changing Perspectives on Malaria." *Malaria Journal* 12 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-232>.
- Hendrickx, Annick, Monique Beullens, Hugo Ceulemans, Tom Den Abt, Aleyde Van Eynde, Emilia Nicolaescu, Bart Lesage, and Mathieu Bollen. 2009. "Docking Motif-Guided Mapping of the Interactome of Protein Phosphatase-1." *Chemistry and Biology* 16 (4): 365–71. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.02.012>.
- Heroes, Ewald, Jens Rip, Monique Beullens, Luc Van Meervelt, Stefan De Gendt, and Mathieu Bollen. 2015. "Metals in the Active Site of Native Protein Phosphatase-1." *Journal of Inorganic Biochemistry*

- 149: 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.012>.
- Hippocrates, F.A. 400BC. “On Airs, Waters, and Places.” EBooks. The Internet Classics Archive. 400BC. <http://classics.mit.edu/Hippocrates/airwatpl.html>.
- Hodson, Nicola, Brandon Invergo, Julian C. Rayner, and Jyoti S. Choudhary. 2015. “Palmitoylation and Palmitoyl-Transferases in *Plasmodium* Parasites.” *Biochemical Society Transactions* 43 (2): 240–45. <https://doi.org/10.1042/BST20140289>.
- Hollin, Thomas, Caroline De Witte, Astrid Lenne, Christine Pierrot, and Jamal Khalife. 2016. “Analysis of the Interactome of the Ser/Thr Protein Phosphatase Type 1 in *Plasmodium Falciparum*.” *BMC Genomics* 17 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2571-z>.
- Homer. 850BC. “Iliade Homère Chant 22.” Iliade Chant 22. 850BC. <http://philoctetes.free.fr/ilchant22.htm>.
- Hopp, Christine S., Amanda E. Balaban, Ellen Bushell, Oliver Billker, Julian C. Rayner, and Photini Sinnis. 2016. “Palmitoyl Transferases Have Critical Roles in the Development of Mosquito and Liver Stages of *Plasmodium*.” *Cellular Microbiology* 18 (11): 1625–41. <https://doi.org/10.1111/cmi.12601>.
- Horii, Toshihiro, Hiroki Shirai, Li Jie, Ken J. Ishii, Nirianne Q. Palacpac, Takahiro Tougan, Mariko Hato, et al. 2010. “Evidences of Protection against Blood-Stage Infection of *Plasmodium Falciparum* by the Novel Protein Vaccine SE36.” *Parasitology International* 59 (3): 380–86. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.05.002>.
- Hu, Ke, David S Roos, and John M Murray. 2002. “A Novel Polymer of Tubulin Forms the Conoid of *Toxoplasma Gondii*.” *The Journal of Cell Biology* 156 (6): 1039–50. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112086>.
- Hunter, Tony. 1987. “A Thousand and One Protein Kinases.” *Cell* 50 (September 11): 823–29.
- Huse, Morgan, and John Kuriyan. 2002. “The Conformational Plasticity of Protein Kinases.” *Cell* 109: 275–82. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00741-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00741-9).
- Intharabut, Benjamas, Hugh W Kingston, Ketsanee Srinamon, Elizabeth A Ashley, Mallika Imwong, Mehul Dhorda, Charles Woodrow, et al. 2019. “Artemisinin Resistance and Stage Dependency of Parasite Clearance in *Falciparum* Malaria.” *The Journal of Infectious Diseases*, no. Xx: 1–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy673>.
- Ishino, Tomoko, Kazuhiko Yano, Yasuo Chinzei, and Masao Yuda. 2004. “Cell-Passage Activity Is Required for the Malarial Parasite to Cross the Liver Sinusoidal Cell Layer.” *PLoS Biology* 2 (1): 77–84. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020004>.
- Issar, Neha, Emeric Roux, Denise Mattei, and Artur Scherf. 2008. “Identification of a Novel Post-Translational Modification in *Plasmodium Falciparum*: Protein Sumoylation in Different Cellular Compartments.” *Cellular Microbiology* 10 (10): 1999–2011. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01183.x>.
- Ito, Yoko, Kiminori Toyooka, Masaru Fujimoto, Takashi Ueda, Tomohiro Uemura, and Akihiko Nakano. 2017. “The Trans-Golgi Network and the Golgi Stacks Behave Independently during Regeneration after Brefeldin A Treatment in Tobacco BY-2 Cells.” *Plant and Cell Physiology* 58 (4): 811–21. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx028>.
- Itzstein, Mark von, Magdalena Plebanski, Brian M. Cooke, and Ross L. Coppel. 2008. “Hot, Sweet and Sticky: The Glycobiology of *Plasmodium Falciparum*.” *Trends in Parasitology* 24 (5): 210–18. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.02.007>.
- Iyer, Gayatri R., Shailja Singh, Inderjeet Kaur, Shalini Agarwal, Mansoor A. Siddiqui, Abhisheka Bansal,

- Gautam Kumar, et al. 2018. "Calcium-Dependent Phosphorylation of Plasmodium Falciparum Serine Repeat Antigen 5 Triggers Merozoite Egress." *Journal of Biological Chemistry* 293 (25): 9736–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001540>.
- Jabeena, CA, and Arumugam Rajavelu. 2019. "Epigenetic Players of Chromatin Structure Regulation in Plasmodium Falciparum." *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800718>.
- Jaffré, Yannick. 2007. "Contributions of Social Anthropology to Malaria Control." *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies*. Wiley-Liss. http://classiques.uqac.ca/contemporains/jaffre_yannick/contributions_sociai_anthropology_malaria/malaria_texte.html.
- Janouškovec, Jan, Aleš Horák, Miroslav Oborník, Julius Lukeš, and Patrick J Keeling. 2010. "A Common Red Algal Origin of the Apicomplexan, Dinoflagellate, and Heterokont Plastids." *PNAS* 107 (24): 10949–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003335107>.
- Janse, Chris J., Jai Ramesar, and Andrew P. Waters. 2004. "Plasmodium Berghei : General Parasitological Methods." Leiden - The Netherlands.
- — —. 2006. "High-Efficiency Transfection and Drug Selection of Genetically Transformed Blood Stages of the Rodent Malaria Parasite Plasmodium Berghei." *Nature Protocols* 1 (1): 346–56. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.53>.
- Janse, Chris J., and Andrew P. Waters. 1995. "Plasmodium Berghei: The Application of Cultivation and Purification Techniques to Molecular Studies of Malaria Parasites." *Parasitology Today* 11 (4): 138–43. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80133-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80133-2).
- Jones, David T., William R. Taylor, and Janet M Thornton. 1992. "The Rapid Generation of Mutation Data Matrices" 8 (3): 275–82.
- Jones, Matthew L., Sujaan Das, Hugo Belda, Christine R. Collins, Michael J. Blackman, and Moritz Treeck. 2016. "A Versatile Strategy for Rapid Conditional Genome Engineering Using LoxP Sites in a Small Synthetic Intron in Plasmodium Falciparum." *Scientific Reports* 6 (November 2015): 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep21800>.
- Kaiser, Gesine, Mariana De Niz, Paul-Christian Burda, Livia Niklaus, Rebecca Limenitakis Stanway, and Volker Heussler. 2017. "Generation of Transgenic Rodent Malaria Parasites by Transfection of Cell Culture-Derived Merozoites." *Malaria Journal* 16 (1): 305. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1949-y>.
- Kannan, Natarajan, and Susan S. Taylor. 2008. "Rethinking Pseudokinases." *Cell* 133 (2): 204–5. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.005>.
- Kanodia, Shivani, Gautam Kumar, Luca Rizzi, Alessandro Pedretti, Anthony N. Hodder, Sergio Romeo, and Pawan Malhotra. 2014. "Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal 6 KDa Region of Plasmodium Falciparum SERA5 Inhibit the Enzyme Activity and Malaria Parasite Development." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1840 (9): 2765–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.04.013>.
- Kapust, Rachel B., and David S. Waugh. 1999. "Escherichia Coli Maltose-Binding Protein Is Uncommonly Effective at Promoting the Solubility of Polypeptides to Which It Is Fused." *Protein Science* 8 (8): 1668–74. <https://doi.org/10.1110/ps.8.8.1668>.
- Kasstan, Ben, Kate Hampshire, Claire Guest, James G. Logan, Margaret Pinder, Kate Williams, Umberto D'Alessandro, and Steve W. Lindsay. 2019. "Sniff and Tell: The Feasibility of Using Bio-Detection Dogs as a Mobile Diagnostic Intervention for Asymptomatic Malaria in Sub-Saharan Africa." *Journal of Biosocial Science*, January, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0021932018000408>.

- Kaur, Inderjeet, Mohammad Zeeshan, Ekta Saini, Abhinav Kaushik, Asif Mohmmmed, Dinesh Gupta, and Pawan Malhotra. 2016. "Widespread Occurrence of Lysine Methylation in Plasmodium Falciparum Proteins at Asexual Blood Stages." *Scientific Reports* 6 (October): 1–24. <https://doi.org/10.1038/srep35432>.
- Kehr, Sebastian, Esther Jortzik, Claire Delahunty, John R. Yates, Stefan Rahlfs, and Katja Becker. 2011. "Protein S -Glutathionylation in Malaria Parasites." *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (11): 2855–65. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4029>.
- Kent, Robyn S., Katarzyna K. Modrzynska, Rachael Cameron, Nisha Philip, Oliver Billker, and Andrew P. Waters. 2018. "Inducible Developmental Reprogramming Redefines Commitment to Sexual Development in the Malaria Parasite Plasmodium Berghei." *Nature Microbiology* 3 (11): 1206–13. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0223-6>.
- Kentaro, Kato. 2018. "How Does Toxoplasma Gondii Invade Host Cells?" *The Journal of Veterinary Medical Science*, no. 122: 1702–6. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1292/jvms.12-0345>.
- Khalife, Jamal, Aline Fréville, Audrey Vandomme, and Christine Pierrot. 2013. "Phosphatases." *Encyclopedia of Malaria*. Hommel M., Kremsner P. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8757-9_59-1.
- Khalife, Jamal, and Christine Pierrot. 2016. "Phosphatases Are Emerging as Novel Druggable Targets in Plasmodium." *Future Microbiology* 11 (5): 603–6. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0029>.
- Khaminets, Aliaksandr, Julia P. Hunn, Stephanie Könen-Waisman, Yang O. Zhao, Daniela Preukschat, Jörn Coers, Jon P. Boyle, et al. 2010. "Coordinated Loading of IRG Resistance GTPases on to the Toxoplasma Gondii Parasitophorous Vacuole." *Cellular Microbiology* 12 (7): 939–61. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01443.x>.
- Kim, Chongwoo A., and James U. Bowie. 2003. "SAM Domains: Uniform Structure, Diversity of Function." *Trends in Biochemical Sciences* 28 (12): 625–28. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.001>.
- Kim, Elliot W., Santhosh M. Nadipuram, Ashley L. Tetlow, William D. Barshop, Philip T. Liu, James A. Wohlschlegel, and Peter J. Bradley. 2016. "The Rhopty Pseudokinase ROP54 Modulates Toxoplasma Gondii Virulence and Host GBP2 Loading." *MSphere* 1 (2): 1–15. <https://doi.org/10.1128/msphere.00045-16>. Editor.
- King, Albert Freeman Africanus. 1883. "Insects and Disease - Mosquitoes and Malaria." *Popular Science Monthly*. 1883. https://en.wikisource.org/wiki/Popular_Science_Monthly/Volume_23/September_1883/Insects_and_Disease_-_Mosquitoes_and_Malaria.
- Kirk, Kiaran, and Adele M. Lehane. 2014. "Membrane Transport in the Malaria Parasite and Its Host Erythrocyte." *Biochemical Journal* 457 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1042/BJ20131007>.
- Knape, Matthias J., and Friedrich W. Herberg. 2017. "Metal Coordination in Kinases and Pseudokinases." *Biochemical Society Transactions* 45 (3): 653–63. <https://doi.org/10.1042/BST20160327>.
- Kobe, Boštjan, Thorsten Kampmann, Jade K. Forwood, Pawel Listwan, and Ross I. Brinkworth. 2005. "Substrate Specificity of Protein Kinases and Computational Prediction of Substrates." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1754 (1–2): 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.036>.
- Koning-Ward, Tania F. De, Matthew W.A. Dixon, Leann Tilley, and Paul R. Gilson. 2016. "Plasmodium Species: Master Renovators of Their Host Cells." *Nature Reviews Microbiology* 14 (8): 494–507. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.79>.
- Kono, M., D. Heincke, L. Wilcke, T. W. Y. Wong, C. Bruns, S. Herrmann, T. Spielmann, and T. W.

- Gilberger. 2016. "Pellicle Formation in the Malaria Parasite." *Journal of Cell Science* 129 (4): 673–80. <https://doi.org/10.1242/jcs.181230>.
- Kornev, Alexandr P., Nina M. Haste, Susan S. Taylor, and Lynn F. Ten Eyck. 2006. "Surface Comparison of Active and Inactive Protein Kinases Identifies a Conserved Activation Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (47): 17783–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607656103>.
- Kornev, Alexandr P., and Susan S. Taylor. 2010. "Defining the Conserved Internal Architecture of a Protein Kinase." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1804 (3): 440–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.017>.
- Kumar, Ganesan Senthil, Ezgi Gokhan, Sofie De Munter, Mathieu Bollen, Paola Vagnarelli, Wolfgang Peti, and Rebecca Page. 2016. "The Ki-67 and RepoMan Mitotic Phosphatases Assemble via an Identical, yet Novel Mechanism." *ELife* 5 (AUGUST): 1–15. <https://doi.org/10.7554/eLife.16539>.
- Kumar, Rajinder, Brian Adams, Anja Oldenburg, Alla Musiyenko, and Sailen Barik. 2002. "Characterisation and Expression of a PP1 Serine/Threonine Proteinphosphatase (PfPP1) from the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum: Demonstration of Its Essential Role Using RNA Interference." *Malaria Journal* 1: 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-1-1>.
- Kumar, Vikash, Ankita Behl, Payal Kapoor, Bandita Nayak, Gurbir Singh, Amrit Pal Singh, Satish Mishra, Tejwant Singh Kang, Prakash Chandra Mishra, and Rachna Hora. 2019. "Inner Membrane Complex 11 Protein of Plasmodium Falciparum Links Membrane Lipids with Cytoskeletal Element 'Actin' and Its Associated Motor 'Myosin.'" *International Journal of Biological Macromolecules* 126: 673–84. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.12.239>.
- Kundu, Tapas K, and Sweta Sikder. 2018. "Evolution of Genome Organization and Epigenetic Machineries." *Journal of Biosciences* 43 (2): 239–42. <https://doi.org/10.1007/s12038-018-9742-9>.
- Kupferschmid, Mattis, Moyira Osny Aquino-Gil, Hosam Shams-Eldin, Jörg Schmidt, Nao Yamakawa, Frédéric Krzewinski, Ralph T. Schwarz, and Tony Lefebvre. 2017. "Identification of O-GlcNAcylated Proteins in Plasmodium Falciparum." *Malaria Journal* 16 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2131-2>.
- Kwan, Jamie J., Neil Warner, Joban Maini, Kelvin W. Chan Tung, Hoshang Zakaria, Tony Pawson, and Logan W. Donaldson. 2006. "Saccharomyces Cerevisiae Ste50 Binds the MAPKKK Ste11 through a Head-to-Tail SAM Domain Interaction." *Journal of Molecular Biology* 356 (1): 142–54. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.012>.
- Lacampagne, Alain, Jérémy Fauconnier, and Sylvain Richard. 2008. "[Ryanodine Receptor and Heart Disease]." *Medecine Sciences : M/S* 24 (4): 399–405. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008244399>.
- Lad, C., N. H. Williams, and R. Wolfenden. 2003. "The Rate of Hydrolysis of Phosphomonoester Dianions and the Exceptional Catalytic Proficiencies of Protein and Inositol Phosphatases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (10): 5607–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.0631607100>.
- Lamarque, Mauld H., Sébastien Besteiro, Julien Papoin, Magali Roques, Brigitte Vulliez-Le Normand, Juliette Morlon-Guyot, Jean François Dubremetz, et al. 2011. "The RON2-AMA1 Interaction Is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites." *PLoS Pathogens* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>.
- Lamarque, Mauld H., Magali Roques, Marie Kong-Hap, Michelle L. Tonkin, George Rugarabamu, Jean Baptiste Marq, Diana M. Penarete-Vargas, Martin J. Boulanger, Dominique Soldati-Favre, and Maryse Lebrun. 2014. "Plasticity and Redundancy among AMA-RON Pairs Ensure Host Cell Entry of Toxoplasma Parasites." *Nature Communications* 5 (July): 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms5098>.

- LaMonte, Gregory, Katelyn A Walzer, Joshua Lacsina, Christopher Nicchitta, and Jen-Tsan Chi. 2015. "Methods to Investigate the Regulatory Role of Small RNAs and Ribosomal Occupancy of *Plasmodium Falciparum*." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 106: e53214. <https://doi.org/10.3791/53214>.
- LaRonde-LeBlanc, Nicole, and Alexander Wlodawer. 2005. "The RIO Kinases: An Atypical Protein Kinase Family Required for Ribosome Biogenesis and Cell Cycle Progression." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1754 (1–2): 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.037>.
- Lasonder, Edwin, Judith L. Green, Munira Grainger, Gordon Langsley, and Anthony A. Holder. 2015. "Extensive Differential Protein Phosphorylation as Intraerythrocytic *Plasmodium Falciparum* Schizonts Develop into Extracellular Invasive Merozoites." *Proteomics* 15 (15): 2716–29. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400508>.
- Lasonder, Edwin, Moritz Treeck, Mahmood Alam, and Andrew B. Tobin. 2012. "Insights into the *Plasmodium Falciparum* Schizont Phospho-Proteome." *Microbes and Infection* 14 (10): 811–19. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.04.008>.
- Lauer, Sabine, Jeffrey VanWye, Travis Harrison, Heather McManus, Benjamin U. Samuel, N. Luisa Hiller, Narla Mohandas, and Kasturi Haldar. 2000. "Vacuolar Uptake of Host Components, and a Role for Cholesterol and Sphingomyelin in Malarial Infection." *EMBO Journal* 19 (14): 3556–64. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.14.3556>.
- Laveran, Louis Alphonse. 1881. *Nature Parasitaire Des Accidents de l'impaludisme*. BnF Gallica. [https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k9761344p.r=laveran%2C nature parasitaire des accidents de l%27impaludisme?rk=21459;2](https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k9761344p.r=laveran%2C%20nature%20parasitaire%20des%20accidents%20de%20l'impaludisme?rk=21459;2).
- Lecointre, Céline, Valérie Simon, Clément Kerneur, Frédéric Allemand, Aurélie Fournet, Ingrid Montarras, Jean Luc Pons, et al. 2018. "Dimerization of the Pragmin Pseudo-Kinase Regulates Protein Tyrosine Phosphorylation." *Structure* 26 (4): 545–554.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.01.017>.
- Lenne, Astrid, Caroline De Witte, Géraldine Tellier, Thomas Hollin, El Moukhtar Aliouat, Alain Martoriati, Katia Cailliau, Jean-Michel Saliou, Jamal Khalife, and Christine Pierrot. 2018. "Characterization of a Protein Phosphatase Type-1 and a Kinase Anchoring Protein in *Plasmodium Falciparum*." *Frontiers in Microbiology* 9 (October): 2617. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02617>.
- Leroy, Catherine, Natalya V. Belkina, Thavy Long, Emeric Deruy, Colette Dissous, Stephen Shaw, and David Tulasne. 2016. "Caspase Cleavages of the Lymphocyte-Oriented Kinase Prevent Ezrin, Radixin, and Moesin Phosphorylation during Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 291 (19): 10148–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.721365>.
- Levine, Norman D. 1988. "Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa." *The Journal of Protozoology* 35 (4): 518–20. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1988.tb04141.x>.
- Li, Jie, Toshihide Mitamura, Barbara A. Fox, David J. Bzik, and Toshihiro Horii. 2002. "Differential Localization of Processed Fragments of *Plasmodium Falciparum* Serine Repeat Antigen and Further Processing of Its N-Terminal 47 KDa Fragment." *Parasitology International* 51 (4): 343–52. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(02\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(02)00042-9).
- Lodish, Harvey, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. 2000. "The Actin Cytoskeleton." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21493/>.
- Long, Manyuan, Sandro Jose de Souza, and Walter Gilbert. 1995. "Evolution of the Intron-Exon Structure of Eukaryotic Genes." *Current Opinion in Genetics and Development* 5 (6): 774–78.

[https://doi.org/10.1016/0959-437X\(95\)80010-3](https://doi.org/10.1016/0959-437X(95)80010-3).

- Lopaticki, Sash, Annie S.P. Yang, Alan John, Nichollas E. Scott, James P. Lingford, Matthew T. O'Neill, Sara M. Erickson, et al. 2017. "Protein O-Fucosylation in Plasmodium Falciparum Ensures Efficient Infection of Mosquito and Vertebrate Hosts." *Nature Communications* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00571-y>.
- Lorestani, Alexander, Douglas F. Ivey, Sivasakthivel Thirugnanam, Michele A. Busby, Gabor T. Marth, Iain M. Cheeseman, and Marc-Jan Gubbels. 2012. "Targeted Proteomic Dissection of Toxoplasma Cytoskeleton Sub- Compartments Using MORN1." *Cytoskeleton (Hoboken)* 69 (12): 1069–85. <https://doi.org/10.1002/cm.21077>.
- Lorestani, Alexander, Lilach Sheiner, Kevin Yang, Seth D. Robertson, Nivedita Sahoo, Carrie F. Brooks, David J.P. Ferguson, Boris Striepen, and Marc Jan Gubbels. 2010. "A Toxoplasma MORN1 Null Mutant Undergoes Repeated Divisions but Is Defective in Basal Assembly, Apicoplast Division and Cytokinesis." *PLoS ONE* 5 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012302>.
- Lover, Andrew A., J. Kevin Baird, Roly Gosling, and Ric N. Price. 2018. "Malaria Elimination: Time to Target All Species." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 99 (1): 17–23. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0869>.
- Low, Leanne M., Danielle I. Stanisic, and Michael F. Good. 2018. "Exploiting the Apicoplast: Apicoplast-Targeting Drugs and Malaria Vaccine Development." *Microbes and Infection* 20 (9–10): 477–83. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.12.005>.
- Lu, Junnan, Ying Tong, Jiaqiang Pan, Yijun Yang, Quan Liu, Xuefang Tan, Siting Zhao, Li Qin, and Xiaoping Chen. 2016. "A Redesigned CRISPR/Cas9 System for Marker-Free Genome Editing in Plasmodium Falciparum." *Parasites & Vectors* 9 (198). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1487-4>.
- Lu, Xueqing Maggie, Gayani Batugedara, Michael Lee, Jacques Prudhomme, Evelien M. Bunnik, and Karine G. Le Roch. 2017. "Nascent RNA Sequencing Reveals Mechanisms of Gene Regulation in the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Nucleic Acids Research* 45 (13): 7825–40. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx464>.
- Lucet, Isabelle S., Jeffrey J. Babon, and James M. Murphy. 2013. "Techniques to Examine Nucleotide Binding by Pseudokinases: Table 1." *Biochemical Society Transactions* 41 (4): 975–80. <https://doi.org/10.1042/BST20130075>.
- Lunghi, Matteo, Furio Spano, Alessandro Magini, Carla Emiliani, Vern B. Carruthers, and Manlio Di Cristina. 2016. "Alternative Splicing Mechanisms Orchestrating Post-Transcriptional Gene Expression: Intron Retention and the Intron-Rich Genome of Apicomplexan Parasites." *Current Genetics* 62 (1): 31–38. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0506-x>.
- Lupardus, P. J., M. Ultsch, H. Wallweber, P. Bir Kohli, A. R. Johnson, and C. Eigenbrot. 2014. "Structure of the Pseudokinase-Kinase Domains from Protein Kinase TYK2 Reveals a Mechanism for Janus Kinase (JAK) Autoinhibition." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (22): 8025–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401180111>.
- Luzolo, Ange Landela, and Dieudonné Mumba Ngoyi. 2019. "Cerebral Malaria." *Brain Research Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.010>.
- Ma, Hui, Ying Lou, Wen Hui Lin, and Hong Wei Xue. 2006. "MORN Motifs in Plant PIPKs Are Involved in the Regulation of Subcellular Localization and Phospholipid Binding." *Cell Research* 16 (5): 466–78. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310058>.
- Mair, Gunnar R., Edwin Lasonder, Lindsey S. Garver, Blandine M.D. Franke-Fayard, Céline K. Carret,

- Joop C.A.G. Wiegant, Roeland W. Dirks, George Dimopoulos, Chris J. Janse, and Andrew P. Waters. 2010. "Universal Features of Post-Transcriptional Gene Regulation Are Critical for Plasmodium Zygote Development." *PLoS Pathogens* 6 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000767>.
- Malaria Vaccine Initiative, Path. n.d. "AnAPN1 Antigen in Transmission- Blocking Vaccines." *Fact Sheet*, 2.
- Manning, G, D B Whyte, R Martinez, T Hunter, and S Sudarsanam. 2002. "The Protein Kinase Complement of the Human Genome." *Science (New York, N.Y.)* 298 (2000).
- Markus, Miles B. 2012. "Dormancy in Mammalian Malaria." *Trends in Parasitology* 28 (2): 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.005>.
- Martin, William, Tamas Rujan, Erik Richly, Andrea Hansen, Sabine Cornelsen, Thomas Lins, Dario Leister, Bettina Stoebe, Masami Hasegawa, and David Penny. 2002. "Evolutionary Analysis of Arabidopsis, Cyanobacterial, and Chloroplast Genomes Reveals Plastid Phylogeny and Thousands of Cyanobacterial Genes in the Nucleus." *PNAS* 99 (19): 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.182432999>.
- Maruthi, Mulaka, Dipti Singh, Segireddy Rameswara Reddy, Babu S. Mastan, Satish Mishra, and Kota Arun Kumar. 2017. "Modulation of Host Cell SUMOylation Facilitates Efficient Development of Plasmodium Berghei and Toxoplasma Gondii." *Cellular Microbiology* 19 (7): 1–13. <https://doi.org/10.1111/cmi.12723>.
- Mathews, Emily S., and Audrey R. Odom John. 2018. "Tackling Resistance: Emerging Antimalarials and New Parasite Targets in the Era of Elimination." *F1000Research* 7 (0): 1170. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14874.1>.
- Matthews, Holly, Craig W. Duffy, and Catherine J. Merrick. 2018. "Checks and Balances? DNA Replication and the Cell Cycle in Plasmodium." *Parasites and Vectors* 11 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2800-1>.
- Matthews, Kathryn M., Ethan L. Pitman, and Tania F. de Koning-Ward. 2019. "Illuminating How Malaria Parasites Export Proteins into Host Erythrocytes." *Cellular Microbiology*, e13009. <https://doi.org/10.1111/cmi.13009>.
- McFadden, Geoffrey Ian. 2018. "Plasmodium: More Don'ts." *Trends in Parasitology* 35 (1): 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.10.002>.
- McFadden, Geoffrey Ian, and Ellen Yeh. 2017. "The Apicoplast: Now You See It, Now You Don't." *International Journal for Parasitology* 47 (2–3): 137–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.08.005>.
- Meibalan, E., and M. Marti. 2017. "The Biology of Malaria Transmission." *Recent Advances in Malaria* 7: 87–124. <https://doi.org/10.1002/9781118493816.ch4>.
- Meibalan, Elamaran, Mary Ann Comunale, Ana M. Lopez, Lawrence W. Bergman, Anand Mehta, Akhil B. Vaidya, and James M. Burns. 2015. "Host Erythrocyte Environment Influences the Localization of Exported Protein 2, an Essential Component of the Plasmodium Translocon." *Eukaryotic Cell* 14 (4): 371–84. <https://doi.org/10.1128/EC.00228-14>.
- Meiselbach, Heike, Heinrich Sticht, and Ralf Enz. 2006. "Structural Analysis of the Protein Phosphatase 1 Docking Motif: Molecular Description of Binding Specificities Identifies Interacting Proteins." *Chemistry and Biology* 13 (1): 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.10.009>.
- Ménard, Robert, Joana Tavares, Ian Cockburn, Miles Markus, Fidel Zavala, and Rogerio Amino. 2013. "Looking under the Skin: The First Steps in Malarial Infection and Immunity." *Nature Reviews Microbiology* 11 (10): 701–12. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3111>.

- Meshnick, Steven R. 2002. "Artemisinin: Mechanisms of Action, Resistance and Toxicity." *International Journal for Parasitology* 32: 1655–60. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00194-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00194-7).
- Miller, Louis H, Dror I Baruch, Kevin Marsh, and Ogobara K Doumbo. 2002. "The Pathogenic Basis of Malaria" 415 (February): 673–79.
- Miller, Susanne K., Robert T. Good, Damien R. Drew, Mauro Delorenzi, Paul R. Sanders, Anthony N. Hodder, Terence P. Speed, Alan F. Cowman, Tania F. De Koning-Ward, and Brendan S. Crabb. 2002. "A Subset of Plasmodium Falciparum SERA Genes Are Expressed and Appear to Play an Important Role in the Erythrocytic Cycle." *Journal of Biological Chemistry* 277 (49): 47524–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206974200>.
- Milner, Danny A. Jr. 2018. "Malaria Pathogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>.
- Milton, Morgan E., and Scott W. Nelson. 2016. "Replication and Maintenance of the Plasmodium Falciparum Apicoplast Genome." *Molecular and Biochemical Parasitology* 208 (2): 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.06.006>.
- Min, Xiaoshan, Byung Hoon Lee, Melanie H. Cobb, and Elizabeth J. Goldsmith. 2004. "Crystal Structure of the Kinase Domain of WNK1, a Kinase That Causes a Hereditary Form of Hypertension." *Structure* 12 (7): 1303–11. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.04.014>.
- Mitcheson, Deborah F., Andrew B. Tobin, and Mahmood M. Alam. 2015. "Applying Chemical Genetic Tools to the Study of Phospho-Signalling Pathways in Malaria Parasites." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1854 (10): 1650–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.06.014>.
- Möbitz, Henrik. 2015. "The ABC of Protein Kinase Conformations." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1854 (10): 1555–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.03.009>.
- Modrzyńska, Katarzyna, Claudia Pfander, Lia Chappell, Lu Yu, Catherine Suarez, Kirsten Dundas, Ana Rita Gomes, et al. 2017. "A Knockout Screen of ApiAP2 Genes Reveals Networks of Interacting Transcriptional Regulators Controlling the Plasmodium Life Cycle." *Cell Host & Microbe* 21 (1): 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.003>.
- Monroe, April, Sarah Moore, Hannah Koenker, Matthew Lynch, and Emily Ricotta. 2019. "Measuring and Characterizing Night Time Human Behaviour as It Relates to Residual Malaria Transmission in Sub-Saharan Africa: A Review of the Published Literature." *Malaria Journal* 18 (1): 6. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2638-9>.
- Moore, Robert B., Miroslav Oborník, Jan Janouškovec, Tomáš Chrudimský, Marie Vancová, David H. Green, Simon W. Wright, et al. 2008. "A Photosynthetic Alveolate Closely Related to Apicomplexan Parasites." *Nature* 451 (7181): 959–63. <https://doi.org/10.1038/nature06635>.
- Mordmüller, Benjamin, Mihály Sulyok, Diane Egger-Adam, Mafalda Resende, Willem A. de Jongh, Mette H. Jense, Helle Holm Smedegaard, et al. 2019. "First-in-Human, Randomized, Double-Blind Clinical Trial of Differentially Adjuvanted PAMVAC, a Vaccine Candidate to Prevent Pregnancy-Associated Malaria." *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1140>.
- Mordue, Dana G, Naishadh Desai, Michael Dustin, and L David Sibley. 1999. "Proteins on the Basis of Their Membrane Anchoring." *J. Exp. Med* 190 (12): 1783–92.
- Morgan, David O. 1995. "Principles of CDK Regulation." *Nature* 374 (6518): 131–34.
- Morita, Masayuki, Hikaru Nagaoka, Edward H. Ntege, Bernard N. Kanoi, Daisuke Ito, Takahiro Nakata, Ji Won Lee, et al. 2018. "PV1, a Novel Plasmodium Falciparum Merozoite Dense Granule Protein, Interacts with Exported Protein in Infected Erythrocytes." *Scientific Reports* 8 (1): 1–11.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22026-0>.

- Morrisette, Naomi S., and David L. Sibley. 2002. "Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites." *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* 66 (1): 21–38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>.
- Mossessova, Elena, Richard A. Corpina, and Jonathan Goldberg. 2003. "Crystal Structure of ARF1•Sec7 Complexed with Brefeldin A and Its Implications for the Guanine Nucleotide Exchange Mechanism." *Molecular Cell* 12 (6): 1403–11. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00475-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00475-1).
- Moura, Margarida, Mariana Osswald, Nelson Leça, João Barbosa, António J. Pereira, Helder Maiato, Claudio E. Sunkel, and Carlos Conde. 2017. "Protein Phosphatase 1 Inactivates Mps1 to Ensure Efficient Spindle Assembly Checkpoint Silencing." *ELife* 6: 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.25366>.
- Mukherjee, Konark, Manu Sharma, Henning Urlaub, Gleb P Bourenkov, Thomas C Südhof, and Markus C Wahl. 2008. "CASK Functions as a Mg²⁺-Independent Neurexin Kinase." *Cell* 133 (2): 328–39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.036>.CASK.
- Mundwiler-Pachlatko, E., and H.-P. Beck. 2013. "Maurer's Clefts, the Enigma of Plasmodium Falciparum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (50): 19987–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309247110>.
- Munton, Richard P., Sándor Vizi, and Isabelle M. Mansuy. 2004. "The Role of Protein Phosphatase-1 in the Modulation of Synaptic and Structural Plasticity." *FEBS Letters* 567 (1): 121–28. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.121>.
- Murphy, James M., Qingwei Zhang, Samuel N. Young, Michael L. Reese, Fiona P. Bailey, Patrick A. Eyers, Daniela Ungureanu, et al. 2014. "A Robust Methodology to Subclassify Pseudokinases Based on Their Nucleotide-Binding Properties." *Biochemical Journal* 457 (2): 323–34. <https://doi.org/10.1042/BJ20131174>.
- Nasa, Isha, Scott F. Rusin, Arminja N. Kettenbach, and Greg B. Moorhead. 2018. "Aurora B Opposes PP1 Function in Mitosis by Phosphorylating the Conserved PP1-Binding RVxF Motif in PP1 Regulatory Proteins." *Science Signaling* 11 (530). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aai8669>.
- Newton, R C. 1895. "Some Observations Which Appear to Establish the Aërial Transportation of Malarial Germs. [Http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed/21409107](http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed/21409107)." *Transactions of the American Climatological Association for the Year ... American Climatological Association* 11: 91–111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21409107>.
- Ngoubangoye, Barthélémy, Larson Boundenga, Céline Arnathau, Illich Manfred Mombo, Patrick Durand, Thierry Audrey Tsoumbou, Bertony Vacky Otoro, et al. 2016. "The Host Specificity of Ape Malaria Parasites Can Be Broken in Confined Environments." *International Journal for Parasitology* 46 (11): 737–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.06.004>.
- Nguyen, Anthony T, Miguel A Prado, Paul J Schmidt, Anoop T Sendamarai, Joshua T. Wilson-Grady, Mingwei Min, Dean R Campagna, et al. 2017. "UBE2O Remodels the Proteome during Terminal Erythroid Differentiation." *Science* 357 (6350): 1–22. <https://doi.org/10.1126/science.aan0218>.
- Niz, Mariana De, Elamaran Meibalan, Pedro Mejia, Siyuan Ma, Nicolas M.B. Brancucci, Carolina Agop-Nersesian, Rebecca Mandt, et al. 2018. "Plasmodium Gametocytes Display Homing and Vascular Transmigration in the Host Bone Marrow." *Science Advances* 4 (5): 1–16. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat3775>.
- Nolen, Brad, Susan Taylor, and Gourisankar Ghosh. 2004. "Regulation of Protein Kinases: Controlling Activity through Activation Segment Conformation." *Molecular Cell* 15 (5): 661–75.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.024>.

- Nunes, Marta C., Mami Okada, Christine Scheidig-Benatar, Brian M. Cooke, and Artur Scherf. 2010. "Plasmodium Falciparum Fick Kinase Members Target Distinct Components of the Erythrocyte Membrane." *PLoS ONE* 5 (7): 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011747>.
- Oborník, Miroslav, David Modrý, Martin Lukeš, Eva Černotíková-Stříbrná, Jaromír Cihlář, Martina Tesařová, Eva Kotabová, Marie Vancová, Ondřej Prášil, and Julius Lukeš. 2012. "Morphology, Ultrastructure and Life Cycle of Vitrella Brassicaformis n. Sp., n. Gen., a Novel Chromerid from the Great Barrier Reef." *Protist* 163 (2): 306–23. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.09.001>.
- Ogola, Edwin, Jandouwe Villinger, Danspaid Mabuka, David Omondi, Benedict Orindi, James Mutunga, Vincent Owino, and Daniel K. Masiga. 2017. "Composition of Anopheles Mosquitoes, Their Blood-Meal Hosts, and Plasmodium Falciparum Infection Rates in Three Islands with Disparate Bed Net Coverage in Lake Victoria, Kenya." *Malaria Journal* 16 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2015-5>.
- Palapac, Nirianne Marie Q., Edward Ntege, Adoke Yeka, Betty Balikagala, Nahoko Suzuki, Hiroki Shirai, Masanori Yagi, et al. 2013. "Phase 1b Randomized Trial and Follow-Up Study in Uganda of the Blood-Stage Malaria Vaccine Candidate BK-SE36." *PLoS ONE* 8 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064073>.
- Palapac, Nirianne Marie Q., Nobuko Arisue, Takahiro Tougan, Ken J. Ishii, and Toshihiro Horii. 2011. "Plasmodium Falciparum Serine Repeat Antigen 5 (SE36) as a Malaria Vaccine Candidate." *Vaccine* 29 (35): 5837–45. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.052>.
- Paloque, Lucie, Benoit Witkowski, Joël Lelièvre, Manel Ouji, Tanila Ben Haddou, Frédéric Arieu, Anne Robert, et al. 2017. "Endoperoxide-Based Compounds: Cross-Resistance with Artemisinins and Selection of a Plasmodium Falciparum Lineage with a K13 Non-Synonymous Polymorphism." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, no. November 2017: 395–403. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx412>.
- Pandey, Rajan, Asif Mohammed, Christine Pierrot, Jamal Khalife, Pawan Malhotra, and Dinesh Gupta. 2014. "Genome Wide in Silico Analysis of Plasmodium Falciparum Phosphatome." *BMC Genomics* 15 (1): 1–22. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1024>.
- Pang, Xin Li, and Toshihiro Horii. 1998. "Complement-Mediated Killing of Plasmodium Falciparum Erythrocytic Schizont with Antibodies to the Recombinant Serine Repeat Antigen (SERA)." *Vaccine* 16 (13): 1299–1305. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00057-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00057-7).
- Pang, Xin Li, Toshihide Mitamura, and Toshihiro Horii. 1999. "Antibodies Reactive with the N-Terminal Domain of Plasmodium Falciparum Serine Repeat Antigen Inhibit Cell Proliferation by Agglutinating Merozoites and Schizonts." *Infection and Immunity* 67 (4): 1821–27.
- Park, Choon-Ho, Hye Guk Ryu, Seong-Hoon Kim, Dohyun Lee, Haengjin Song, and Kyong-Tai Kim. 2015. "Presumed Pseudokinase VRK3 Functions as a BAF Kinase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853 (7): 1738–48. <https://doi.org/10.1016/j.BBAMCR.2015.04.007>.
- Paul, Gourab, Arunaditya Deshmukh, Inderjeet Kaur, Sumit Rathore, Surbhi Dabral, Ashutosh Panda, Susheel Kumar Singh, Asif Mohammed, Michael Theisen, and Pawan Malhotra. 2017. "A Novel Pfs38 Protein Complex on the Surface of Plasmodium Falciparum Blood-Stage Merozoites." *Malaria Journal* 16 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1716-0>.
- Paulick, Margot G, and Carolyn R Bertozzi. 2008. "The Glycosylphosphatidylinositol Anchor : A Complex Membrane-Anchoring." *Biochemistry* 47: 6991–7000. <https://doi.org/10.1021/bi8006324>.

- Pease, Brittany N., Edward L. Huttlin, Mark P. Jedrychowski, Eric Talevich, John Harmon, Timothy Dillman, Natarajan Kannan, et al. 2013. "Global Analysis of Protein Expression and Phosphorylation of Three Stages of Plasmodium Falciparum Intraerythrocytic Development." *Journal of Proteome Research* 12 (9): 4028–45. <https://doi.org/10.1021/pr400394g>.
- Peixoto, Lucia, Feng Chen, Omar S. Harb, Paul H. Davis, Daniel P. Beiting, Catie Small Brownback, Dinkorma Ouloguem, and David S. Roos. 2010. "Integrative Genomic Approaches Highlight a Family of Parasite-Specific Kinases That Regulate Host Responses." *Cell Host & Microbe* 8 (2): 208–18. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2010.07.004>.
- Pérez-Gallegos, Ajax, Mireia Garcia-Viloca, Àngels González-Lafont, and José M. Lluch. 2014. "A QM/MM Study of the Associative Mechanism for the Phosphorylation Reaction Catalyzed by Protein Kinase A and Its D166A Mutant." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 28 (11): 1077–91. <https://doi.org/10.1007/s10822-014-9786-3>.
- Perry, George H. 2014. "Parasites and Human Evolution." *Evolutionary Anthropology* 23 (6): 218–28. <https://doi.org/10.1002/evan.21427>.
- Petithory, Jean-Claude. 1995. "A Propos de La Découverte de l'hématozoaire Du Paludisme Par A. Laveran Bône 1878 -Constantine 1880*." *Histoire Des Sciences Medicales* 1: 57. <http://www.biusante.parisdescartes.fr/sfhm/hsm/HSMx1995x029x001/HSMx1995x029x001x0057.pdf>.
- Philip, Nisha, and Andrew P. Waters. 2015. "Conditional Degradation of Plasmodium Calcineurin Reveals Functions in Parasite Colonization of Both Host and Vector." *Cell Host and Microbe* 18 (1): 122–31. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.018>.
- Phillips, Margaret A., Jeremy N. Burrows, Christine Manyando, Rob Hooft van Huijsduijnen, Wesley C. Van Voorhis, and Timothy N. C. Wells. 2017. "Malaria." *Nature Reviews - Disease Primers* 3 (17050). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>.
- Pierrot, Christine, Aline Freville, Christophe Olivier, Vianney Souplet, and Jamal Khalife. 2012. "Inhibition of Protein-Protein Interactions in Plasmodium Falciparum: Future Drug Targets." *Current Pharmaceutical Design* 18 (24): 3522–30. <https://doi.org/10.2174/138161212801327329>.
- Pierrot, Christine, Xiguang Zhang, Gigliola Zanghi, Aline Fréville, Angelita Rebollo, and Jamal Khalife. 2018. "Peptides Derived from Plasmodium Falciparum Leucine-Rich Repeat 1 Bind to Serine/Threonine Phosphatase Type 1 and Inhibit Parasite Growth in Vitro." *Drug Design, Development and Therapy* Volume 12: 85–88. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S153095>.
- Planson, Anne Gaëlle, J. Iñaki Guijarro, Michel E. Goldberg, and Alain F. Chaffotte. 2003. "Assistance of Maltose Binding Protein to the in Vivo Folding of the Disulfide-Rich C-Terminal Fragment from Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Protein 1 Expressed in Escherichia Coli." *Biochemistry* 42 (45): 13202–11. <https://doi.org/10.1021/bi035321c>.
- Ponder, Elizabeth L., Victoria E. Albrown, Brittany A. Leader, Miklós Békés, Jowita Mikolajczyk, Urša Pečar Fonović, Aimee Shen, et al. 2011. "Functional Characterization of a SUMO Deconjugating Protease of Plasmodium Falciparum Using Newly Identified Small Molecule Inhibitors." *Chem Biol.* 18 (6): 711–21. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.04.010.Functional>.
- Ponting, Christopher P. 1995. "SAM: A Novel Motif in Yeast Sterile and Drosophila Polyhomeotic." *Molecular And General Genetics*, 1928–30.
- Ponts, Nadia, Anita Saraf, Duk-Wong D. Chung, Alona Harris, Jacques Prudhomme, Michael P. Washburn, Laurence Florens, and Le. 2011. "Unraveling the Ubiquitome of the Human Malaria Parasite." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (46): 40320–30.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238790>.

- Poran, Asaf, Christopher Nötzel, Omar Aly, Nuria Mencia-trinchant, T. Harris Chantal, Monica L. Guzman, Duane C. Hassane, Olivier Elemento, and Weill Cornell. 2017. "Single-Cell RNA-Seq Reveals a Signature of Sexual Commitment in Malaria Parasites." *Nature* 551 (7678): 95–99. <https://doi.org/10.1038/nature24280>. Single-cell.
- Pradel, Gabriele, and Ute Frevert. 2001. "Malaria Sporozoites Actively Enter and Pass through Rat Kupffer Cells Prior to Hepatocyte Invasion." *Hepatology* 33 (5): 1154–65. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.24237>.
- Prommana, Parichat, Chairat Uthaiipibull, Chayaphat Wongsombat, Sumalee Kamchonwongpaisan, Yongyuth Yuthavong, Ellen Knuepfer, Anthony A. Holder, and Philip J. Shaw. 2013. "Inducible Knockdown of Plasmodium Gene Expression Using the GlmS Ribozyme." *PLoS ONE* 8 (8): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073783>.
- Przyborski, Jude M., Susanne K. Miller, Judith M. Pfahler, Philipp P. Henrich, Petra Rohrbach, Brendan S. Crabb, and Michael Lanzer. 2005. "Trafficking of STEVOR to the Maurer's Clefts in Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes." *EMBO Journal* 24 (13): 2306–17. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600720>.
- Przyborski, Jude M., Britta Nyboer, and Michael Lanzer. 2016. "Ticket to Ride: Export of Proteins to the Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocyte." *Molecular Microbiology* 101 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1111/mmi.13380>.
- Pulcini, Serena, Henry M. Staines, Andrew H. Lee, Sarah H. Shafik, Guillaume Bouyer, Catherine M. Moore, Daniel A. Daley, et al. 2015. "Mutations in the Plasmodium Falciparum Chloroquine Resistance Transporter, PfCRT, Enlarge the Parasite's Food Vacuole and Alter Drug Sensitivities." *Scientific Reports* 5 (August): 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep14552>.
- Putrianti, Elyzana D., Anja Schmidt-Christensen, Iris Arnold, Volker T. Heussler, Kai Matuschewski, and Olivier Silvie. 2010. "The Plasmodium Serine-Type SERA Proteases Display Distinct Expression Patterns and Non-Essential in Vivo Roles during Life Cycle Progression of the Malaria Parasite." *Cellular Microbiology* 12 (6): 725–39. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01419.x>.
- Qiao, Feng, and James U. Bowie. 2005. "The Many Faces of SAM." *Science's STKE* 123 (6): 993–99. <https://doi.org/10.1126/stke.2862005re7>.
- Ragusa, Michael J., Barbara Dancheck, David A. Critton, Angus C. Nairn, Rebecca Page, and Wolfgang Peti. 2010. "Spinophilin Directs Protein Phosphatase 1 Specificity by Blocking Substrate Binding Sites." *Nature Structural Molecular Biology* 17 (4): 459–64. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1786>.
- Ralph, Stuart A., Giel G. van Dooren, Ross F. Waller, Michael J. Crawford, Martin J. Fraunholz, Bernardo J. Foth, Christopher J. Tonkin, David S. Roos, and Geoffrey I. McFadden. 2004. "Metabolic Maps and Functions of the Plasmodium Falciparum Apicoplast." *Nature Reviews Microbiology* 2 (3): 203–16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro843>.
- Ramachander, Ranjini, and James U. Bowie. 2004. "SAM Domains Can Utilize Similar Surfaces for the Formation of Polymers and Closed Oligomers." *Journal of Molecular Biology* 342 (5): 1353–58. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.011>.
- Rebelo, Sandra, Mariana Santos, Filipa Martins, Edgar F. da Cruz e Silva, and Odete A.B. da Cruz e Silva. 2015. "Protein Phosphatase 1 Is a Key Player in Nuclear Events." *Cellular Signalling* 27 (12): 2589–98. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.08.007>.
- Reddy, BP. Niranjana, Sony Shrestha, Kevin J. Hart, Xiaoying Liang, Karen Kemirembe, Liwang Cui, and

- Scott E. Lindner. 2015. "A Bioinformatic Survey of RNA-Binding Proteins in Plasmodium." *BMC Genomics* 16 (1): 1–26. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2092-1>.
- Reese, Michael L., and John C. Boothroyd. 2011. "A Conserved Non-Canonical Motif in the Pseudoactive Site of the ROP5 Pseudokinase Domain Mediates Its Effect on Toxoplasma Virulence." *Journal of Biological Chemistry* 286 (33): 29366–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253435>.
- Reese, Michael L., and Jon P. Boyle. 2012. "Virulence without Catalysis: How Can a Pseudokinase Affect Host Cell Signaling?" *Trends in Parasitology* 28 (2): 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.12.004>.
- Reese, Michael L., Shah, and John C. Boothroyd. 2014. "The Toxoplasma Pseudokinase ROP5 Is an Allosteric Inhibitor of the Immunity-Related GTPases." *Journal of Biological Chemistry* 289 (40): 27849–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567057>.
- Reid, Adam J., Arthur M. Talman, Hayley M. Bennett, Ana R. Gomes, Mandy J. Sanders, Christopher J.R. Illingworth, Oliver Billker, Matthew Berriman, and Mara K.N. Lawniczak. 2018. "Single-Cell RNA-Seq Reveals Hidden Transcriptional Variation in Malaria Parasites." *ELife* 7: 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.33105>.
- Resh, Marilyn D. 2006. "Trafficking and Signaling by Fatty-Acylated and Prenylated Proteins." *Nature Chemical Biology* 2 (11): 584–90. <https://doi.org/10.1038/nchembio834>.
- Richter, Joachim, Gabriele Franken, Martha C. Holtfreter, Susanne Walter, Alfons Labisch, and Heinz Mehlhorn. 2016. "Clinical Implications of a Gradual Dormancy Concept in Malaria." *Parasitology Research* 115 (6): 2139–48. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5043-0>.
- Risco-Castillo, Veronica, Selma Topçu, Carine Marinach, Giulia Manzoni, Amélie E. Bigorgne, Sylvie Briquet, Xavier Baudin, Maryse Lebrun, Jean François Dubremetz, and Olivier Silvie. 2015. "Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles." *Cell Host and Microbe* 18 (5): 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.006>.
- Rivkin, Anna, Sharon Ben-Hur, and Neta Regev-Rudzki. 2017. "Malaria Parasites Distribute Subversive Messages across Enemy Lines." *Trends in Parasitology* 33 (1): 2–4. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.005>.
- Roberts, Leslie. 2017. "Drug-Resistant Malaria Advances in Mekong." *Science Mag* 358 (6360): 155–56. <https://doi.org/10.1126/science.358.6360.155>.
- Rogerson, Stephen, Lars Hviid, Patrick E. Duffy, Rose F. G. Leke, and Diane W. Taylor. 2007. "Malaria in Pregnancy: Pathogenesis and Immunity." *Lancet Infectious Diseases* 7: 105–11. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70022-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70022-1).
- Ross, Ronald. 1898. "Report on the Cultivation of Proteosoma, Labbé, in Grey Mosquito - Concluded from Page 408." *The Indian Medical Gazette*, 1898.
- 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." *The Lancet* 386 (9988): 31–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8).
- Russell, Paul F. 1943. "Malaria and Its Influence on World Health." *Bulletin of the New York Academy of Medicine*.
- Sabbatani, Sergio, Roberto Manfredi, and Sirio Fiorino. 2010. "Malaria Infection and Human Evolution." *Le Infezioni in Medicina* 1: 56–74.
- Saïssy, Jean-Marie. 2001. *Paludisme Grave*. ARNETTE GR. Rueil-Malmaison.

- Sampaio, Natalia Guimaraes, Lesley Cheng, and Emily M. Eriksson. 2017. "The Role of Extracellular Vesicles in Malaria Biology and Pathogenesis." *Malaria Journal* 16 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1891-z>.
- Samuel, Benjamin U., Narla Mohandas, Travis Harrison, Heather McManus, Wendell Rosse, Marion Reid, and Kasturi Haldar. 2001. "The Role of Cholesterol and Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins of Erythrocyte Rafts in Regulating Raft Protein Content and Malarial Infection." *Journal of Biological Chemistry* 276 (31): 29319–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101268200>.
- Scheeff, Eric D, Jeyanthi Eswaran, Gabor Bunkoczi, Stefan Knapp, and Gerard Manning. 2009. "Structure of the Pseudokinase VRK3 Reveals a Degraded Catalytic Site, a Highly Conserved Kinase Fold, and a Putative Regulatory Binding Site." *Structure (London, England: 1993)* 17 (1): 128–38. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.018>.
- Seydel, Karl B., Samuel D. Kampondeni, Clarissa Valim, Michael J. Potchen, Danny A. Milner, Francis W. Muwalo, Gretchen L. Birbeck, et al. 2015. "Brain Swelling and Death in Children with Cerebral Malaria." *New England Journal of Medicine* 372 (12): 1126–37. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400116>.
- Sharma, Amit, Indu Sharma, Darin Kogkasuriyachai, and Nirbhay Kumar. 2003. "Structure of a Gametocyte Protein Essential for Sexual Development in *Plasmodium Falciparum*." *Nature Structural Biology* 10 (3): 197–203. <https://doi.org/10.1038/nsb899>.
- Sharma, Drista, Rani Soni, Praveen Rai, Bhaskar Sharma, and Tarun Kumar Bhatt. 2018. "Relict Plastidic Metabolic Process as a Potential Therapeutic Target." *Drug Discovery Today* 23 (1): 134–40. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.019>.
- Sharma, Pushkar, and Chetan E. Chitnis. 2013. "Key Molecular Events during Host Cell Invasion by Apicomplexan Pathogens." *Current Opinion in Microbiology* 16 (4): 432–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.004>.
- Shaw, Andrey S., Alexandr P. Kornev, Jiancheng Hu, Lalima G. Ahuja, and Susan S. Taylor. 2014. "Kinases and Pseudokinases: Lessons from RAF." *Molecular and Cellular Biology* 34 (9): 1538–46. <https://doi.org/10.1128/MCB.00057-14>.
- Shears, Melanie J., Cyrille Y. Botté, and Geoffrey I. McFadden. 2015. "Fatty Acid Metabolism in the *Plasmodium* Apicoplast: Drugs, Doubts and Knockouts." *Molecular and Biochemical Parasitology* 199 (1–2): 34–50. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.03.004>.
- Shi, Fumin, Shannon E. Telesco, Yingting Liu, Ravi Radhakrishnan, and Mark A. Lemmon. 2010. "ErbB3/HER3 Intracellular Domain Is Competent to Bind ATP and Catalyze Autophosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (17): 7692–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002753107>.
- Sibley, David L. 2011. "Invasion and Intracellular Survival by Protozoan Parasites." *Immunological Reviews* 240 (1): 72–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x>.
- Sicard, Audrey, Jean Philippe Semblat, Caroline Doerig, Romain Hamelin, Marc Moniatte, Dominique Dorin-Semblat, Julie A. Spicer, et al. 2011. "Activation of a PAK-MEK Signalling Pathway in Malaria Parasite-Infected Erythrocytes." *Cellular Microbiology* 13 (6): 836–45. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01582.x>.
- Silva Junior, Geraldo Bezerra da, José Reginaldo Pinto, Elvino José Guardao Barros, Geysa Maria Nogueira Farias, and Elizabeth De Francesco Daher. 2017. "Kidney Involvement in Malaria: An Update." *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, no. December 2016: 1–6. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759053>.

- Simon, Bertrand, Anne Sophie Huart, and Matthias Wilmanns. 2015. "Molecular Mechanisms of Protein Kinase Regulation by Calcium/Calmodulin." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 23 (12): 2749–60. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.051>.
- Sinha, Abhinav, Katie R Hughes, Katarzyna K Modrzynska, Thomas D Otto, Nicholas J Dickens, Agnieszka A Religa, Ellen Bushell, et al. 2014. "A Cascade of DNA Binding Proteins for Sexual Commitment and Development in Plasmodium." *Nature* 507 (7491): 253–57. <https://doi.org/10.1038/nature12970>.
- Smith, Ryan C., Jonas G. King, Dingyin Tao, Oana A. Zeleznik, Clara Brando, Gerhard G. Thallinger, and Rhoel R. Dinglasan. 2016. "Molecular Profiling of Phagocytic Immune Cells in *Anopheles Gambiae* Reveals Integral Roles for Hemocytes in Mosquito Innate Immunity." *Molecular & Cellular Proteomics* 15 (11): 3373–87. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.060723>.
- Sodero, Ana Carolina Rennó, Bárbara Abraham-Vieira, Pedro Henrique Monteiro Torres, Pedro Geraldo Pascutti, Célia R.S. Garcia, Vitor Francisco Ferreira, David Rodrigues da Rocha, Sabrina Baptista Ferreira, and Floriano Paes Silva. 2017. "Insights into Cytochrome Bc1 Complex Binding Mode of Antimalarial 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones through Molecular Modelling." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 112 (4): 299–308. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160417>.
- Soldati-Favre, Dominique, Bernardo J. Foth, and Alan F. Cowman. 2004. "Molecular and Functional Aspects of Parasite Invasion." *Trends in Parasitology* 20 (12). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.09.009>.
- Sologub, Ludmilla, Andrea Kuehn, Selina Kern, Jude Przyborski, Rebecca Schillig, and Gabriele Pradel. 2011. "Malaria Proteases Mediate Inside-out Egress of Gametocytes from Red Blood Cells Following Parasite Transmission to the Mosquito." *Cellular Microbiology* 13 (6): 897–912. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01588.x>.
- Solyakov, Lev, Jean Halbert, Mahmood M. Alam, Jean Philippe Semblat, Dominique Dorin-Semblat, Luc Reininger, Andrew R. Bottrill, et al. 2011. "Global Kinomic and Phospho-Proteomic Analyses of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Nature Communications* 2 (1): 512–65. <https://doi.org/10.1038/ncomms1558>.
- Spillman, Natalie J., Josh R. Beck, and Daniel E. Goldberg. 2015. "Protein Export into Malaria Parasite-Infected Erythrocytes: Mechanisms and Functional Consequences." *Annual Review of Biochemistry* 84 (1): 813–41. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034157>.
- Sreelatha, Anju, Samantha S. Yee, Victor A. Lopez, Brenden C. Park, Lisa N. Kinch, Sylwia Pilch, Kelly A. Servage, et al. 2018. "Protein AMPylation by an Evolutionarily Conserved Pseudokinase." *Cell* 175 (3): 809–821.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.046>.
- Stallmach, Robert, Manoli Kavishwar, Chrislaine Withers-Martinez, Fiona Hackett, Christine R. Collins, Steven A. Howell, Sharon Yeoh, et al. 2015. "Plasmodium Falciparum SERA5 Plays a Non-Enzymatic Role in the Malarial Asexual Blood-Stage Lifecycle." *Molecular Microbiology* 96 (2): 368–87. <https://doi.org/10.1111/mmi.12941>.
- Stancik, Ivan Andreas, Martin Sebastijan Šestak, Boyang Ji, Marina Axelson-Fisk, Damjan Franjevic, Carsten Jers, Tomislav Domazet-Lošo, and Ivan Mijakovic. 2018. "Serine/Threonine Protein Kinases from Bacteria, Archaea and Eukarya Share a Common Evolutionary Origin Deeply Rooted in the Tree of Life." *Journal of Molecular Biology* 430 (1): 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.11.004>.
- Stapleton, D., I. Balan, T. Pawson, and F. Sicheri. 1999. "The Crystal Structure of an Eph Receptor SAM Domain Reveals a Mechanism for Modular Dimerization." *Nature Structural Biology* 6 (1): 44–49. <https://doi.org/10.1038/4917>.

- Tadesse, Fitsum G., Lisette Meerstein-Kessel, Bronner P. Gonçalves, Chris Drakeley, Lisa Ranford-Cartwright, and Teun Bousema. 2018. "Gametocyte Sex Ratio: The Key to Understanding Plasmodium Falciparum Transmission?" *Trends in Parasitology* xx: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.12.001>.
- Takeshima, Hiroshi, Shinji Komazaki, Miyuki Nishi, Masamitsu Iino, and Kenji Kangawa. 2000. "Junctophilins: A Novel Family of Junctional Membrane Complex Proteins." *Molecular Cell* 6 (1): 11–22. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00003-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00003-4).
- Talevich, Eric, Natarajan Kannan, and Diego Miranda-Saavedra. 2013. "Current Classification of Apicomplexan Kinomes." In *Protein Phosphorylation in Parasites*, edited by Christian Doerig, Gerald Späth, Martin Wiese, and Paul M. Selzer, Wiley Blac, 19–22.
- Talevich, Eric, Amar Mirza, and Natarajan Kannan. 2011. "Structural and Evolutionary Divergence of Eukaryotic Protein Kinases in Apicomplexa." *BMC Evolutionary Biology* 11 (1): 321. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-321>.
- Talevich, Eric, Andrew B. Tobin, Natarajan Kannan, and Christian Doerig. 2012. "An Evolutionary Perspective on the Kinome of Malaria Parasites." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (1602): 2607–18. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0014>.
- Tannous, Stephanie, and Esther Ghanem. 2018. "A Bite to Fight: Front-Line Innate Immune Defenses against Malaria Parasites." *Pathogens and Global Health* 112 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1429847>.
- Tao, Dingyin, Brent McGill, Timothy Hamerly, Tamaki Kobayashi, Prachi Khare, Amanda Dziedzic, Tomasz Leski, et al. 2019. "A Saliva-Based Rapid Test to Quantify the Infectious Subclinical Malaria Parasite Reservoir." *Science Translational Medicine* 11 (January). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan4479>.
- Taylor, Susan S., Malik M. Keshwani, Jon M. Steichen, and Alexandr P. Kornev. 2012. "Evolution of the Eukaryotic Protein Kinases as Dynamic Molecular Switches." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (1602): 2517–28. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0054>.
- Taylor, Susan S., and Alexandr P Kornev. 2011. "Protein Kinases: Evolution of Dynamic Regulatory Proteins." *Trends in Biochemical Sciences* 36 (2): 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006>.
- Tellier, Géraldine, Astrid Lenne, Katia Cailliau-Maggio, Alejandro Cabezas-Cruz, James J. Valdés, Alain Martoriat, El M. Aliouat, et al. 2016. "Identification of Plasmodium Falciparum Translation Initiation EIF2 β Subunit: Direct Interaction with Protein Phosphatase Type 1." *Frontiers in Microbiology* 7 (MAY): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00777>.
- Tewari, Rita, Ursula Straschil, Alex Bateman, Ulrike Böhme, Inna Cherevach, Peng Gong, Arnab Pain, and Oliver Billker. 2010. "The Systematic Functional Analysis of Plasmodium Protein Kinases Identifies Essential Regulators of Mosquito Transmission." *Cell Host and Microbe* 8 (4): 377–87. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.006>.
- Thavayogarajah, Thuvaraka, Preetish Gangopadhyay, Stefan Rahlfs, Katja Becker, Klaus Lingelbach, Jude M. Przyborski, and Anthony A. Holder. 2015. "Alternative Protein Secretion in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *PLoS ONE* 10 (4): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125191>.
- Thompson, Elaine E., Alexandr P. Kornev, Natarajan Kannan, Choel Kim, Lynn F. Ten Eyck, and Susan S. Taylor. 2009. "Comparative Surface Geometry of the Protein Kinase Family." *Protein Science* 18 (10): 2016–26. <https://doi.org/10.1002/pro.209>.

- Tonkin, Christopher J, Bernardo J Foth, Stuart A Ralph, Nicole Struck, Alan F Cowman, and Geoffrey I Mcfadden. 2008. "Evolution of Malaria Parasite Plastid Targeting Sequences." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (12): 4781–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707827105>.
- Tonkin, Michelle L., Magali Roques, Mauld H. Lamarque, Martine Pugnère, Dominique Douguet, Joanna Crawford, Maryse Lebrun, and Martin J. Boulanger. 2011. "Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites: Insights from the Co-Structure of AMA1 with a RON2 Peptide." *Science* 333 (6041): 463–67. <https://doi.org/10.1126/science.1204988>.
- Torii, Motomi, John H Adams, Louis H Miller, and Masamichi Aikawal. 1989. "Release of Merozoite Dense Granules during Erythrocyte Invasion by Plasmodium Knowlesi." *Infection and Immunity* 57 (10): 3230–33.
- Trager, William, and James B. Jensen. 1976. "Human Malaria Parasites in Continuous Culture." *Science* 193 (4254): 673–75. <https://doi.org/10.1126/science.781840> ARTICLE.
- Trampuz, Andrej, Matjaz Jereb, Igor Muzlovic, and Rajesh M. Prabhu. 2003. "Clinical Review: Severe Malaria." *Critical Care* 7 (4): 315–23. <https://doi.org/10.1186/cc2183>.
- Traverso, José A., Carmela Giglione, and Thierry Meinzel. 2013. "High-Throughput Profiling of N-Myristoylation Substrate Specificity across Species Including Pathogens." *Proteomics* 13 (1): 25–36. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200375>.
- Trecek, Moritz, John L. Sanders, Joshua E. Elias, and John C. Boothroyd. 2011. "The Phosphoproteomes of Plasmodium Falciparum and Toxoplasma Gondii Reveal Unusual Adaptations within and beyond the Parasites' Boundaries." *Cell Host and Microbe* 10 (4): 410–19. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.004>.
- Treiber, Daniel K., and Neil P. Shah. 2013. "Ins and Outs of Kinase DFG Motifs." *Chemistry and Biology* 20 (6): 745–46. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.06.001>.
- Trench, Robert K., and Rudolf J. Blank. 1987. "Symbiodinium Microadriaticum Freudenthal, S. Goreauii Sp. Nov., S. Kawagutii Sp. Nov. and S. Pilosum Sp. Nov.: Gymnodinioid Dinoflagellate Symbionts of Marine Invertebrates." *Journal of Phycology* 23 (3): 469–81. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb02534.x>.
- Trinkle-Mulcahy, Laura, Judith E Sleeman, and Angus I Lamond. 2001. "Dynamic Targeting of Protein Phosphatase 1 within the Nuclei of Living Mammalian Cells." *Journal of Cell Science* 114 (23): 4219–28.
- Tuikue Ndam, Nicaise, Azizath Moussiliou, Thomas Lavstsen, Claire Kamaliddin, Anja T.R. Jensen, Atikatu Mama, Rachida Tahar, et al. 2017. "Parasites Causing Cerebral Falciparum Malaria Bind Multiple Endothelial Receptors and Express EPCR and ICAM-1-Binding PfEMP1." *Journal of Infectious Diseases* 215 (12): 1918–25. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix230>.
- Turk, Benjamin E. 2008. "Understanding and Exploiting Substrate Recognition by Protein Kinases." *Current Opinion in Chemical Biology* 12 (1): 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.018>.
- Tuteja, Renu. 2007. "Malaria - An Overview." *FEBS Journal* 274 (18): 4670–79. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x>.
- Vaughan, Ashley M, and Stefan H I Kappe. 2017. "Plasmodium Liver Infection and Exoerythrocytic Biology." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025486>.
- Vembar, Shruthi Sridhar, Cameron Ross Macpherson, Odile Sismeiro, Jean Yves Coppée, and Artur Scherf. 2015. "The PfAlba1 RNA-Binding Protein Is an Important Regulator of Translational Timing in Plasmodium Falciparum Blood Stages." *Genome Biology* 16 (1): 1–18.

<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0771-5>.

- Verbinnen, Iris, Monica Ferreira, and Mathieu Bollen. 2017. "Biogenesis and Activity Regulation of Protein Phosphatase 1." *Biochemical Society Transactions* 45 (1): 89–99. <https://doi.org/10.1042/BST20160154>.
- Wagner, Jeffrey C., Randall J Platt, Stephen J Goldfless, and Jacquin C Niles. 2014. "Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in *P. Falciparum*." *Nature Methods* 11 (9): 915–18. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3063>.
- Wakula, Paulina, Monique Beullens, Hugo Ceulemans, Willy Stalmans, and Mathieu Bollen. 2003. "Degeneracy and Function of the Ubiquitous RVXF Motif That Mediates Binding to Protein Phosphatase-1." *Journal of Biological Chemistry* 278 (21): 18817–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300175200>.
- Waller, Ross F, Michael B Reed, Alan F Cowman, and Geoffrey I Mcfadden. 2000. "Protein Trafficking To the Plastid of *Plasmodium Falciparum* Is via the Secretory Pathway." *The EMBO Journal* 19 (8): 1794–1802. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1794>.
- Wampfler, Rahel, Nathalie E. Hofmann, Stephan Karl, Inoni Betuela, Benson Kinboro, Lina Lorry, Mariabeth Silkey, Leanne J. Robinson, Ivo Mueller, and Ingrid Felger. 2017. "Effects of Liver-Stage Clearance by Primaquine on Gametocyte Carriage of *Plasmodium Vivax* and *P. Falciparum*." *Plos Neglected Tropical Diseases* 11 (7): e0005753. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005753>.
- Wang, Jinzeng, Qi Lv, Xujuan Li, Ya Liu, Kang Liu, and Haiyun Wang. 2016. "Post-Transcriptional and Translational Regulation Modulates Gene Co-Expression Behavior in More Synchronized Pace to Carry out Molecular Function in the Cell." *Gene* 587 (2): 163–68. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.055>.
- Wang, Lihui, Claire Delahunty, Judith Helena Prieto, Stefan Rahlfs, Esther Jortzik, John R. Yates, and Katja Becker. 2014. "Protein S -Nitrosylation in *Plasmodium Falciparum*." *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (18): 2923–35. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5553>.
- Wang, Qi, Erik M. Vogan, Laura M. Nocka, Connor E. Rosen, Julie A. Zorn, Stephen C. Harrison, and John Kuriyan. 2015. "Autoinhibition of Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) and Activation by Soluble Inositol Hexakisphosphate." *ELife* 2015 (4): 1–31. <https://doi.org/10.7554/eLife.06074>.
- Wang, Weiping, P. Todd Stukenberg, and David L. Brautigan. 2008. "Phosphatase Inhibitor-2 Balances Protein Phosphatase 1 and Aurora B Kinase for Chromosome Segregation and Cytokinesis in Human Retinal Epithelial Cells." *Molecular Biology of the Cell* 19: 4852–62. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-05-0460>.
- Ward, Gary E., Hisashi Fujioka, Masamichi Aikawa, and Louis H Miller. 1994. "Staurosporine Inhibits Invasion of Erythrocytes by Malarial Merozoites." *Experimental Parasitology* 79: 480–87. <https://doi.org/0014-4894/94>.
- Ward, Pauline, Leila Equinet, Jeremy Packer, and Christian Doerig. 2004. "Protein Kinases of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*: The Kinome of a Divergent Eukaryote." *BMC Genomics* 5: 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-79>.
- Waters, Andrew P., D G Higginst, and T F Mccutchan. 1991. "*Plasmodium Falciparum* Appears to Have Arisen as a Result of Lateral Transfer between Avian and Human Hosts." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88 (April): 3140–44.
- Weatherby, Kate, and Dee A. Carter. 2013. *Chromera Velia. The Missing Link in the Evolution of Parasitism. Advances in Applied Microbiology*. 1st ed. Vol. 85. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00004-6>.

- Weathers, Pamela J., Melissa Towler, Ahmed Hassanali, Pierre Lutgen, and Patrick Ogwang Engeu. 2014. "Dried-Leaf *Artemisia Annua*: A Practical Malaria Therapeutic for Developing Countries?" *World Journal of Pharmacology* 3 (4): 39–55. <https://doi.org/10.5497/wjp.v3.i4.39>.
- Weiss, Greta E., Brendan S. Crabb, and Paul R. Gilson. 2016. "Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion." *Trends in Parasitology* 32 (4): 284–95. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.007>.
- White, Michael T., Stephan Karl, Cristian Koepfli, Rhea J. Longley, Natalie E. Hofmann, Rahel Wampfler, Ingrid Felger, et al. 2018. "Plasmodium Vivax and Plasmodium Falciparum Infection Dynamics: Re-Infections, Recrudescences and Relapses." *Malaria Journal* 17 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2318-1>.
- WHO-VCAG. 2017. "Vector Control Advisory Group (VCAG) on New Tools , Technologies and Approaches – Terms of Reference 1," no. November 2018: 1–7.
- WHO, World Health Organization. 2015. "WHO Guidelines for the Treatment of Malaria - 3rd Edition." *WHO*, 27–30. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90261-V](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90261-V).
- — —. 2017a. "Status Report on Artemisinin and ACT Resistance (April 2017)." *WHO/HTM/GMP/2017.9*, no. April: 11. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin-resistance-april2017/en/>.
- — —. 2017b. "The Evaluation Process for Vector Control Products." *WHO/HTM/GMP/2017.13*, no. June: 10. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255644/WHO-HTM-GMP-2017.13-eng.pdf?sequence=1>.
- — —. 2017c. *WORLD MALARIA REPORT 2017*. Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- — —. 2018a. "Artemisinin Resistance and Artemisinin-Based Combination Therapy Efficacy (Status Report - August 2018)." *WHO*, no. August. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274362/WHO-CDS-GMP-2018.18-eng.pdf?ua=1>.
- — —. 2018b. "Malaria Vaccine: WHO Position Paper, January 2016 – Recommendations." *Vaccine* 36 (25): 3576–77. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.047>.
- Wilkes, Jonathan M., and Christian Doerig. 2008. "The Protein-Phosphatome of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *BMC Genomics* 9: 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-412>.
- Williams, John, Fanta Njie, Matthew Cairns, Kalifa Bojang, Sheick Oumar Coulibaly, Kassoum Kayentao, Ismaela Abubakar, et al. 2016. "Non-Falciparum Malaria Infections in Pregnant Women in West Africa." *Malaria Journal* 15 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1092-1>.
- Wilson, R. J.M.(Iain), Paul W. Denny, Peter R. Preiser, Kaveri Rangachari, Kate Roberts, Anjana Roy, Andrea Whyte, et al. 1996. "Complete Gene Map of the Plastid-like DNA of the Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *Journal of Molecular Biology* 261 (2): 155–72. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0449>.
- Witkowski, Benoit, Joel Lelièvre, María José López Barragán, Victor Laurent, Xin Zhuan Su, Antoine Berry, and Françoise Benoit-Vical. 2010. "Increased Tolerance to Artemisinin in *Plasmodium Falciparum* Is Mediated by a Quiescence Mechanism." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (5): 1872–77. <https://doi.org/10.1128/AAC.01636-09>.
- Wright, Megan H., Barbara Clough, Mark D Rackham, Kaveri Rangachari, James A Brannigan, Munira Grainger, David K Moss, et al. 2014. "Validation of N-Myristoyltransferase as an Antimalarial Drug Target Using an Integrated Chemical Biology Approach." *Nature Chemistry* 6 (February): 112–21. <https://doi.org/10.1038/nchem.1830>.

- Xiong, Ying, Joachim D. Uys, Kenneth D. Tew, and Danyelle M. Townsend. 2011. "S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Health Outcomes." *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (1): 233–70. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3540>.
- Xue, Xiangyang, Qingfeng Zhang, Yufu Huang, Le Feng, and Weiqing Pan. 2008. "No MiRNA Were Found in Plasmodium and the Ones Identified in Erythrocytes Could Not Be Correlated with Infection." *Malaria Journal* 7: 1–6. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-47>.
- Yagi, Masanori, Gilles Bang, Takahiro Tougan, Nirianne M Q Palacpac, Nobuko Arisue, Taiki Aoshi, Yoshitsugu Matsumoto, et al. 2014. "Protective Epitopes of the Plasmodium Falciparum SERA5 Malaria Vaccine Reside in Intrinsically Unstructured N-Terminal Repetitive Sequences." *PLoS ONE* 9 (6): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098460>.
- Yagi, Masanori, Nirianne M.Q. Palacpac, Kazuya Ito, Yuko Oishi, Sawako Itagaki, Betty Balikagala, Edward H. Ntege, et al. 2016. "Antibody Titres and Boosting after Natural Malaria Infection in BK-SE36 Vaccine Responders during a Follow-up Study in Uganda." *Scientific Reports* 6 (October): 2–9. <https://doi.org/10.1038/srep34363>.
- Yakubu, Rama R., Natalie C. Silmon de Monerri, Edward Nieves, Kami Kim, and Louis M. Weiss. 2017. "Comparative Monomethylarginine Proteomics Suggests That Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) Is a Significant Contributor to Arginine Monomethylation in *Toxoplasma Gondii*." *Molecular & Cellular Proteomics* 16 (4): 567–80. <https://doi.org/10.1074/mcp.M117.066951>.
- Yakubu, Rama R., Louis M. Weiss, and Natalie C. Silmon de Monerri. 2018. "Posttranslational Modifications as Key Regulators of Apicomplexan Biology: Insights from Proteome-Wide Studies Rama." *Molecular Microbiology* 107 (1): 1–23. <https://doi.org/10.1186/s40945-017-0033-9>.Using.
- Yang, Chunlin, and Gustavo Arrizabalaga. 2017. "The Serine/Threonine Phosphatases of Apicomplexan Parasites." *Molecular Microbiology* 106 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1111/mmi.13715>.
- Yeh, Ellen, and Joseph L. DeRisi. 2011. "Chemical Rescue of Malaria Parasites Lacking an Apicoplast Defines Organelle Function in Blood-Stage Plasmodium Falciparum." *PLoS Biology* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001138>.
- Zeqiraj, Elton, and Daan M.F. van Aalten. 2010. "Pseudokinases-Remnants of Evolution or Key Allosteric Regulators?" *Current Opinion in Structural Biology* 20 (6): 772–81. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.10.001>.
- Zhang, Hua, Andrew Photiou, Arnhild Grothey, Justin Stebbing, and Georgios Giamas. 2012. "The Role of Pseudokinases in Cancer." *Cellular Signalling* 24 (6): 1173–84. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.017>.
- Zhang, Min, Satish Mishra, Ramanavelan Sakthivel, Beatriz M.A. Fontoura, and Victor Nussenzweig. 2016. "UIS2: A Unique Phosphatase Required for the Development of Plasmodium Liver Stages." *PLoS Pathogens* 12 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005370>.
- Zhang, Min, Chengqi Wang, Thomas D. Otto, Jenna Oberstaller, Xiangyun Liao, Swamy R. Adapa, Kenneth Udenze, et al. 2018. "Uncovering the Essential Genes of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum by Saturation Mutagenesis." *Science* 360 (6388). <https://doi.org/10.1126/science.aap7847>.

Annexes

I. Positionnement des amorces pour le séquençage du transcrit *PfpTKL*

ATGGGCAACACCCTTGATAGTAACAAACCCAAAACTTTGTTACTTACGCAGATTATAAATATAT
AGGAAAATTAAATAATAAAAAACGAACATCATGGGATAGGTATCATTTTATATAATTCTGGAGAAT
CATTTTATGGTTCCTTTATAAACGGGAAAAAAGAAGGCAAAGGGATATATATTGATAAGAATTTA
ACAAGATATATAAATACTTGGGTGATAATAAAGTTTTTCGGAAAAGTAAAAGTTGTTCCATATAA
TAGTAATAGAGTATATTATTTTTATTACAAAAATTATATGATAGAGAAATGTATATATTTTGATAA
TAATATAAATAATAAAGAGTCTCATCATAAAAAATAATTTTATAATAACTACGATAATAATTCGT
ATAATAATAATTCTTGTGATGATGAAGAAAAAAGAAAATATCCTATTGGAGTCACCAAATTTAAA
GAAGATCTATCCAATTATATTCACTCTACACATATAATGAAAAAAAATAATAAACTTTTTAATAA
AAATGATAATGAATATAATATTTTTTCCTCATCACTATCTTACAGCTCAGACTCAGAAAATATTAA
TCTACTCGATATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
CAAAAAACAAAAACACACAAATATTATCTTGTACACAACATAAAATGTATGAACATAATATG
AATGAATCAAACCTTACAAAAAAGGACAACGTAAATTGTGAACACACCGACAAAATGAATATAT
CCCTTCATGAAAAAATGATAAAAAAATGAGAAAAAATGAGAAGAAAAATAAGAAAAAA
AACTTTTTTAAATATTTTTCAAATAATATAGAAAATTTAATTATTGAAAATTATCAGACATGGTCT
TTAAGAGAAGTAATTCAATGGCTTATGTTATGCAATGTACCTGTTAAATGGTTAATAAGTTTTTAT
AAAAATAATATAACAGGTGATAAATTAATAATATATTAATATAAATACTATAAGAAATGAATTGG
GGATTATTGCTTATGGACATGCAATCAAAATATTACAATTAATCAAAAACTCTACAAGTTATGGCA
TATAATAAAAAATTCAATAACTTAATACAAATAGAAGAATATAAAAAATTATATAAGACAAAAGG
AAAACACAAACAAAAATATAAAAAAAGGGAAAAATATAAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
AGAAAAAATATAAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAACAAAAAATTCAACAAC
ATGGATAAAAAATATATAGATTTAGCTATTCATAAAAAATGTTAAGAATATACAAAATGATACTTT
TTATAATAAGCATGAAAATATTTACAATTGTAAGAATCAAACAAATTTTATTTATCAAAATGATTC
TGAAATAAAAAAATCATGAATAAAAAGAAAGTATCATTTGAATATGATAATAATGAAGAAAA
AAAAAAAAAAAAATATTATTAAATTTATAAAAAATAATAAATCATTACAAAATTCAAATGGGGAA
TATTATTTAATAAATCACTTATCAAAAAGGTATATGTAGTGATAGCATATTTTATAAATCATCACC
ATCATCATCACCATCATCTCCACCATCCCCCTTATCTTATAAAGACAACCTTCCCATTTCATCCTCT
TGTAAGTTCTTTAGAACGATTACCTTCATACGAAAAAAATTATTATCTTCATCACAATCAAATATA
GAACACATAAAAAACCTTCCCTTAGATGTCTTAAGCAATAATAATAGTTCGGCAAATATAAAAAAT
AAAAAAAAGTAAATCAAATATAACAATGATAAAAAAGAACAGAAGAAATTACCATTGATTCT
GAATAAATCAAGTTCTGAATTTTACCTTCTCATTCGTACACTTCTAAATCATATCATTATAATATT
AAACCATCCTTACAATCATCATCTAATAATTCTTCAGATTCTTCTTATAGTATATCTTCAACATGTT
CTTCATCCTCCTCATATGTTTCTTCATTATATTCTAATAGAAGTAATGATATTCTGAATTTTTATAGA
AATAAAATAATTAAGTATTGCAACAATATATACATGAATACCAAATTAGCATACTCTTATATGAA
TGGTTTCATAATTCCTCATGAAGATTTAATATTTATACACCCTATCGAAAATTATTATATGGATAAT
ACAAATGAAAAGAATAACATAAATAATCCTTATACTAAAGAAAAAATTATGAATCATAATTTCTC
ATTTAATACAAAAAATAACACATCCTTTATAGATATAAACACAAACATATTTTCATCAAAACAAAC
AACAAATATAAATAACTTTGGAAAAATATAAAAAAATGAAAAGCAGAATGTTTAAAGGTAAATA
TATGGGAAAAGAAGTAGCTATAAAAAATATTAGTTGGAAAAATAAAAAATTTTAAAAAACTTCAT
CAGATACTATATAATTTATACAACTTAAGACATTCAAATCTTGTCTAATTATGGGAGTATCTATT
CATTATCCTTTTGTTTTTATAATTTATGAATATATGAAAAATAAGTGTCTCTTTTCATATCTACAT

TATTAAATATAAACATGTCTATATAAGCACTTTCCTTCAAAGGTATAAGACATTGTTACATATTAC
 TCAACAAGAAAAAATTAACAAAAACAAACATAAATAATAAACAACATAAATCATAACAA
 CATAAATAATAACAACATAAATCATAACAACATAAATCATAACAACATAAATAATAAACATA
 AATAATAATAACATAAATTATAACAAAGATTACAATAATAAGAAGAAGAAAGAAGATGAGCAG
 CATAATATTGAACATCAAGACACATTTATAGATTTACCAGAAAAAAGTAATATATCAAGTGATGA
 TAATAATTCAACAGATATTAGTCAAATACAAAAGGAAAAATTTTCATTTCTTAAATAAAAAAATTG
 AAGAAAAATAAAAAATATTATTTATGATGATCATA **CAAGTACACTTTCTGATCATAG** TATACATAAT
 ATTAACAAAAGTTATGATAATGTATATAAAAAACAAAATGAATATATTTTCATTACCAACATA **ATGT**
ATTATGTGGAGCATACGA TAATAATGATAATAATATAAATGACAATGATATTTATTGTAATAATA
 TTTATGATAATAATATAAATGACAATCATATATATTGTAATAATAAATGACAATCATATATATT
 GTAATAATATTTATGACCATCATAAGAACACATCATTAAATTCAAAGGAACAAAACACCGATCA
 CAATATTGAACAAATTAATGAATGTAACAAATATGCTTCAGAAACAAAATATAATATAAAAAAA
 AGCAATTTAAAAAATAATATTATATCACATAAAAACTTTCAAAAATGTAATCAAATACAAATGA
 ACCAACCATATACATTTCCACCATATCAAAAAGAATTATCATCCTATTTAAAAAATGAAAAATA
 AAAAGGAAAAAGAAAGTTCTCTTTAGTTATTTAAAAACTCATATACATTTTAATTCACAACAAAT
 TAATGACCAACATAATCGTTTAAGCGTTCAAAAATAAATGAAAATTATCACCGATGTGACTTTGG
 CTTGCACTTATTTAGAAAAGGAAAAGATGAGTCCAATAAATTTAAAACCAACAAATATATTACTT
 GACGAATCTCTGAACGCTAAAATATCCGACTTTGGTATATCAAAAATAGAAAATTGCCTAGATAT
 GAATATTGATTATTCTTATAAAATTTTCATCAAACAGTGTGATAAAAATTAACAAAAAAGAATATG
 AACAAAAGAAAGCGAAAAAAATAAAAAATAGTCAACAAAAATAAATGATTTGTTATATTTATA
 TGATCATAATAAATGTGTATAAATATAATACACAATATATTGATGTTACCTATAATAATTCTTA
 TCCCTCCATTTTTTATTGGACTCCCCAGAAATATTAAGGGGGGAAAAAAATAAAAAATTTTATTC
 AGACATTTATGCTTTCGGAATCATACTTTGGGAAATGCTATCTAATGATATTCCATACAATTACCC
 CTTTGCCTCACACATAATGGCTGTAGTTGGATATGCTAATGAAGAATTATCTTTTAACAATATCCC
 AGTGTCGATACAAAGTTTGATAAAAGCTTGTGTAAATAGAAATAAATATAAAAGACCTACATTTG
 AACATATATTAAAAACAATATCTACGTTATATCAAAAGGCAAATACAAAAGTAGAGGATGCATT
 A **ATTTCATTTATGGATGGAACATAA**

Repérage des amorces de séquençage du transcrit de *PfpTKL* :

Couple F1/R2 & **couple F3/R4** & **couple F5/R6** & **couple F7/R8** & **couple F9/R10** & **couple F11/R12**

II. Alignement - résultat du séquençage de PfpTKL

						
	5	15	25	35	45	55
pTKL_DB	MGNTLDSNKP	KNFVTYADYK	YIGKLNNKNE	HHGIGIILYN	SGESFYGSFI	NGKKEGKGIY
pTKLseq	MGNTLDSNKP	KNFVTYADYK	YIGKLNNKNE	HHGIGIILYN	SGESFYGSFI	NGKKEGKGIY
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	65	75	85	95	105	115
pTKL_DB	IDKNLTRYIN	TWVDNKVFGK	VKVVPYNSNR	VYYFYYKNYM	IEKCIYFDNN	INNKESHKHN
pTKLseq	IDKNLTRYIN	TWVDNKVFGK	VKVVPYNSNR	VYYFYYKNYM	IEKCIYFDNN	INNKESHKHN
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	125	135	145	155	165	175
pTKL_DB	NIYNNYDNNNS	YNNNSCDEE	KRKYPIGVTK	FKEDLSNYIH	STHIMKKNNK	LFNKNDNEYN
pTKLseq	NIYNNYDNNNS	YNNNSCDEE	KRKYPIGVTK	FKEDLSNYIH	STHIMKKNNK	LFNKNDKEYN
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****:***
						
	185	195	205	215	225	235
pTKL_DB	IFSSSLSYSS	DSENINLLDI	LKKKKNNKKNK	KNKKKKNNKKT	KNTQILSCTQ	HKMYEHNMNE
pTKLseq	IFSSSLSYSS	DSENINLLDI	LKKKKNNKKNK	KNKKKKNNKKT	KNTQILSCTQ	HKMYEHNMNE
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	245	255	265	275	285	295
pTKL_DB	SNFTTKDENVN	CEHTDKMNIS	LHEKNDKKNE	KKNEKKNNKKK	KLFKYFSNNI	ENLIENYQT
pTKLseq	SNFTTKDENVN	CEHTDKMNIS	LHEKNDKKNE	KKNEKKNNKKK	KLFKYFSNNI	ENLIENYQT
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	305	315	325	335	345	355
pTKL_DB	WSLREVIQWL	MLCNVPVKWL	ISFYKNNITG	DKLKYININT	IRNELGIIAY	GHAIKILQLI
pTKLseq	WSLREVIQWL	MLCNVPVKWL	ISFYKNNITG	DKLKYININT	IRNELGIIAY	GHAIKILQLI
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	365	375	385	395	405	415
pTKL_DB	KNLQVMAYNK	KFNNLIQIEE	YKNYIRQKEN	TNKNIKKGKN	IKKEK KK KE	KNIKKEKKKK
pTKLseq	KNLQVMAYNK	KFNNLIQIEE	YKNYIRQKEN	TNKNIKKGKN	IKKEK NI KE	KNIKKEKKKK
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****:***	*****
						
	425	435	445	455	465	475
pTKL_DB	KKETKKFNNM	DKKYIDLAIH	KNVKNIQNDT	FYNKHENIYN	CKNQTNFIYQ	NDSEIKKIMN
pTKLseq	KKETKKFNNM	DKKYIDLAIH	KNVKNIQNDT	FYNKHENIYN	CKNQTNFIYQ	NDSEIKKIMN
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	485	495	505	515	525	535
pTKL_DB	KKKVSFEYDN	NEEKKKKNII	KFIKNNKSLQ	NSNGEYYLIN	HLSKGICSDS	IFYKSSQSKS
pTKLseq	KKKVSFEYDN	NEEKKKKNII	KFIKNNKSLQ	NSNGEYYLIN	HLSKGICSDS	IFYKSSQSKS
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	545	555	565	575	585	595
pTKL_DB	SSQLSSPLSS	PLSSPSPSSS	PSS SPSSSPS	SSPSSSPSPS	SSPSPSSSPS	SSPSSSPSSP
pTKLseq	SSQLSSPLSS	PLSSPSPSSS	PSS -----	-SPSSSPSPS	SSPSPSSSPS	SSPSSSPSSP
Clustal Co	*****	*****	***	*****	*****	*****
						
	605	615	625	635	645	655
pTKL_DB	PSPLSYKDNF	PISSSCSSLE	RLPSYEKLL	SSSQSNIEHI	KNLPLDVLSN	NNSSANIKIK
pTKLseq	PSPLSYKDNF	PISSSCSSLE	RLPSYEKLL	SSSQSNIEHI	KNLPLDVLSN	NNSSANIKIK
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****

						
	665	675	685	695	705	715
pTKL_DB	KSKSKYNNDK	KEQKKLPLIL	NKSSSEFSPS	HSYTSKSYHY	NIKPSLQSSS	NNSSDSSYSI
pTKLseq	KSKSKYNNDK	KEQKKLPLIL	NKSSSEFSPS	HSYTSKSYHY	NIKPSLQSSS	NNSSDSSYSI
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	725	735	745	755	765	775
pTKL_DB	SSTCSSSSSY	VSSLYSNRSN	DILNFYRNKI	IKYCNNIYMN	TKLAYSYMNG	FIIPHEDLIF
pTKLseq	SSTCSSSSSY	VSSLYSNRSN	DILNFYRNKI	IKYCNNIYMN	TKLAYSYMNG	FIIPHEDLIF
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	785	795	805	815	825	835
pTKL_DB	IHPHENYMD	NTNEKNNINN	PYTKEKIMNH	NFSFNTKNNT	SFIDINTNIF	SSNKQQNINN
pTKLseq	IHPHENYMD	NTNEKNNINN	PYTKEKIMNH	NFSFNTKNNT	SFIDINTNIF	SSNKQQNINN
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	845	855	865	875	885	895
pTKL_DB	FGKYKKMKSR	MFKGKYMGE	VAIKILVGKI	KNFKKLHQIL	YNLYNLRHSN	LVLIMGVSIH
pTKLseq	FGKYKKMKSR	MFKGKYMGE	VAIKILVGKI	KNFKKLHQIL	YNLYNLRHSN	LVLIMGVSIH
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	905	915	925	935	945	955
pTKL_DB	YPFVFIIIEY	MKNKCLFSYL	HCIKYKHVYI	STFLQRYKTL	LHITQQEKIK	KTNNINNNNN
pTKLseq	YPFVFIIIEY	MKNKCLFSYL	HCIKYKHVYI	STFLQRYKTL	LHITQQEKIK	KTNNINNNNN
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	965	975	985	995	1005	1015
pTKL_DB	INHNNINNNN	INHNNINHNN	INNNINNNNN	INYNKDYNK	KKKEDEQHNI	EHQDTFIDL
pTKLseq	INHNNINNNN	INHNNINHNN	INNNINNNNN	INYNKDYNK	KKKEDEQHNI	EHQDTFIDL
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	1025	1035	1045	1055	1065	1075
pTKL_DB	EKSNISSDDN	NSTDISIQK	ENFHFLNKKI	EENKNIIYDD	HTSTLSDHSI	HNINKSYDNV
pTKLseq	EKSNISSDDN	NSTDISIQK	ENFHFLNKKI	EENKNIIYDD	HTSTLSDHSI	HNINKSYDNV
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	1085	1095	1105	1115	1125	1135
pTKL_DB	YKNKMNIIFY	QHNVLGCAYD	NNDNNINDND	IYCNNIYDNN	INDNHIYCNN	INDNHIYCNN
pTKLseq	YKNKMNIIFY	QHNVLGCAYD	NNDNNINDND	IYCNNIYDNN	INDNHIYCNN	-----N
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*
						
	1145	1155	1165	1175	1185	1195
pTKL_DB	INDNHIYCNN	IYDHHKNTSL	NSKEQNTDHN	IEQINECNKY	ASETKYNIKK	SNLKNNIISH
pTKLseq	INDNHIYCNN	IYDHHKNTSL	NSKEQNTDHN	IEQINECNKY	ASETKYNIKK	SNLKNNIISH
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	1205	1215	1225	1235	1245	1255
pTKL_DB	KNFQKCNQIQ	MNQPYTFPPY	QKELSSYLKN	EKIKRKRKVL	FSYKTHIHF	NSQQINDQHN
pTKLseq	KNFQKCNQIQ	MNQPYTFPPY	QKELSSYLKN	EKIKRKRKVL	FSYKTHIHF	NSQQINDQHN
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	1265	1275	1285	1295	1305	1315
pTKL_DB	RLSVQKIMKI	ITDVTLACTY	LEKEKMSPIN	LKPTNILLDE	SLNAKISDFG	ISKIENCLDM
pTKLseq	RLSVQKIMKI	ITDVTLACTY	LEKEKMSPIN	LKPTNILLDE	SLNAKISDFG	ISKIENCLDM
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****

						
	1325	1335	1345	1355	1365	1375
pTKL_DB	NIDYSYKISS	NSVIKINKKE	YEQKKAKKIK	IVNKNNNDLL	YLYDHNNNVY	KYNTQYIDVT
pTKLseq	NIDYSYKISS	NSVIKINKKE	YEQKKAKKIK	IVNKNNNDLL	YLYDHNNNVY	KYNTQYIDVT
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	1385	1395	1405	1415	1425	1435
pTKL_DB	YNNPSYPSIFY	WTPPEILRGK	KNKKFYSDIY	AFGIILWEML	SNDIPYNYPF	ASHIMAVVGY
pTKLseq	YNNPSYPSIFY	WTPPEILRGK	KNKKFYSDIY	AFGIILWEML	SNDIPYNYPF	ASHIMAVVGY
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	1445	1455	1465	1475	1485	1495
pTKL_DB	ANEELSFNNI	PVSIQSLIKA	CVNRNKYKRP	TFEHILKTIS	TLYQKANTKV	EDALISFMDG
pTKLseq	ANEELSFNNI	PVSIQSLIKA	CVNRNKYKRP	TFEHILKTIS	TLYQKANTKV	EDALISFMDG
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	.					
pTKL_DB	T					
pTKLseq	T					
Clustal Co	*					

Alignement réalisé avec T-Coffee (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>) entre la séquence de *Pfp*TKL disponible sur PlasmoDB (pTKL_DB) et celle obtenue après séquençage (pTKLseq).

III. Positionnement des domaines de PfpTKL sur sa séquence protéique

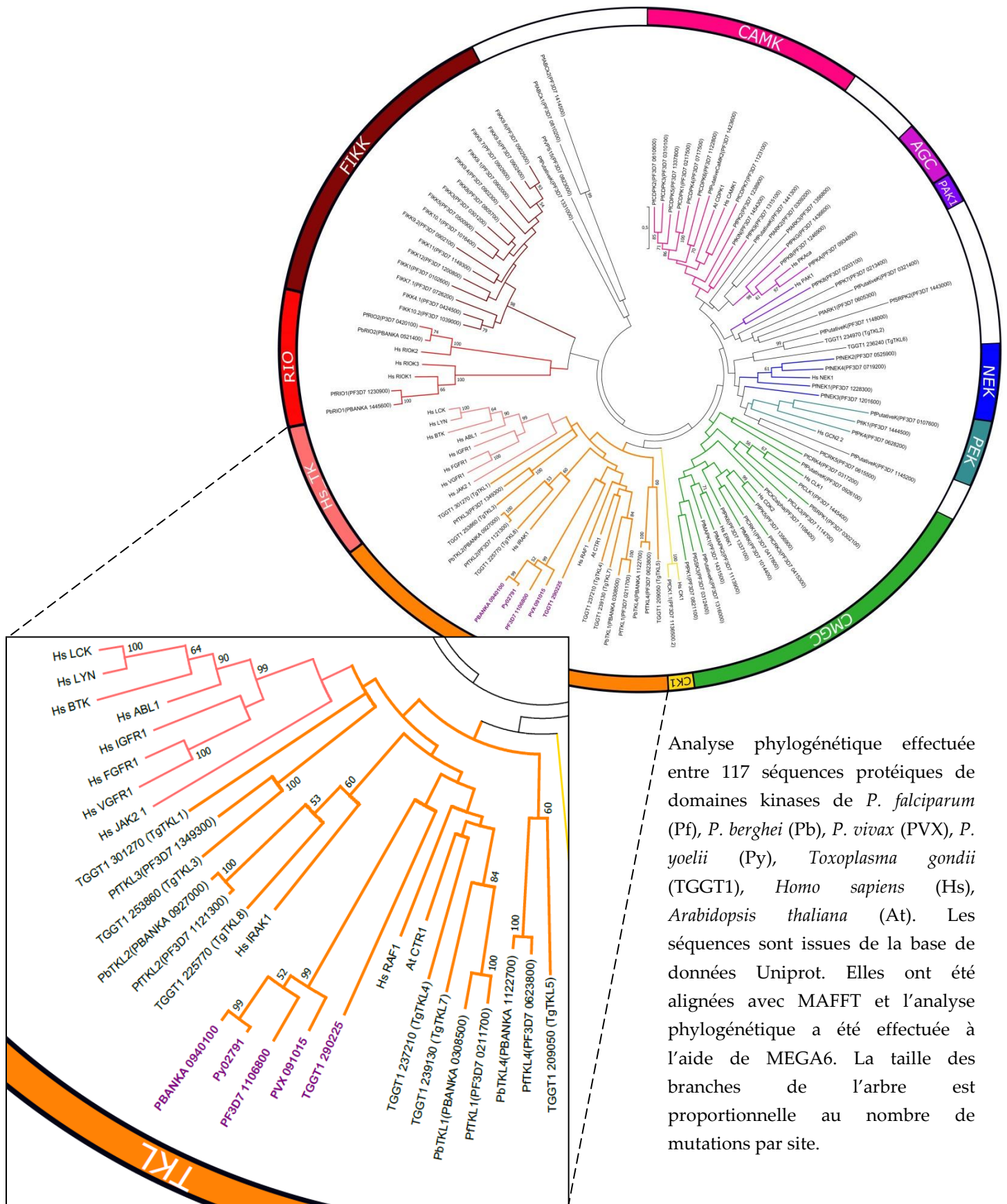
[illegible]

Séquence protéique de *PfpTKL* post-séquençage (1483 acides aminés). Les domaines MORN sont surlignés en **vert**, le domaine SAM en **bleu**, les motifs RVxF en **mauve**, le domaine BTK-like en **rouge** et le domaine kinase en **rouge foncé**.

Modifications post-traductionnelles répertoriées à ce jour :

- ◆ Phosphorylation (Peptides identifiés surlignés en **Cyan** – AA phosphorylés en **gras**) d'après [PlasmoDB](#).
- ◆ Méthylation (Peptides identifiés surlignés en **Jaune** - Lysine méthylée en **gras**) d'après (*Kaur et al. 2016*). La première Lysine indiquée peut être mono- ou di-méthylée.

IV. Analyse phylogénétique du domaine kinase de *Pfp*TKL



Analyse phylogénétique effectuée entre 117 séquences protéiques de domaines kinases de *P. falciparum* (Pf), *P. berghei* (Pb), *P. vivax* (Pv), *P. yoelii* (Py), *Toxoplasma gondii* (TGGT1), *Homo sapiens* (Hs), *Arabidopsis thaliana* (At). Les séquences sont issues de la base de données Uniprot. Elles ont été alignées avec MAFFT et l'analyse phylogénétique a été effectuée à l'aide de MEGA6. La taille des branches de l'arbre est proportionnelle au nombre de mutations par site.

V. Gènes synthétiques (WT et mutants)

1. Gène synthétique – domaine SAM

Séquence du gène optimisée pour faciliter l'expression en bactéries :

GATATCGGATCCGAATTCAAAAACTGTTCAAATACTTTAGCAATAACATCGAAAACCTGATTAT
CGAAAACCTACCAAACCTGGAGCCTGCGCGAAGTGATTCAATGGCTGATGCTGTGCAACGTGCCG
GTTAAGTGGCTGATCAGCTTCTACAAAAACAACATTACCGGTGACAAGCTGAAATATATCAACAT
TAACACCATCCGTAACGAGCTGGGTATCATTGCGTACGGCCACGCGATCAAGATTCTGCAGCTGA
TTAAAAACCTGCAAGTGATGGCGTATAATAAGAAGTTTAACAACCTGATCCAGATTGAGGAGTAC
AAGAATCTCGAGAAGCTT

Séquence protéique correspondante :

DIGSEFKKLFKYFSNNIENLIIENYQTWSLREVIQWLMLCNVPVKWLISFYKNNITGDKLKYININTIR
NELGIIAYGHAIKILQLIKNLQVMAYNKKFNNLIQIEEYKNLEKL

2. Gène synthétique – domaine kinase

Séquence du gène optimisée pour faciliter l'expression en bactéries :

GAATTCGACAATCACATTTACTGCAATAACATTTACGATCACCACAAAAACACGTCATTGAACTC
GAAAGAACAAAATACGGACCATAACATCGAACAGATTAATGAGTGTAACAAATATGCCAGTGA
AACCAAATACAACATTAAGAAATCGAACCTGAAGAATAACATTATCTCGCATAAGAACTTCCAG
AAATGCAATCAGATTCAGATGAACCAACCCTACACGTTTCCACCATATCAGAAAGAACTGAGCT
CTTATCTTAAAAACGAAAAGATCAAACGGAAACGCAAAGTGCTGTTTTCTACCTGAAAACCCAT
ATTCATTCAACAGTCAGCAGATTAACGATCAACACAATCGCTTATCTGTGCAGAAAATTATGAA
AATCATTACTGATGTCACCCTTGCTTGACATATCTGGAAAAGGAGAAAATGAGCCCCATTAATC
TGAAACCTACCAATATCCTGTTGGACGAATCTCTGAATGCCAAAATTAGCGATTTCCGGTATCAGC
AAAATTGAGAATTGTCTGGATATGAACATTGACTATTACATACAAAATTAGCTCCAACCTCAGTCAT
CAAAATTAATAAAAAAGAATATGAGCAAAAAGAAAGCGAAGAAAATCAAAATTGTGAATAAAAA
CAATAATGACTTACTGTACCTGTACGATCACAATAACAACGTCTATAAGTACAATACCCAATATA
TCGACGTAACCTATAACAACAGTTATCCGAGCATCTTCTATTGGACTCCTCCGGAAATCTTACGTG
GCAAAAAAACAAGAAATTTTACAGCGATATTTACGCATTTGGGATCATCCTCTGGGAAATGCTG
AGTAATGATATTCCGTACAACCTATCCGTTTGCATCCCATATTATGGCCGTTGTAGGCTATGCGAAT
GAAGAACTGTCATTCAACAACATTCCGGTTTCCATTCAGTCGTTGATCAAAGCGTGTGTTAATCGC
AACAAATATAAGCGTCCGACGTTTGAGCATATTCTGAAAACGATCTCTACACTCTATCAGAAAGC
GAATACCAAAGTGGAAGATGCTCTTATCAGCTTTATGGATGGTACTCTCGAGCATCATCACCATC
ATCATTAAGGATCC

Séquence protéique correspondante (pTKL_KD_WT) :

EFDNHIYCNNIYDHHKNTSLNSKEQNTDHNIEQINECNKYASETKYNIKKSNLKNNIISHKNFQKC
NQIQMNQPYTFPPYQKELSSYLKNEKIKRKRKVLFSYLKTHIHFNSSQQINDQHNRLSVQKIMKIITD
VTLACTYLEKEKMSPINLKPTNILLDESLNAKISDFGSKIENCLDMNIDYSYKISSNSVIKINKKEYEQ
KKAKKIKIVNKNNNDLLYLDHNNNVYKYNTQYIDVTYNNNSYPSIFYWTPPEILRGKKNKKFYSI
YAFGIILWEMLSNDIPYNYPFASHIMAVVGYANEELSFNNIPVSIQSLIKACVNRNKYKRPTFEHILKT
ISTLYQKANTKVEDALISFMDGTLEHHHHHHH

Séquence protéique du mutant N1272D (pTKL_KD_ND) :

EFDNHIYCNNIYDHHKNTSLNSKEQNTDHNIEQINECNKYASETKYNIKKSNLKNNIISHKNFQKC
NQIQMNQPYTFPPYQKELSSYLKNEKIKRKRKVLFSYLKTHIHFNSSQQINDQHNRLSVQKIMKIITD
VTLACTYLEKEKMSPIDLKPTNILLDESLNAKISDFGSKIENCLDMNIDYSYKISSNSVIKINKKEYEQ
KKAKKIKIVNKNNNDLLYLDHNNNVYKYNTQYIDVTYNNNSYPSIFYWTPPEILRGKKNKKFYSI
YAFGIILWEMLSNDIPYNYPFASHIMAVVGYANEELSFNNIPVSIQSLIKACVNRNKYKRPTFEHILKT
ISTLYQKANTKVEDALISFMDGTLEHHHHHHH

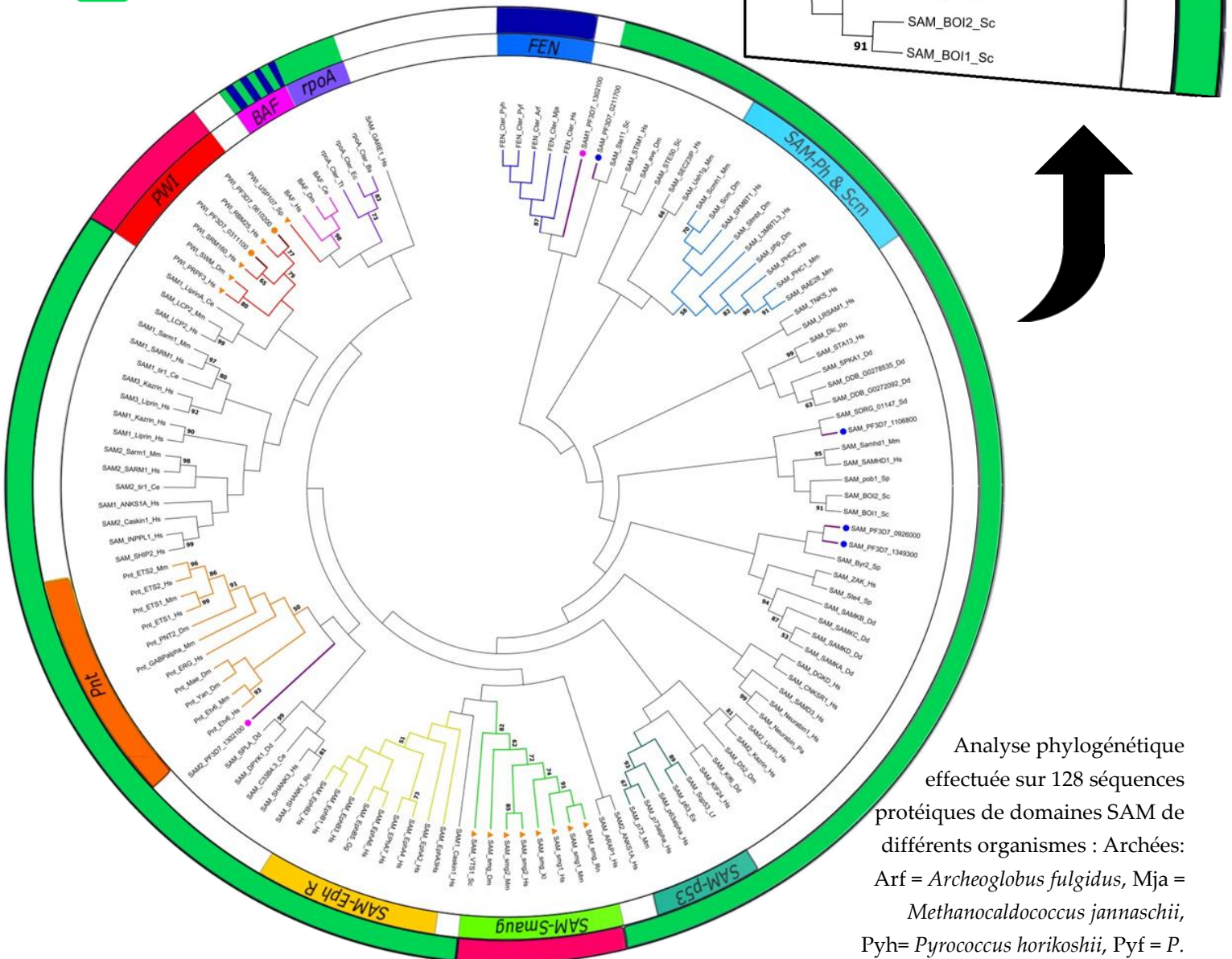
Séquence protéique du mutante DFG-GFE (pTKL_KD_DG) :

EFDNHIYCNNIYDHHKNTSLNSKEQNTDHNIEQINECNKYASETKYNIKKSNLKNNIISHKNFQKC
NQIQMNQPYTFPPYQKELSSYLKNEKIKRKRKVLFSYLKTHIHFNSSQQINDQHNRLSVQKIMKIITD
VTLACTYLEKEKMSPINLKPTNILLDESLNAKISGFISKIENCLDMNIDYSYKISSNSVIKINKKEYEQ
KKAKKIKIVNKNNNDLLYLDHNNNVYKYNTQYIDVTYNNNSYPSIFYWTPPEILRGKKNKKFYSI
YAFGIILWEMLSNDIPYNYPFASHIMAVVGYANEELSFNNIPVSIQSLIKACVNRNKYKRPTFEHILKT
ISTLYQKANTKVEDALISFMDGTLEHHHHHHH

VI. Classification du domaine SAM de PfpTKL

Légende :

- = interaction avec de l'ADN
- = interaction avec de l'ARN
- = interaction avec des protéines



Analyse phylogénétique effectuée sur 128 séquences protéiques de domaines SAM de différents organismes : Archées: Arf = *Archeoglobus fulgidus*, Mja = *Methanocaldococcus jannaschii*, Pyh = *Pyrococcus horikoshii*, Pyf = *P.*

furiosus; Bactéries: Bs= *Bacillus subtilis*, Ec= *Escherichia coli*, Tt= *Thermus thermophilus*; Amoebozoa: Dd= *Dictyostelium discoideum*, Métazoaires : Ce= *Caenorhabditis elegans*, Dm= *Drosophila melanogaster*, Es= *Euprymna scolopus* (Seiche de Hawaïi), Hs= *Homo sapiens*, Lf= *Loligo forbesi* (Calmar d'Europe du Nord), Mm= *Mus musculus*, Pa= *Papio anubis*, Rn= *Rattus norvegicus*, Xl= *Xenopus laevis*; Fungi: Sc= *Saccharomyces cerevisiae*, Sp= *Schizosaccharomyces pombe*; Stramenopile: Sd= *Saprolegnia diclina*; Alveolata: *Plasmodium falciparum*. Les séquences sont issues de la base de données Uniprot. Elles ont été alignées avec MAFFT et l'analyse phylogénétique a été effectuée à l'aide de MEGA6.

VII. Résultats du double hybride de levure (Y2H)

N° du clone	Dév. sur TDO/A	Dév. sur QDO/A	Dév. en SD-Leucine liquide	Transformation de DH5α	Résultat de séquençage (gris = hors du cadre avec le GAL4-AD)	Nom de la protéine	Région de <i>PfSERA5</i> (AA)
12	+	+	+	+	PF3D7_0827900	PDI8	
156	+	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	200-334
157	+	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	191-323
183	+	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	185-317
199	+	+	+	+	PF3D7_0827900	PDI8	
249	+	+	+	-	/		
605	+	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	188-253
610	+	+	+	+	PF3D7_0827900	PDI8	
614	+	+	+	+	PF3D7_0715600		
680	+	+	+	+	PF3D7_0827900	PDI8	
699	+	-	/	/	/		
748	+	+	+	+	PF3D7_1026600		
988	+	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	191-257
1236	+	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	201-336
1237	+	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	201-336
1537	+	+	+	+	PF3D7_0312800		
1546	+	+	+	+	PF3D7_1028700		
2775	+	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	200-332
3070	+	+	+	+	CHR13		
3087	+	+	+	+	PF3D7_1140900		
3292	/	+	+	+	PF3D7_0818900		
3303	/	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	191-257
3457	/	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	145-276
3597	/	+	+	+	PF3D7_0827900	PDI8	
3821	/	+	+	+	PfEMP1 (VAR)		
4112	/	+	+	+	PF3D7_1337500		
4117	/	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	199-265
4119	/	+	+	+	PF3D7_1337500		
4333	/	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	189-255
4497	/	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	216-365
4921	/	+	+	+	PF3D7_0207600	SERA5	191-257
5068	/	+	+	+	PF3D7_0204100		
5517	/	+	+	+	PF3D7_0827900	PDI8	

Ce tableau montre les résultats du screening Y2H effectué entre des levures Y187 exprimant le domaine SAM de *PfpTKL* et des levures Y2Hgold transformées avec une banque d'ADNc de *P. falciparum*. 6000 diploïdes ont été criblés par repiquage sur TDO/A et/ou double repiquage sur milieu QDO/A (colonnes 2 et 3, Dév. = Développement). 32 diploïdes ont survécu à cette sélection. Ils ont été repiqués en SD-L pour amener les diploïdes à se débarrasser du plasmide pGBKT7 portant l'auxotrophie pour le Tryptophane (colonne 4). Après propagation en DH5α (colonne 5), les plasmides ont été séquencés et les gènes clonés identifiés (colonne 6). Les deux partenaires principaux identifiés sont en colonne 7 et les régions de *PfSERA5* identifiées par séquençage sont délimitées en colonne 8 (région minimum d'interaction = AA 216-253).

VIII. Alignement entre les séquences protéiques de *Pfp*TKL et *Pbp*TKL

PF3D7_1106800	1	MGNTLDSNKPKNFVTTYADYKYIGKLNKNKNEHHGIGIILYNSGESFYGSFI	50
		: :	
PBANKA_094010	1	MGN-INSIQTKNYIKFEKYYYYAGDLNVDNLPHGRGLMLYENGNSFFGHFI	49
PF3D7_1106800	51	NGKKEGKGIYIDKLNLTTRYINTWVDNKVFGKVVPYNSNRVYYFYKKNYM	100
		: : : : : : : : : : : : : : : : : :	
PBANKA_094010	50	NGKKHGGKGIYIDKNLTKYISKWKYDHISNKVKVKQFDSDIVYLFYYKNGL	99
PF3D7_1106800	101	IEKCIYFDNNINNKESSHKNNIYNNYDNNSYNNNSCDDEEKRKYPIGVTK	150
		: :	
PBANKA_094010	100	IDHCKVYE-YISNKKKKKKKK-----NDGILEDSEIQNRSINFEK	138
PF3D7_1106800	151	FKEDLSNYIHSTHIMKKNNKLFNKNDNEYNIFSSSLSYSSDSENINLLDI	200
		: :	
PBANKA_094010	139	DNIMIIQNCQEKSIVNKKEEIIDIPNNKYN-----ENDDTDKVDN	178
PF3D7_1106800	201	LKKKKNKKNKKNKKNKKNKTKNTQILSCTQHKKMYEHNMNESNFTKKDNVN	250
		: :	
PBANKA_094010	179	FSKKINLEQSQNNMLKYKKKK-----TFDEM--NSLNDISIFCS----S	215
PF3D7_1106800	251	CEHTDKM----NISLHEKNDKK-NEKKNEKKNNKKKLFKY-----F	286
		: :	
PBANKA_094010	216	CESTSKSIGSDYISHFEKKEKQINKQEDELKKSKENYMNHSEYSNSSTNF	265
PF3D7_1106800	287	SNN-----IENLI-----IENYQTWSLREVIQWLMLCNP	316
		: :	
PBANKA_094010	266	ENNKIKDISDESIMRLRLKNIINNNTDLKIENYELWNKEQVAQWLSLCNP	315
PF3D7_1106800	317	VKWLISFYKNNITGDKLKYININTIRNELGIIAYGHAIKILQLIKNLQVM	366
		: :	
PBANKA_094010	316	MKWALSVYKNNINGQRLNNLNLYFIRNKLGLISYGQAIKFLQLIKNLRT	365
PF3D7_1106800	367	AYNKKFNNLIQIEEYKNIYRQKENTNKNIKKGKNIKKEKKKKKEKNIKKE	416
		: :	
PBANKA_094010	366	AYNTRFSNTLNLEEYEIYLK-----KKMKKKKMRENKDGE	400
PF3D7_1106800	417	-----KKKKKKETKKFNNMDKKYIDLAIHKNVKNIQNDTFYKNHEN	457
		: :	
PBANKA_094010	401	YTATTSSQAEDFQKNNQKIIMNQIKSMID-----QNDDDKSFSDKIKN	444
PF3D7_1106800	458	IY-----NCKNQTNFIYQNDSEIKKIMNKKKVSFEY---DNN-----EEK	494
		: :	
PBANKA_094010	445	GFFKGNTNIRNLQNLV-----INSIWNKSKDEFKIPIDENNVPNMIEKG	488
PF3D7_1106800	495	KKKNIIKFI--KNNKSLQNSNGEYYLINHLSKGICSDSIFYKSSQSKSSS	542
		: :	
PBANKA_094010	489	KELNTNDQITGKKKKKLKNK-----YINHIIQKNI---SMLKKLNNASNES	530
PF3D7_1106800	543	QLSSPLSSPLSSPSPSSPSSPSSPSSPSSPSSPSSPSSPSSPSSPSSS	592
		: :	
PBANKA_094010	531	QSSNESVTQILSTS-----SESSFANIHSGLSSK	559
PF3D7_1106800	593	PSSSPSPSPSPSYKDNFPISSSCSSSLERLPSEYKLLSSSQSNIEHIKN	642
		: :	
PBANKA_094010	560	MLFHDKLEPEPIK-----PNKEKE-----	578

PF3D7_1106800	1309	FGISKIENCLDMNIDYSYKISSNSVIKINKKEYEQKKAKKIKIVNKNND	1358
		.:. . : .:.:.: : . .:. :.:. .:.	
PBANKA_094010	1123	FGIKEIEQCLDINIDYSYIVFPNNVIKFNKHF-KNKIKKIKIVNKGSED	1171
PF3D7_1106800	1359	LLYLYDHNNNVYKYNTQYIDVTYNNNSYPSIFYWTPPEILRGKKKNKFYSD	1408
		: : .:. .:.: : : : .:.: : .:. .:. .:.: : : : : : : : : :	
PBANKA_094010	1172	MLHVFSSKNHIYKYNTREINVSSNTHNSSVFFWTSPEILKGKQSPSLYSD	1221
PF3D7_1106800	1409	IYAFGIILWEMLSNDIPYNYPFASHIMAVVGYANEELSFNNIPVSIQSLI	1458
		: :	
PBANKA_094010	1222	VYAYGIILWELMTNSVPFNRYFKSHLLASVGYAKESLPFQNIPPFIKNI	1271
PF3D7_1106800	1459	KACVNRNKYKRPTFEHILKTISTLYQKANTKVEDALISFMDGT	1501
		: :	
PBANKA_094010	1272	KSCINRNKYKRPTFDRILIEISMIYEQINPKEEDALMSFMDG-	1313

L'alignement a été effectué avec Needle https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/

Les domaines de *Pfp*TKL sont également surlignés : MORN, SAM, RVxF1, RVxF2, BTK-like, Kinase (pourcentage d'identité des domaines de 50 à 70% entre les deux homologues).

Le programme a également rendu les résultats suivants :

Identité : 577/1593 (36.2%)

Similarité : 814/1593 (51.1%)

Gaps : 372/1593 (23.4%)

Score : 2367.5

AAAAATATAAATGATTGGATAAAAGTAAAATTGTTATAGAAAAAAAATGCACGAAAAATATTAAATAATA
TTTGTTCACAACCTCCAAACCCCTTTCATTTTGAGATAAGTCTGTCAAAAAATCGGGCGGAAGCGTATGT
ATCAAAAAGGGAAACATATTTTACCCTTGATTATTTTATTATATATTTTTTTTTTTTTTATTATTTTATATT
TTCCACCACTATTTTCGTTATTTCAATTTTAAAAACGTCTGGTATGTTTCATCTCAAACCGAGAGATAGAAAT
AGAAAAAATAAAATAGCCAAAAAAAATTTAAAATGAAATTTAATAAAATATAAAACAAAA
GTAGCTATTATATACACAAAGGGAAATATCAATCAAACTATGCACATATATTATCTATATTTATGCAT
AAATATGTTTGTGAACAAGATTTCTGCAACTTGGTACTCAGAATAATGCAAAAGATATTAAGGAGAAT
TAAATAGAATTGAAAATAAACAAATAAAATAGTAGGATTAAAATAGTAACATCGGAAGGAAATAATAT
TGCCTAATTTTCATGATTGATATTCAAAAATATAAATTTAAATAACTACATAATATTCGAAATAATAAT
AAATGTGCAAAATATATAAATTATAAAAAATGTATTTACTTTATAATATAATCATAAATATTATATTGTA
TGTATGAATAAATGTGTTTAGTTTGATTTTCAATTATCAAATTTTTTAATTAGGATGTTTTTATTTGATT
TGAGCAAAGTTTATATTTTTGTTAATTTTTACTCTTAAATTATTTAAAATCATGTTATATACTAAATTA
TATTTGTAGAAATATATAATGGGAAATATAAATTCTATTCAAACAAAAAATTACATAAAATTTGA
AAAATATTATTATGCTGGGGATTTGAATGTAGATAAATTGCCACATGGTAGGGGATTAATGTTATA
TGAAAATGGAAATTCATTTTTTGGGCATTTTATAAATGGTAAAAAACATGGTAAAGGAATATATA
TCGATAAAAATTTAACAAAATACATTTCAAATGGAAATATGATCATATTTCAAATAAAGTTAAA
GTTAAACAATTTGACAGTGATATTGTTTATTTTATTATAAAAAATGGTTTAATTGATCATTGCA
AGGTTTATGAGTATATATCAAATAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGATGGAATACTAG
AAGACAGTGAAATACAAAATCGATCGATAAATTTTGAAAAAGACAATATTATGATAATTCAAAA
TTGCCAAGAAAAATCAATTGTTAATAAAAAAGAAGAAATTATTGATATACCTAATAATAAGTAC
AATGAAATGATGATACTGATAAAGTAGATAATTTTTCAAAGAAAATAAACCTAGAGCAATCTC
AAAACAATATGTTAAAATATAAAAAAAAAAAAAACATTTGATGAAATGAACTCTTAAATGATTC
CATATTTTGCTCATCATGTGAATCTACTTCTAAATCAATTGGATCAGATTATATTTACATTTTGAA
AAAAAAGAAAAACAAATAAATAAACAAGAAGACGAACTTAAAAAATCGAAGGAAAATTATAT
GAACCATAGTGAATACAGTAATTCATCAACTAACTTTGAAAATAACAAAATAAAAGACATATCT
GACGAAAGTATTATGCTAAGGCTAAAAAATATAATAAACAATAATACAGATTTAAAAAATTGAAA
ATTATGAGCTGTGGAATAAAGAACAAGTAGCACAGTGGCTTAGTTTGTGTAATGTTCTATGAAA
TGGGCTTTAAGCGTTTATAAAAAATAATATTAATGGCCAAAGATTAAATAAATTAACTTATATTT
TATAAGAAATAAACTTGGAATATTATCATATGGGCAAGCTATCAAATTTTTACAACCTATAAAAA
ACCTGCGCGTTACGGCTTACAACACAAGTTTTCTAATACGTTGAACTTAGAAGAATATGAAATT
TACCTAAAAAAAATGAAAAAAAAAAAAATGAGAGAAAACAAAGACGGTGAATACACAGC
GACAACAAGTAGCCAAGCAGAAGACTTTCAGAAAAATAATCAAAAAATAATAATGAATCAAAT
TAAATCAATGATAGACCAAAAAAATGATGACGATAAATCGTTTTCAGATAAAATAAAAAATGGA
TTTTTCAAAGGAAATACAAATATCAGAAATCTACAAAATTTAGTAATAAATTCATATGGAATAA
AAGTAAAGATGAATTTAAATTCCTATTGATGAAAATAATGTTCTATGAATATCGAAAAAGGAA
AGGAATTAATACTAATGACCAAATTACAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAATTAAAAAATAAATATA
TTAATCATATTCAAAAAAATATATCTATGTTAAAAAATTAAATAACGCATCTAATGAATCACAA
TCAAGTAATGAATCCGTCACACAAATATTATCTACCTCTTCAGAATCATCCTTTGCAAATATACAT
TCTGGTTTATCCTCGAAAATGCTATTTACGACAAATTGGAGCCCCGAACCTATTAAGCCAAATAA

AGAAAAGGAGGAAAACAACCCGAATCTTTCTCCTATTATAAAATTCTAAAAATGAACTAACTTAT
 TAAACGATTCAAACCCAACAAAATTACAAGATGAACTACCAAATCACCCTGTTTCGATAGACTC
 AGAAAGTTCATCAGAAAAATCGTCAGAAACATCGTCAGAAACATCTTCGTTTTGCTCCGAACATA
 GCGAGTTTGCCAACTTTCACAATAATAACAAAATAGTAAAATATAGCAATAATATAT**ACATCAAT**
AGCAGTTTGGCATTTTCATATATATATAGCTTTATAATACCTCCAGAAAATTTAACATTTTTGTAT
 CAAATAAGAAATTATTATGTTAGAGATGTAGAAAATGATTTGAATCCAAACAATGAATTAGATTT
 TTGTGATAGTTTTAACTTTTACAAAAATTGTGAAATTATTAATAAATAAGAATAATAAACCTGGTAT
 TAGAAATTGCTCATATGCATCAAATCATTCTAAATTCCAACAAAATAAAAAATAGAAAATATTTTA
 ATTATAGTGATTGTAAAAATGAAAGAAAAAAGACAAAACCCCAAAAAATGAAAAGTAGAGTAT
 TTAGAGGTAGATATATGGGTAAAGATGTGCTATAAAAGTTTTAGTTGGAAATATAAAAAATTTT
 ACAAATTTTCATAAAGTTTTATATAAGTTATATATTTTAAGGCATACTAATATAGCATTAAATAATG
 GGTGTTTCAATTAGCTATCCTTTTGTTTTTATAATATATGAATATATAAAAAATTTATGTCTATTTTC
 TTATTTGCATTGTGTAAAAATATAAACATATTTATGTAAGCAAACCTTTTAAAAATATTATCAAAAAAA
 ATTCATAAATCAAAATTTTCAACAACAAAATAATACAATGTCTAGTGATAGAAAATATATTTCAA
 ATGATGATAATGAAAAAATTAATTTTGATTTCGAGGAATATTTTAAGAAACAAACCTTTTAGAAATA
 AAATGCAAAAAATAATGCAAAAAATAAAATAACCGAAAAAAATAATTTAAAAGATGAACAGATT
 TATTCTTCATCAACGTCAATCAAATCTTTAGACACTAGTTCATCTAATATGAATAATACAAAACCTA
 AAAAATATAAATTTTAACAAGAACCGATATATAAATAAAATACATTCCATGTTTCAGAAATAAAAA
 ATAATATATTGTGTGGTAATTATTATTATTTATTAGAAAAAAGAAAAACAATATATCTATATCAC
 ACGAACATAAAAAACAGTGATCGAACAATCTTCACAAATGAGTCACAAAATTTATTAAAAAATAA
 AATATCCCAAAAAAATAAATAAAAAATTAACTTTAAAGCTAAAATCAAAATAAATCGTCCA
 TATGCCTTTCCACCACTTCAAGAAGATTTTAATTTTTATTAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
 AATTTTATTAGTTATCTAAAAACACATTCCTATTTTAAATCGAAAAAATGTGACAGCAGAAAAA
 ACAAATTGTCTGATCATCAAATAATGAAAATCATCATgtaaaaaaaaaaaaataataaaaaataataaaaaataaa
 taatagtataataataatgataataataatagtgatcataataatgataataaattactattttctataaaatgcacattcatcattacattcttttcattt
 catcag**GGACATTACCCTAGCTTGCTCTT**ATTGGAAAAACAAAAGgtattatattgctgtatctaactattccactttatt
 gcataaacatttaattgtgcatacatgcacctaataatataaaactctatacattttttgcattttttccacatgtgtatataaccttattaatacaatcagGT
 ACGATGGATAAACCTCAAACCGACTAATATTTTACTTGACGGATCTCTAAATGCAAAAAATAT**CCG**
ATTTTGAATTAAAGAAATAGAACAATGTCTCGACATAAATATTGATTATTCTTATATAGTTTTTC
 CAAATAATGTAATCAAATTTAATAATAAGCACTTCAAAAATAAAATCAAAAAAATAAAAAATTGT
 GAATAAGGGTTCAGAGGATATGCTCCATGTATTTAGTTCCAAAAATCATATTTATAAATATAATAC
 ACGAGAAATTAATGTATCTTCAAATACCCATAATTCCTCTGTTTTTTTTTGGACATCCCCTGAAGtaa
 acaaaaaaacaatgcataaatatattacatatatgaataaattcagagtataaccctacctcttatttttactataggattaacttattcataacatattat
 ttaatttatagATATTAAAGGGGAAACAAAGTCCAAGTTTATATTCAGACGTATATGCTTATGGTATTAT
 ACTATGGGAACCTTgtaaggctaattggatatcaattaaatataaacaataaaaaaacataaaaaaatgaataaatgaacaagtcatac
 atgttacataaatctgtaattagcaaatataattccaaaaatattttattttttcttcagATGACAAATAGTGTTCCTTTTAATTATC
 GTTTTAAATCTCATCTTTTGgtataagcatatgtctattaatagcgtgtcaactcttatgaaaaatataataaaaaatttatatacatttcatttt
 atgcataacatcgattattattattttcattatagGCTTCAGTTGGATATGCCAAAGAATCATTACCCTTTCAAAATATT
 CCACCTTTTATTAAAgattataaaaaaatatcaatataaaataagccacattcatttatcccaaaaatgttgcatTTTTTTTTcttttttagAATT
 TAATAAAGAGTTGTATTAATAGGAACAAATATAAAAGACCTACATTTGATAGAATTTTAATTGAA
 ATTTCAATGATATACGAACAGgtatagtttataaacaacatagtttctcatattttcactttttcattttttcattgtcctaactcatatatacctc
 tcttttcagATTAACCCTAAGGAAGAGGAC**GCTTTAATGCTTTTTATGGATGGA**TAGTAAATATGTTAT

AACAAAAGTTAAATAAAATTTTACTAAAAAACTAAATTATCAATTTATA **TACAAATATCACATTGGAA**
TTTGCTTTTTTTTTCATTATATTTGTATGTTAAGTGTTATATGCCCATTTTTTTTTGTGTTAATTTTATTG
ATTTTTTTGACATTTTGAAATTAATAATTCATCCCTTATTATATAGCAATATTCTTCATTTTTTCCTAATTT
TTGTGTAAATACACTTAATTACAATAACATATATATTTCTGTTTCGTGTGTACCTCTTTAATTAGTATAC
TTATATTTAATGTTATTATATACGAAAATATATAATAAGCTTAATATTAAGCTTAAATTTTTTTTTTAA
AATTTTTTTTTCTCCAAACACAACGAATATACAACATATGAAAAAAAAAGGGAAAAATATGTATACAAT
ATATATGGATATTTTTCTTATATAAAATATTTAAAAAAAAAAAAATACATAATTATATATTTATAAAAAATA
TTATTTCTTTAGCTATTTTTAAGAAAAATGTCTAACTTTTATGAAAATGATGATGATGTTCTTCAAAT
GATACAACAAATAAAAAAAAAATACTAATGAGTCAAAAAGAAAATTTGAACATGAAATAGATTATTTA
GTCAAAGATACAAAAAAT **TGTTTAATTAACACTGTTAATCATGAA**AAAAATGCTATAAAAAATACAGC
AGAGGAAAAATTAAATAAATAT **CGTGAAAATATTTTAAAACAGGAAAAAAATATTAAGAAAAACAT**
AGAATATATCAAAAATTGAAAA **CCGAATTAGCTCAAGTAGCAAAC**AATTACAAAAATAAAATTAAGgt
tatttattttaaacattttagaatatatttatttaactatataaaatcttcaattcattatatataatgtgcatttatatacatcttcttatatataatttatac

Séquence du gène *PbpTKL* : exons en lettres MAJUSCULES – introns en lettres minuscules – UTR en *italique* – gènes attenants en *italique*

Amorces utilisées pour le clonage + génotypage en pBS-DHFR : 5' en jaune, 3' en vert

Amorces utilisées pour le clonage + génotypage en pG362 et pL1886-mCherry : en rose

Amorces utilisées pour amplifier les 964 premières paires de *PbpTKL* (F5'/R5') : en mauve

Amorce GT utilisée pour génotyper les parasites transfectés avec le PGem-342364 : en rouge

X. Données brutes de l'interactome de *PbpTKL* (partenaires de *PbpTKL*)

NEGATIVE CONTROL		IP <i>PbpTKL</i> -AID-HA			significant	Gene name	Taxonomy	Protein Name
WT1	WT2	WT3	pTKL Ghosts 1	pTKL Ghosts 2	pTKL Ghosts 3			
			25.15 21.77	25.39 21.40	27.88	PbpTKL-AID-HA C1rb	Plasmodium berghei Mus musculus	Protein kinase, Complement C1r-B subcomponent OX=10090
				26.55	28.05	Fhl3	Mus musculus	Four and a half LIM domains protein 3 OX=10090
				26.40	28.68	Crip1	Mus musculus	Cysteine-rich protein 1 OX=10090
				26.27	24.44	Optn	Mus musculus	Optineurin OX=10090
				25.34	24.97	Metap1	Mus musculus	Methionine aminopeptidase 1 OX=10090
				24.62	22.12	Rnf31	Mus musculus	E3 ubiquitin-protein ligase RNF31 OX=10090
				24.43	26.24	Rps7	Mus musculus	40S ribosomal protein S7 OX=10090
				24.36	25.76	Csrp1	Mus musculus	Cysteine and glycine-rich protein 1 OX=10090
				24.28	23.80	Prdx3	Mus musculus	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OX=10090
				24.19	25.98	Zyx	Mus musculus	Zyxin OX=10090
				23.92	26.57	PB001410.02.0	Plasmodium berghei	40S ribosomal protein S10, putative OX=5823
				23.87	24.35	PBK173_000072300	Plasmodium berghei	PHF5-like protein, putative OX=5821
				23.69	22.85	Ap2a2	Mus musculus	AP-2 complex subunit alpha-2 OX=10090
				23.46	23.25	Mgst3	Mus musculus	Microsomal glutathione S-transferase 3 OX=10090
				23.37	25.26	Pcbp2	Mus musculus	Poly(rC)-binding protein 2 OX=10090
				23.19	23.67	Traf5	Mus musculus	TNF receptor-associated factor 5 OX=10090
				23.12	25.08	PB000180.03.0	Plasmodium berghei	40S ribosomal protein S7 OX=5823
				23.09	24.45	Rpl29	Mus musculus	60S ribosomal protein L29 OX=10090
				22.68	24.18	Lasp1	Mus musculus	LIM and SH3 domain protein 1 OX=10090
				22.15	21.23	S100a14	Mus musculus	Protein S100-A14 OX=10090
				21.99	24.64	Cnn2	Mus musculus	Calponin-2 OX=10090
				21.83	22.38	PB001131.01.0	Plasmodium berghei	Tryptophan/threonine-rich antigen, putative OX=5823
				21.81	22.91	Tln1	Mus musculus	Talin-1 OX=10090
				21.64	23.19	Isg15	Mus musculus	Ubiquitin-like protein ISG15 OX=10090
				21.49	22.25	Psmb5	Mus musculus	Proteasome subunit beta type-5 OX=10090
				21.02	22.39	Atp5f1c	Mus musculus	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OX=10090
				20.97	23.45	Abcb10	Mus musculus	ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial OX=10090
			22.24		24.28	PBK173_0000169600	Plasmodium berghei	Uncharacterized protein OX=5821
			22.11	22.94		PBNK65E_000100600	Plasmodium berghei	Ubiquitin-2 like Rad60 SUMO-like/Ubiquitin family/Ubiquitin-like domain containing protein, putative OX=5821

Données brutes obtenues au cours de l'étude de l'interactome de *PbpTKL* par spectrométrie de masse. Seules les protéines partenaires de *PbpTKL* sont indiquées. Les échantillons WT 1 à 3 correspondent aux contrôles négatifs utilisés (i.e. extraits de GRi par des parasites WT incubés sur des billes HA) et les échantillons pTKL Ghosts 1 à 3 sont issus de l'immunoprécipitation de *PbpTKL*-AID-HA à partir des ghosts et de la VP des GRi par des parasites de la lignée *PbpG230* exprimant *PbpTKL*-AID-HA. Les chiffres indiqués pour chaque protéine (colonnes 1 à 6) correspondent à la quantification label-free effectuée à l'aide du logiciel MaxQuant version 1.5.2.3.