



**Caractérisation d'un effecteur de phosphoinositides  
chez le parasite de la malaria *Plasmodium  
falciparum***

**Mémoire**

**David Gaumond**

**Maîtrise en microbiologie-immunologie**  
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© David Gaumond, 2016

**Caractérisation d'un effecteur de phosphoinositides  
chez le parasite de la malaria *Plasmodium  
falciparum***

**Mémoire**

**David Gaumont**

Sous la direction de :

Dave Richard, directeur de recherche

## Résumé

La malaria est une maladie infectieuse causant plus de 500 000 morts chaque année. La maladie est causée par un protozoaire de la famille *Plasmodium*. L'apparition de souches résistantes aux traitements actuels et l'absence de vaccin efficace rendent la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques urgente. Le parasite possède un complexe apical, un groupement de vacuoles sécrétoires spécialisées contenant les protéines responsables de l'invasion du globule rouge. Nous nous intéressons aux mécanismes gouvernant le transport intracellulaire de ces protéines et à la biogenèse du complexe apical lors de la formation des nouveaux parasites. Plus particulièrement, nous nous intéressons au rôle des phosphoinositides dans le recrutement des protéines à la membrane de l'appareil de Golgi. Par analyse bio-informatique du génome de *P. falciparum*, nous avons identifié plusieurs protéines effectrices liant potentiellement les phosphoinositides. Les travaux présentés dans ce mémoire concernent Mal13P1.188, une protéine possédant un domaine Pleckstrin homology. Nous proposons que Mal13P1.188 ait un rôle dans la génération du complexe apical en recrutant les protéines le constituant à la membrane du Golgi par la liaison avec les phosphoinositides. Afin de vérifier nos hypothèses, nous avons généré une lignée de parasite dont le gène de Mal13P1.188 est fusionné avec une GFP et une hémagglutinine. À l'aide de cette lignée de parasite, nous avons pu identifier Mal13P1.188 à proximité de l'appareil de Golgi lorsque les parasites étaient sous la forme schizont du cycle érythrocytaire. D'autres expériences ont permis de confirmer que le domaine Pleckstrin homology de Mal13P1.188 était capable de reconnaître les différentes formes de phosphoinositides. Finalement, d'autres travaux devront être faits sur Mal13P1.188 afin de déterminer si elle est essentielle à la survie du parasite.

## Abstract

Malaria is a deadly infectious disease taking more than 500,000 lives each year. The disease is caused by a protozoan of the *Plasmodium* family. Resistant strains beginning to spread and the inexistence of an efficient vaccine make the discovery of new targets urgent. The parasite secretes proteins to invade the red blood cell. Those proteins are regrouped in the apical complex, a group of organelles used for the invasion. Our research team focus on the transport mechanisms that drive the formation of the apical complex during the cellular division of new parasite. In other terms, we are interested on the role of phosphoinositide in the recruitment of protein inside the Golgi apparatus. After a bioinformatics analyse the *P. falciparum* genome, we identified many effectors protein that can bind phosphoinositides. Among them, we focused our work on Mal13P1.188, a protein with a Pleckstrin homology domain. We propose that Mal13P1.188 has a role in the recruitment of the apical proteins to the Golgi membrane using phosphoinositide as a marker on the membrane. To verify that hypothesis, we generated a strain of parasite with endogenous Mal13P1.188 tagged to a GFP and a hemagglutinin. With those parasites, we identified Mal13P1.188 near the Golgi apparatus during the Schizont stage of the blood cycle. Other experiment confirmed that the Pleckstrin homology domain of Mal13P1.188 is able to bind different form of phosphoinositides. Finally, more work has to be done to confirm if Mal13P1.188 is essential to the parasite survival.

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des Figures .....	viii
Liste des Abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
1. Introduction .....	1
1.1 Généralités .....	1
1.2 <i>Plasmodium falciparum</i> .....	3
1.2.1 Le cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	3
1.2.1.1 Le stade pré-érythrocytaire .....	4
1.2.1.1.1 Le stade Anopheles .....	4
1.2.1.1.2 Le stade hépatique .....	5
1.2.1.2 Le stade érythrocytaire .....	5
1.2.1.3 Le complexe apical .....	8
1.2.1.3.1 Les micronèmes .....	9
1.2.1.3.2 Les rhoptries .....	9
1.2.1.3.3 Les granules denses .....	10
1.2.1.4 Le développement du cycle érythrocytaire .....	11
1.3 La synthèse protéique .....	13
1.3.1 Le transport protéique intracellulaire .....	14
1.3.1.1 Ras-like GTPases (Rab) .....	14
1.3.1.2 Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE).....	15
1.3.2 Le système de sécrétion protéique chez <i>Plasmodium</i> .....	15
1.3.3 Les phosphoinositides.....	19
1.3.4 Les effecteurs de phosphoinositides .....	21
1.3.4.1 Les domaines d'interactions .....	22
1.3.4.1.1 Pleckstrin homology domain .....	22
1.3.4.1.2 Phox homology domain.....	23
1.3.4.1.3 Domaine FYVE .....	23

1.3.4.2 Les protéines modifiant les phosphoinositides .....	23
1.3.4.2.1 Kinases .....	23
1.3.4.2.2 Phosphatases .....	24
1.3.4.2.3 Phospholipase C.....	25
1.4 La prévention et les traitements .....	27
1.4.1 La prévention .....	27
1.4.2 Les traitements.....	28
1.4.2.1 Quinine .....	28
1.4.2.2 Chloroquine .....	29
1.4.2.3 Artémisinine .....	29
1.4.3 La vaccination .....	30
2. But et Hypothèse .....	32
2.1 Problématiques actuelles .....	32
2.2 But.....	32
2.3 Hypothèse de recherche .....	33
3. Matériels et méthodes.....	34
3.1 Culture cellulaire de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	34
3.2 Clonage de Mal13P1.188 dans le plasmide pGDB .....	34
3.3 Synchronisation des cultures de parasites .....	34
3.4 Transfection des parasites .....	35
3.5 Intégration du plasmide pGDB au génome du parasite.....	35
3.6 Isolement de parasites à partir de globules rouges infectés.....	36
3.7 Test d'intégration de la cassette GFP-HA par Southern blot.....	36
3.8 Détection de Mal13P1.188 par Western blot.....	37
3.9 Détection de Mal13P1.188 par microscopie à fluorescence.....	38
3.10 Localisation de Mal13P1.188 par immunofluorescence .....	38
3.11 Production du domaine PH recombinant chez <i>Escherichia coli</i> .....	39
3.12 PIP-Strip .....	40
4. Résultats.....	41
4.1 Test d'intégration de la lignée Mal13P1.188-GFP-HA.....	41
4.2 Expression de Mal13P1.188 durant le cycle érythrocytaire .....	43
4.3 Localisation de Mal13P1.188 par immunofluorescence .....	45
4.4 Spécificité élargie du domaine PH de Mal13P1.188.....	47

5. Discussion .....	48
5.1 Rôle de Mal13P1.188 dans la génération de nouveaux parasites.....	48
5.2 Rôle dans le transport vers l'apicoplaste .....	49
5.3 Spécificité élargie du domaine PH de Mal13P1.188.....	50
6. Perspectives .....	52
6.1 Rôle essentiel de Mal13P1.188 chez <i>Plasmodium falciparum</i> .....	52
6.2 Identification des partenaires d'interaction .....	54
6.3 Spécificité du domaine PH .....	55
7. Conclusion .....	57
Bibliographie .....	58

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	4
<b>Figure 2.</b> L'invasion du globule rouge par le mérozoïte.....	6
<b>Figure 3.</b> Anatomie du mérozoïte de <i>Plasmodium</i> .....	9
<b>Figure 4.</b> Cycle érythrocytaire de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	12
<b>Figure 5.</b> Schéma du transport vésiculaire de Rap2 lors de la formation des rhotries.....	17
<b>Figure 6.</b> Schéma des différentes formes de PIP présentes chez les cellules eucaryotes et les différentes possibilités au niveau de la modification des sites de leur tête inositol.....	20
<b>Figure 7.</b> « PIP code » chez la levure .....	21
<b>Figure 8.</b> Schéma d'intégration de la cassette GFP-HA au gène Mal13P1.188 endogène de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	42
<b>Figure 9.</b> Résultat du Southern blot testant la lignée exprimant Mal13P1.188 fusionné à une GFP et à une hémagglutinine.....	43
<b>Figure 10.</b> Western blot de l'expression de Mal13P1.188 durant les différents stades du cycle érythrocytaire.....	44
<b>Figure 11.</b> Image en microscopie à fluorescence de notre lignée Mal13P1.188-GFP durant les différents stades du cycle érythrocytaire.....	45
<b>Figure 12.</b> Photo de microscopie à fluorescence des tests de localisation par immunofluorescence de Mal13P1.188 chez le parasite <i>P. falciparum</i> .....	46
<b>Figure 13.</b> Résultats des tests de liaison du domaine PH et d'un mutant ayant une polarité modifiée (Tyrosine par un acide glutamique en position 12), aux PIP sur PIP-strip.....	47
<b>Figure 14.</b> Système d'expression conditionnel utilisant la ribozyme glmS.....	53
<b>Figure 15.</b> Système d'intégration utilisant le système CRISPR/Cas9.....	54

## Liste des Abréviations

ACP	Acyl-carrier protein
ACT	Artemisinin-Combinaison Therapy
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMA1	Apical membrane antigen 1
ARN	Acide Ribonucléique
BSA	Bovine serum albumin
BSD	Blasticidine
Cas	CRISPR-associated protein
COP	Coat Protein
CSP	Circumsporozoite protein
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DSP	Dithiobis[succinimidyl propionate]
EBA	Erythrocyte binding antigen
ecDHFR	E. coli dihydrofolate reductase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FITC	Fluorescein isothiocyanate 1
GAP	GTPases accelerating protein
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Green fluorescent protein
GSK	GlaxoSmithKline
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Hémagglutinine
HSP70	Heat shock protein
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphate
LB	Luria-Bertoni
MIC	Adhesive microneme protein
MSP-1	Merozoite surface protein
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Acide phosphatidique
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PfEMP1	Erythrocyte Membrane Protein-1
PfPI3K	PI3P kinase
PfPI4KIII $\beta$	PI4P kinase de type III bêta
PfRH	Reticulocyte binding-like protein
PH	Pleckstrin-homology
PI	Phosphoinositide
PIP	Phosphoinositol phosphate
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylserine
PX	Phox-homology domain
Rab	Ras-related in brain GTPase
RAMA	Rhoptries-associated membrane antigen

RAP	Rhoptry-associated Protein
RE	Réticulum Endoplasmique
RON	Rhoptry neck protein
ROP	Rhoptry protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
SRP	Signal Recognition Particle
Synj1	Synaptojanin1
TMP	Trimetoprim

*À ma famille que j'aime et en mémoire de  
mon grand-père, Fernand Beaulieu*

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Dave Richard qui m'a accueilli au sein de son équipe de recherche. Grâce à lui, j'ai pu nourrir ma curiosité scientifique sur un sujet qui m'intéressait beaucoup. J'ai aussi eu la chance de travailler avec une équipe de recherche formidable. Ils ont su m'accompagner tout au long de mon projet et je leur dois la plupart de mes réussites. Dominic Gagnon, Stéphanie Hallée et Catherine Thériault vont se rappeler de la plupart de mes citations célèbres qui resteront entre nous je l'espère bien.

Je tiens à remercier toute ma famille pour le support qu'ils m'ont offert. Nous avons passé des étapes difficiles avec la mort de mon grand-père, mais nous avons su rester forts et je suis certain qu'il est fier de nous. Ma mère et mon père, Nathalie Beaulieu et Alain Gaumond, qui ont su m'encourager tout au long de mes études. Ils m'ont appris à être persévérant et toujours donner mon 100%. C'est grâce à cette détermination que j'ai réussi à compléter mes études supérieures et je leur en suis très reconnaissant. Mon frère Étienne Gaumond, avec qui j'ai eu beaucoup de conversations durant les moments plus difficiles. Il a su me donner l'énergie qui me fallait pour avancer dans mes travaux.

Finalement, je tiens à remercier les Instituts de Recherche en Santé du Canada et leur financement, sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour.

# 1. Introduction

## 1.1 Généralités

La malaria, aussi connue sous le nom de paludisme, est une cause importante de mort en Afrique, et plus particulièrement dans la région subsaharienne. Il s'agit de la maladie tropicale la plus importante sur le globe. En effet, 3.2 milliards d'êtres humains sont à risque de contracter la malaria simplement dû à la présence du parasite dans plus de 106 pays<sup>1</sup>. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 214 millions de cas ont été rapportés dans le monde en 2015 dont 88% sont localisés en Afrique. Le nombre de morts est estimé à 438 000 mondialement dont 90% sont situés dans la région Africaine chez les enfants de moins de 5 ans<sup>1</sup>. Après l'instauration du plan d'action de l'OMS, nous avons vu une diminution de la mortalité de 50% depuis le début des années 2000. Toutefois, l'apparition de souches résistantes aux traitements de première ligne et l'absence de vaccin efficace rendent la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques critiques<sup>2</sup>. Beaucoup d'efforts ont été mis en place depuis les années 2000 afin de réduire la quantité d'infection grâce à différentes techniques de prévention. De plus, plusieurs travaux ont été réalisés afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'infection, et ainsi développer de nouvelles méthodes afin de combattre le parasite<sup>1</sup>.

Les symptômes de la malaria sont principalement de la fièvre, des maux de tête, des vomissements et une anémie qui se manifeste aux 48h. Ces symptômes apparaissent 10 à 15 jours après la transmission du parasite par un moustique infecté<sup>1</sup>. Nous allons discuter plus en détail du cycle de vie du parasite afin de mieux comprendre les phénomènes responsables de la pathologie dans la prochaine section. Lorsque l'infection est sérieuse, une réduction importante des globules rouges est observée réduisant l'apport en oxygène aux organes et tissus. Certaines souches de parasite peuvent aussi former des agrégats de cellules obstruant les vaisseaux sanguins menant souvent à plusieurs complications cardiovasculaire comme la malaria cérébrale qui peut causer la mort<sup>3</sup>.

La malaria humaine est causée par cinq espèces de parasite protozoaire du genre *Plasmodium* : *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale* et *P. falciparum*. Ce dernier est l'espèce la plus mortelle, responsable de 90% de la mortalité dans tous les cas de malaria sur le globe, qui est pour cette raison l'espèce la plus étudiée. En effet, c'est *P. falciparum* qui cause les complications aux différents organes, dont le cerveau<sup>4</sup>, amenant l'hôte dans un coma dû à l'adhésion des cellules sanguines dans les vaisseaux sanguins du cerveau.

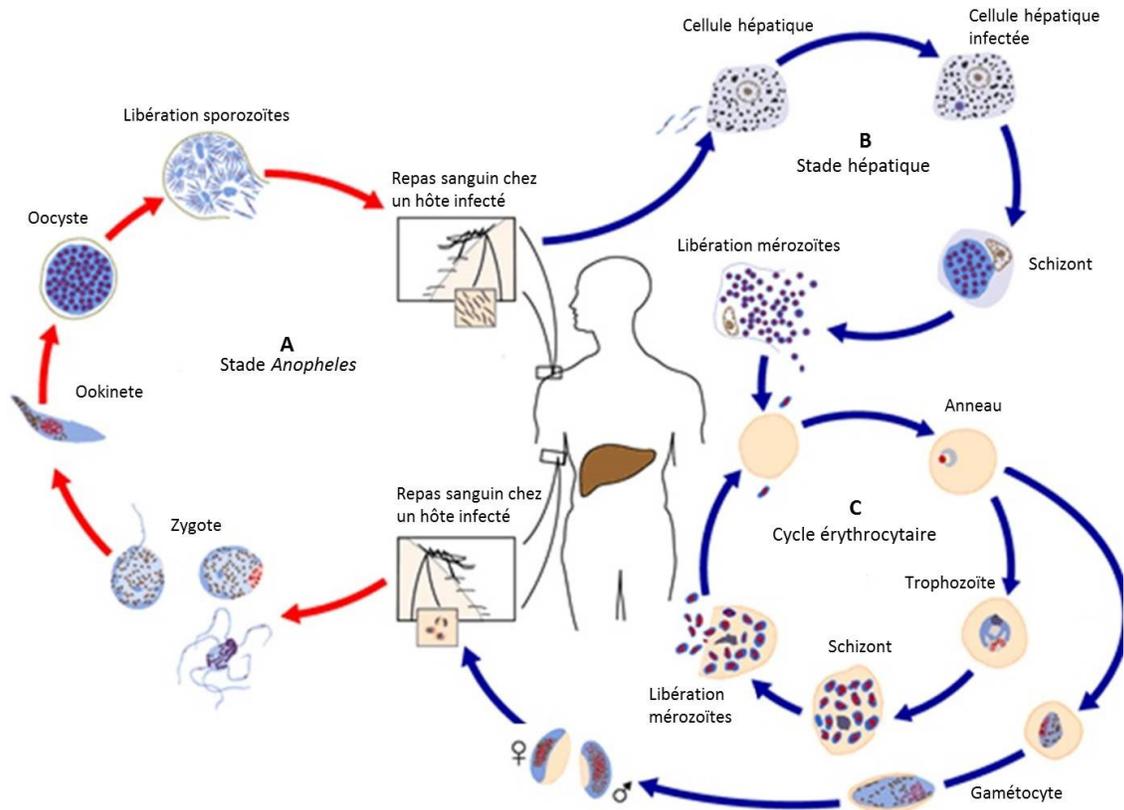
Cela est causé par l'exportation de protéines à la surface du globule rouge et responsable de la cytoadhésion<sup>5</sup>. Ce mécanisme permet entre autres au parasite d'éviter la rate et causer une réduction de l'apport d'oxygènes aux tissus et organes<sup>4</sup>. La rate permet d'éliminer les globules rouges altérés. Ainsi, les globules rouges infectés par *P. falciparum* sont modifiés et éliminés lorsqu'ils passent dans les capillaires de la rate<sup>6</sup>. Plusieurs protéines sont responsables de cette cytoadhésion, mais une protéine en particulier, la PfEMP1 est le centre d'intérêt de cette recherche. Cette protéine est un antigène retrouvé en grande quantité à la surface du globule rouge infecté pouvant être reconnu par le système immunitaire. Chaque parasite possède 60 versions du gène *var* codant pour une PfEMP1 et chacun est antigéniquement unique. Lorsqu'une version du gène est exprimée, les 59 autres sont inhibés, laissant une seule version de la protéine à la surface du globule rouge. La transcription des autres gènes *var* est inhibée par un mécanisme qui semble impliquer la méthylation des histones<sup>7</sup>. Ainsi, chaque globule rouge infecté va exprimer une version différente de PfEMP1 à sa surface rendant l'éradication du parasite difficile pour le système immunitaire. De plus, des mécanismes de recombinaison dans les gènes *var* permettraient à *P. falciparum* de générer de nouvelles séquences de PfEMP1 rendant la reconnaissance par le système immunitaire encore plus complexe<sup>8</sup>.

## 1.2 *Plasmodium falciparum*

Les parasites *Plasmodium* font partie d'une famille de protozoaires appartenant au phylum *Apicomplexa*. Ce groupe comprend plusieurs autres familles de parasites intracellulaires comme *Toxoplasma* et *Cryptosporidium*. Même si les cellules hôtes des *Apicomplexa* sont très différentes, ces parasites possèdent tous des organelles sécrétoires très spécialisées, le complexe apical, les différenciant des autres phylums<sup>9</sup>. Certaines protéines sécrétées vont être spécifiques à la cellule hôte infectée et donc différentes chez les différentes familles d'*Apicomplexa*. En ce qui concerne *Plasmodium*, il se retrouve principalement au niveau de l'équateur du globe : la région subsaharienne de l'Afrique, le nord de l'Amérique du Sud et le sud de l'Asie. De plus, on retrouve la souche mortelle *Plasmodium falciparum* principalement en Afrique ce qui explique la mortalité accrue dans cette région du globe<sup>1</sup>.

### 1.2.1 Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

Le cycle de vie complet de *Plasmodium* se sépare en trois étapes. Durant ces différents stades de vie, le parasite va exprimer différents gènes lui conférant la capacité d'infecter différents types cellulaires c'est-à-dire les glandes salivaires du moustique, les cellules hépatiques et finalement les globules rouges. Nous séparons la présentation du cycle de vie en deux sections distinctes. Tout d'abord le stade pré-érythrocytaire consiste au moment où le parasite ne cause pas les symptômes de la malaria. Il est composé du cycle *Anopheles* et du cycle hépatique (Figure 1, A et B). Finalement, nous allons voir plus en détail la deuxième section du cycle de vie qui consiste au stade érythrocytaire qui est aussi le stade sur lequel nos travaux de recherche se consacrent (Figure 1 C).



**Figure 1.** Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*. Les flèches rouges montrent le cycle à l'intérieur du moustique *Anopheles* et les flèches bleues représentent les stades retrouvés au niveau de l'être humain.<sup>10</sup> Traduit en français par David Gaumond

### 1.2.1.1 Le stade pré-érythrocytaire

#### 1.2.1.1.1 Le stade *Anopheles*

*Plasmodium* est transmis à l'être humain par un moustique vecteur de la famille des *Anopheles*. Plus de 300 espèces différentes existent sur le globe et plus de 50 d'entre elles sont capables de transmettre le parasite. Ceci est dû principalement au fait que le parasite doit reconnaître certains récepteurs sur les glandes salivaires présentes seulement chez certaines espèces et qu'il doit contourner les défenses présentes dans le vecteur<sup>11</sup>. Nous discuterons des différentes étapes de ce stade qui est illustré à la figure 1A.

Ce stade débute par l'ingestion de gamétocytes présents dans le sang de l'hôte infecté. Une petite portion des parasites présents dans le sang d'un humain infecté va se différencier en cette forme afin de pouvoir être transmis à un moustique lors d'un repas sanguin (Figure 1C). Lorsqu'ingérés par le moustique, les gamétocytes entrent dans une phase de maturation qui mène à la formation d'un

zygote dans la lumière de l'intestin moyen du moustique. Cette forme cellulaire est la seule du cycle de vie qui est sexuée. L'activation des gamétocytes est possible grâce au changement de température et de pH causant une activation menant à leur fertilisation. Le zygote diploïde va ensuite se différencier en une forme mobile appelée l'ookinete<sup>12</sup>.

L'ookinete va traverser la membrane péritrophique recouvrant le repas sanguin du moustique pour ensuite traverser la couche de cellules épithéliales composant l'intestin. Durant tout ce procédé, le parasite devra éviter l'action des enzymes digestives s'attaquant au sang ingéré. L'ookinete va alors se loger entre la couche de cellules épithéliales et la lame basale afin de former ce qu'on appelle un oocyste. Sous cette forme, *Plasmodium* va produire une très grande quantité de sporozoïtes qui seront libérés lors de la rupture de l'oocyste. Cette étape du développement prend de 10 à 24 jours dépendamment de l'espèce du parasite<sup>12</sup>.

Lorsque les sporozoïtes seront libérés, ils vont subir une pression provenant du système de défense du moustique. Ils devront survivre aux peptides antimicrobiens et aux autres facteurs humoraux tentant de les éliminer. En effet, seulement une faible quantité de sporozoïtes vont pouvoir atteindre les glandes salivaires et envahir la lame basale. Lorsque le parasite aura envahi l'organe, il va pouvoir envahir les cellules de la glande salivaire afin de se retrouver dans la cavité sécrétoire. Le sporozoïte va alors être transmis avec la salive lors du prochain repas sanguin<sup>12</sup>.

#### *1.2.1.1.2 Le stade hépatique*

Une centaine de sporozoïtes vont être transmis par un moustique infecté lors du repas sanguin. Ces parasites vont alors migrer vers le foie afin d'infecter les cellules hépatiques et commencer le stade hépatique (Figure 1B)<sup>5</sup>. Après sept jours, la cellule va lyser libérant des milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine<sup>13</sup>. Ce stade est essentiel au parasite et asymptomatique pour l'hôte. C'est aussi durant la migration des sporozoïtes que le parasite est le plus exposé au système immunitaire<sup>14</sup>. Il s'agit donc d'une cible intéressante pour le développement de vaccins. En effet, c'est en utilisant des protéines de ce stade que la plupart des compagnies pharmaceutiques tentent de produire un vaccin contre le protozoaire comme pour le Mosquirix que nous allons voir plus loin<sup>2</sup>.

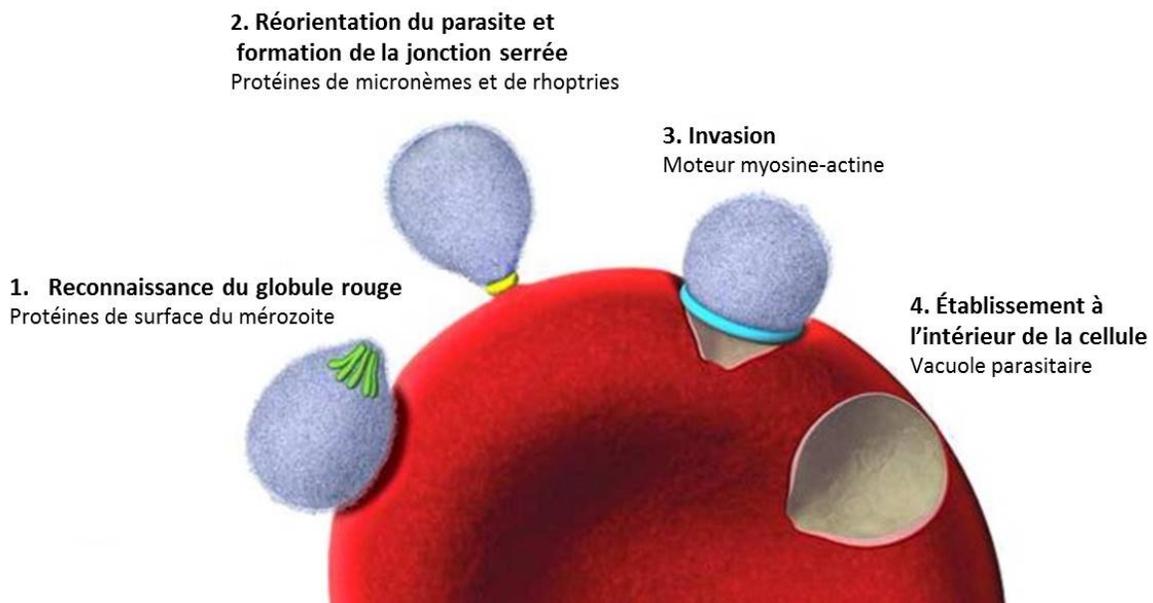
#### *1.2.1.2 Le stade érythrocytaire*

Nous verrons maintenant le stade érythrocytaire, qui cause la malaria chez l'hôte. Nous appelons aussi ce stade le cycle érythrocytaire, car le parasite produit d'autres mérozoïtes capables d'infecter de nouvelles cellules lorsque le globule rouge lyse. Ainsi, ce stade débute lorsque les mérozoïtes

sont libérés dans la circulation sanguine après la lyse des cellules hépatiques infectées. Tout comme le sporozoïte, le mérozoïte est aussi accessible au système immunitaire lorsqu'il est libre dans le sang. Toutefois, celui-ci est capable d'envahir un érythrocyte en moins d'une minute ce qui permet à plusieurs mérozoïtes d'éviter le système de défense de l'hôte<sup>15</sup>. Ceci est possible dû à la régulation et l'efficacité de son système d'invasion que nous allons voir plus en détail. Nous détaillerons tout d'abord l'invasion du globule rouge pour ensuite nous attarder sur le développement du parasite lors du stade érythrocytaire.

#### 1.2.1.2.1 L'invasion du globule rouge

Nous pouvons séparer les différentes étapes de l'invasion du globule rouge en trois phases. Tout d'abord, il y a la reconnaissance du globule rouge à l'aide des protéines à la surface du mérozoïte. Ensuite, il y a l'internalisation du parasite dans le globule rouge nécessitant plusieurs protéines de *Plasmodium* et son moteur d'actine. Finalement, il y a l'échinocytose qui consiste à l'établissement du parasite à l'intérieur de sa cellule hôte. En effet, puisque les globules rouges ne possèdent pas de noyau, le parasite doit fournir son propre système de sécrétion protéique. Nous allons donc voir les étapes de liaison et de l'internalisation du parasite plus en détail.



**Figure 2.** L'invasion du globule rouge par le mérozoïte.<sup>16</sup> Traduit en français par David Gaumond.

La première étape de l'invasion est la reconnaissance entre le globule rouge et le parasite que nous pouvons voir à l'étape 1 de la figure 3, qui est possible grâce à plus d'une douzaine de récepteurs retrouvés à la surface du parasite. Parmi ces différentes protéines de surface, la protéine MSP-1

(GPI-anchored merozoite surface protein 1) est celle dont le rôle a été le plus caractérisée. Cette protéine se lie à un récepteur sur le globule rouge dont l'identité est encore méconnue à ce jour<sup>17</sup>. Cette première liaison est faible et permet au parasite de s'orienter afin d'approcher son apex, région où nous retrouvons les organites responsable de l'invasion, à la membrane du globule rouge<sup>18</sup>. Nous savons que le parasite utilise d'autres protéines de surface afin de lier le globule. En effet, des familles protéiques de voies alternatives comme les EBA (Erythrocyte binding antigen) et les PfrRH (Reticulocyte-binding like receptor) ont aussi des rôles importants au niveau de l'invasion de l'érythrocyte. Plusieurs protéines de cette dernière ont été caractérisées jusqu'à maintenant, mais nous allons plus nous concentrer sur PfrRH1 et PfrRH5. Le premier joue un rôle dans la liaison du parasite au globule rouge et permettrait l'activation du relâchement d'EBA-175 par les micronèmes du parasite. Cette dernière jouerait un rôle complémentaire à PfrRH1 en liant des récepteurs différents à la surface du globule rouge<sup>19</sup>. De plus, si nous bloquons une de ces deux protéines, le parasite semble augmenter l'expression de l'autre afin de pouvoir lier le globule rouge à nouveau. Ceci peut aussi être observé *in vivo* chez des parasites sauvages afin de contourner le polymorphisme des cellules sanguines des différents hôtes et afin d'éviter la neutralisation par les anticorps<sup>20</sup>. Il y aurait ainsi une redondance dans la fonction de ces deux protéines. En ce qui concerne PfrRH5, nous savons qu'elle lie la basigine présente à la surface du globule rouge. Le rôle de cette liaison dans l'invasion est encore méconnu, mais le parasite ne peut envahir la cellule si cette interaction est bloquée à l'aide d'anticorps<sup>21</sup>.

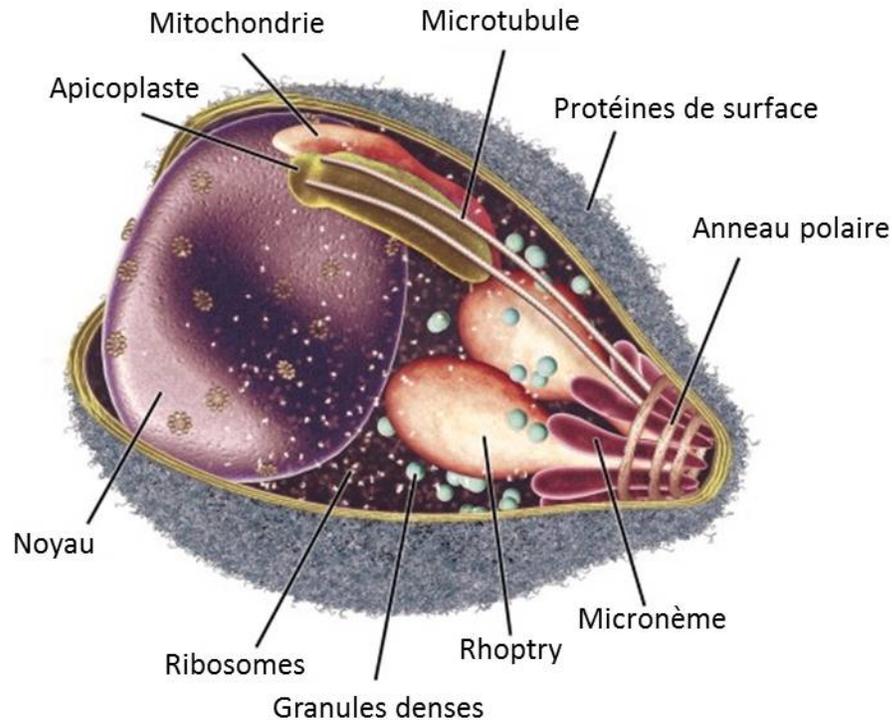
Ainsi, comme nous avons mentionné plus haut, la première liaison permet au parasite d'orienter son apex afin de le rapprocher de la membrane du globule rouge comme à l'étape 2 de la figure 3. Il y aura ensuite la formation de la jonction serrée qui forme un anneau à la surface du globule rouge qui est marqué en jaune sur la figure. Le parasite va alors passer au travers de cet anneau durant son entrée dans la cellule, permettant de former une vacuole autour du parasite nommé la vacuole parasitaire (étape 3 figure 3). Celle-ci permet de former un espace autour du parasite le séparant du cytoplasme de l'érythrocyte. Ainsi, la formation de cette jonction serrée est essentielle afin d'initier l'entrée du parasite et de permettre l'établissement du parasite à l'intérieur de la cellule hôte. Celle-ci est formée grâce à la liaison entre la protéine AMA1 (Apical membrane antigen 1) et le complexe RON (Rhoptry neck protein), tous produit par le parasite. Le complexe RON est inséré dans la membrane du globule rouge alors qu'AMA1 est sécrété à la surface du mérozoïte. L'anneau délimitant la jonction serrée sera formé lors de la liaison AMA1-RON<sup>22</sup>. La neutralisation de cette interaction empêche le parasite d'envahir le globule rouge et d'établir la vacuole parasitaire ce qui suggère que AMA1-RON et la formation de la jonction serrée ont un rôle essentiel dans les

mécanismes d'invasion de *Plasmodium*<sup>23-22</sup>. Une fois cette jonction formée entre le globule rouge et le mérozoïte, le parasite va pénétrer la cellule à l'aide de son moteur d'actine-myosine et va se retrouver dans la vacuole parasitaire, où il va se développer durant tout le stade érythrocytaire. C'est lorsqu'il se retrouve dans cette vacuole que le parasite va sécréter plusieurs protéines afin de modifier la structure de l'érythrocyte et ainsi établir son système de sécrétion dans le globule rouge (étape 4 figure 3). Nous pouvons observer l'effet de l'établissement du parasite à l'intérieur du globule rouge dans la figure 2 lorsque le parasite est sous la forme trophozoïte que nous allons discuter plus loin.

Il est intéressant de noter que le parasite pénètre le globule rouge sans utiliser de mécanismes provenant de la cellule hôte. En plus de devoir fournir tous les acteurs responsables de l'invasion, le parasite exprime des protéines ayant des fonctions redondantes afin de réduire l'efficacité du système immunitaire à bloquer l'invasion<sup>24</sup>. De plus, la majorité des protéines sécrétées à la surface du globule rouge afin d'initier l'invasion se retrouvent toutes le complexe apical du parasite.

#### 1.2.1.3 Le complexe apical

Le complexe apical est ce qui permet aux parasites de la famille des *Apicomplexa* d'envahir leur cellule hôte respective. Il s'agit plus précisément d'un ensemble de vacuoles sécrétoires spécialisées retrouvées à l'apex des parasites comme nous pouvons voir à la figure 4. On retrouve dans le complexe apical de *Plasmodium* les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Chacune de ces vacuoles possède des protéines essentielles à l'invasion qui sont sécrétées de façon séquentielle et très régulée<sup>9</sup>. Nous allons voir plus en détail chacune de ces vacuoles selon l'ordre dans laquelle leur contenu est sécrété.



**Figure 3.** Anatomie du mérozoïte de *Plasmodium*.<sup>25</sup> Traduit en français par David Gaumond.

#### 1.2.1.3.1 Les micronèmes

Les premières vacuoles parasitaires à libérer leurs contenus sont les micronèmes possédant un rôle important au niveau de l'attachement au globule rouge et à l'initiation de l'invasion. En effet, leur sécrétion est déclenchée lors de la liaison faible avec la cellule hôte<sup>26</sup>. La liaison de MSP-1 à la surface du parasite augmente le calcium intracellulaire et conduit à l'activation de la sécrétion des protéines des micronèmes à la surface du globule rouge<sup>27</sup>. Des protéines comme EBA et AMA1, que nous avons mentionnés plus tôt, sont des protéines retrouvées dans les micronèmes du parasite<sup>28</sup>.

#### 1.2.1.3.2 Les rhoptries

Les rhoptries sont les organites prédominants du complexe apical. Ils sont présents chez *Plasmodium* en duo chez les sporozoïtes et les mérozoïtes. Ces organites sont absents chez la forme ookinetes, due au fait que le parasite ne produit pas de vacuole parasitaire à l'intérieur de l'estomac du moustique<sup>24</sup>. Ceci suggère que les rhoptries auraient un rôle dans l'établissement de la vacuole parasitaire à l'intérieur de la cellule hôte en plus de l'invasion du globule rouge<sup>9</sup>. On peut séparer les rhoptries en deux compartiments distincts possédants des protéines différentes : l'apex nommé « Rhopty Neck » retrouvé près de la membrane et la partie postérieure nommée « Rhopty Bulb »

retrouvé plus près du cytoplasme. Les protéines retrouvées à l'apex des rhoptries (RON) se retrouvent chez plusieurs espèces d'*Apicomplexa*, alors que les protéines retrouvées dans le bulbe (ROP) semblent être plus spécifiques à l'espèce<sup>9</sup>.

Nous avons déjà discuté des protéines présentes dans l'apex des rhoptries lorsque nous avons discuté des étapes d'invasion. En effet, les protéines PFRH et les protéines RON se retrouvent dans cette partie des rhoptries. Ainsi, ces protéines ont pour fonction l'adhésion du parasite au globule rouge et la formation de la jonction serrée<sup>9</sup>.

Les protéines du bulbe semblent avoir plusieurs rôles chez le parasite comme l'invasion du globule rouge, la formation de la vacuole parasitaire et la modification de la cellule hôte. Il y a deux complexes protéiques de rhoptries bien caractérisés chez le parasite *Plasmodium* : RAP (Rhoptry associated protein) et RhopH. Le complexe RAP semble jouer un rôle dans l'invasion du parasite, car lorsque certains membres du groupe sont mutés, le parasite est incapable d'envahir le globule rouge. Ce complexe sera discuté plus tard dans la section du transport protéique intracellulaire. En ce qui concerne le complexe RhopH, il semble avoir un rôle dans la modification de la cellule hôte post-invasion. En effet, RhopH1/clag9 sont sécrétés à la membrane du globule rouge et semble jouer rôle dans la cytoadhérence comme nous avons vu avec PfEMP1<sup>9</sup>. De plus, RhopH1 semblerait permettre l'établissement d'une voie de perméabilisation par l'intermédiaire de clag3 favorisant ainsi l'entrée de nutriments dans le globule rouge<sup>9</sup>.

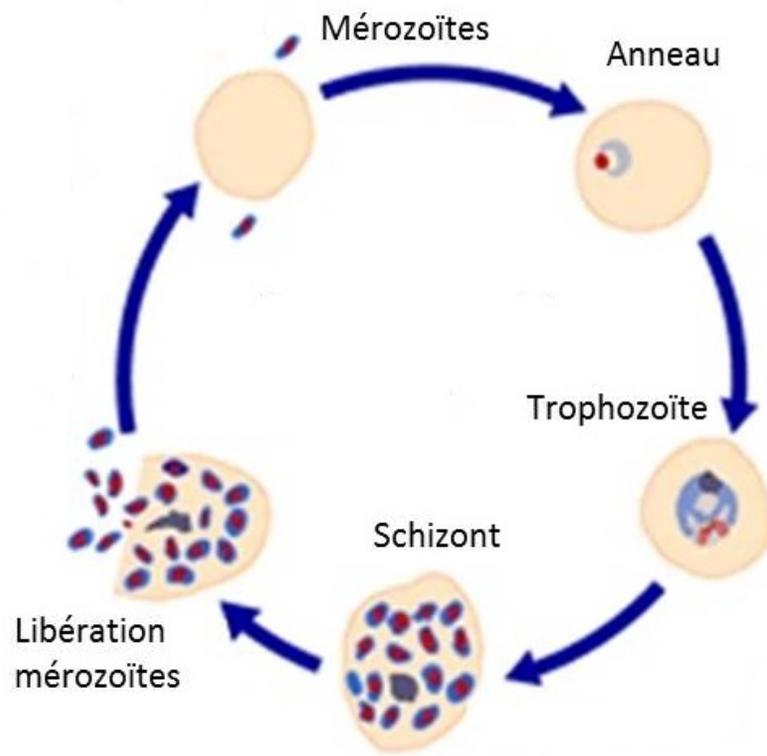
Ainsi, il y aurait une corrélation avec le rôle des protéines et le moment où elles sont relâchées par la cellule. Les protéines retrouvées dans l'apex vont être sécrétées en premier et vont alors permettre l'adhérence et l'invasion de la cellule. Alors que pour les protéines retrouvées dans le bulbe vont permettre l'invasion et l'établissement du parasite dans la cellule<sup>9</sup>.

#### *1.2.1.3.3 Les granules denses*

Finalement les granules denses vont sécréter leur contenu lorsque le parasite va avoir terminé d'entrer dans la cellule hôte et que la vacuole parasitaire serait terminée d'être formée. En effet, on peut détecter une très grande quantité de protéines des granules durant les premières heures de l'infection. Ces vacuoles spécialisées semblent avoir un rôle plus important dans l'établissement du parasite dans le globule rouge<sup>29</sup>.

#### 1.2.1.4 Le développement du cycle érythrocytaire

Nous allons maintenant voir les différentes phases que le parasite va passer après avoir envahi la cellule hôte (Figure 4). Les premières heures suivant l'infection permet à *Plasmodium* de modifier la composition de l'érythrocyte. Cette forme du parasite aussi connu sous le nom anneau dure environ 22 heures et permet au parasite de sécréter beaucoup de protéines dans le globule rouge afin d'augmenter sa porosité et sa cytoadhérence<sup>30</sup>. Toutefois, une adhérence efficace aux vaisseaux sanguins ne va être possible que lorsque parasite sera en forme trophozoïte. C'est sous cette forme que *P. falciparum* peut éviter la rate et causer des complications en bloquant les vaisseaux sanguins réduisant l'apport en nutriments aux organes et tissus du corps humain. Le parasite va aussi commencer à dégrader les composantes biologiques retrouvées dans le cytoplasme des érythrocytes comme l'hémoglobine afin d'obtenir les nutriments dont il a besoin pour se diviser<sup>31</sup>. Il y a donc un transport important de protéines du parasite vers le globule rouge et vice-versa tout au long de cette phase. En effet, l'hémoglobine devra être transportée dans une vacuole spécialisée, la vacuole digestive, afin d'être dégradée. Ce procédé va produire un intermédiaire qui est toxique aux cellules eucaryotes et qui se verra transformer en hémozoïne par le parasite, une forme cristallisée et non toxique pour celui-ci. Finalement, les dernières heures (6 heures) du stade érythrocytaire, où *Plasmodium* sera sous la forme schizont, vont permettre aux parasites de diviser leur génome et leurs organites afin de produire de nouveaux mérozoïtes. Finalement, le cycle complet va se terminer par la lyse des globules rouges et la libération dans le sang de 16 à 32 nouveaux mérozoïtes par érythrocytes infectés<sup>30</sup>. Une portion des parasites ayant infecté un globule rouge vont se voir différencier en gamétocytes au lieu de passer toutes les étapes du cycle érythrocytaire afin de pouvoir être transmis à un moustique et ainsi infecter un nouvel être humain<sup>5</sup>.



**Figure 4.** Cycle érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*.<sup>10</sup> Traduit en français par David Gaumond

### 1.3 La synthèse protéique

Puisque le complexe apical et les protéines qui le composent sont essentiels à l'invasion, nous devons comprendre comment celles-ci sont produites et transportées vers les vacuoles sécrétoires du parasite. Ceci nous permettra de mieux comprendre les différents mécanismes entourant la biogenèse du complexe apical de *Plasmodium*.

Tous les organismes vivants vont produire des protéines à partir de leur code génétique, autant les procaryotes que les eucaryotes. Ces derniers vont devoir transporter les protéines produites vers leurs différents organites respectifs. Chez toutes les cellules vivantes possédant un génome, la synthèse des protéines se fait à partir des ribosomes. On les retrouve éparpillés dans le cytoplasme chez les bactéries et principalement dans le cytosol et du côté externe de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) chez les eucaryotes. Ainsi, l'ARN messager provenant du noyau va pouvoir être sécrété dans le cytosol à proximité du RE afin de débiter la traduction de l'acide nucléique en acide aminé.

Toutes les protéines possédant un domaine transmembranaire vont devoir être synthétisées et co-transloquées dans la membrane du RE avant de se retrouver dans les membranes des différents organites par différents mécanismes de transport vésiculaire. Pour ce faire, les protéines vont pénétrer la membrane plasmique du RE durant leur traduction réduisant le contact des portions hydrophobes avec le cytosol de la cellule. En ce qui concerne les protéines sécrétées ou celles solubles présentes dans les organites, elles vont passer en majorité par le RE avant de se retrouver dans le cytosol des différents organites ou d'être sécrétée à l'extérieur de la cellule. L'entrée dans le RE est permise grâce à un peptide signal retrouvé au début de la séquence de la protéine. Toutes les molécules passant par le RE vont devoir être transportées vers l'appareil de Golgi où elles vont être triées selon les différents organites auxquelles elles sont destinées<sup>32</sup>. Ce phénomène semble être différent en ce qui concerne les protéines destinées à l'apicoplaste du parasite, ce que nous discuterons plus loin dans la section sur le système de sécrétion chez *Plasmodium*<sup>33</sup>.

Nous verrons les mécanismes généraux du transport protéique intracellulaire chez les eucaryotes pour ensuite explorer les différences présentes chez *Plasmodium*. Ceci va nous permettre de mieux comprendre les enjeux de la biogenèse du complexe apical et les acteurs pouvant être bloqués afin d'empêcher le parasite de se développer.

### 1.3.1 Le transport protéique intracellulaire

On distingue les eucaryotes des autres microorganismes par la présence d'un noyau et de compartiments intracellulaires séparés du cytosol par des membranes lipidiques que l'on nomme organite. Ceux-ci maintiennent leur propre identité, leur propre composition biochimique et possèdent des fonctions indépendantes des autres. La biogenèse de ces compartiments cellulaire est possible grâce à l'appareil de Golgi qui permet de trier les protéines solubles synthétisées vers leurs organites respectifs. De plus, ces dernières échangent entre eux différentes molécules à l'aide de vésicules de transport de façon très régulée pour ne pas interférer avec leur équilibre biochimique. Les mécanismes de recrutement des protéines lors du transport protéique intracellulaire doit être fiable afin de respecter l'homéostasie et l'équilibre biochimique des différents organites de la cellule<sup>34</sup>.

La liaison des protéines à la membrane va permettre la formation d'une vésicule qui va ensuite être transportée vers l'organite ciblé. Les mécanismes généraux du transport vésiculaire sont conservés chez la plupart des cellules eucaryotes. Nous pouvons tout d'abord séparer le trafic vésiculaire en quatre étapes qui consiste en la sélection du cargo, c'est-à-dire les protéines et autres molécules qui devront être transportées. Ensuite, il y aura la formation de la vésicule et son déplacement vers sa cible en utilisant différents moteurs de transport comme les kinésines par exemple. Puis, lorsque la vésicule se retrouvera à son organite cible, il devra y avoir rapprochement des deux membranes pour finalement permettre la fusion de la vésicule à la membrane réceptrice<sup>35</sup>.

Ainsi, les vésicules de transport doivent posséder une certaine identité afin d'être transportées de façon adéquate aux bonnes membranes dans la cellule. Il faut alors que la sélection du cargo, le transport de la vésicule et la fusion entre la vésicule et la membrane réceptrice soient fortement régulés. Nous préciserons sur le sujet des Ras-like GTPases (Rab) et des «soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor» (SNARE), deux familles de protéines jouant un rôle important dans la régulation du transport protéique et de la fusion à la membrane réceptrice<sup>36</sup>. En ce qui concerne le recrutement des cargos, nous développerons sur les potentiels acteurs chez *Plasmodium*.

#### 1.3.1.1 Ras-like GTPases (Rab)

Les protéines de cette famille peuvent réguler toutes les étapes du transport vésiculaire<sup>36</sup>. Elles font partie du groupe des Ras-like GTPases qui comportent plusieurs membres chez les différents organismes eucaryotes. Il semblerait que le nombre de Rab différents corrèle avec la complexité de

l'organisme. Chaque membre de la famille Rab possède une spécificité pour des protéines effectrices différentes et donc peuvent avoir différents rôles selon quel effecteur elles peuvent lier.

Le fonctionnement de ces protéines est plutôt simple. Les protéines Rab passent d'une forme active, liée au guanosine triphosphate (GTP), et une forme inactive, liée au guanosine diphosphate (GDP). C'est la variation entre ces deux formes qui détermine sa fonction et sa localisation dans l'organisme. On retrouve Rab lié au GDP lorsqu'il est inactif et lié à sa membrane spécifique, différente selon le membre de la famille Ras. Un « GDP dissociation inhibitor » (GDI) peut accélérer l'inactivation de Rab et sa liaison à sa membrane. Une « guanine nucleotide exchange factor » (GEF) va pouvoir interagir avec le Rab inactif afin de le rendre en forme active. Lorsque sous cette forme, les protéines Rab peuvent lier leurs protéines effectrices et ainsi participer aux différentes étapes du transport vésiculaire. Finalement, les protéines Rab peuvent se retrouver à nouveau sous la forme inactive à l'aide d'une « GTPase accelerating protein » (GAP) afin de passer la liaison du GTP au GDP lorsque le transport de la vésicule est terminé.

Or, ce serait les protéines effectrices liant les protéines Rab qui confèreraient l'identité des vésicules. Celles-ci peuvent lier spécifiquement une protéine Rab et réguler leurs différentes fonctions lors du transport vésiculaire, du recrutement des cargos et de la fusion de la vésicule à la membrane réceptrice<sup>35</sup>.

#### 1.3.1.2 Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)

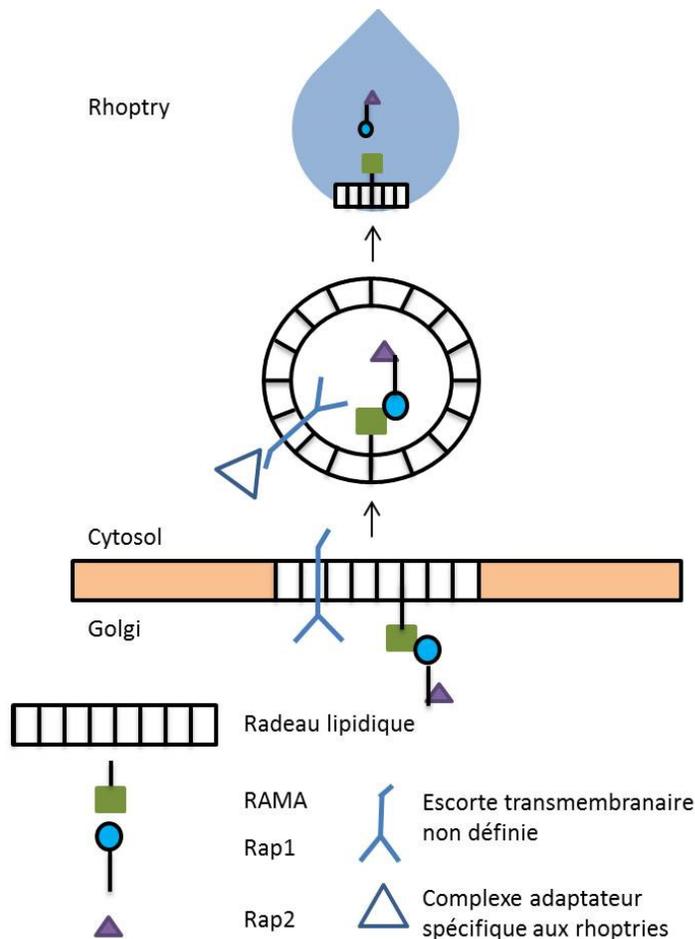
Les « Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor » (SNARE) permettent d'approcher la membrane de la vésicule à la membrane réceptrice afin qu'elles fusionnent. La famille protéique SNARE possède aussi plusieurs membres chez les cellules eucaryotes. Ainsi, il faut que la protéine SNARE sur la vésicule et celle sur l'organite soient complémentaires afin que la fusion des membranes soit possible. Ceci empêche les vésicules de lier des organites qu'elles ne sont pas censées reconnaître dépendamment des protéines qu'elles contiennent. En effet, certaines SNARE auraient une spécificité pour certains organites permettant ainsi de déterminer la cible de la vésicule formée<sup>34</sup>. Lorsque les deux membranes seront près l'une de l'autre, les deux formes de SNARE vont se lier, changer de conformation et rapprocher les deux membranes pour qu'elles fusionnent<sup>37</sup>.

#### 1.3.2 Le système de sécrétion protéique chez *Plasmodium*

Les mécanismes généraux de transport retrouvés chez les eucaryotes sont aussi présents chez *Plasmodium*. Toutefois, il y a plusieurs autres mécanismes permettant le transport des protéines

dans les différents organites de la cellule. Plusieurs études suggèrent que le parasite utiliserait d'autres mécanismes pour certains organites qu'on ne retrouve pas chez les autres eucaryotes<sup>37</sup>. En effet, *P. falciparum* possède un apicoplaste, un complexe apical et une vacuole digestive qui sont uniques aux *Apicomplexa*. Tous ces organites possèdent différentes protéines qui doivent passer les étapes du transport vésiculaire classique<sup>37</sup>. De plus, le parasite de la malaria est reconnu pour sécréter beaucoup de protéines à l'extérieur de la cellule, c'est-à-dire dans l'érythrocyte et dans la vacuole parasitaire, qui devront passer par le système de transport. Ainsi, les mécanismes régulant le transport de toutes ces protéines sont très importants et doivent être régulés de façons très précises. Le complexe apical est composé de protéines nécessaires à l'invasion des globules rouges qui devront passer par ces différentes étapes de recrutement lors du transport<sup>38</sup>. Il doit donc y avoir une régulation de transport au niveau de l'appareil de Golgi afin de diriger les différentes protéines à leur organite respectif. Plus précisément, cette régulation doit être faite lors du recrutement des protéines à la portion interne de la membrane du Golgi.

Les protéines retrouvées dans les différents organites du complexe apical doivent être sécrétées de façon très séquentielle et une mauvaise localisation de certaines d'entre elles pourrait inhiber l'invasion du parasite. Toutefois, ces mécanismes de sélection des cargos au Golgi sont encore méconnus chez *Plasmodium*. Chez *Toxoplasma*, souvent utilisé comme modèle pour l'étude de *Plasmodium*, nous savons que les protéines de rhoptries, ROP1 et les protéines de micronèmes, MIC2 et MIC6, sont recrutées à la membrane du Golgi à l'aide d'un motif sur leur queue cytosolique. Cette queue est présente seulement chez les protéines ayant des domaines transmembranaires. Toutefois, la grande majorité des protéines retrouvées dans les rhoptries de *Plasmodium* sont soluble et ne possède donc pas de queue cytosolique<sup>24-9</sup>.



**Figure 5.** Schéma du transport vésiculaire de Rap2 lors de la formation des rhoptries. *Fait par David Gaumont. Adapté de Richard, Kats LM, Langer C, et al.<sup>39</sup>*

Un des mécanismes de transport protéique bien caractérisé est celui utilisé par le complexe RAP (Rhoptry associated protein). Afin que RAP2 se localise de façon adéquate aux rhoptries, il doit interagir avec RAP1 comme nous pouvons voir dans la figure 5. Le complexe RAP va lier une protéine membranaire, RAMA (Rhoptry associated membrane antigen), en se liant à la partie N-terminal de RAP1. Lorsque ce dernier est muté, RAP2 est retrouvé au RE au lieu des rhoptries. On observe le même mécanisme pour la protéine RAP3. De plus, si on observe RAMA en microscopie, on peut voir qu'au début du développement du parasite la protéine est localisée à la membrane du RE et du Golgi. Lorsque le parasite est en fin de développement, on retrouve RAMA principalement aux rhoptries. Ceci est dû au transport vésiculaire du complexe RAP lié à RAMA lors de la formation des rhoptries<sup>9-39</sup>. Tel que proposé par l'équipe du Dr. Richard, RAMA permettrait de former des microdomaines protéiques à la membrane interne du Golgi afin de former les vésicules de transport destinées aux rhoptries<sup>39</sup>. Nous pensons que ce mécanisme permettrait la

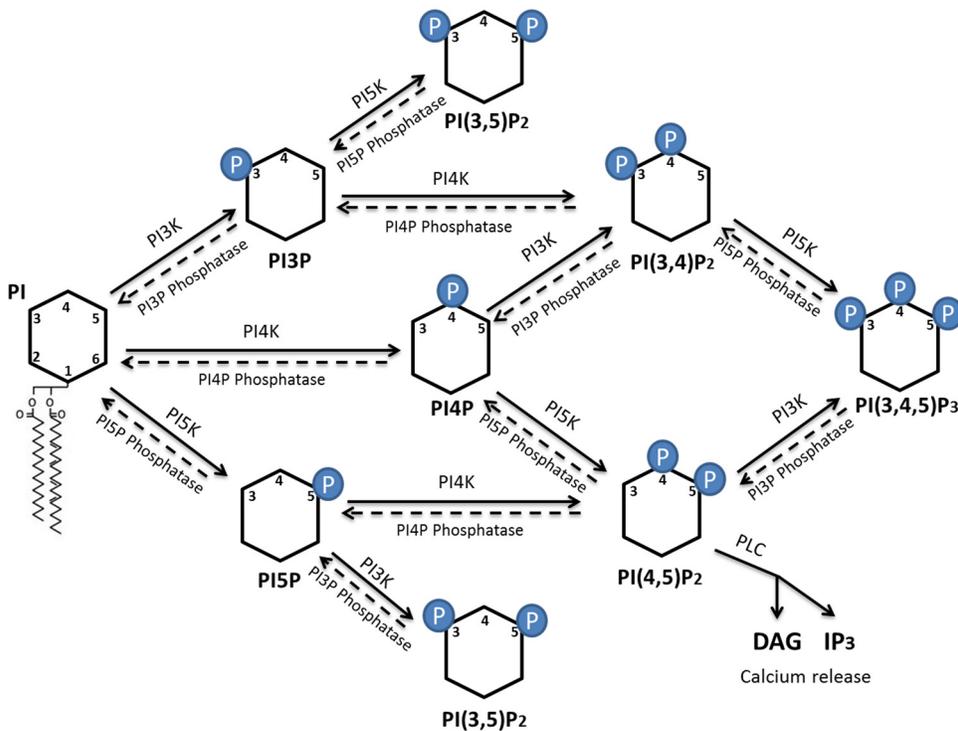
formation d'autres organites du complexe apical, en utilisant d'autres acteurs membranaires spécifiques à l'organite ciblé.

Un autre organite unique aux *Apicomplexa* est l'apicoplaste. Celui-ci provient d'un ancêtre de cyanobactérie qui aurait été phagocytée il y a plusieurs millions d'années et qui aurait formé une symbiose avec les parasites. Nous avons discuté du complexe apical et de son rôle essentiel au niveau de l'invasion, mais l'apicoplaste est aussi essentiel aux parasites au niveau de la production de dérivés lipidiques et d'acides aminées<sup>40</sup>. Puisque cet organite provient d'une bactérie comme pour les mitochondries, il possède son propre ADN. Toutefois, il est important de noter que la plupart des protéines retrouvées à l'intérieur de l'apicoplaste sont codées dans le noyau du parasite et ensuite transportées vers l'organite. De plus, il semblerait que la majorité des protéines destinées à l'apicoplaste possèdent un peptide signal particulier permettant à la protéine de traverser les multiples membranes de l'organite et permettrait aux protéines de passer du RE à l'apicoplaste sans devoir être triées à l'appareil de Golgi. D'autres travaux suggèrent que certaines protéines destinées à l'apicoplaste passeraient par l'appareil de Golgi<sup>33</sup>. Ainsi, ceci laisse à croire que les protéines transportées pourraient utiliser des mécanismes de transport semblable à ceux observés chez les rhoptries<sup>41</sup>.

La formation des microdomaines à la membrane du Golgi permet la sélection des cargos lors du transport protéique. Ceci semble nécessiter un marqueur à la membrane du Golgi ainsi qu'une protéine capable de lier le marqueur et faire l'intermédiaire avec les autres protéines étant transportées. RAMA semble jouer le rôle de protéine adaptatrice en recrutant RAP1 et RAP2 à la membrane. L'implication d'une protéine membranaire additionnelle semble aussi jouer un rôle important pour déterminer la cible de la vésicule de transport (Fig.5). Il existe des molécules conférant une identité aux différentes membranes des eucaryotes et possédant un rôle dans le recrutement différentiel des protéines. Parmi ces nombreux marqueurs, notre hypothèse est que les phosphoinositides auraient un rôle dans le recrutement des cargos à la membrane de l'appareil de Golgi chez *Plasmodium*. Nous pensons aussi que l'action de protéines adaptatrices pouvant lier les phosphoinositides est nécessaire au recrutement des protéines aux différentes membranes plasmiques comme le fait RAMA. Ces protéines adaptatrices pourraient avoir un rôle essentiel dans la biogenèse du complexe apical et pourraient servir éventuellement de cibles thérapeutiques pour de nouveaux traitements.

### 1.3.3 Les phosphoinositides

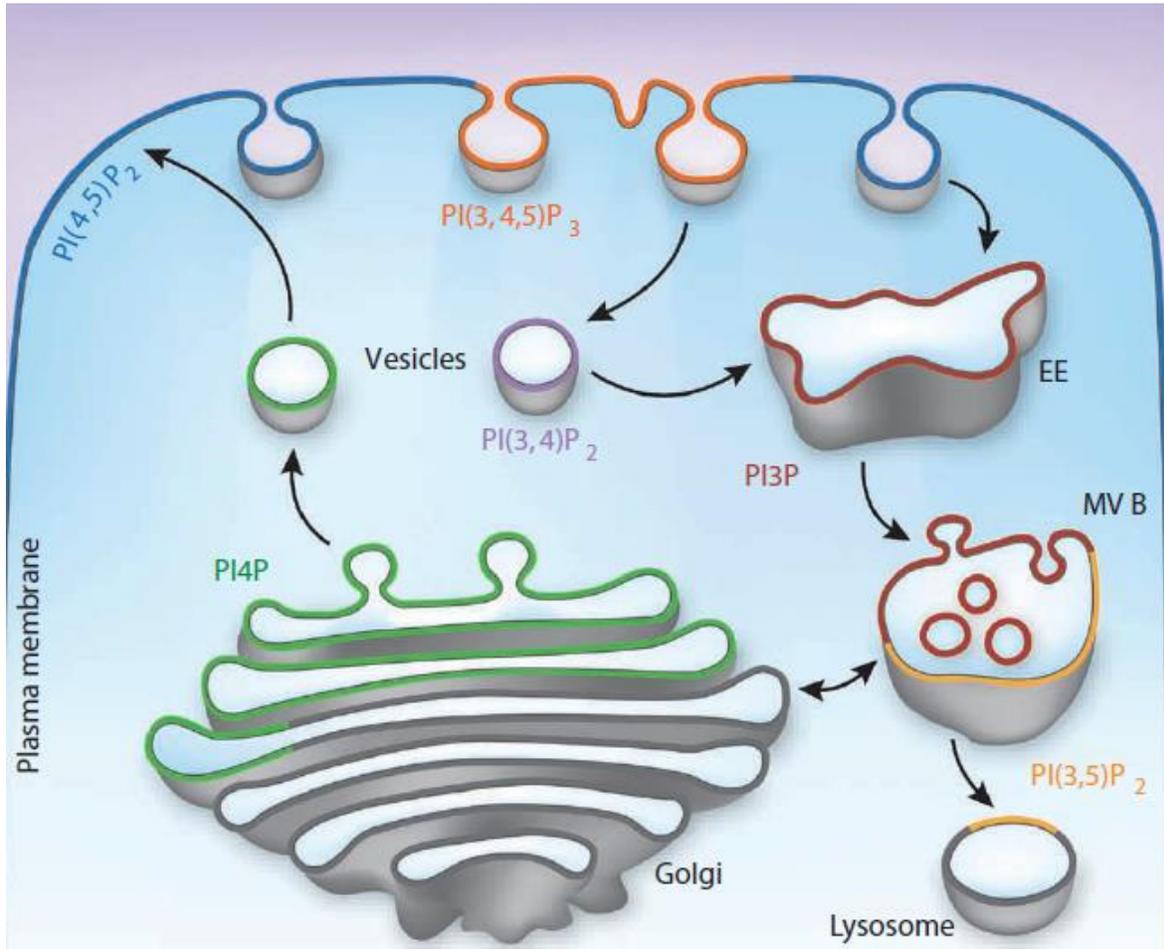
Les phosphoinositides sont la forme phosphorylée du phosphatidylinositol (PI). Le PI est un lipide membranaire possédant une tête inositol pouvant être phosphorylée à trois sites : 3', 4' et 5'. C'est lorsque le PI possède un ou plusieurs phosphates sur son anneau inositol que nous le classifions comme étant du phosphatidylinositol phosphate (PIP) ou encore phosphoinositide. Le PI est synthétisé dans le RE et transporté vers les différents organites où il sera phosphorylé afin de former les différentes isoformes de PIP. La phosphorylation du PI peut aussi être faite directement dans le RE avant le transport vers le Golgi<sup>42</sup>. Les trois sites de phosphorylation présents sur la tête inositol du PI permettent de former jusqu'à sept formes de PIP différents<sup>43</sup>. Chez les eucaryotes, les PIP représentent une infime portion de la totalité des phospholipides retrouvés dans les membranes<sup>42-44</sup>. Chaque forme de PIP est présente en majorité dans un organite particulier conférant une certaine identité aux organites<sup>45</sup>. Les PIP sont reconnus pour avoir un rôle important dans la signalisation intracellulaire et le trafic vésiculaire chez les cellules eucaryotes<sup>46</sup>. De plus, les PIP sont capables de passer d'une forme à l'autre par l'action de kinases et de phosphatases modifiant les phosphates sur leur anneau inositol comme nous pouvons voir à la figure 6<sup>46</sup>. Il existe aussi des phospholipases pouvant cliver les PIP présents dans certaines membranes afin de former des seconds messagers<sup>47</sup>. Ceci étant dit, ces phospholipides permettraient de marquer les vésicules de transport lors de la sélection des cargos. En effet, une vésicule composée d'une certaine forme de PIP devra être transportée vers l'organite composé du même marqueur.



**Figure 6.** Schéma des différentes formes de PIP présentes chez les cellules eucaryotes et les différentes possibilités au niveau de la modification des sites de leur tête inositol. Chaque forme de PIP peut voir un de ses sites être phosphorylé par une kinase spécifique (Flèches pleines) ou se voir retirer un groupement phosphate par une phosphatase (Flèche pointillée) démontrant une plasticité chez les différentes membranes plasmiques. Figure faite par David Gaumond.

Des travaux ont permis d'identifier la forme de PIP majoritaire dans les différentes membranes chez la levure (Figure 7)<sup>45</sup>. Toutefois, la plupart de ces observations n'ont pas été encore confirmées chez *Plasmodium*. Les formes les plus abondantes sont le PI(4)P et le PI(4,5)P<sub>2</sub><sup>42</sup>. Plus particulièrement, le PI(4,5)P<sub>2</sub> a été le premier à avoir été identifié avec un rôle dans la signalisation cellulaire. En effet, celui-ci est localisé dans la membrane plasmique et est essentiel pour le relâchement du calcium par l'action de la Phospholipase C (PLC) et dans l'endocytose<sup>42</sup>. Le deuxième PIP le plus abondant, le PI(4)P, est retrouvé principalement dans l'appareil de Golgi. Des travaux ont démontré qu'un manque de PI(4)P avait un effet sur la structure du Golgi causant l'accumulation de protéines à sa membrane<sup>42</sup>. Ensuite, le PI(3)P est retrouvé principalement dans les endosomes précoces et est reconnu chez *Plasmodium* pour avoir un rôle important dans le transport de l'hémoglobine vers la vacuole digestive du parasite<sup>48</sup>. De plus, d'autres travaux ont identifié ce PIP comme étant un marqueur principal de l'apicoplaste du parasite<sup>49</sup>. Nous verrons ce PIP plus particulièrement lorsque nous allons aborder le sujet du domaine protéique FYVE (Fab1, YOTB, Vac1 et EEA1) dans la

section des effecteurs de PIP. On peut aussi trouver une portion de PI(3)P dans les endosomes tardifs où le PI(3,5)<sub>2</sub> est normalement majoritaire. Ensuite, le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> serait aussi présent majoritairement dans la membrane cellulaire et aurait un rôle dans la phagocytose et l'endocytose<sup>50</sup>. Finalement, le PI(5)P est le PIP le moins bien caractérisé. Des études récentes ont démontré qu'il serait présent au niveau du noyau<sup>51</sup> et qu'il aurait un rôle lors du stress cellulaire<sup>52</sup>.



**Figure 7.** « PIP code » chez la levure. Identification des formes majoritaires de PIP chez les différents organites de la levure.<sup>45</sup>

### 1.3.4 Les effecteurs de phosphoinositides

Il existe plusieurs domaines protéiques capables de lier les différentes formes de PIP ou de les modifier. Cette reconnaissance peut être spécifique à une forme de PIP ou à un éventail plus élargi, dépendamment de leur fonction dans la cellule et de leur nature. Parmi ces différentes protéines effectrices, certaines sont reconnues pour jouer un rôle dans le recrutement de protéines à la membrane<sup>45</sup>. Ces protéines pourraient jouer un rôle lors de la formation des vésicules de transport.

Les effecteurs modifiant les formes de PIP vont principalement être les kinases et les phosphatases. Ceux-ci peuvent respectivement ajouter ou retirer un groupement phosphate sur la tête inositol du PIP. Même si la majorité des interactions se font au niveau des phosphates, certaines protéines comme les phospholipases vont pouvoir lier la tête inositol afin de la couper et ainsi produire un second messager comme le fait la PLC. Nous explorerons les différents domaines protéiques reconnaissant les PIP en débutant par les domaines d'interactions, pour terminer avec les domaines pouvant modifier la forme de PIP.

#### 1.3.4.1 Les domaines d'interactions

##### *1.3.4.1.1 Pleckstrin homology domain*

Le premier domaine protéique pouvant lier les PIP à avoir été identifié a été le « Pleckstrin homology domain » (PH). Celui-ci intervient principalement dans la communication protéine-protéine lors de la signalisation cellulaire et du transport vésiculaire<sup>53</sup>. C'est-à-dire, que les protéines possédant ce domaine peuvent lier le PIP et une autre protéine simultanément. Auparavant, on pensait que seulement 20% des protéines possédant un domaine PH étaient capables de lier les PIP des membranes. En effet, les protéines possédant ce domaine sont reconnues pour posséder plusieurs autres ligands comme des protéines, des phospholipides acides et des inositols phosphates.

Toutefois, une récente étude a permis de démontrer que 61% des domaines PH peuvent lier les PIP retrouvés dans les membranes<sup>54</sup>. Il est maintenant clair que la plupart des protéines possédant ce domaine interagissent avec la membrane en se liant aux PIP, permettant un ancrage à la membrane afin de recruter d'autres protéines à la membrane<sup>53</sup>. En lien avec nos hypothèses à propos de l'implication des PIP dans la biogenèse du complexe apical, des protéines possédant un domaine PH pourraient avoir un rôle comme protéine adaptatrice et ainsi permettraient de former des microdomaines à la membrane du Golgi lors du transport vésiculaire.

Les domaines PH sont reconnus pour avoir une spécificité très élargie envers les différentes formes de PIP. En effet, seulement 10% des domaines PH lient spécifiquement une seule forme de PIP<sup>45</sup>. Cette spécificité élargie aurait pour effet de permettre à la protéine une liaison multiple entre différentes molécules simultanément. L'interaction avec un autre ligand au même moment changerait la conformation de la protéine et ainsi permettrait la liaison à une forme de PIP particulière. Ainsi, la protéine liée déterminerait la forme de PIP pouvant être reconnue par le domaine<sup>45</sup>.

#### 1.3.4.1.2 Phox homology domain

Le «Phox homology domain» (Px) fut tout d'abord identifié chez une sous-unité de la NADPH oxydases des phagocytes. Plus de 100 protéines ont été identifiées chez les eucaryotes possédant ce domaine d'interaction, dont les SNARE. Parmi toutes ces protéines, plusieurs semblent lier spécifiquement les PIP<sup>55</sup>. De plus, leur spécificité pour les différentes formes de PIP semble élargie comme pour le domaine PH<sup>42</sup>. Toutefois, il a été rapporté que le domaine PX aurait une préférence pour le PI3P présent sur les endosomes des cellules<sup>56</sup>.

#### 1.3.4.1.3 Domaine FYVE

Le domaine FYVE tient son nom des 4 protéines riches en cystéine dans lesquelles il a été identifié : Fab1, YOTB, Vac1 et EEA1. Ce domaine d'interaction est reconnu pour lier spécifiquement le PI3P contrairement aux deux autres que nous avons vu<sup>42</sup>. Comme il a été discuté plus haut, le PI3P est impliqué dans les mécanismes de l'endocytose, la phagocytose et du transport vers les endosomes. Le domaine FYVE fait partie d'une plus grande famille de protéines, les « Zinc coordinated RING fingers », reconnu pour lier l'ADN et les protéines<sup>48</sup>. On retrouve trois motifs signature dans le domaine FYVE qui lui confère sa spécificité au PI3P dû à la génération d'un site chargé positivement. Le principal rôle des protéines contenant le domaine FYVE semble être associé avec le transport vésiculaire des endosomes vers les autres organelles<sup>48</sup>. Nous allons discuter plus loin du rôle de ce domaine dans la dégradation de l'hémoglobine chez *Plasmodium*.

### 1.3.4.2 Les protéines modifiant les phosphoinositides

On retrouve chez les eucaryotes des kinases et des phosphatases capables de modifier spécifiquement la forme de PIP en agissant sur les groupements phosphates de leur anneau inositol. Ceci permet le maintien de l'équilibre du métabolisme cellulaire et l'homéostasie des PIP retrouvés dans les différentes membranes de la cellule<sup>57</sup>. En effet, les vésicules de transport sont un bourgeonnement de la membrane, ce qui signifie que les PIP retrouvés dans celle-ci vont être transportés avec le contenu. Donc, lorsqu'arrivés à l'organite récepteur, ils devront subir des modifications afin de respecter la signature de PIP de la membrane. *Plasmodium* pour sa part possède un éventail restreint de kinases et de phosphatases. Nous verrons la fonction de différents types protéiques capable de modifier la forme de PIP chez *Plasmodium*.

#### 1.3.4.2.1 Kinases

Tout d'abord, parmi les protéines pouvant modifier les PIP, nous avons les PIP-kinases capables d'ajouter des groupements phosphates aux différents sites sur l'anneau inositol. De plus, il semblerait que la phosphorylation des PIP sert de seconds messagers dans plusieurs cascades

signalétiques essentielles chez les cellules eucaryotes<sup>46</sup> et permet de générer les différentes formes de PIP qui ont des rôles dans plusieurs voies métaboliques.

Par exemple, une kinase 5-phosphate va ajouter un phosphate à la position 5' de la tête inositol du PIP afin de générer les formes PI5P, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> et PI(3,4,5)P<sub>2</sub>. Certaines kinases 5-phosphate vont avoir une spécificité pour une forme de PIP. Par exemple, il en existe capable de phosphoryler le PI4P afin de former le PI(4,5)P<sub>2</sub>, qui est essentiel pour l'endocytose. Sans ces kinases, les cellules seront incapables de produire cette forme de PIP dans le Golgi et auront ainsi une déficience en PI(4,5)P<sub>2</sub> à leur membrane plasmique les rendant incapables d'internaliser les molécules dans l'environnement externe.

En ce qui concerne *Plasmodium*, la kinase la plus étudiée est la PI3P kinase (PfPI3K) qui peut phosphoryler la position 3' des différents PIP. Plus particulièrement, le PI3P joue plusieurs fonctions chez le parasite, dont le transport de l'hémoglobine vers la vacuole digestive du parasite<sup>43</sup>. En effet, une protéine responsable du recrutement de l'hémoglobine lie le PI3P à l'aide de son domaine FYVE afin d'être transportée vers la vacuole parasitaire avec l'hémoglobine<sup>58</sup>. Cette kinase représente une cible thérapeutique potentielle puisque l'hémoglobine est très importante pour le développement du parasite. Une autre kinase de PIP ayant été caractérisée chez *Plasmodium* est la PI4P kinase de type III bêta (PI4KIIIβ). Des études sur l'effet de l'imidazopyrazine ont démontré que cette molécule avait un effet inhibiteur sur la kinase. Ceci causait un arrêt de développement des parasites dans les stades tardifs du cycle érythrocytaire. Plus précisément, les mérozoïtes en formation ne peuvent pas former leur membrane plasmique dû à l'absence de PI4P. Ce phosphoinositide aurait un rôle important dans le transport des composantes formant la membrane cellulaire du parasite.

#### 1.3.4.2.2 Phosphatases

En plus d'ajouter des groupements phosphates au PIP, il faut pouvoir en retirer afin de revenir aux formes antérieures ou encore au PI. Ceci permet le maintien de l'homéostasie des PIP, une fonction similaire aux kinases<sup>59</sup>. Certains PIP comme le PI(3,4)P<sub>2</sub> et le PI(4,5)P<sub>2</sub> sont déphosphorylés et forment du PI4P qui permet de maintenir la stabilité membranaire du Golgi<sup>60</sup>. Il existe plusieurs domaines PIP phosphatases chez les cellules eucaryotes, mais nous allons voir plus en détail seulement le domaine Sac1.

Sac1 est un domaine phosphatase retrouvé principalement sur les phosphatases du RE et de l'appareil de Golgi. Il permet le contrôle de l'identité des membranes des organites par la régulation du PI4P en jouant le rôle d'une PI4P phosphatase. Ce PIP est présent principalement dans l'appareil

de Golgi comme nous avons vu plus tôt. Celui-ci aurait un rôle important dans le transport des vésicules destinées à l'extérieur du Golgi<sup>60</sup>. Puisque l'action des phosphatases est en pair avec celle des kinases, les protéines possédant un domaine Sac1 forment souvent un complexe avec une PI4K<sup>60</sup>. Ainsi, lorsque les vésicules possédant le PI4P vont quitter le Golgi, la phosphatase va pouvoir retirer le phosphate afin de former du PI. Celui-ci semble être ensuite retourné vers le Golgi afin de reformer du PI4P grâce à la kinase complexée avec la phosphatase. Toutefois, les mécanismes de transport des protéines Sac1 vers les différents organites sont encore méconnus. Malgré cela, nous savons que les protéines ayant un domaine d'homologie avec le Sac1 possèdent une portion transmembranaire qui pourrait permettre à la phosphatase de se déplacer dans la même vésicule que le PI4P sans nécessairement posséder un autre domaine d'interaction comme un domaine PH par exemple<sup>59-60</sup>.

Ce domaine Sac1 est aussi retrouvé chez la protéine Synja1 (Synaptojanine1) ayant une double activité phosphatase. En effet, cette protéine possède un domaine phosphatase Sac1 et un domaine inositol 5-phosphatase<sup>61</sup>. Ceci confère à la protéine une activité phosphatase pour les groupements en position 4' et 5'. Elle a tout d'abord été caractérisée chez les neurones comme acteur important dans leur développement. Plus particulièrement, elle aurait un rôle dans le recyclage des vésicules ayant participé à l'endocytose et dans le désassemblage des vésicules de clathrine. C'est-à-dire que des protéines sont internalisées à l'aide du PI(4,5)P<sub>2</sub> présent à la surface de la membrane plasmique pour être envoyé vers les endosomes. Ensuite, ces protéines doivent se détacher des PIP lorsqu'elles sont retrouvées dans l'endosome ce qui est possible grâce à la phosphatase. Lorsque la forme de PIP est modifiée, les protéines liant ce PIP peuvent se détacher. Des mutations chez Synja1 causeraient une déficience dans le développement neuronal menant à la mort. On observe chez ces mutants une accumulation de PI(4,5)P<sub>2</sub> et de vésicules couvertes de clathrine dans les neurones<sup>62</sup>.

#### 1.3.4.2.3 Phospholipase C

Finalement, cette enzyme n'est pas une phosphatase, mais joue un rôle très important au niveau des PIP. En effet, la PLC peut cliver le PI(4,5)P<sub>2</sub> à la jonction entre le lipide et l'anneau inositol libérant du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Ces deux molécules jouent plusieurs rôles dans la cellule, en outre, dans la signalisation cellulaire et le relâchement du calcium. Il existe plusieurs formes différentes de PLC dans les cellules eucaryotes ayant chacune des mécanismes d'activation différents. De plus, les PLC peuvent produire d'autres dérivés ayant aussi des rôles essentiels. Toutefois, il semblerait que *Plasmodium* ne possède qu'une seule forme de PLC<sup>63</sup>.

Nous avons donc vu que les PIP jouent un rôle essentiel au niveau du transport différentiel et de l'identité membranaire. Ainsi, la composition en PIP des vésicules permettrait de dicter leur cible dans la cellule. La liaison de protéines adaptatrices permettrait la formation de microdomaines réunissant les autres protéines destinées aux mêmes organites. Ceci permettrait donc de réguler la sélection des cargos lors du transport vésiculaire.

## 1.4 La prévention et les traitements

Après avoir survolé le fonctionnement du parasite, son cycle de vie et son complexe apical, nous verrons ce qui est disponible pour traiter et prévenir la malaria à ce jour. Le parasite de la malaria a développé des mécanismes de résistance aux traitements couramment utilisés et les enjeux pour le développement d'un médicament ou un vaccin efficace sont importants. Nous discuterons des différents composés utilisés dans le traitement et la prévention de la malaria et les mécanismes d'action pour certains d'entre eux et leurs limites d'efficacité.

### 1.4.1 La prévention

Depuis le début du 21<sup>e</sup> siècle, il y a eu une grande réduction des cas de malaria dans les régions africaines dues au plan d'action de l'OMS visant à réduire l'incidence de la maladie dans les pays où elle est endémique. Ceci a été possible grâce à l'accessibilité des systèmes de prévention dans les pays pauvres. Par exemple, 57 des 106 pays à très haut risque de transmission de la malaria ont vu leur taux d'infection réduit de plus de 75%. Ceci a été possible grâce à la distribution de filets couverts d'insecticides afin de réduire les risques de transmission par le vecteur *Anopheles*. Il s'agit d'une réduction des cas de 205-316 millions en 2000 à 149-303 millions en 2015. De nos jours, 56% de la population dans les régions subsahariennes ont accès à des filets protecteurs pour les lits<sup>1</sup>.

Les insecticides peuvent aussi être utilisés afin de contrôler le vecteur. Par exemple, la dispersion dans les marécages à proximité de la population et l'utilisation de vaporisateurs intérieurs sont utilisées afin d'éliminer les moustiques qui pourraient contenir le parasite en Afrique. Par contre, il a été rapporté que des souches résistantes aux insecticides utilisés comme la pyréthroïde ont été isolés dû à l'utilisation abusive du produit dans les dernières années<sup>64</sup>. C'est ce phénomène qui est observé aussi chez la plupart des traitements contre le parasite.

Sinon il est possible d'utiliser des médicaments afin de prévenir le développement du parasite dans sa forme érythrocytaire. Ceci est utilisé chez les personnes les plus à risque, c'est-à-dire les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans, et chez les voyageurs. Bien sûr pour ces derniers la meilleure méthode de prévention est d'éviter les pays où le parasite est présent. Un des médicaments préventifs le plus connus est la malarone qui est à base d'atovaquone et de proguanil. Il est un médicament utilisé principalement pour la prévention des infections, mais qui peut aussi servir de traitement contre la malaria. Ce mélange est produit et commercialisé depuis 1990 par la compagnie GSK et est prescrit principalement pour les personnes allant dans les régions où la malaria est endémique. La malarone s'attaque plus particulièrement au stade hépatique et

érythrocytaire du parasite. Ceci permet donc de prévenir le développement de la maladie chez les voyageurs de courte durée et traiter les personnes présentes dans des régions où la résistance aux autres traitements a été rapportée<sup>65</sup>. Les premiers cas de résistance ont été vu en 2000 chez des voyageurs provenant du Nigéria<sup>65</sup>.

Sinon, l'OMS propose d'utiliser la chloroquine dans les pays où les souches résistantes ne sont pas présentes, c'est-à-dire, dans très peu de pays. Toutefois, les traitements préventifs ont plusieurs effets secondaires comme des hallucinations et des tremblements<sup>1</sup>. D'autre part, la vaccination est la meilleure méthode de prévention contre les maladies infectieuses. Par contre, il n'existe pas à ce jour de vaccin efficace contre le parasite, ce que nous allons voir en détail plus loin.

## 1.4.2 Les traitements

Même s'il y a plusieurs stratégies préventives mises en place par l'OMS, il y a tout de même plusieurs cas d'infection par années. De plus, la malaria ne peut être diagnostiquée que lorsque le parasite est dans son stade érythrocytaire. Ainsi, la plupart des médicaments utilisés vont cibler les mécanismes essentiels de ce stade. Ils existent plusieurs médicaments différents capables d'éliminer le parasite dont les mécanismes d'action sont connus. Toutefois, en plus de l'apparition de souches résistantes, nous devons avoir des médicaments dont les coûts de production sont modiques, car la principale population touchée est très pauvre. Nous allons voir différents médicaments qui étaient utilisés et qui sont encore utilisés de nos jours contre le parasite *P. falciparum*.

### 1.4.2.1 Quinine

La Quinine fut le premier traitement découvert et utilisé afin de combattre le parasite de la malaria dans les années 1600. Il s'agit d'une molécule retrouvée dans l'écorce de l'arbre Cinchona ou Quina-Quina, d'où il tient son nom. On utilise encore des médicaments synthétiques dérivés de cette molécule. La quinine a un effet contre les schizonts chez la plupart des espèces de *Plasmodium* et les gamétocytes de *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae*. Par contre, les mécanismes responsables de l'élimination du parasite sont encore inconnus<sup>66</sup>. L'OMS recommande d'utiliser la quinine en combinaison avec la doxycycline, la tétracycline ou la clindamycine lorsque les traitements de première ligne ne fonctionnent pas ou s'ils ne sont pas accessibles. La doxycycline est un médicament utilisé afin de combattre les cellules cancéreuses, plus précisément en s'attaquant aux mitochondries des cellules<sup>67</sup>. La tétracycline et la clindamycine sont des antibiotiques qui s'attaquent aux bactéries. Ceux-ci semblent avoir un effet contre l'apicoplaste de *Plasmodium*, un organe unique au parasite qui, comme nous avons expliqué précédemment, est

dérivé d'une cyanobactérie<sup>68</sup>. Finalement, la quinine peut être parfois donnée en première ligne dans les cas de malaria moins sévère.

#### 1.4.2.2 Chloroquine

La chloroquine fut le traitement le plus utilisé contre la malaria durant plusieurs années. Les avantages de ce médicament étaient sa fiabilité, son efficacité contre le parasite et son coût très faible<sup>69</sup> permettant de traiter les personnes dans les pays en voie de développement. Toutefois, l'apparition de souches résistantes a été observée dans les régions est et ouest de l'Afrique, l'Amérique du Sud et le sud-ouest de l'Asie dû principalement à l'utilisation abusive et non contrôlée du médicament. Or, la chloroquine ne peut être utilisée maintenant que dans les régions où il n'y a pas de cas de résistance, mais malheureusement la résistance est très répandue limitant l'utilisation de ce médicament<sup>70</sup>.

La résistance à la chloroquine semble être due à la production de pompe à efflux dans la vacuole digestive<sup>69</sup>. En effet, la molécule peut diffuser à l'intérieur du globule rouge jusqu'à la vacuole digestive où l'hémoglobine est digérée par le parasite. Lorsque la molécule de chloroquine se retrouve dans cet environnement acide, il capture des protons causant un changement de polarité, le rendant incapables de sortir de la vacuole. La chloroquine interfère avec la formation d'hémozoin, une forme non toxique de l'hémoglobine digérée dont nous avons discuté lors de développement du stade érythrocytaire. Toutefois, les réactions chimiques exactes responsables sont encore méconnues<sup>69</sup>.

#### 1.4.2.3 Artémisinine

L'artémisinine est le médicament avec l'effet le plus rapide contre le parasite de la malaria. Elle est utilisée de nos jours en combinaison avec d'autres médicaments : artemisinin-combinaison therapy (ACT)<sup>1</sup>. C'est le traitement utilisé en première ligne afin de traiter la maladie dans les pays où la malaria est endémique et où les cas de résistance à la chloroquine sont omniprésents<sup>71</sup>. L'artémisinine est utilisée en combinaison avec d'autres médicaments afin de réduire les risques de développement de souches résistantes comme on a pu observer avec la chloroquine. L'artémisinine est utilisée avec des médicaments possédant des temps d'action plus longs<sup>72</sup>. En ce moment, l'OMS recommande cinq différentes combinaisons ACT<sup>1</sup>. De plus, il existe un dérivé semi-synthétique de l'artémisinine, l'artesunate, qui est administré par intraveineuse et utilisé lorsque les patients sont atteints de malaria sévère. Il est donc possible de traiter les personnes dans le coma par

intraveineuse<sup>66</sup>. Malheureusement, les mécanismes d'action de la drogue sont encore méconnus. Tout ce que nous savons c'est qu'elle semble empêcher la dégradation de l'hémoglobine.

L'OMS demande à tous les pays utilisant l'artémisinine de vérifier régulièrement l'efficacité des médicaments afin de reporter l'apparition de souches résistantes. En effet, l'artémisinine est en ce moment le médicament le plus efficace contre la malaria et le développement d'un nouveau dérivé risque de prendre plusieurs années<sup>1</sup>. Malheureusement, on a détecté des souches résistantes en Thaïlande et dans plusieurs régions avoisinantes<sup>71</sup>. La propagation de ces parasites pourrait avoir des effets désastreux si elles atteignent l'Afrique.

### 1.4.3 La vaccination

Le développement d'un vaccin efficace contre *Plasmodium* est un des grands défis de la recherche biopharmaceutique. Il n'existe aucun vaccin efficace contre un parasite protozoaire, car ceux-ci sont beaucoup plus complexes qu'une bactérie ou un virus. En effet, nous avons vu que le stade de vie du parasite était très complexe. Plus précisément, *P. falciparum* possède plus de 5000 gènes et 3 différents cycles de vie durant lequel il exprime des protéines complètement différentes<sup>73</sup>. Dû à cette complexité, il y a différentes approches qui peuvent être adoptées afin de développer une thérapie vaccinale efficace. Toutefois, le corps doit être en mesure de reconnaître plusieurs formes que le parasite peut prendre pour qu'il soit protégé contre la malaria.

Le cycle érythrocytaire est une cible intéressante pour le développement de vaccins. Nous pouvons empêcher l'invasion des mérozoïtes à l'aide d'anticorps neutralisant reconnaissant les protéines à leur surface. Sinon, il est possible de réduire l'efficacité du parasite à croître lorsqu'à l'intérieur du globule rouge en immunisant avec des protéines du parasite retrouvées à la surface du globule rouge. Nous avons vu dans la section sur l'invasion que le parasite exprime différentes protéines à sa surface comme les EBA, les RH et MSP1 qui sont très immunogènes. Malheureusement, ces protéines sont très polymorphiques et peuvent subir des mutations. De plus, le parasite est très efficace lors de l'invasion ce qui réduit le temps d'action du système immunitaire.

Sinon, le cycle hépatique du parasite peut aussi être ciblé. Plus particulièrement la forme sporozoïte qui est transmis par le moustique. Lorsque le parasite est sous cette forme, il passe un long moment dans la circulation avant d'atteindre le foie ce qui le rend vulnérable au système immunitaire. Le vaccin Mosquirix (RTS,S/AS01) développé par GSK est le premier à avoir démontré qu'il était possible de produire une immunisation contre un parasite protozoaire<sup>74</sup>. Le vaccin est composé de la protéine CSP<sup>74</sup>, une protéine de surface du sporozoïte et d'une protéine d'enveloppe du virus de

l'Hépatite B, permettant la formation d'une particule « virus-like » pouvant être reconnue par le système immunitaire<sup>73</sup>. Toutefois, les essais cliniques de phase 3 du vaccin ont démontré une protection de 50.4% après 14 mois chez les enfants plus âgés et seulement 30.1% chez les enfants de moins de 5 ans<sup>73</sup>. De plus, il semblerait que la protection de ces derniers diminue jusqu'à 18% après 1 an s'ils ne reçoivent pas de doses supplémentaires<sup>75</sup>.

D'autres études ont tenté de produire un vaccin capable de s'attaquer aux parasites dans le moustique *Anopheles*. Ceci permettrait de réduire l'émergence de nouveaux cas de malaria dans les pays où le parasite est endémique<sup>76</sup>. Dans le même sens, des travaux ont tenté de faire un vaccin afin d'éliminer les gamétocytes. Il s'agirait d'un vaccin altruiste afin de stopper la transmission aux individus sains dans les régions où les cas de malaria sont très élevés<sup>77</sup>.

Donc, le vaccin idéal contre *Plasmodium* devra activer les deux branches de l'immunité adaptative, c'est-à-dire l'immunité cellulaire afin d'activer les lymphocytes cytotoxique et humoral afin de différencier les lymphocytes B en plasmocytes et ainsi produire des anticorps neutralisants. De plus, il faudra permettre l'immunisation à plusieurs formes du parasite. Par exemple, il faudrait immuniser avec des protéines de sporozoïtes et de mérozoïtes afin d'éliminer la forme hépatique et la forme érythrocytaire. En d'autres mots, si le système immunitaire ne reconnaît que les sporozoïtes comme le fait le Mosquirix, il ne suffit qu'un seul sporozoïte évite le système de défense et atteigne le foie afin de produire des milliers de mérozoïtes qui eux ne sont pas reconnus par les cellules immunitaires<sup>73</sup>. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous pouvons voir une réduction de l'immunité 1 an après la dernière dose chez les jeunes enfants.

## 2. But et Hypothèse

### 2.1 Problématiques actuelles

Maintenant que nous avons fait l'introduction de la malaria, de *Plasmodium* et du transport protéique, nous devons revenir à la problématique actuelle : l'émergence de souches résistantes et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Depuis les années 2000, nous pouvons voir une très grande réduction des cas d'infections et de mortalités par année. Ceci a été permis grâce à l'OMS et son plan d'action mis en place afin d'éliminer la malaria. Par contre, l'apparition de souches résistantes aux traitements de première ligne utilisés afin de traiter la malaria sévère sonne l'alarme dans les laboratoires et les hôpitaux. En effet, des cas de résistances ont été rapportés dans les dernières années des cas de résistances à l'artémisinine dans 5 pays d'Asie du sud et des cas de résistance aux insecticides chez le vecteur *Anopheles* dans plusieurs pays<sup>1</sup>.

C'est dans ce contexte, nous proposons d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques contre le parasite *Plasmodium*. Ces cibles doivent être uniques au parasite et surtout essentielles à sa survie. Le parasite de la malaria possède plusieurs organites essentiels qui sont uniques au phylum *Apicomplexa* comme le complexe apical et l'apicoplaste. Plus particulièrement, notre laboratoire s'intéresse à la biogenèse du complexe apical et de l'implication des PIP dans le transport différentiel des protéines qui le composent lors de la formation des nouveaux mérozoïtes.

### 2.2 But

Le complexe apical est composé des organites responsables de l'invasion du globule rouge. Il va sans dire que le parasite ne peut pas survivre sans ce complexe. Cependant, la formation de ces organites durant la génération des nouveaux mérozoïtes à l'intérieur de l'érythrocyte reste à élucider. Nous avons concentré nos travaux sur le transport des protéines contenues dans les rhoptries et les micronèmes. Plus particulièrement, nous sommes intéressé à la sélection de ces protéines au niveau de la membrane du Golgi lors du transport vésiculaire. Nous avons mentionné le rôle de RAMA et le recrutement de protéines des rhoptries formant des microdomaines à la membrane interne de l'appareil de Golgi. Les résultats obtenus dans l'équipe du Dr. Dave Richard suggèrent que d'autres molécules dans la membrane du Golgi pourraient permettre la formation de microdomaines lors du transport protéique vers d'autres organites.

Ainsi, les PIP servent de marqueurs à la membrane du Golgi et permettent le recrutement des protéines destinées au transport vésiculaire vers différents organites de la cellule. Les différentes formes de PIP permettraient de différencier les destinations des vésicules directement à la membrane du Golgi lors de la formation des microdomaines. Donc, comme pour RAMA, nous suggérons que ce mécanisme de recrutement nécessite une protéine adaptatrice capable de reconnaître le marqueur comme le fais Rap1 lors de la formation des rhotries.

Une analyse bio-informatique a été effectuée par d'autres membres de notre équipe afin d'identifier des protéines hypothétiques dans le génome de *P. falciparum* possédant des domaines d'interactions aux PIP, qui pourraient jouer le rôle de protéine adaptatrice lors de la formation des vésicules de transports. Cette analyse a permis d'identifier plusieurs gènes pouvant produire des protéines comme des kinases, des phosphatases et d'autres protéines possédants des domaines d'interactions avec les PIP. Parmi les différents candidats identifiés, nous avons sélectionné Mal13P1.188 une protéine hypothétique possédant un domaine PH sur laquelle nos travaux se sont concentrés.

## **2.3 Hypothèse de recherche**

Nous proposons que Mal13P1.188 ait un rôle dans la formation des microdomaines à la membrane de l'appareil de Golgi lors du transport différentiel des protéines vers le complexe apical lors de la génération des nouveaux mérozoïtes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré une lignée de parasites exprimant Mal13P1.188 fusionné à une molécule GFP et une hémagglutinine (HA). Ceci nous a permis d'identifier le stade du cycle érythrocytaire où la protéine est exprimée et sa localisation dans le parasite. Finalement, nous avons aussi généré une lignée bactérienne produisant le domaine PH de façon recombinant afin de tester sa capacité à lier les PIP et de vérifier s'il possède une certaine spécificité pour une forme de PIP. La caractérisation de cette protéine nous permettra d'évaluer son potentiel au niveau du recrutement des protéines à la membrane de l'appareil de Golgi et son implication dans la biogenèse du complexe apical. Ainsi, si Mal13P1.188 semble être essentiel à la formation des nouveaux mérozoïtes, il pourrait être une cible thérapeutique intéressante.

## 3. Matériels et méthodes

### 3.1 Culture cellulaire de *Plasmodium falciparum*

Les parasites de la souche 3D7 sont cultivés dans un milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complété avec du NaHPO<sub>3</sub> et de l'Albumax (Gibco, 11021-037) auquel nous ajoutons 4% de globules rouges provenant de culots sanguins (Croix rouge canadienne). Le marqueur de sélection des lignées transfectées est la blasticidine à une concentration finale de 2.5 µg/ml. Les cultures sont incubées à 37°C dans un mélange gazeux de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> et 90% N<sub>2</sub>. Les parasites sont passés aux deux jours afin de réduire la quantité de cellules infectées et permettre leur survie. Les parasites sont colorés à l'aide d'une solution de 15% Giemsa et analysés au microscope à fond clair afin de déterminer la parasitémie et le stade où ils se trouvent.

### 3.2 Clonage de Mal13P1.188 dans le plasmide pGDB

Nous avons amplifié la région 3' du gène Mal13P1.188 en prenant soin de retirer le codon-stop afin que le gène soit transcrit en phase avec une GFP et une hémagglutinine provenant du virus de l'influenza. Pour ce faire, nous avons effectué les différentes étapes du clonage dans des bactéries *Escherichia coli* TOP10 produites au laboratoire. La portion 3' du gène Mal13P1.188 (environ 500pb) a été amplifiée à l'aide de la polymérase KAPA High fidelity (KAPA Biosystem, KK2502) à une température d'élongation de 68°C. Les premières étapes de clonages ont été faites dans le plasmide pGEM T-easy (Promega) afin de faciliter la sélection de clones et le séquençage. Les clones ont été sélectionnés à l'aide de la coloration Bleu/Blanc et les clones positifs ont été séquencés avec les amorces liant le promoteur T7 et SP6 afin de confirmer que la séquence du gène soit sans mutation. Lorsque la séquence a été confirmée, le clone est remis en culture afin d'en extraire le plasmide qui sera digéré avec les enzymes XhoI et AVRII afin d'extraire la portion de Mal13P1.188 amplifiée et l'introduire dans le plasmide pGDB qui contient notre cassette GFP-HA à l'aide d'une T4 ligase (Biolabs, M0202L). Les mêmes étapes de clonage sont faites avec ce plasmide sauf pour le séquençage afin d'isoler des clones ayant le plasmide pGDB-Mal13P1.188-GFP-HA.

### 3.3 Synchronisation des cultures de parasites

Les cultures de parasite sont synchronisées à l'aide d'une solution de 5% D-sorbitol. Cette solution élimine les parasites sous la forme trophozoïte et schizont donnant une culture où l'âge des parasites est entre 0 et 22h. Pour ce faire, les cellules sont centrifugées à 1200 rpm durant 5 minutes. Le surnageant est retiré pour être remplacé par 3ml de 5% D-sorbitol. Le tout est incubé 5 minutes dans

un bain-marie à 37°C. Les cellules sont centrifugées de nouveau à 1200 rpm durant 5 minutes afin de retirer le D-sorbitol. Les cellules vont alors être ressuspendues dans du milieu RPMI et remises en culture. Afin d'obtenir une culture ayant une fenêtre d'âge plus étroite, nous synchronisons une deuxième fois après 18h de culture afin d'obtenir une culture de 18-22h et ainsi vérifier par Western blot l'expression de la protéine selon la forme du cycle érythrocytaire qui nous intéresse.

### **3.4 Transfection des parasites**

Pour transmettre le plasmide de façon efficace dans le parasite, nous nécessitons une solution contenant 100µg d'ADN. Pour ce faire, nous préparons des midi-preps (Promega, A2492) de bactéries possédant le plasmide pGDB-Mal13P1.188-GFP-HA afin de produire suffisamment d'ADN pour la transfection. Celle-ci est précipitée à l'aide d'éthanol et d'acétate de sodium durant toute la nuit à -20°C et resuspendue dans 30 µl de tampon Tris-EDTA après deux lavages à l'éthanol 70%. Nous ajoutons ensuite 370µl d'une solution Cytomix (120mM KCl, 0.15mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 25mM HEPES). La culture de parasites doit avoir été préalablement synchronisée afin d'avoir une grande majorité de parasites sous la forme anneau. La culture sera centrifugée à 1200 rpm durant 5 minutes et le surnageant sera retiré afin d'y ajouter le Cytomix contenant l'ADN à transférer. Les cellules et le Cytomix seront transférés à une cuvette d'électroporation (GenePulser Biorad, 0.2 cm gap, #165-2086). Les cellules vont subir une électroporation à 0.310 kV and 950 µF et ensuite transférées à un milieu de culture frais sans aucun marqueur de sélection. Nous attendons 24 heures avant d'ajouter la blasticidine à la culture. Le milieu de culture sera changé tous les jours durant la première semaine suivant la transfection. Il va nécessiter environ 3 semaines au parasite avant d'être observé à nouveau en microscopie à fond clair. Nous vérifierons l'intégration du plasmide dans le noyau du parasite par PCR en utilisant les mêmes amorces que lors des tests de clonage chez les bactéries en plus d'amorces reconnaissant des séquences du génome. Pour ce faire, nous récoltons une aliquote de 2 µl de la culture qu'on utilise comme matrice au test PCR.

### **3.5 Intégration du plasmide pGDB au génome du parasite**

Comme nous avons vu plus tôt, le plasmide pGDB doit être intégré au génome du parasite. Ceci est possible dû à la région 3' de Mal13P1.188 que nous avons amplifiée et fusionnée à la cassette GFP-HA dans le plasmide. Ainsi, de façon aléatoire dans la culture certains parasites vont recombiner leur génome avec le plasmide par recombinaison homologue. Nous sélectionnons les parasites intégrés en cyclant le marqueur de sélection. C'est-à-dire que nous retirons la blasticidine durant 1 mois des cultures après la réapparition des parasites. Ceci va permettre au parasite n'ayant pas

intégré le plasmide de le perdre. Nous ajoutons ensuite la blasticidine de nouveau et attendons que les parasites soient visibles en microscopie afin de recommencer un nouveau cycle en retirant le marqueur de sélection de nouveau. Nous appelons cette technique la sélection ON/OFF. Nous effectuons cette technique afin d'avoir 4 cycles de sélection ON/OFF, permettant d'éliminer les parasites ayant une expression épisomale du plasmide. Nous pouvons ensuite tester l'intégration par tests PCR ou par Southern blot comme ce fut le cas pour Mal13P1.188.

### **3.6 Isolement de parasites à partir de globules rouges infectés**

Nous récoltons les cellules totales des cultures que nous centrifugeons à 1200 rpm durant 5 minutes. Nous retirons le surnageant et ajoutons 5 ml d'une solution de saponine (0,15% Saponin dans PBS pH 7,4) que nous plaçons sur la glace durant 15 minutes afin de lyser les globules rouges. Nous centrifugeons ensuite à 3200 rpm durant 5 minutes pour isoler les parasites. Trois lavages au PBS froid sont effectués afin de retirer les traces d'hémoglobines. Les échantillons peuvent être congelés à -80°C jusqu'à la prochaine utilisation.

### **3.7 Test d'intégration de la cassette GFP-HA par Southern blot**

Nous avons testé l'intégration de la cassette GFP-HA au génome de *P. falciparum* par Southern blot. L'ADN des parasites a été isolé à partir des culots saponisés en utilisant le Blood Genomic DNA kit (Sigma, NA2010-1KT). L'ADN est ensuite digéré utilisant 1 ou 2 enzymes de restriction afin d'obtenir des tailles distinctes entre la forme sauvage, épisomale du plasmide et intégrée au génome, déterminé l'aide du logiciel SnapGene. L'ADN est migré sur un gel d'agarose 0,7% à 25V durant toute la nuit. Une photo du gel est prise en utilisant une règle fluorescente le lendemain afin d'associer la distance parcourue par l'ADN à leur taille. Le gel est ensuite lavé avec 0,25 N HCl durant 15 minutes et au 0,4 N NaOH durant 30 minutes. Il est ensuite placé face vers le bas sur 2 papiers Whatman imbibés de NaOH. Nous déposons une membrane Hybond-XL (GE Healthcare, RPN303 S) au-dessus du gel suivi de 2 autres papiers Whatman imbibés de NaOH. Le montage est finalisé avec beaucoup de papier essuie-tout blanc sur lequel nous déposons un poids afin de permettre le transfert de l'ADN par capillarité durant toute la nuit. Le lendemain, nous marquons l'emplacement des puits sur la membrane à l'aide d'un crayon de plomb et nous fixons l'ADN à la membrane avec un appareil à ondes UV. Nous effectuons au moins 2 lavages avec une solution 2x SSC (NaCl, NaCitrate) pour ensuite placer la membrane dans un tube d'hybridation contenant la solution d'hybridation (SSC 6%, solution 5X Denhart et 0,5% SDS). Nous laissons agiter durant 20-30 minutes à 62°C. Nous ajoutons ensuite 100µl de ssDNA (single strain DNA) chauffé à 100°C afin de bloquer la membrane que nous laissons incubé durant 3 heures ou plus. Il faut alors

préparer la sonde radioactive d'ADN spécifique à notre gène d'intérêt. Pour ce faire, nous prenons la même séquence utilisée lors de l'amplification PCR durant le clonage dans pGDB qui reconnaît la portion 3' de Mal13P1.188 que nous bouillons durant 5 minutes à 100°C. Nous préparons ensuite notre sonde d'ADN avec 30µCi de dATP<sup>32</sup>, une solution OLB (Oligos Labelling Buffer) et l'enzyme polymérase Klenow. Nous incubons le mélange à 37°C durant 1 heure. La sonde est ensuite purifiée à l'aide de colonnes MicroSpin Sephadex G-50 (illustra, GE HealthCare) et dénaturée à 100°C durant 5 minutes avant d'être déposée dans notre tube à hybridation avec notre membrane. Nous laissons incubé à 62°C durant toute la nuit. Le lendemain, la membrane est nettoyée environ 2 fois avec du SSC 2X à 62°C. Nous révélons ensuite à l'aide de films sensibles à la radioactivité (Progene, 39-20810) présente sur la membrane où notre séquence est présente. Ceci est fait à -80°C à l'abri de la lumière durant 2 jours tout dépendant de l'intensité du signal.

### **3.8 Détection de Mal13P1.188 par Western blot**

Les parasites récoltés par saponine sont solubilisés dans du Sample Buffer (0,5M EDTA, 1M Tris, 4% SDS, glycérol, β-mercaptoethanol et 0,2% Bleu de bromophénol) puis chauffés à 100°C durant 5 minutes afin de lyser les cellules et dénaturer les protéines. Différents échantillons provenant de différents temps du cycle érythrocytaire ont été déposés sur un gel de 7% polyacrylamide avec un marqueur de taille (Precision plus Protein All blue, Bio-rad, 161-0373) et ont été transférés sur une membrane de transfert (Immobilon, IPVH00010). La membrane a été traitée au méthanol afin de fixer les protéines à sa surface. Après trois lavages de 5 minutes avec une solution TBS-T (200 nM Tris, 3M NaCl et 1% Tween-20), nous bloquons la membrane avec une solution de 4% de lait en poudre dans du TBS-T durant 1-2 h. La membrane est ensuite mise en contact avec des anticorps reconnaissant la portion HA (rat, Roche, 11 867 423 001) et HSP70 (StressMarq, SPC-1866) servant à détecter notre protéine d'intérêt et notre marqueur de charge respectivement, à 4°C sous agitation durant toute la nuit. La membrane va passer trois étapes de lavage de 5 minutes au TBS-T pour alors être traitée avec les anticorps secondaires jumelés à une peroxydase (Horse radish peroxydase) à température pièce durant 30 minutes. La membrane sera lavée de nouveau 3 fois au TBS-T pour ensuite être traitée à l'ECL (Clarity western ECL, Bio-rad) permettant à la peroxydase de produire de la lumière qui pourra être détecté sur un film photosensible (même film que pour le Southern blot) détectant la présence de notre protéine sur la membrane. Les anticorps sont tous déposés dans la même solution utilisée pour le blocage de la membrane, c'est-à-dire 4% de lait en poudre dans du TBS-T.

### **3.9 Détection de Mal13P1.188 par microscopie à fluorescence**

Notre protéine étant fusionnée à une GFP, nous pouvons vérifier directement par microscopie à fluorescence son expression dans le parasite. Pour ce faire, nous récoltons environ 500 µl de globules rouges provenant de notre culture de parasite. Nous ajoutons 0,5 µg de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) aux cellules que nous incubons à 37°C durant 15 minutes à l'abri de la lumière. Ensuite, tout en prenant le soin de réduire l'exposition de nos échantillons à la lumière, nous effectuons 2 lavages au PBS à 37°C afin d'éliminer les excès de DAPI. Finalement, 2 µl de l'échantillon est déposé sur une lame qui sera ensuite scellée à l'aide de VALAP (Vaseline, Lanolin et paraffine). Les lames sont ensuite observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Delta Vision. Nous allons donc pouvoir observer les noyaux des parasites à l'aide du DAPI (358 nm excitation/461 nm émission) et notre protéine à l'aide du filtre FITC (490 nm excitation/525 nm émission). Le traitement des images de microscopie est fait à l'aide du logiciel FIJI.

### **3.10 Localisation de Mal13P1.188 par immunofluorescence**

Afin de localiser notre protéine dans le parasite, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence. Cette technique nous permet de marquer notre protéine d'intérêt et un organite simultanément avec des fluorochromes différents. Pour ce faire, nous prenons une aliquote de 500 µl de nos cultures de parasites que nous allons fixer à l'aide d'une solution 25%paraformaldehyde et 0,035% glutaraldehyde durant 30 minutes avec agitation. Cette étape et les suivantes doivent être faites sous une hôte chimique due à la toxicité des agents fixatifs. Ensuite, les cellules sont centrifugées à 1200 rpm durant 5 minutes, le surnageant est retiré et les cellules sont lavées une fois avec du PBS. Nous perméabilisons les cellules avec une solution de 0,1% Triton X-100 dans le PBS durant 10 minutes sous faible agitation. Après cette étape, les globules rouges contenant les parasites sont très sensibles et doivent être manipulés avec précaution. Lorsque les cellules ont été centrifugées et que le PBS-TX-100 a été retiré, nous ajoutons une solution de 3% BSA dans du PBS aux cellules afin de bloquer les régions pouvant être reconnues de façon non spécifique par nos anticorps. Cette étape peut être faite à 4°C toute la nuit sans agitation afin de diminuer la lyse des cellules. Celles-ci sont ensuite séparées en différentes conditions qui auront différents organites de marqués. Elles sont alors suspendues avec les anticorps primaires qui sont composés d'un anticorps HA (mouse, Cedarlane, CLH104AP) reconnaissant notre protéine d'intérêt et d'un anticorps spécifique à un organite (ERD2, Rap1, RON4, etc.). Il y a donc 2 anticorps de déposés par échantillon. Nous incubons nos échantillons avec les anticorps primaires dans une solution 3% BSA-PBS durant au moins 1h sous agitation. Ils vont ensuite être lavés 2 fois avec du PBS pour ensuite être mis en contact avec l'anticorps secondaire qui est couplé à un fluorochrome.

Mal13P1.188 sera marqué à l'Alexa 488 (Life technologies) émettant une lumière verte et le marqueur de l'organite sera marqué à l'Alexa 594 (Life technologies) émettant une lumière rouge. Les échantillons sont alors incubés durant 1h à l'obscurité sous agitation. Après 2 lavages au PBS, nos différents marquages sont déposés sur une lame avec une solution de VectaShield (1µl DAPI dans 999µl anti-fade) permettant de colorer le noyau des cellules et réduit le blanchiment des fluorochromes. Les lames sont alors scellées à l'aide de verni à ongle et observé au microscope à fluorescence DeltaVision. L'Alexa 488 est observé à l'aide du filtre FITC utilisé aussi pour la GFP, l'Alexa 594 est observé à l'aide du filtre Alexa 594 (590 nm excitation/617 nm émission) et les noyaux sont observés avec le même filtre DAPI qu'auparavant. La mise en forme des photos de microscopie est faite à l'aide du logiciel FIJI.

### **3.11 Production du domaine PH recombinant chez *Escherichia coli***

Le domaine PH de Mal13P1.188 a été amplifié par PCR comme pour la région 3' de Mal13P1.88. Nous avons amplifié le domaine PH (nucléotide 73 à 183) afin de le cloner dans le vecteur pGEX-6 P3 qui permet de fusionner notre protéine en 3' à une Glutathione S-transferase (GST) bactérienne. Le plasmide a ensuite été transformé dans une souche d'E. coli BL21. Notre domaine peut ensuite être produit par ces bactéries. Pour ce faire, nous cultivons les bactéries pour environ 3h à 37°C dans du milieu Luria-Bertoni (LB) de façon à ce que la densité optique (DO) atteigne 0.4 sur un lecteur de plaque à 600nm. Lorsque nous avons atteint cette DO, nous ajoutons 0.3mM d'IPTG à la culture que nous incubons 3h à 37°C. Cette solution va activer l'expression de notre protéine. Les bactéries récoltées vont ensuite être lysées à l'aide de lysozyme d'œuf (Sigma, L6876-106) et de DTT (Biolab, B7705S). Nous incubons les cellules sur glace durant 30 minutes pour ensuite les passer au sonicateur. Nous ajoutons 1% de Triton X-100 afin de solubiliser les membranes des cellules lysées que nous centrifugeons à 13000 rpm durant 10 minutes. Le surnageant contenant nos protéines est récolté afin d'être mis en contact avec des billes d'agarose glutathion (Sigma, G4510-10ml) durant 1h sous agitation afin de lier la GST liée à notre domaine PH. Nous passons alors nos billes dans des colonnes de chromatographie (Biorad, 732-1010) afin d'éliminer les protéines qui ne sont pas liées. L'élution est possible à l'aide d'une solution de 20 nM de L-Glutathion réduit (Sigma, 70-18-8) compétitionnant la liaison de la GST aux billes permettant ainsi de décrocher nos protéines et les récolter. Les protéines recombinantes produites ont été dosées par coloration de Bradford (Biorad, 500-0006) et testées par Western blot afin de vérifier la pureté des échantillons en à l'aide d'un anticorps reconnaissant la portion GST (Bethyl, A190-122A). Ces mêmes échantillons purifiés ont été utilisés pour les tests PIP-strip.

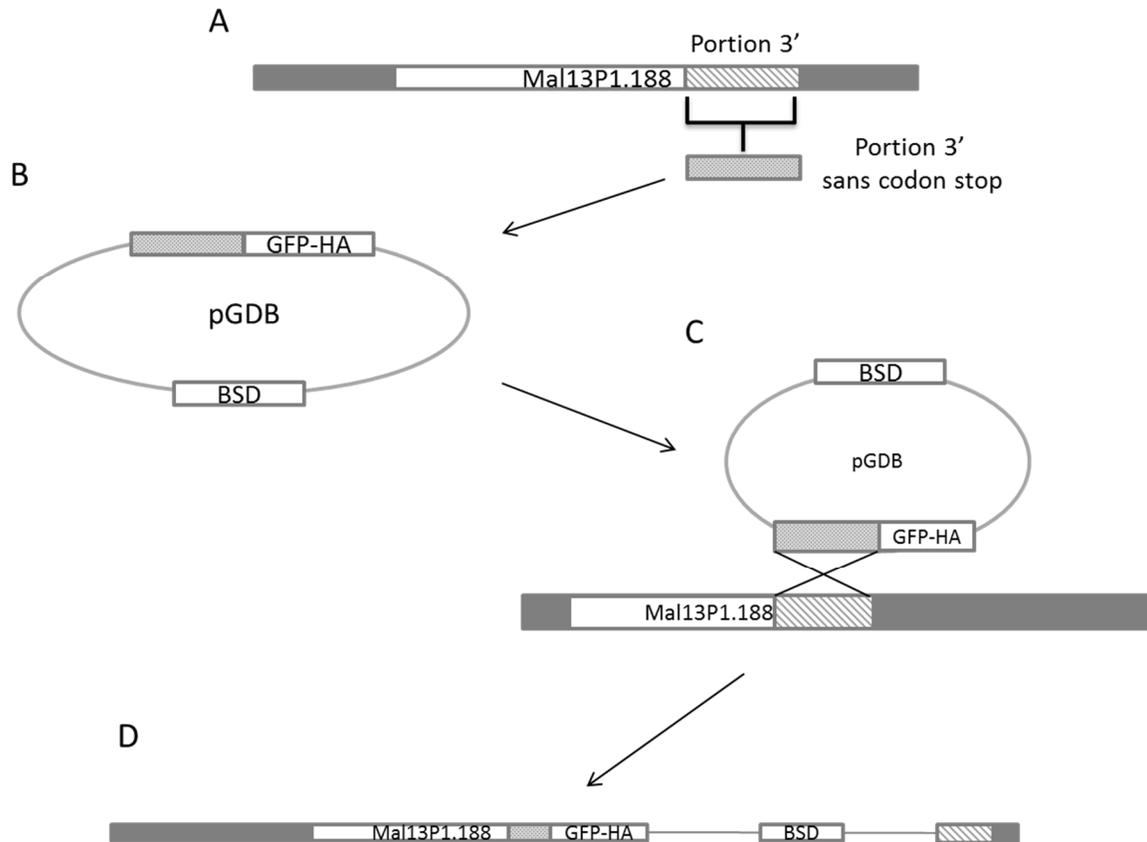
### **3.12 PIP-Strip**

Après avoir produit notre domaine PH fusionné à la GST, nous avons fait un PIP-Strip (Echelon, P-6001-10 pk). Il s'agit d'une membrane sur laquelle certaines régions contiennent une forme de phospholipide. Il y a parmi ces phospholipides les différentes formes de PIP et le PI. Nous pouvons donc déposer nos échantillons sur cette membrane afin de tester la liaison de notre domaine avec ces différents lipides. Pour ce faire, nous devons bloquer la membrane PIP-Strip avec une solution 3% BSA «lipid free» (Sigma, 9048-46-8) dans du TBS-T toute la nuit à 4°C sous agitation. Nous avons ensuite déposé notre protéine purifiée sur la membrane à une concentration de 1µg/ml durant 1h à température pièce sous agitation. Après avoir lavé la membrane 3 fois au TBS-T, nous avons déposé un anticorps détectant la région GST durant 1h sous agitation. La membrane est lavée 3 fois avec du TBS-T avant que nous ajoutions l'anticorps secondaire couplé à la HRP. La membrane va ensuite être traitée à l'ECL et révélée à l'aide d'un film photosensible comme pour le Western blot.

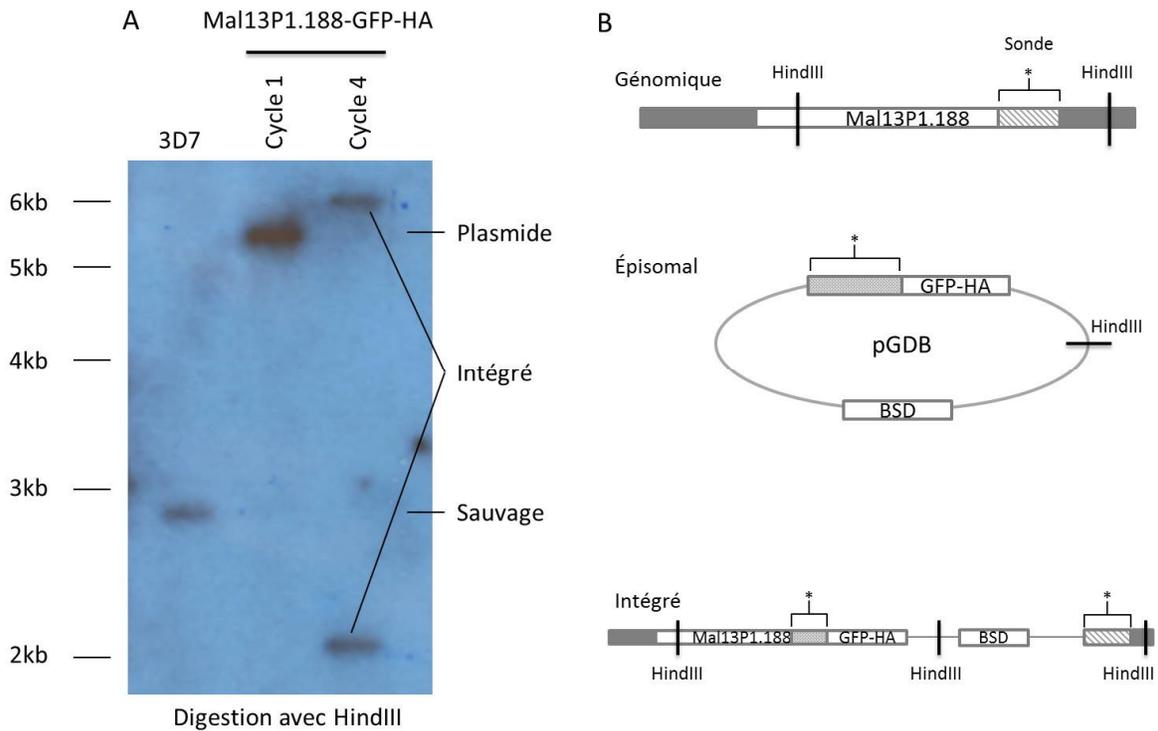
## 4. Résultats

### 4.1 Test d'intégration de la lignée Mal13P1.188-GFP-HA

Nous avons généré une lignée de parasite pouvant exprimer Mal13P1.188 fusionné en C-terminal avec une GFP et une hémagglutinine. Nous avons effectué la transfection du plasmide pGDB et la sélection des clones par les méthodes décrites précédemment. Après plus de 6 mois de sélection ON/OFF, nous avons extrait les parasites des globules rouges afin de tester la présence de la cassette intégrée à tous les parasites de la culture par Southern blot (Figure 8). Une sonde radioactive reconnaissant la région 3' de Mal13P1.188 a été utilisée afin de détecter les différentes formes sous lesquelles notre gène peut se retrouver (Sauvage, plasmidique et intégrée). Cette sonde va alors détecter la forme sauvage du gène chez les parasites 3D7 non transfectés, le plasmide non intégré lors des premiers cycles suivant la transfection des parasites (premier cycle de sélection) et deux régions lorsqu'intégrée au génome dû à la recombinaison homologue laissant la portion 3' sauvage de Mal13P1.188 intact en 3' du plasmide (Figure 9). Nous avons constaté que lors de la transfection (Cycle 1) nous pouvions voir que la majorité des parasites avaient le plasmide non intégré à leur génome. Ceci démontre que plusieurs étapes de sélections ON/OFF doivent être fait afin d'isoler nos clones intégrés. En effet, après 4 cycles de sélection, nous pouvons voir les deux bandes présentes chez les parasites ayant intégré notre plasmide à leur génome. Nous avons poursuivi nos expériences avec cette lignée de parasite ayant Mal13P1.188 marqué.



**Figure 8.** Schéma d'intégration de la cassette GFP-HA au gène Mal13P1.188 endogène de *Plasmodium falciparum*. A) Amplification de la portion 3' de Mal13P1.188 sans son codon-stop. B) Plasmide pGDB préparé afin d'être transfecté dans les parasites 3D7. C) Recombinaison homologue de la portion 3' sans codon-stop avec la portion 3' endogène de Mal13P1.188. D) Génération de notre lignée Mal13P1.188-GFP-HA possédant le plasmide complet à l'intérieur de son génome.

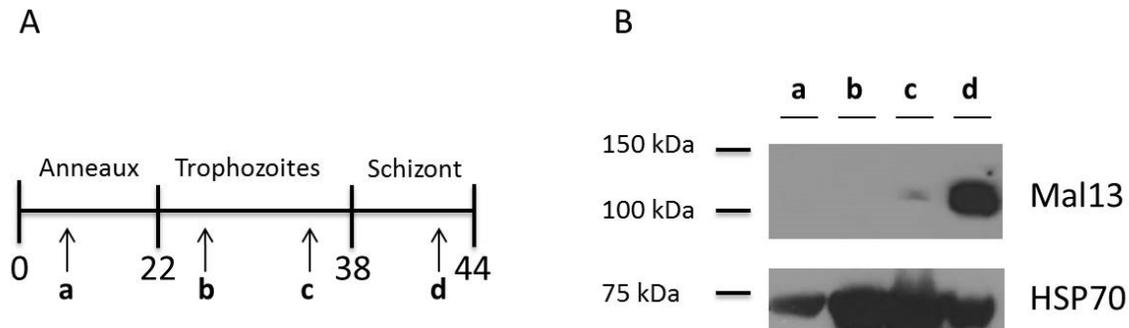


**Figure 9.** Résultat du Southern blot testant la lignée exprimant Mal13P1.188 fusionné à une GFP et à une hémagglutinine. A) Southern blot montrant la détection de la portion 3' de Mal13P1.188 chez une souche sauvage, après l'insertion du plasmide pGDB dans le noyau du parasite et après 4 cycles ON/OFF de sélection. B) Schéma montrant les différents fragments d'ADN pouvant être détectés à l'aide de notre sonde. Nous pouvons voir que la forme intégrée possède deux régions 3' de Mal13P1.188 que nous pouvons observer sur le Southern blot.

## 4.2 Expression de Mal13P1.188 durant le cycle érythrocytaire

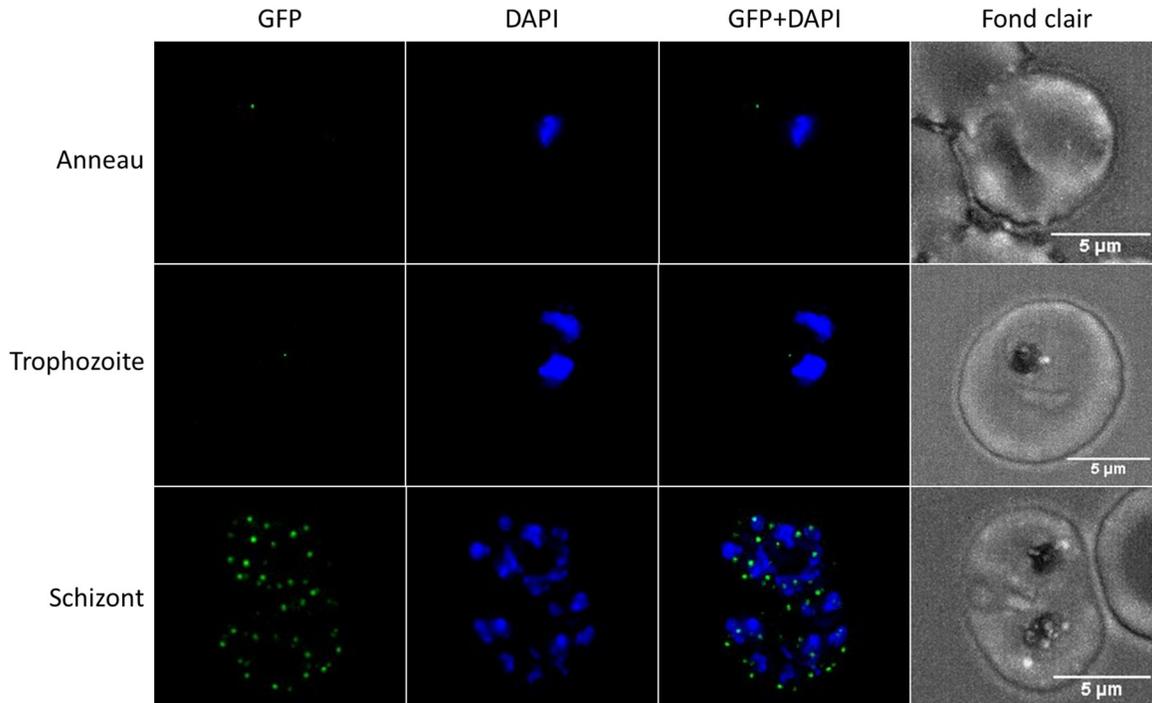
Nous nous sommes intéressés à connaître durant quel stade de vie du cycle érythrocytaire Mal13P1.188 était produit. Pour ce faire, nous avons synchronisé nos parasites afin d'obtenir des échantillons à différents moments du cycle érythrocytaire, plus particulièrement à la forme anneau, jeune et vieux trophozoïte, et schizont (Figure 10A). Nous avons ensuite vérifié la présence de Mal13P1.188 dans ces différents échantillons utilisant des anticorps contre la portion HA ajouté au gène de notre lignée de parasite. Les résultats obtenus en Western blot nous a permis d'identifier Mal13P1.188 seulement lorsque le parasite est sous la forme schizont. Nous avons utilisé comme

contrôle de charge parasitaire le HSP70 qui est produit de façon constitutive durant le cycle. Ceci nous a permis de vérifier que chacun des échantillons déposés sur le gel était composé d'une quantité semblable de parasites (Figure 10B). Nous pouvons voir que l'intensité des bandes pour cette protéine augmente plus le stade de vie du parasite est avancée. En effet, le parasite est en division durant ces derniers moments du cycle érythrocytaire. Or, la quantité de HSP70 sera augmentée plus le parasite aura divisé son contenu pour la production de cellules filles.



**Figure 10.** Western blot de l'expression de Mal13P1.188 durant les différents stades du cycle érythrocytaire. A) Présentation des différents temps du stade érythrocytaire ciblé post invasion. B) Western blot utilisant un anticorps reconnaissant l'étiquette HA de Mal13P1.188 et un anticorps reconnaissant HSP70, une protéine servant de contrôle de charge protéique.

Avec les résultats obtenus par Western blot, nous nous sommes intéressés à l'expression de GFP durant les différents stades du cycle érythrocytaire par microscopie à fluorescence afin d'appuyer les résultats précédents. En effet, la lignée Mal13P1.188 fusionnée à la GFP nous a permis de confirmer que Mal13P1.188 n'était présent que chez les parasites sous la forme schizont. Nous pouvons distinguer ces parasites par la présence de plusieurs noyaux, dus à la division du noyau qui est active que durant cette étape du cycle (Figure 11). Nous pouvons aussi voir que la GFP semble être exprimée de façon localisée dans le parasite (Figure 11). C'est-à-dire que l'expression de GFP n'est pas diffuse dans le cytosol du parasite, mais semble plutôt se retrouver dans un compartiment restreint.



**Figure 11.** Image en microscopie à fluorescence de notre lignée Mal13P1.188-GFP durant les différents stades du cycle érythrocytaire. Nous pouvons voir notre protéine en vert et les noyaux des parasites marqués au DAPI en bleu. Ces images de microscopie confirment que Mal13P1.188 est exprimé que lors du stade schizont du cycle érythrocytaire tel qu'observé par Western blot.

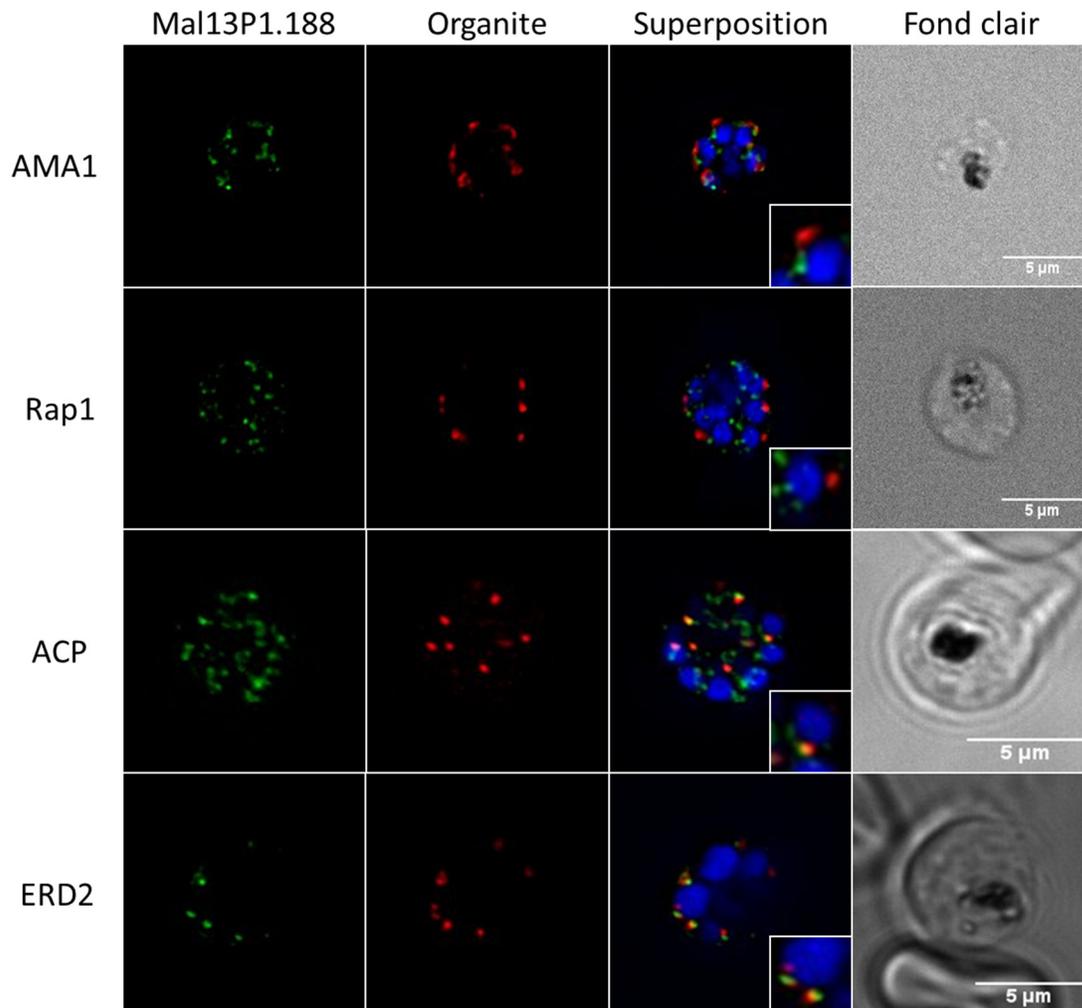
En conclusion, nous pouvons affirmer que Mal13P1.188 est une protéine qui n'est exprimée chez le parasite lors du stade schizont du cycle érythrocytaire. Ceci a été confirmé par Western blot et microscopie à fluorescence. Puisque la protéine est exprimée de façon localisée à l'intérieur du parasite, nous nous sommes intéressés à identifier ce compartiment cellulaire.

### 4.3 Localisation de Mal13P1.188 par immunofluorescence

Nous nous sommes intéressés à identifier l'organe dans lequel Mal13P1.188 était localisé. Pour ce faire, nous avons utilisé un anticorps reconnaissant la portion HA de Mal13P1.188 en combinaison avec un anticorps pour une protéine dont la localisation était connue dans le parasite. Nous couplons les anticorps liés à Mal13P1.188 à un fluorochrome émettant une lumière verte et les anticorps reconnaissant un organe avec un fluorochrome rouge. Ainsi, si les deux marqueurs se retrouvent au même endroit, nous allons avoir un signal jaune.

Nous avons donc fait plusieurs échantillons différents afin de cibler différents organes du complexe apical, l'appareil de Golgi, l'apicoplaste, le RE et plusieurs autres. Parmi les différents

marqueurs, nous avons pu constater que la protéine était plutôt restreinte près de l'appareil de Golgi et de l'apicoplaste (ERD2 et ACP, Figure 12). De plus, nous pouvons voir qu'il n'y a aucune colocalisation avec des protéines du complexe apical (Rap1 et AMA1, Figure 12).

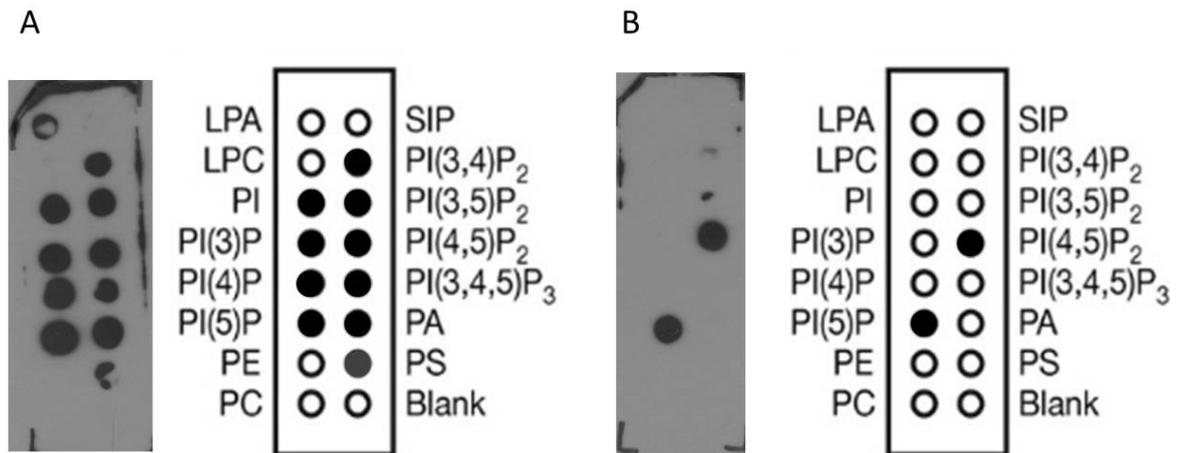


**Figure 12.** Photo de microscopie à fluorescence des tests de localisation par immunofluorescence de Mal13P1.188 chez le parasite *P. falciparum*. Plusieurs marqueurs ont été utilisés afin de localiser la protéine chez le parasite. Nous avons utilisé différents marqueurs dont AMA1 (Micronèmes), Rap1 (Rhoptry), ACP (apicoplaste) et ERD2 (Golgi) présentés dans cette figure. Mal13P1.188 semblerait être localisé au niveau de l'appareil de Golgi et de l'apicoplaste du parasite.

## 4.4 Spécificité élargie du domaine PH de Mal13P1.188

Puisque le domaine PH de Mal13P1.188 a été identifié à l'aide d'un logiciel bio-informatique, nous voulions confirmer que cette région de la protéine avait la capacité de lier les PIP. De plus, nous avons déjà mentionné que 61% des protéines possédant un domaine PH peuvent lier les PIP. Ainsi, il était important de vérifier si le domaine de Mal13P1.188 était capable de lier les différents PIP dans les membranes cellulaires et s'il avait une certaine spécificité. Nous avons donc produit un plasmide dans lequel nous avons amplifié la séquence du domaine PH qu'on a ensuite transformé dans une lignée d'*Escherichia coli*. Après avoir produit le domaine PH et une version mutée de façon recombinante, nous avons déposé les protéines sur membrane PIP-strip et détecté en utilisant un anticorps reconnaissant la région GST fusionné au domaine. Les détails de ce procédé sont présentés dans la section méthodologie.

Les résultats recueillis avec la forme sauvage et mutée du domaine PH de Mal13P1.188 montrent qu'il peut se lier aux PIP. De plus, il semble posséder une spécificité élargie pour les différentes formes (Figure 13A). Le domaine PH muté en Y12D montre une perte de liaison pour tous les PIP sauf pour le PI(5)P et le PI(4,5)P<sub>2</sub> (Figure 13B). Cette mutation nous a permis d'éliminer les liaisons étant non spécifique au domaine PH de Mal13P1.188. Avec ces résultats, nous avons confirmé que Mal13P1.188 possède un domaine PH capable de reconnaître les PIP avec une spécificité élargie.



**Figure 13.** Résultats des tests de liaison du domaine PH et d'un mutant ayant une polarité modifiée (Tyrosine par un acide glutamique en position 12), aux PIP sur PIP-strip. A) Domaine PH sauvage de Mal13P1.188. B) Domaine PH muté Y12D de Mal13P1.188. Le résultat confirme que le domaine PH de Mal13P1.188 peut lier les PIP avec une spécificité élargie.

## 5. Discussion

La caractérisation de Mal13P1.188 nous a démontré que la protéine était produite lors du stade schizont et à proximité de l'appareil de Golgi. Ces résultats suggèrent que Mal13P1.188 pourrait avoir un rôle dans le transport différentiel dû à son emplacement dans la cellule et à sa synthèse lors de la formation des nouveaux mérozoïtes. Toutefois, la cible de transport ne semble pas être celle que nous nous attendions. Nous précisons sur les différentes théories que nous proposons et des expériences que nous devons faire afin de les confirmer.

### 5.1 Rôle de Mal13P1.188 dans la génération de nouveaux parasites

Plusieurs caractéristiques de Mal13P1.188 suggèrent qu'elle joue un rôle dans le transport protéique lors de la production des composantes nécessaires aux parasites en division. En effet, cette protéine est exprimée au stade schizont qui est l'étape où le parasite forme les différents organites des cellules filles. Ainsi, les protéines nécessaires à leur génération sont produites durant cette phase et nécessitent d'être transportées par le système de transport vésiculaire de la cellule. Alors, les protéines nécessaires au recrutement des composantes des différents organites devront être produites au même moment dans le cycle érythrocytaire.

Un autre résultat qui vient appuyer l'hypothèse du rôle de Mal13P1.188 dans la sélection des cargos lors du transport vésiculaire est sa localisation au niveau du Golgi. Ceci suggère que notre protéine aurait un rôle lors de la formation des microdomaines à la membrane. Des analyses bio-informatique de la protéine par I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBLY Refinement)<sup>78-79</sup> ont permis d'identifier des domaines de liaison protéique suggérant que cette protéine aurait la capacité à lier d'autres composantes cellulaires que les PIP. C'est ce que nous attendons d'une protéine adaptatrice.

Toutefois, nous n'avons toujours pas été en mesure d'identifier les différents partenaires d'interactions de Mal13P1.188. Nous avons tenté de les identifier en bloquant les liaisons entre Mal13P1.188 et ses partenaires d'interaction à l'aide de DSP (dithiobis(succinimidyl propionate)). Cette molécule est capable de lier les amines présentes sur différents acides aminés et ainsi figer les interactions entre les différentes protéines de l'échantillon. Lorsque nous avons récolté nos parasites, il est possible de les culoter à l'aide de bille couverte d'anticorps reconnaissant la partie HA de notre protéine liée à Mal13P1.188. Ces billes purifiées contenant la protéine cible ainsi que d'éventuel partenaire cellulaire ont été envoyés pour analyse au spectrophotomètre de masse. Cet

appareil permet d'identifier les différents peptides retrouvés dans l'échantillon et nous indiquer la nature de toutes les protéines pouvant lier Mal13P1.188. Toutefois, les résultats se sont avérés négatifs dû au fait qu'il n'y avait pas suffisamment de protéines dans nos échantillons analysés en spectrométrie de masse. L'identification de ces partenaires d'interaction pourrait confirmer nos hypothèses sur le rôle que Mal13P1.188 a tant qu'acteur important dans le recrutement des protéines à la membrane de l'appareil de Golgi et déterminer vers quel organite il est transporté.

## 5.2 Rôle dans le transport vers l'apicoplaste

Nous avons parlé tout au long de ce mémoire de la biogenèse du complexe apical. En effet, ces organites représentent une bonne cible afin d'éliminer le parasite sans causer d'effet secondaire à l'hôte infecté. En effet, ce complexe possède les protéines essentielles à l'invasion du globule rouge, qui sont aussi absentes chez l'être humain. Ainsi, en ciblant ces organites, nous pouvons empêcher l'invasion du parasite tout en évitant des réactions croisées chez l'hôte infecté. Toutefois, nos résultats de localisation de Mal13P1.188 semblent démontrer que notre protéine n'est peut-être pas impliquée dans la biogenèse du complexe apical. Or, si nous restons en lien avec notre hypothèse et que Mal13P1.188 est une protéine adaptatrice, elle devrait être transportée avec la vésicule et se retrouver dans l'organite récepteur après la fusion des membranes. Ainsi, nous verrons notre protéine en immunofluorescence dans l'organite de départ et celui où il est transporté. Or, tout ce que nous avons vu en utilisant cette technique est une localisation dans l'appareil de Golgi et l'apicoplaste.

Si nous séparons ces deux résultats, nous pouvons dire que la localisation au Golgi supporte notre hypothèse au niveau du rôle de Mal13P1.188 et de son implication dans le recrutement de protéines à la membrane lors de la sélection des cargos. Par contre, nous pouvons aussi observer à l'occasion une localisation dans l'apicoplaste. Les images présentées dans ces travaux sont celles ayant la localisation la plus claire. Toutefois, il arrive de voir une localisation partielle. C'est-à-dire que quelques parasites présents dans le globule rouge ont Mal13P1.188 localisé à l'apicoplaste. Ainsi, nous pensons que ceci est dû au fait que Mal13P1.188 serait dégradé après un certain temps lorsque présent dans l'organite cible. Alors, certaines cellules filles auraient leur apicoplaste complètement formé alors que d'autres seraient en formation dans le même globule rouge. De plus, nous savons que l'apicoplaste possède le PI3P chez *Plasmodium* en majorité. Ainsi, Mal13P1.188 pourrait lier ce PIP *in vivo* et ainsi permettre le transport vers l'organite<sup>49</sup>.

L'apicoplaste est un organite qui a son origine d'une symbiose avec une cyanobactérie, un peu comme les mitochondries dérivent d'une bactérie, et ils possèdent tous les deux leur propre génome. Toutefois,

il a été démontré que les protéines retrouvées dans cet organite provenaient en très grande majorité du noyau de *Plasmodium*. Il y a donc un transport de protéines vers l'apicoplaste lors de leur biogénèse<sup>41</sup>. De plus, il a été démontré dans d'autres travaux que cet organite possédait aussi des PIP, plus particulièrement, il y aurait une majorité de PI3P comme chez les endosomes. Une augmentation de ce PIP lors de la fin du développement du cycle érythrocytaire a aussi été observée chez les parasites<sup>49</sup>. Ceci serait dû à la formation des différents apicoplastes des cellules filles produites en stage schizont. De plus, une étude récente a démontré que certaines protéines destinées à l'apicoplaste semblaient passer par l'appareil de Golgi contrairement à la majorité qui passe du RE à l'apicoplaste directement<sup>33</sup>. Ainsi, il est raisonnable de proposer que Mal13P1.188 joue un rôle dans le recrutement à la membrane du Golgi des protéines destinées à l'apicoplaste. La capacité de son domaine PH à lier le PI3P et d'autre PIP supporte cette hypothèse. Nous discuterons de la spécificité élargie du domaine PH plus loin et de ce que cela peut signifier.

Finalement, il nous faudra identifier les protéines recrutées par Mal13P1.188 afin d'identifier les protéines qui sont transporté par ce cargo. Ainsi, en identifiant les partenaires d'interaction, nous aurions une meilleure idée du rôle que pourrait jouer Mal13P1.188 et de l'identité de l'organite ciblé. De plus, même si nous venons à la conclusion que Mal13P1.188 n'est pas impliqué dans la formation du complexe apical, mais plutôt dans celle de l'apicoplaste, cette protéine pourrait être une cible intéressante puisque cet organite est aussi essentiel à la survie du parasite. Afin de tester cette hypothèse, nous devons générer une lignée de parasite ayant Mal13P1.188 muté ou encore fusionné à un système d'expression conditionnel. Nous discuterons plus en détail de ces approches dans les perspectives de ce projet.

### **5.3 Spécificité élargie du domaine PH de Mal13P1.188**

Les résultats obtenus lors des tests de liaison du domaine PH au PIP ont démontré que le domaine de Mal13P1.188 avait une spécificité élargie envers les différentes formes de PIP. Toutefois, nous nous attendions à une spécificité qui aurait permis d'appuyer les résultats de localisation. Par exemple, si nous avons identifié le PI(4,5)P<sub>2</sub> comme étant la cible principale du domaine de Mal13P1.188, on aurait dû observer notre protéine à la membrane plasmique. Par contre, même si l'emplacement des PIP est connu chez la levure, nous ne savons pas si ses localisations sont semblables chez *Plasmodium*. Ainsi, les résultats obtenus démontrent une spécificité qui est élargie envers les différentes formes de PIP, ce qui a été rapporté pour plusieurs protéines ayant un domaine PH<sup>42</sup>. Toutefois, nous pensons que Mal13P1.188 nécessite des partenaires d'interaction afin de lier spécifiquement une forme de PIP.

La forme mutée du domaine nous a permis d'identifier les liaisons non spécifiques. Nous avons donc pu éliminer le PI5P et le PI(4,5)P<sub>2</sub> des liaisons possibles chez Mal13P1.188. Ces résultats font du sens puisque le PI5P semble être majoritairement retrouvé au noyau et le PI(4,5)P<sub>2</sub>, est retrouvé principalement à la membrane plasmique chez la majorité des types de cellules ce qui n'est pas le cas de notre protéine. Ainsi, ces résultats semblent concorder avec la localisation de notre protéine et son rôle potentiel de recrutement à la membrane du Golgi.

Il est raisonnable de proposer que la spécificité de Mal13P1.188 peut se modifier lorsqu'elle se lie à une protéine. Ceci permettrait de cibler la protéine vers le bon PIP afin qu'elle puisse être transportée vers l'organite où elle est destinée. Toutefois, nous n'avons localisé Mal13P1.188 qu'au Golgi et à l'apicoplaste. Nous pensons que la spécificité de notre protéine envers les différentes formes de PIP peut changer selon ses partenaires d'interaction. Ainsi, ceci permettrait à Mal13P1.188 de lier le bon PIP selon la protéine liée afin qu'elle soit dirigée vers le bon organite. Puisque nous voyons en immunofluorescence notre protéine à l'apicoplaste, nous pensons que Mal13P1.188 aurait une spécificité pour le PI3P dû à ses partenaires d'interaction, qui n'ont pas été identifiés jusqu'à maintenant. De plus, nous avons tenté de vérifier si la protéine totale avait la même spécificité que le domaine PH sur PIP-strip. Nous avons tenté de déposer des extraits protéiques provenant de notre lignée Mal13P1.188-GFP-HA et ainsi détecter notre protéine grâce à des anticorps reconnaissant la portion HA directement sur la membrane couverte de phospholipides. Toutefois, le bruit de fond étant trop fort, nous n'avons pas été en mesure d'identifier les PIP liés par la protéine complète.

## 6. Perspectives

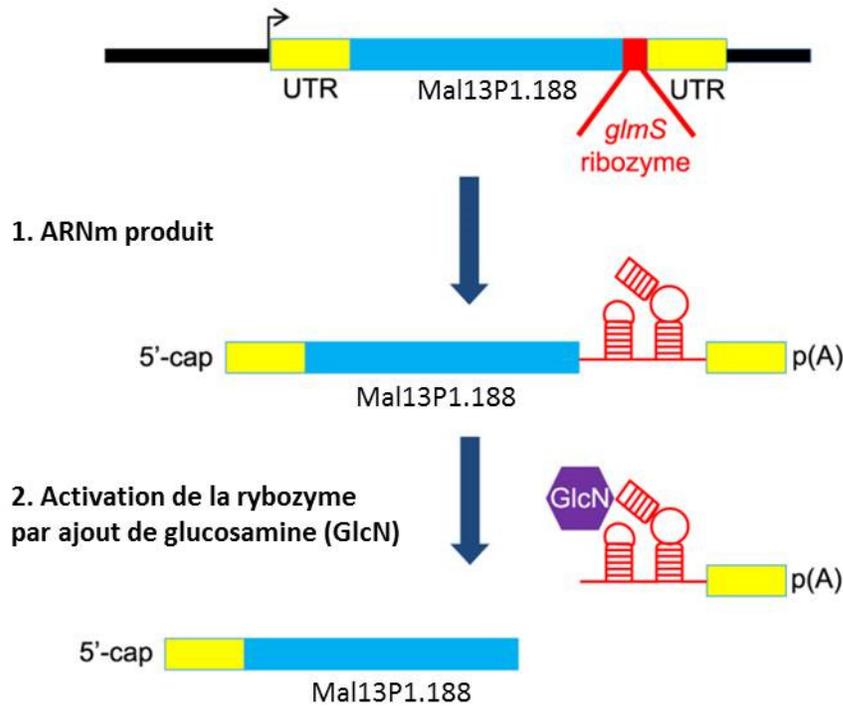
Plusieurs expériences ont été faites afin de caractériser Mal13P1.188 chez *Plasmodium falciparum* et plusieurs des résultats obtenus suggèrent un rôle dans le transport vésiculaire différentiel vers l'apicoplaste. D'autres tests doivent être effectués afin de pouvoir valider nos hypothèses. De nouvelles expériences ont été entreprises afin de compléter la caractérisation de Mal13P1.188 chez *Plasmodium falciparum*.

### 6.1 Rôle essentiel de Mal13P1.188 chez *Plasmodium falciparum*

L'objectif central de la recherche sur le parasite de la malaria est de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, il est nécessaire de vérifier si Mal13P1.188 est essentiel à la survie du parasite. Pour ce faire, nous ajouterons une cassette d'expression conditionnelle au gène afin de simuler l'absence de la protéine chez le parasite. Nous pourrions ensuite observer le phénotype d'une inactivation génique sur la suivie du parasite et déterminer si Mal13P1.188 est essentiel. Deux différentes stratégies s'offrent à nous : soit nous dégradons la protéine à l'aide de domaine déstabilisant, soit nous stoppons en amont la traduction de la protéine en dégradant l'ARNm. Pour la première stratégie, nous pouvons utiliser des domaines déstabilisants comme l'ecDHFR (E. coli dihydrofolate reductase) pouvant être activé afin de dégrader la protéine. Après plusieurs essais au laboratoire, nous sommes venus à la conclusion que ce système n'était pas suffisamment efficace. Nous nous sommes tournés vers la deuxième stratégie en intégrant une Riboswitch afin de dégrader l'ARNm de notre protéine d'intérêt. Ce système semble être plus fiable. Il n'y a pas de protéine ayant résisté à la dégradation par les protéases de l'organisme. Un autre système différent de l'expression conditionnel, mais pouvant aussi déterminer si le gène est essentiel est le « Knock-Sideway ». Ceci demande de marquer notre protéine d'intérêt avec une FKBP (FK binding protein) et une protéine dans un organite étranger de notre protéine, comme le noyau par exemple, avec un FRB (FKBP-rapamycin binding). Ces deux domaines que nous ajoutons vont former un dimère lorsque nous ajoutons de la rapamycine dans le milieu de culture, déplaçant ainsi notre protéine d'intérêt de son organite habituel permettant de vérifier si sa relocalisation est létale. Toutefois, nous allons voir plus en détail la stratégie utilisant la Riboswitch glmS permettant de déterminer si Mal13P1.188 est essentiel au parasite.

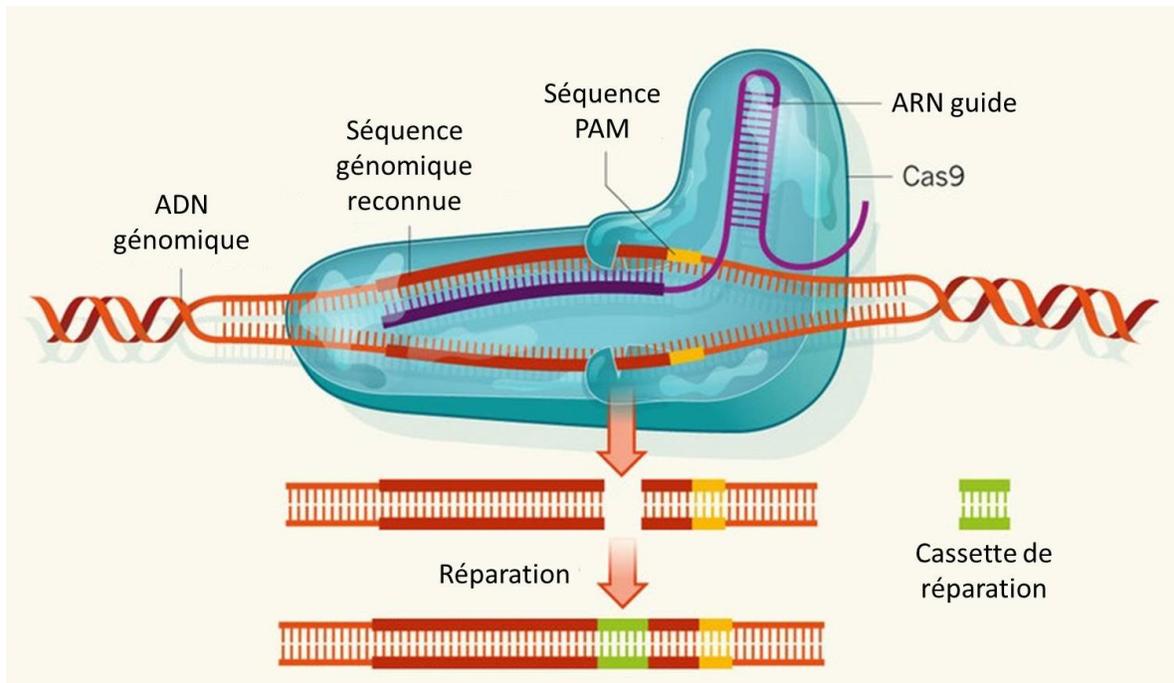
Il nous faut générer une lignée de parasite ayant le gène de Mal13P1.188 fusionné à la cassette 3HA-glmS. Le glmS est un ribozyme autocatalytique (aussi nommé Riboswitch) qui va se retrouver sur l'ARNm de notre protéine. Il s'agit d'une région non codante qui sera activée lors de l'ajout de

glucosamine. Ainsi, l'activation du ribozyme va permettre son action catalytique causant la coupure de l'ARN dont il fait partie, causant ainsi sa dégradation et empêchant le gène d'être traduit<sup>80</sup>. Ceci permet alors de stopper l'expression de notre protéine d'intérêt et regarder l'effet sur nos cultures<sup>81</sup>. Nous sommes en train de générer cette lignée de parasite, qui nous permettra de déterminer si l'absence de Mal13P1.188 est fatale pour le parasite.



**Figure 14.** Système d'expression conditionnel utilisant la ribozyme *glmS*.<sup>81</sup>

Plutôt que de faire comme pour le plasmide pGDB, nous avons utilisé un nouveau système d'intégration plus fiable et rapide, CRISPR/Cas9. Pour ce faire, nous avons amplifié une courte séquence ARN guide permettant à la Cas9 (CRISPR-associated protein) de reconnaître et couper une région précise dans le gène comme nous pouvons voir à la figure 15. Par exemple, puisque nous voulons intégrer une cassette en 3' du gène, nous amplifions la région à proximité du codon-stop afin qu'elle soit ensuite remplacée par notre cassette. Cette coupure va être réparée à l'aide d'un plasmide possédant des régions homologues autour de la coupure, permettant au parasite de remplacer la séquence endommagée par une double recombinaison homologue. Le parasite va alors intégrer entre la fin du gène et son codon-stop notre cassette HA-*glmS* et un gène de résistance à un marqueur de sélection. Lorsque notre lignée *Mal13P1.188-3HA-glmS* sera générée, nous pourrons commencer à tester l'effet de l'absence de notre protéine sur la survie du parasite<sup>82</sup>.



**Figure 15.** Système d'intégration utilisant le système CRISPR/Cas9.<sup>82</sup>

Ainsi, si l'absence de Mal13P1.188 cause la perte des parasites, nous devons vérifier à quelle étape du développement le parasite semble être stoppé. Puisque la protéine semble avoir un rôle dans le transport différentiel lors de la génération des cellules filles, nous nous attendons à voir apparaître des mérozoïtes non fonctionnels dans nos cultures si Mal13P1.188 est essentiel. Toutefois, si l'absence de notre protéine n'a pas d'effet sur la survie du parasite, nous devons vérifier s'il y a une accélération ou un ralentissement du développement des parasites. De plus, une inactivation complète du gène pourra être faite afin de confirmer si Mal13P1.188 n'est pas essentiel.

Plusieurs observations laissent à croire que Mal13P1.188 est important dans le transport protéique chez le parasite *Plasmodium falciparum*. Toutefois, nous avons vu précédemment que *Plasmodium* exprimait plusieurs protéines ayant des fonctions redondantes comme c'est le cas d'EBA-175 et de PfRH1. Pour cette raison, nous devons vérifier si l'absence de Mal13P1.188 a un effet sur la survie du parasite, car il peut exister d'autres protéines qui jouent la même fonction dans le transport protéique.

## 6.2 Identification des partenaires d'interaction

Nous revenons encore sur le fait que nous avons élaboré plusieurs théories suite aux résultats de caractérisation récoltés jusqu'à présent. Comme il a été mentionné plusieurs fois déjà, il nous faut

identifier les différents partenaires d'interaction de notre protéine afin de pouvoir éclaircir nos soupçons à propos du rôle de Mal13P1.188. Il existe plusieurs stratégies pouvant identifier les protéines interagissant avec Mal13P1.188 et nous allons voir ce qui a été envisagé chez *Plasmodium*.

Il existe une autre méthode différente du DSP afin d'identifier les protéines interagissant directement avec notre protéine et celles retrouvées dans son environnement proche. Il s'agit du BioID qui a été testé chez *Toxoplasma* et que nous tentons de développer chez *Plasmodium*<sup>83</sup>. Cette méthode nécessite de fusionner notre protéine à la biotine ligase BirA, une protéine pouvant ajouter des biotines aux protéines avoisinantes lorsque de la D-biotine est ajoutée au milieu de culture. Il est ensuite possible de recueillir les échantillons provenant des parasites et de purifier les protéines possédant une biotine à l'aide de billes couvertes de streptavidine, capable de lier la biotine. Ainsi, cette méthode nous permettrait d'identifier par spectrométrie de masse des protéines d'interaction et des protéines retrouvées dans le même organe que Mal13P1.188. Il serait alors possible de confirmer sa localisation grâce à cette méthode et d'identifier de potentiels partenaires d'interaction.

### **6.3 Spécificité du domaine PH**

Nous avons mentionné plus haut que la conformation de la protéine totale pourrait avoir un effet sur la spécificité du domaine PH. Pour ce faire, il nous faudrait produire notre protéine de façon synthétique puisque la production de façon recombinante chez les bactéries serait impossible dû au fait que les codons AT riches se font beaucoup plus rare chez les cellules procaryotes. Nous avons alors discuté différentes approches pouvant investiguer davantage la liaison du domaine PH et de la protéine complète envers les différentes formes de PIP.

D'autres méthodes différentes des PIP-strips peuvent être envisagées afin de tester la capacité de liaison du domaine PH. Par exemple, l'utilisation de PIP sous forme de liposomes permettrait de mimer une interaction avec une membrane cellulaire. En effet, lorsque le domaine doit interagir avec une membrane, il est possible que ces sites de liaison réagissent différemment lorsqu'il y a d'autres lipides membranaires présents, pouvant conférer une spécificité différente que nous n'arrivons pas à voir avec le PIP-strip. Ainsi, nous pourrions produire les liposomes avec différentes formes de PIP et effectuer des essais de liaison avec notre protéine. Nous pourrions ensuite purifier les liposomes afin de vérifier le nombre de domaines PH lié selon la forme de PIP utilisé. Une autre méthode utilise des billes d'agarose couplé à des PIP. Cette technique ressemble un peu aux liposomes, toutefois sans imiter la membrane lipidique.

Ensuite, nous voulons tester la liaison de la protéine complète avec les PIP. Puisque nous avons été incapables d'obtenir un résultat clair en utilisant un extrait protéique complet provenant de parasite Mal13P1.188-GFP-HA, la solution la plus plausible est de la faire synthétiser *in vitro*. En effet, utiliser des bactéries comme pour le domaine PH n'est pas une bonne option, car le génome de *Plasmodium* étant très riche en séquence AT et ceci cause des problèmes lorsqu'introduit dans des cultures bactériennes. Ainsi, puisque les codons AT riches sont rares chez *E. coli*, notre protéine est très souvent retrouvée dans les corps d'inclusion et ainsi elle est impossible à récolter et purifier. Nous pouvons nous tourner vers les systèmes d'expression protéique eucaryotes comme les cellules d'insecte ou de plantes. Puisque ces cellules possèdent des mécanismes de synthèse protéique semblables aux autres cellules eucaryotes, nous avons plus de chance de produire une protéine de *Plasmodium* complète. Nous pouvons aussi nous tourner vers une méthode *in vitro* afin de produire notre protéine de façon synthétique. Ainsi, nous pourrions tester sa capacité de liaison et vérifier si les acides aminés retrouvés autour du domaine et la conformation de la protéine jouent sur sa spécificité.

## 7. Conclusion

En résumé, nous avons caractérisé une protéine effectrice de phosphoinositides, Mal13P1.188, pouvant avoir un rôle potentiel dans le transport vésiculaire différentiel lors de la génération des nouveaux mérozoïtes durant le stade final du cycle érythrocytaire. Nous avons démontré que cette protéine était exprimée uniquement lors du stade schizont et qu'elle semblait être localisée au Golgi, ce qui appuyait l'hypothèse concernant la sélection des protéines lors du triage des vésicules de transport. Contrairement à nos attentes, Mal13P1.188 ne semble pas être impliqué dans le transport des protéines destinées au complexe apical, mais semble plutôt avoir un rôle dans le transport vers l'apicoplaste du parasite *P. falciparum*. Plusieurs expériences doivent être complétées afin de confirmer nos hypothèses concernant la biogenèse de l'apicoplaste. Parmi ces différents travaux, il va de soi que l'identification des partenaires d'interaction et du caractère essentiel de Mal13P1.188 pour la survie du parasite est très important. En effet, ces résultats pourront appuyer les résultats de colocalisation et permettront déterminer si Mal13P1.188 pourrait être une cible thérapeutique intéressante.

Finalement, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est loin d'être terminée. Il est important de connaître les mécanismes essentiels du parasite afin de les cibler et ainsi diminuer les chances d'effets secondaires chez l'hôte. Notre équipe de recherche s'est concentrée sur le transport vésiculaire protéique lors de la génération des nouveaux mérozoïtes, mais d'autres travaux sont en cours dans le monde ciblant différents mécanismes de survie du parasite *Plasmodium*. Avec tous ces efforts visant à éliminer la malaria pour de bon, nous serons sans doute capables d'aider les pays en voies de développement atteints par le parasite dans les prochaines décennies.

## Bibliographie

1. World Health Organization. World Malaria Report. 2015.
2. Longley RJ, Hill AVS, Spencer AJ. Malaria vaccines: Identifying Plasmodium falciparum liver-stage targets. *Front Microbiol.* 2015;1-8. doi:10.3389/fmicb.2015.00965.
3. Sahu PK, Satpathi S, Behera PK, Mishra SK, Mohanty S, Wassmer SC. Pathogenesis of cerebral malaria: new diagnostic tools, biomarkers, and therapeutic approaches. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;1-13. doi:10.3389/fcimb.2015.00075.
4. Watermeyer JM, Hale VL, Hackett F, et al. A spiral scaffold underlies cytoadherent knobs in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Blood.* 2015. doi:10.1182/blood-2015-10-674002.
5. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002;415(6872):673-679. doi:10.1038/415673a.
6. Buffet P a, Safeukui I, Deplaine G, et al. The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans : insights from splenic physiology Review article The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans : insights from splenic physiology. *Blood.* 2013;117(2):381-392. doi:10.1182/blood-2010-04-202911.
7. Jiang L, Mu J, Zhang Q, Ni T, Srinivasan P. PfSETvs methylation of histone H3K36 represses virulence genes in Plasmodium falciparum. 2014;499(7457):223-227. doi:10.1038/nature12361.PfSETvs.
8. Flick K, Chen Q. var genes, PfEMP1 and the human host. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;134(1):3-9. doi:10.1016/j.molbiopara.2003.09.010.
9. Counihan N a., Kalanon M, Coppel RL, De Koning-Ward TF. Plasmodium rhoptry proteins: Why order is important. *Trends Parasitol.* 2013;29(5):228-236. doi:10.1016/j.pt.2013.03.003.
10. Cdc CFDC and P. Malaria biology. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. Published 2016.
11. Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, et al. Mosquito Feeding Assays to Determine the Infectiousness of Naturally Infected Plasmodium falciparum Gametocyte Carriers. *PLoS One.* 2012;7(8):e42821. doi:10.1371/journal.pone.0042821.
12. Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of amazon anopheles vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(1):1-25. doi:10.1590/0074-02760140266.
13. Soulard V, Bosson-Vanga H, Lorthiois A, et al. Plasmodium falciparum full life cycle and Plasmodium ovale liver stages in humanized mice. *Nat Commun.* 2015:7690. doi:10.1038/ncomms8690.
14. Offeddu V, Thathy V, Marsh K, Matuschewski K. Naturally acquired immune responses against Plasmodium falciparum sporozoites and liver infection. *Int J Parasitol.* 2012;42(6):535-548. doi:10.1016/j.ijpara.2012.03.011.
15. Clark M a, Goheen MM, Spidale N a, Kasthuri RS, Fulford A, Cerami C. RBC Barcoding Allows for the Study of Erythrocyte Population Dynamics and P. falciparum Merozoite Invasion. *PLoS One.* 2014;9(7):e101041. doi:10.1371/journal.pone.0101041.
16. Boyle MJ, Wilson DW, Beeson JG. New approaches to studying Plasmodium falciparum merozoite invasion and insights into invasion biology. *Int J Parasitol.* 2013;43(1):1-10. doi:10.1016/j.ijpara.2012.11.002.
17. Weiss GE, Gilson PR, Taechalertpaisarn T, et al. Revealing the Sequence and Resulting

- Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *PLoS Pathog.* 2015;11(2):1-25. doi:10.1371/journal.ppat.1004670.
18. Chitnis CE. Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. *Curr Opin Hematol.* 2001;8(2):85-91. doi:10.1097/00062752-200103000-00005.
  19. Gao X, Gunalan K, Yap SSL, Preiser PR. Triggers of key calcium signals during erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nat Commun.* 2013;4:2862. doi:10.1038/ncomms3862.
  20. Persson KEM, McCallum FJ, Reiling L, et al. Variation in use of erythrocyte invasion pathways by Plasmodium falciparum mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J Clin Invest.* 2008;118(1):342-351. doi:10.1172/JCI32138.
  21. Baum J, Chen L, Healer J, et al. Reticulocyte-binding protein homologue 5 - An essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by Plasmodium falciparum. *Int J Parasitol.* 2009;39(3):371-380. doi:10.1016/j.ijpara.2008.10.006.
  22. Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, et al. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.* 2011;7(2). doi:10.1371/journal.ppat.1001276.
  23. Zuccala ES, Gout AM, Dekiwadia C, et al. Subcompartmentalisation of Proteins in the Rhoptries Correlates with Ordered Events of Erythrocyte Invasion by the Blood Stage Malaria Parasite. *PLoS One.* 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0046160.
  24. Kats LM, Black CG, Proellocks NI, Coppel RL. Plasmodium rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol.* 2006;22(6):269-276. doi:10.1016/j.pt.2006.04.001.
  25. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 2006;124(4):755-766. doi:10.1016/j.cell.2006.02.006.
  26. Carruthers VB, Tomley FM. Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell Biochem.* 2008;47:33-45. doi:10.1007/978-0-387-78267-6\_2.
  27. Singh S, More KR, Chitnis CE. Role of calcineurin and actin dynamics in regulated secretion of microneme proteins in Plasmodium falciparum merozoites during erythrocyte invasion. *Cell Microbiol.* 2014;16(1):50-63. doi:10.1111/cmi.12177.
  28. Besteiro S, Dubremetz JF, Lebrun M. The moving junction of apicomplexan parasites: A key structure for invasion. *Cell Microbiol.* 2011;13(6):797-805. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x.
  29. Mercier C, Adjogble KDZ, D'ubener W, Delauw MFC. Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol.* 2005;35(8):829-849. doi:10.1016/j.ijpara.2005.03.011.
  30. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, et al. Review article The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans : insights from splenic physiology stages of the parasite that develop inside. 2011;117(2):1-3. doi:10.1182/blood-2010-04-202911.
  31. Florens L, Washburn MP, Raine JD, et al. A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. *Nature.* 2002;419(6906):520-526.
  32. Deponte M, Hoppe HC, Lee MCS, et al. Wherever i may roam: Protein and membrane trafficking in P. falciparum-infected red blood cells. *Mol Biochem Parasitol.* 2012;186(2):95-116. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.09.007.
  33. Heiny SR, Pautz S, Recker M, Przyborski JM. Protein traffic to the plasmodium falciparum apicoplast: Evidence for a sorting branch point at the Golgi. *Traffic.* 2014;15(12):1290-1304. doi:10.1111/tra.12226.
  34. Jahn R, Scheller RH. SNAREs — engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):631-643. doi:10.1038/nrm2002.
  35. Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(32):11821-11827. doi:10.1073/pnas.0601617103.
  36. Alex H. Hutagalung and Peter J. Novick. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Manuscript, Author Physiol Cell.* 2013;91(1):119-149.

- doi:10.1152/physrev.00059.2009.Role.
37. Angelica MD, Fong Y. Plasmodium falciparum secretory pathway: Characterization of PfStx1, a plasma membrane Qa-SNARE. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;141(4):520-529. doi:10.1016/j.surg.2006.10.010.Use.
  38. Krai P, Dalal S, Klemba M. Evidence for a Golgi-to-Endosome Protein Sorting Pathway in Plasmodium falciparum. *PLoS One.* 2014;9(2):e89771. doi:10.1371/journal.pone.0089771.
  39. Richard D, Kats LM, Langer C, et al. Identification of rhoptry trafficking determinants and evidence for a novel sorting mechanism in the malaria parasite plasmodium falciparum. *PLoS Pathog.* 2009;5(3):e1000328. doi:10.1371/journal.ppat.1000328.
  40. Foth B, McFadden G. The apicoplast: A plastid in Plasmodium falciparum and other apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol.* 2003;224. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769605240032>.
  41. Seliverstov A V, Zverkov O a, Istomina SN, Pirogov S a, Kitsis PS. Comparative Analysis of Apicoplast-Targeted Protein Extension Lengths in Apicomplexan Parasites. *Biomed Res Int.* 2015;2015:452958. doi:10.1155/2015/452958.
  42. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* 2006;443(7112):651-657. doi:10.1038/nature05185.
  43. Vaid A, Ranjan R, Smythe WA, Hoppe HC, Sharma P. PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from Plasmodium falciparum, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. *Blood.* 2010;115(12):2500-2507. doi:10.1182/blood-2009-08-238972.
  44. Balla T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1019-1137. doi:10.1152/physrev.00028.2012.
  45. Kuteladze TG. Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol.* 2013;18(9):1199-1216. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.
  46. Brown JR, Auger KR. Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. *BMC Evol Biol.* 2011;11(1):4. doi:10.1186/1471-2148-11-4.
  47. Majerus PW, York JD. Phosphoinositide phosphatases and disease. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S249-54. doi:10.1194/jlr.R800072-JLR200.
  48. Gillooly DJ, Simonsen a, Stenmark H. Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem J.* 2001;355(Pt 2):249-258. doi:10.1042/0264-6021:3550249.
  49. Tawk L, Chicanne G, Dubremetz J-F, et al. Phosphatidylinositol 3-phosphate, an essential lipid in Plasmodium, localizes to the food vacuole membrane and the apicoplast. *Eukaryot Cell.* 2010;9(10):1519-1530. doi:10.1128/EC.00124-10.
  50. Dewitt S, Tian W, Hallett MB. Localised PtdIns(3,4,5)P3 or PtdIns(3,4)P2 at the phagocytic cup is required for both phagosome closure and Ca<sup>2+</sup> signalling in HL60 neutrophils. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 3):443-451. doi:10.1242/jcs.02756.
  51. Viaud J, Boal F, Tronchere H, Gaits-Iacovoni F, Payrastre B. Phosphatidylinositol 5-phosphate: A nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *BioEssays.* 2014;36(3):260-272. doi:10.1002/bies.201300132.
  52. Bua DJ, Martin GM, Binda O, Gozani O. Nuclear phosphatidylinositol-5-phosphate regulates ING2 stability at discrete chromatin targets in response to DNA damage. *Sci Rep.* 2013;3:2137. doi:10.1038/srep02137.
  53. Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J.* 2000;350 Pt 1:1-18. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1221219&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
  54. Lenoir M, Kufareva I, Abagyan R, Overduin M. Membrane and Protein Interactions of the Pleckstrin Homology Domain Superfamily. *Membranes (Basel).* 2015;5(4):646-663.

- doi:10.3390/membranes5040646.
55. Ellson CD, Andrews S, Stephens LR, Hawkins PT. The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 6):1099-1105. <http://jcs.biologists.org/content/115/6/1099.abstract>.
  56. Mas C, Norwood SJ, Bugarcic A, et al. Structural basis for different phosphoinositide specificities of the PX domains of sorting nexins regulating G-protein signaling. *J Biol Chem.* 2014;289(41):28554-28568. doi:10.1074/jbc.M114.595959.
  57. Daher W, Morlon-Guyot J, Sheiner L, et al. Lipid kinases are essential for apicoplast homeostasis in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2015;17(4):559-578. doi:10.1111/cmi.12383.
  58. McIntosh MT, Vaid A, Hosgood HD, et al. Traffic to the malaria parasite food vacuole: A novel pathway involving a phosphatidylinositol 3-phosphate-binding protein. *J Biol Chem.* 2007;282(15):11499-11508. doi:10.1074/jbc.M610974200.
  59. Liu Y, Boukhelifa M, Tribble E, et al. The Sac1 Phosphoinositide Phosphatase Regulates Golgi Membrane Morphology and Mitotic Spindle Organization in Mammals. *Mol Biol Cell.* 2008;3080-3096. doi:10.1091/mbc.E07.
  60. Cai Y, Deng Y, Horenkamp F, Reinisch KM, Burd CG. Sac1-Vps74 structure reveals a mechanism to terminate phosphoinositide signaling in the Golgi apparatus. *J Cell Biol.* 2014;206(4):485-491. doi:10.1083/jcb.201404041.
  61. Mani M, Lee SY, Lucast L, et al. The Dual Phosphatase Activity of Synaptojanin1 Is Required for Both Efficient Synaptic Vesicle Endocytosis and Reavailability at Nerve Terminals. *Neuron.* 2007;56(6):1004-1018. doi:10.1016/j.neuron.2007.10.032.
  62. George AA, Hayden S, Holzhausen LC, Ma EY, Suzuki SC, Brockerhoff SE. Synaptojanin 1 is required for endolysosomal trafficking of synaptic proteins in cone photoreceptor inner segments. *PLoS One.* 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0084394.
  63. Kadamur G, Ross EM. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:127-154. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183750.
  64. Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: What are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* 2011;27(2):91-98. doi:10.1016/j.pt.2010.08.004.
  65. Wichmann O, Muehlen M, Gruss H, Mockenhaupt FP, Suttorp N, Jelinek T. Malarone treatment failure not associated with previously described mutations in the cytochrome b gene. *Malar J.* 2004;3(1):14. doi:10.1186/1475-2875-3-14.
  66. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J.* 2011;10(1):144. doi:10.1186/1475-2875-10-144.
  67. Lamb R, Ozsvari B, Lisanti C. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: Treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget.* 2015;6(7):4569-4584. doi:10.18632/oncotarget.3174.
  68. Dahl EL, Shock JL, Shenai BR, Gut J, DeRisi JL, Rosenthal PJ. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):3124-3131. doi:10.1128/AAC.00394-06.
  69. Martin RE, Marchetti R V, Cowan AI, Howitt SM, Bröer S, Kirk K. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science.* 2009;325(5948):1680-1682. doi:10.1126/science.1175667.
  70. Fa J, Am C. Drugs for preventing malaria in travellers. *TheCochrane Libr.* 2010;(4). doi:DOI: 10.1002/14651858.CD006491.
  71. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Drug Ther (NY).* 2009;361(5):455-467. doi:10.1086/657120.
  72. Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, et al. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2015. doi:10.1038/nature14412.
  73. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The March Toward Malaria Vaccines. *Am*

- J Prev Med.* 2015;49(6):S319-S333. doi:10.1016/j.amepre.2015.09.011.
74. Morrison C. Landmark green light for Mosquirix malaria vaccine. *Nat Biotechnol.* 2015;33(10):1015-1016. doi:10.1038/nbt1015-1015.
  75. Greenwood BM. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet.* 2015;386(9988):31-45. doi:10.1016/S0140-6736(15)60721-8.
  76. Arakawa T, Tachibana M, Miyata T, et al. Malaria ookinete surface protein-based vaccination via the intranasal route completely blocks parasite transmission in both passive and active vaccination regimens in a rodent model of malaria infection. *Infect Immun.* 2009;77(12):5496-5500. doi:10.1128/IAI.00640-09.
  77. Carter R. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine.* 2001;19(17-19):2309-2314. doi:10.1016/S0264-410X(00)00521-1.
  78. I-TASSER website. <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>.
  79. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010;5(4):725-738. doi:10.1038/nprot.2010.5.
  80. Collins JA, Irnov I, Baker S, Winkler WC. Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme. *Genes Dev.* 2007;3356-3368. doi:10.1101/gad.1605307.2.
  81. Prommana P, Uthaipibull C, Wongsombat C, et al. Inducible Knockdown of Plasmodium Gene Expression Using the glmS Ribozyme. *PLoS One.* 2013;8(8):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0073783.
  82. Charpentier E, Doudna J a. Rewriting a genome. *Nature.* 2013;495:50-51. doi:10.1038/495050a.
  83. Chen AL, Kim EW, Toh JY, et al. Novel components of the toxoplasma inner membrane complex revealed by BioID. *MBio.* 2015;6(1):1-12. doi:10.1128/mBio.02357-14.