



**Une protéine à domaine PHOX de liaison aux  
phosphoinositides impliquée dans le transport de  
l'hémoglobine chez le parasite de la malaria  
*Plasmodium falciparum*.**

**Mémoire**

**Marie-Ève Crochetière**

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

Québec, Canada

© Marie-Ève Crochetière, 2019

**Une protéine à domaine PHOX de liaison aux  
phosphoinositides impliquée dans le transport de  
l'hémoglobine chez le parasite de la malaria  
*Plasmodium falciparum*.**

**Mémoire**

**Marie-Ève Crochetière**

Sous la direction de :

Dave Richard, directeur de recherche

## Résumé

La malaria est un des fléaux les plus dévastateurs dans les pays en voie de développement. L'absence d'un vaccin et la résistance aux agents antimalariaux disponibles démontrent le besoin urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Les phosphoinositides (PIP) sont des composants essentiels des membranes cellulaires chez les eucaryotes jouant un rôle important dans la signalisation intracellulaire, la synthèse d'ADN et le trafic protéique, par exemple. Malgré leur importance chez les eucaryotes, on en connaît peu sur leurs fonctions chez le parasite de la malaria *Plasmodium falciparum*. Dans notre laboratoire, nous avons réalisé un criblage par inactivation génique de 36 effecteurs potentiels de la voie métabolique PIP pour identifier les gènes qui sont essentiels à la prolifération chez *P. falciparum*. Notre étude a montré que 72% des gènes potentiellement impliqués dans la voie métabolique des PIP ne pouvaient être inactivés et sont donc potentiellement essentiels pour la survie du parasite. L'analyse d'une souche *knock-out* pour la protéine PfPX, ayant un domaine de liaison aux PIP de type Phox, a démontré un ralentissement sévère de la croissance du parasite. La caractérisation de la protéine PfPX a révélé qu'elle se localisait à la membrane de la vacuole digestive, le site où le parasite digère l'hémoglobine (Hb) de l'hôte afin de subvenir à ses besoins en acides aminés. Nous avons montré que les parasites dépourvus de la protéine Phox accumulaient plus d'Hb et que celle-ci était piégée dans des vésicules à proximité de la vacuole digestive, suggérant un rôle pour cette protéine dans la fusion des vésicules d'Hb avec la membrane de la vacuole digestive. Globalement, nos résultats ont révélé que les PIP ont un rôle important dans le transport de l'Hb chez *P. falciparum*.

## **Abstract**

Malaria is one of the most devastating curses in developing countries. The absence of a vaccine and resistance to available antimalarial agents demonstrate the urgent need to identify new therapeutic targets. Phosphoinositides (PIPs) are essential components of cell membranes in eukaryotes, playing an important role in intracellular signaling, DNA synthesis and protein trafficking, for example. Despite their importance in eukaryotes, little is known about their functions in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In our laboratory, we screened 36 putative effectors of the PIP pathway by gene inactivation to identify the genes that are essential for proliferation in *P. falciparum*. Our studies showed that 72% of genes possibly involved in the PIP pathway could not be inactivated and are therefore potentially essential for parasite survival. Analysis of a knockout strain for PfPX protein, having a Phox-like PIP binding domain, demonstrated a severe slowdown in parasite growth. Characterization of the PfPX protein revealed that it was localized to the food vacuole membrane, the site where the parasite digests the hemoglobin (Hb) of the host in order to meet his needs in amino acids, and in vesicular type structures. We have shown that parasites lacking the Phox protein accumulate more Hb and that it is trapped in vesicles near the digestive vacuole, suggesting a role for this protein in the fusion of Hb vesicles with the membrane of the digestive vacuole. Overall, our results revealed that PIPs play an important role in the transport of *P. falciparum* Hb.

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1. Le parasite de la malaria <i>Plasmodium falciparum</i> .....	1
1.1.1. Informations générales.....	1
1.1.2. Le cycle de vie du parasite.....	3
1.1.2.1. Stade sporogénique ( <i>Anophèle</i> ).....	3
1.1.2.2. Stade hépatique.....	5
1.1.2.3. Stade érythrocytaire.....	6
1.1.3. Prévention et traitements.....	8
1.1.3.1. La prévention.....	8
1.1.3.2. Les traitements.....	10
1.1.3.2.1. Quinine.....	11
1.1.3.2.2. Chloroquine.....	11
1.1.3.2.3. Traitements combinés à l'artémisinine.....	11
1.1.3.3. La résistance aux antimalariaux.....	12
1.1.3.4. La vaccination.....	13
1.2. Endocytose et dégradation de l'hémoglobine.....	14
1.2.1. L'endocytose et le transport de l'hémoglobine.....	14
1.2.2. La digestion de l'hémoglobine par la vacuole digestive.....	17
1.3. Phosphoinositides.....	18
1.3.1. Les phosphoinositides chez les eucaryotes.....	20
1.3.1.1. Rôles des différents phosphoinositides.....	20
1.3.1.1.1. PI3P.....	20
1.3.1.1.2. PI4P.....	20
1.3.1.1.3. PI5P.....	21
1.3.1.1.4. PI(3,5)P <sub>2</sub> .....	21
1.3.1.1.5. PI(4,5)P <sub>2</sub> .....	21

1.3.1.1.6. PI(3,4)P2 et PI(3,4,5)P3.....	21
1.3.1.2. <i>Les domaines de liaison aux phosphoinositides</i> .....	22
1.3.2. Les phosphoinositides chez <i>Plasmodium falciparum</i> .....	23
1.3.2.1. <i>Les protéines effectrices connues chez Plasmodium</i> .....	24
1.3.2.1.1. PI3K (PI3P) .....	24
1.3.2.1.2. PI4K (PI4P) .....	25
1.3.2.1.3. Phospholipase C (PI(4,5)P <sub>2</sub> ) .....	25
1.4. Problématique .....	26
<b>2. Matériels et méthodes</b> .....	29
2.1. Culture cellulaire de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	29
2.2. Synchronisation des parasites.....	29
2.3. Construction des vecteurs pSLI et transfection .....	29
2.4. Intégration du plasmide pSLI au génome du parasite .....	30
2.5. Isolation des parasites.....	31
2.6. Vérification de l'intégration de PfpX par PCR .....	31
2.7. Construction de la souche pLN-PX-GFP .....	32
2.8. Détermination de l'expression de PfpX par microscopie .....	32
2.9. Détermination de l'expression de PfpX par Western Blot.....	32
2.10. Quantification de la dégradation de PfpX.....	33
2.11. Localisation de PfpX par immunofluorescence .....	34
2.12. Décompte des vésicules contenant l'hémoglobine par IFA .....	34
2.13. Cavitation à l'azote .....	35
<b>3. Résultats</b> .....	36
3.1. Génération de lignées PfpX-GFP et PfpX-smHA .....	36
3.2. La protéine PfpX est exprimée tout au long du cycle érythrocytaire.....	37
3.3. Le domaine PX seul est suffisant pour la localisation de la protéine .....	40
3.4. La protéine PfpX pourrait être impliquée dans le trafic de l'hémoglobine .....	41
3.5. PfpX est dégradée dans la vacuole digestive .....	42
3.6. En absence de PfpX, l'hémoglobine tend à s'accumuler dans le parasite .....	44
<b>4. Discussion</b> .....	46
4.1. Rôle possible de PfpX dans le trafic de l'hémoglobine .....	46
4.2. Rôle important des phosphoinositides pour PfpX.....	49
4.3. Perspectives.....	50

4.3.1. Caractérisation plus poussée du rôle de PfPX.....	51
4.3.2. Spécificité du domaine PX.....	52
4.3.3. Identification des partenaires d'interaction. ....	53
<b>Conclusion</b> .....	55
<b>Bibliographie</b> .....	56
<b>Annexes</b> .....	65
Annexe A: Confirmation de l'accumulation de l'hémoglobine par Western blot.....	66
Annexe B: Observation de vésicules géantes contenant de l'hémoglobine .....	67
Annexe C: Analyse de la granularité et du volume de la vacuole digestive .....	68
Annexe D: Contribution dans un article scientifique publié. ....	69

## Liste des figures

**Figure 1** : Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum*.

**Figure 2** : La structure du mérozoïte et le processus d'invasion d'un globule rouge.

**Figure 3** : Le stade érythrocytaire du parasite de la malaria.

**Figure 4** : La malaria autour du monde.

**Figure 5** : Structures moléculaires des composés thérapeutiques utilisés contre la malaria.

**Figure 6** : L'endocytose et le transport de l'hémoglobine via des vésicules.

**Figure 7** : Structures moléculaires des produits de dégradation de l'hémoglobine (Hb).

**Figure 8** : Structures des différents phosphoinositides et leurs transformations.

**Figure 9** : Les phosphoinositides et leurs domaines de liaisons spécifiques.

**Figure 10** : Distribution des phosphoinositides chez *Plasmodium falciparum*.

**Figure 11** : Résultats préliminaires de l'étude des effecteurs des PIP.

**Figure 12** : Génération et confirmation des souches de parasites PfPX étiquetées.

**Figure 13** : Expression intracellulaire de PfPX tout au long du cycle érythrocytaire par microscopie.

**Figure 14** : Expression intracellulaire de PfPX et sa dégradation tout au long du cycle de vie.

**Figure 15** : Expression du domaine PX seul durant le cycle érythrocytaire.

**Figure 16** : Localisation intracellulaire de la protéine PfPX.

**Figure 17** : Dégradation de PfPX observée avec ou sans la vacuole digestive (VD).

**Figure 18** : Dénombrement des vésicules d'hémoglobine (Hb) dans les souches PfPX-KO et dans les souches contrôles pSLI-PfPX-GFP et 3D7.

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Amorces utilisées pour la construction des vecteurs pSLI.

**Tableau 2** : Amorces utilisées pour la confirmation de l'intégration des vecteurs pSLI-PfPX-GFP et pSLI-PfPX-smHA.

**Tableau 3** : Amorces utilisées pour la construction du vecteur pLN-PX-GFP.

## Liste des abréviations

ACT	<i>Artemisinin-based combination therapy</i>
BFA	Bréfeldine A
BSA	Albumine de sérum bovin
CK	Cellule de Kupffer
CMV	Corps multivésiculaires
CQ	Chloroquine
CSP	protéine circumsporozoïte
DAG	Diacylglycérol
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
DSP	Dithiobis (succinimidyl propionate)
EMA	Agence européenne des médicaments
FPIX	Ferriprotoporphyrine IX
FYVE	Fab1, YOTB, Vac1 et EEA1
GEF	Facteurs d'échange de guanine
GFP	Protéine fluorescente verte ( <i>Green fluorescent protein</i> )
GMEP	<i>Global malaria eradication program</i>
GR	Globule rouge
GST	Glutathione-S-Transférase
hDHFR	<i>Human dihydrofolate reductase</i>
Hb	Hémoglobine
HSP70	<i>Heat choc protein</i>
IP3	Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>
KO	<i>Knock out</i>
MSP1	<i>Merozoite surface protein 1</i>

OMS	Organisme mondiale de la santé
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PKD1	<i>PIP-dependent kinase 1</i>
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol 3-phosphate kinase
PI4K	Phosphatidylinositol 4-phosphate kinase
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PIP	Phosphatidylinositol phosphate
PLC	Phospholipase C
PM1	Plasmepsine I
PM2	Plasmepsine II
PX	<i>Phox</i> ou <i>Phagocyte oxidase</i>
Rab	Ras-related in brain GTPase
RAP1	<i>Rhoptry associated protein 1</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPM	Rotations par minute
SB	<i>Sample buffer</i>
SPR	Résonance des plasmons de surface
smHA	Spaghetti Monster Hémagglutinine
SOD	Superoxyde dismutase
VD	Vacuole digestive

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Dave Richard, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir supervisé mes travaux. Son écoute, sa disponibilité et son dévouement m'ont été d'une grande aide et m'ont permis de mener à bien ce projet. La confiance qu'il a placée en moi m'a permis de m'épanouir durant les deux dernières années et de développer mon autonomie et ma polyvalence dans le laboratoire me permettant ainsi de rapidement entrer sur le marché du travail. Sans lui, rien de tout ce que j'ai accompli durant les dernières années sur le plan professionnel n'aurait été possible.

Je remercie également mes collègues de travail passé et présent, pour leur aide et leur soutien tout au long de mes études. Merci à Dominic Gagnon, le ninja du laboratoire, pour sa disponibilité, son écoute et son aide précieuse. Merci à Stéphanie Hallée de m'avoir transmis son savoir et de m'avoir accompagné depuis le tout début. Merci à Angana Mukherjee et à Zeinab Ebrahimzadeh pour leurs conseils scientifiques. Finalement, merci à Audrey Sergerie de m'avoir accompagné dans ce cheminement et d'avoir partagé mes frustrations et mes joies.

Un merci tout particulier à ma famille, mon conjoint et mes amis qui m'ont toujours soutenu et accompagné durant tout ce processus. Merci d'avoir enduré mes crises de nerfs, mes angoisses et mes histoires, même si la plupart du temps vous ne compreniez pas vraiment de quoi je parlais. Vous m'avez toujours soutenu et avez été partie prenante de ma réussite.

# Introduction

---

## 1.1. Le parasite de la malaria *Plasmodium falciparum*

### 1.1.1. Informations générales

Le paludisme, aussi connu sous le nom de la malaria, est l'une des maladies infectieuses les plus dévastatrices et anciennes que le monde ait connues. Bien que le parasite causant cette maladie ne fût observé qu'en 1880 par Alphonse Laveran, les symptômes de la malaria furent décrits dans plusieurs documents anciens notamment en Chine en 2700 av. J.-C<sup>1</sup>. Depuis des dizaines de milliers d'années, l'Homme évolue avec cette maladie à ses côtés. Malgré une longue coexistence entre l'Homme et le parasite, près de la moitié de la population mondiale est à risque de contracter la malaria, soit plus de 3,2 milliard de personnes dans 91 pays<sup>2</sup>. Parmi eux, 15 pays totalisent 80% des cas de malaria répertoriés dans le monde et, à l'exception de l'Inde, ils sont tous localisés en Afrique subsaharienne. Pour l'année 2017, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) rapportait environ 435 000 morts et 219 millions de cas de paludisme dont environ 90% se situent en Afrique et dont la majorité sont des enfants en bas âge<sup>3</sup>. En effet, près du deux tiers des décès causés par cette maladie touchent les enfants de moins de 5 ans, ce qui confère à la malaria le troisième rang dans les causes de décès chez les jeunes enfants après la pneumonie et la diarrhée<sup>2,4</sup>.

Ce parasite protozoaire nous est transmis par le biais de moustiques Anophèles femelles porteuses de la maladie qui sont les véritables vecteurs de la malaria<sup>1</sup>. Ce parasite appartient au phylum des *Apicomplexa* qui se caractérise notamment par la présence d'un complexe apical. Ce dernier est situé à l'une de ses extrémités et contient trois organites distincts soit les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. La pointe apicale permet notamment la sécrétion régulée des protéines essentielles pour l'invasion du parasite<sup>5</sup>. Cinq espèces du parasite *Plasmodium* peuvent infecter l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*, auparavant connu chez le singe et récemment identifié chez l'homme<sup>6</sup>. La première espèce, *P. falciparum*, est toutefois connue pour être la plus prévalente et la plus meurtrière<sup>7</sup>.

*Plasmodium* est un parasite intracellulaire obligatoire qui infecte les globules rouges (GR) et s'y réplique. C'est cette réplication qui entraîne les symptômes caractéristiques de la malaria. Ces derniers surviennent normalement de 10 à 15 jours après la transmission du parasite par le moustique et sont cycliques toutes les 48 heures<sup>8</sup>. Ces symptômes sont notamment la fièvre, la fatigue, les maux de tête, les vomissements, l'anémie et, dans les cas sévères, la détresse respiratoire, le coma et la mort<sup>6,9</sup>. La malaria sévère est surtout causée à la suite d'une infection par *P. falciparum*, l'espèce la plus virulente, qui entraîne l'adhésion des GR infectés dans les différents organes entraînant ainsi leur défaillance. Ce phénomène est spécifique aux GR et n'affecte pas d'autres cellules sanguines. Durant son cycle de vie, le parasite modifie la porosité et l'adhérence du GR le rendant plus rigide et susceptible d'être détecté et éliminé par la rate<sup>9</sup>. Toutefois, le parasite réussit à échapper à cette élimination. Un phénomène, nommé cytoadhérence, se produit suite à la libération de protéines formant des structures « knobs » à la surface des érythrocytes infectés les rendant rugueux et contrôlant ainsi la cytoadhérence<sup>10</sup>. Cette dernière permet de former des agrégats d'érythrocytes dans les microvaisseaux et dans les organes tels que le placenta, la moelle osseuse et le cerveau<sup>9,10</sup>. Il s'agit d'un procédé très utile pour le parasite, car il lui permet ne pas être éliminé par la rate et d'ainsi poursuivre l'infection. Ce phénomène est notamment possible grâce à l'expression de la protéine PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) possédant différents domaines d'adhésion variables ciblant différents récepteurs chez l'hôte<sup>9</sup>. Cette protéine est codée par la large famille de gènes *var*, soit une soixantaine de gènes exprimant tous une protéine fonctionnelle différente, rendant ainsi la protéine PfEMP1 très polymorphe. Régie par l'exclusion allélique, un parasite ne peut exprimer qu'un seul gène *var* et ne peut transiger d'un gène à un autre<sup>11</sup>. Il existe toutefois une faible population de parasite chez un hôte, soit environ 2%, qui exprime un gène *var* différent rendant ainsi difficile l'élimination complète du parasite par le système immunitaire<sup>9</sup>.

*P. falciparum* est particulièrement concentré dans les pays d'Afrique subsaharienne, d'où le nombre de cas plus élevés et la prédominance de la malaria sévère dans cette région<sup>7</sup>. Les plus touchés par cette dernière sont les enfants en bas âge. En effet, dans cette région, la forme sévère de la maladie est plutôt rare chez les enfants plus vieux et les adultes<sup>12</sup>. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que la cohabitation constante avec le parasite a

permis aux populations les plus touchées de développer une certaine forme d'immunité avec les années. En effet, bien que le parasite soit toujours présent, une diminution des symptômes graves est observée dû au phénomène de prémunition, soit une immunité partielle développée dans les régions très endémiques<sup>13</sup>. De plus, sous l'effet de pression sélective prolongée, différentes mutations génétiques contribuent à protéger contre les complications sévères de la malaria<sup>12,14</sup>. De ce fait, l'anémie falciforme, ou drépanocytose, est la mutation la plus répandue et la plus caractérisée offrant une protection contre les effets dévastateurs du parasite<sup>14,15,16</sup>. Cette mutation altère la structure de l'hémoglobine (Hb), une composante du sang essentielle permettant notamment le transport d'oxygène et qui constitue par le fait même un élément important de notre étude<sup>17</sup>. Si la maladie peut s'avérer mortelle, un porteur sain, possédant un seul allèle défectueux, se voit doté d'une certaine protection contre la malaria sévère et la mortalité causée par *Plasmodium*. Toutefois, durant les dernières années, les progrès dans le contrôle de la propagation de la malaria dans les pays les plus touchés ont contribué à une diminution du nombre de cas, mais aussi à une légère diminution de l'immunité de ces populations contre la maladie, ce qui pourrait entraîner une future éclosion<sup>7</sup>.

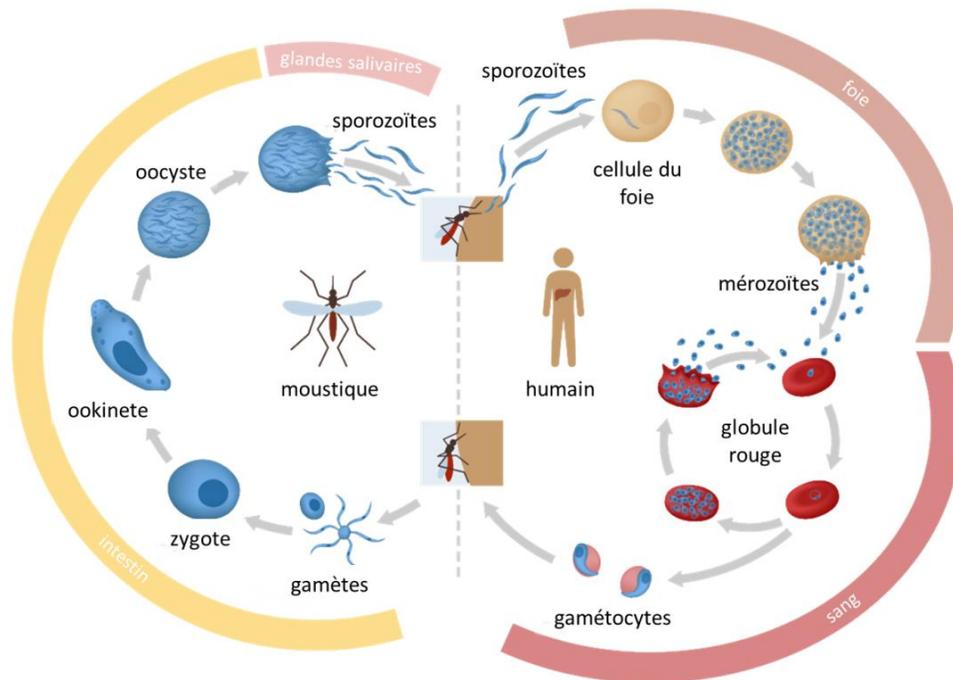
### **1.1.2. Le cycle de vie du parasite**

Le cycle de vie de *P. falciparum* se divise en trois stades distincts, soit le stade sporogénique, le stade hépatique et le stade érythrocytaire (Figure 1). Ces stades sont répartis chez les deux hôtes du parasite, le premier se produisant chez le moustique et les deux autres chez l'homme. Durant son cycle de vie, le parasite se présente sous différentes formes, lui permettant ainsi d'infecter différents tissus que ce soit l'intestin du moustique ou encore les cellules du foie et les GR de l'homme.

#### **1.1.2.1. Stade sporogénique (Anophèle)**

Comme mentionné plus tôt, *Plasmodium* est transmis à l'homme par l'insecte de type *Anophèle*. Il existe plus de 400 espèces différentes d'anophèles répartis partout dans le monde, dont environ 70 peuvent transmettre le parasite<sup>18</sup>.

L'infection commence lors d'un repas sanguin durant lequel l'insecte ingère des gamétocytes mâles et femelles présents dans le sang de l'individu infecté et formés durant le stade érythrocytaire (Section 1.1.2.3). Dans l'estomac, les gamétocytes se différencient en gamètes mâles et femelles sous l'effet du changement de température, de pH et la présence d'acide xanthurénique, un facteur d'activation produit par le moustique<sup>19,20</sup>. Ceux-ci fusionnent en une forme diploïde nommée zygote. Ce dernier est la seule forme sexuée du cycle de vie complet du parasite. Le zygote se transforme en ookinete, la forme motile du parasite, qui peut traverser la muqueuse intestinale et ainsi devenir un oocyste dans la cavité hémocoelique<sup>21</sup>. Le parasite produit ensuite une grande quantité de sporozoïtes qui sont relâchés et migrent jusqu'aux glandes salivaires. Grâce à des récepteurs spécifiques, le sporozoïte s'attache à la glande salivaire et peut procéder à son invasion, une étape clé, bien que peu efficace, qui déterminera si le parasite pourra être transmis ou non<sup>22</sup>. C'est ainsi que lors de son prochain repas sanguin, le moustique transmettra le parasite de sa salive à l'homme et infectera ce dernier.



**Figure 1 : Le cycle de vie de Plasmodium falciparum.**  
 Traduite par Marie-Ève Crochetière. ©Genome Research Limited

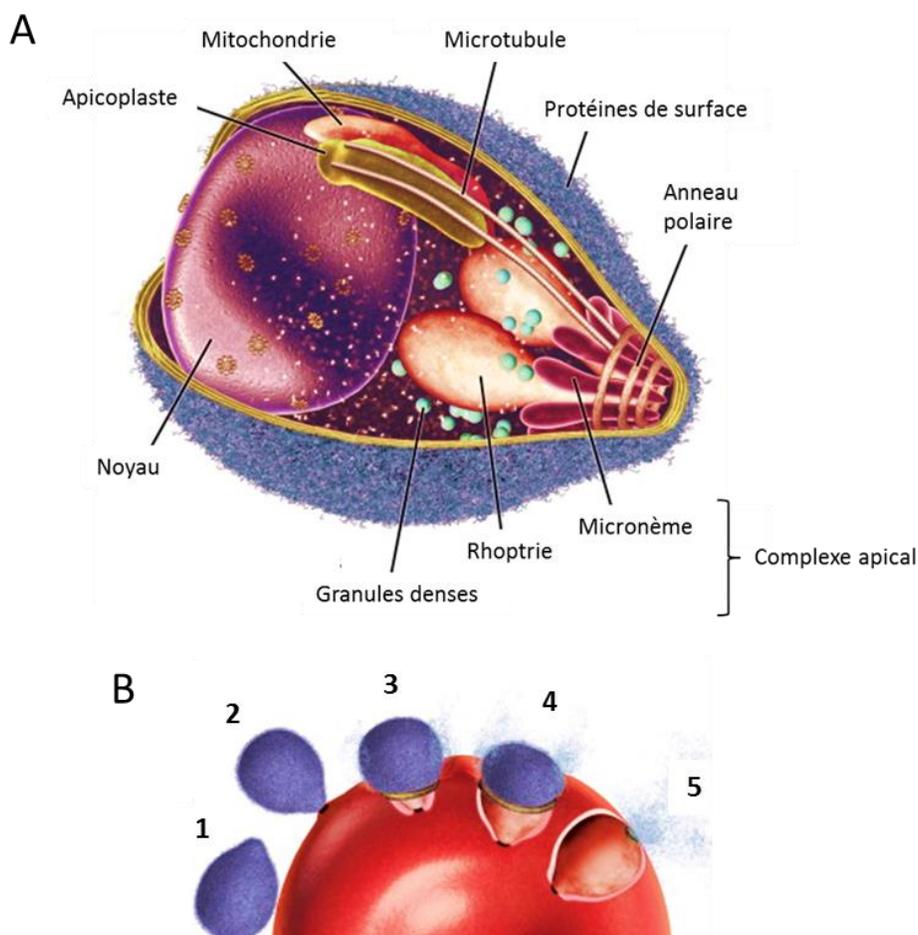
Ce stade, d'une durée d'environ 10 à 24 jours, exerce une pression sur le parasite dès son entrée dans l'estomac jusqu'à son arrivée dans les glandes salivaires. En effet, avant même d'être un sporozoite, le parasite doit d'abord échapper aux enzymes digestives produites dans l'intestin, traverser la matrice péritrophique, une barrière physique servant à prévenir le contact des parasites avec la paroi intestinale, et échapper au système immunitaire. Une fois différencié en sporozoite, celui-ci doit encore contrer les hémocytes, des cellules du système immunitaire de l'insecte, les peptides antimicrobiens et d'autres facteurs humoraux<sup>23</sup>. Ainsi, l'infection de l'insecte par *Plasmodium* et la possibilité de transmission constituent un chemin semé d'embûches pour le parasite.

#### **1.1.2.2. Stade hépatique**

Le stade hépatique, aussi nommé exo-érythrocytaire, est un cycle asymptomatique qui ne se produit qu'une seule fois au début de l'infection. Il commence par l'entrée d'une centaine de sporozoites dans l'organisme humain par une lésion dans le derme lors du repas sanguin de l'insecte<sup>24</sup>. Certains sporozoites réussissent ensuite à atteindre la circulation sanguine par glissement (*gliding motility*) et sont rapidement dirigés vers le foie<sup>25</sup>. Dans cet organe, le sporozoite fait son chemin sur les cellules épithéliales jusqu'à ce qu'il fasse son entrée dans les hépatocytes en traversant un macrophage hépatique nommé cellule de Kupffer (CK). Les CK sont des composantes essentielles de l'immunité innée et sont parmi les premières en jeu dans la réponse contre les bactéries, les parasites et les autres dangers auxquels l'organisme peut être en contact<sup>26</sup>. Par la suite, le sporozoite infecte une cellule hépatique non sans engendrer la mort de certains autres hépatocytes sur son chemin. Cette traverse de plusieurs cellules hépatiques semble être essentielle pour l'invasion, le développement et la formation de la vacuole parasitaire (VP) du sporozoite<sup>27</sup>. Dans sa VP, le parasite prolifère, copiant ainsi son ADN afin de se multiplier des milliers de fois dans la cellule hépatique infectée. Ce sont quelques dizaines de milliers de copies du parasite qui seront finalement relâchées dans la circulation sanguine<sup>28</sup>. Ce stade dure près de deux semaines chez *P. falciparum*, mais certaines espèces, notamment *P. vivax*, peuvent rester en latence dans les cellules du foie durant plusieurs mois<sup>29</sup>.

### 1.1.2.3. Stade érythrocytaire

Symptomatique et d'une durée totale d'environ 48 heures, le stade érythrocytaire commence lors de la libération d'une grande quantité de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Le mérozoïte est formé de plusieurs organites caractéristiques aux apicomplexés et essentiels à l'invasion de l'érythrocyte, notamment le complexe apical<sup>30</sup> (Figure 2A). Ce dernier procède alors à l'invasion d'un GR, une étape importante et hautement régulée (Figure 2B).

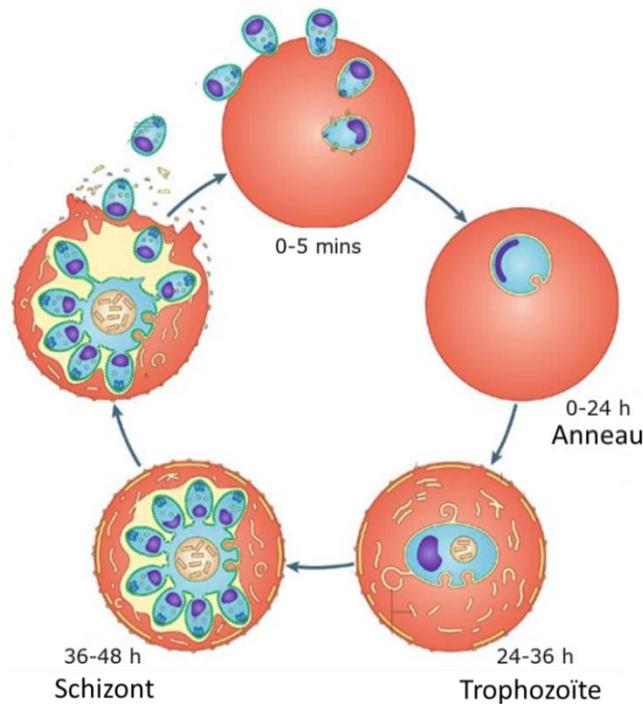


**Figure 2 : La structure du mérozoïte (A) et le processus d'invasion d'un globule rouge (B).**  
*Traduites et adaptées par Marie-Ève Crochetière. Images tirées de* <sup>33</sup>

L'invasion commence par son attachement à la surface du GR à l'aide des protéines à sa surface (Figure 2B1)<sup>31</sup>. Le mérozoïte entame ensuite sa réorientation à l'aide d'adhésines sécrétées par les micronèmes. Un attachement irréversible à la pointe apicale est ensuite possible grâce à ce même organite (Figure 2B2)<sup>32</sup>. Une jonction serrée est formée grâce à l'action combinée des protéines de micronèmes et de rhoptries (Figure 2B3)<sup>33</sup>. Ces derniers

sont également responsables de la formation de la VP qui entoure le parasite à l'intérieur de l'érythrocyte<sup>31</sup>. Cette jonction parcourt ensuite la surface du mérozoïte de sa pointe apicale à son extrémité permettant ainsi son inclusion dans le GR et libérant par le fait même ses protéines de surface (Figure 2B4-5)<sup>33</sup>. La VP est finalement scellée complétant ainsi l'invasion du GR par le mérozoïte. Tout ce processus d'invasion ne dure que quelques minutes.

À la suite de l'invasion du GR par le mérozoïte, ce dernier entame le cycle érythrocytaire en se différenciant en forme anneau (Figure 3). Cette forme qui perdure environ 24 heures permet de sécréter beaucoup de protéine dans le GR afin d'augmenter sa porosité et sa cytoadhérence<sup>10</sup>. Ce n'est toutefois qu'en forme trophozoïte de 24 à 36 heures que le GR modifie sa paroi, ce qui permet au parasite d'échapper au système immunitaire en formant des agrégats et en séquestrant les parasites dans différents organes<sup>9</sup>. De plus, les composantes biologiques retrouvées dans le cytoplasme de l'érythrocyte commencent à être dégradées au stade anneau, mais le sont plus activement au stade trophozoïte. Cette dégradation dans la vacuole digestive (VD) permet au parasite d'obtenir les nutriments nécessaires pour sa division cellulaire<sup>34</sup>. L'Hb est un nutriment essentiel pour le parasite à ce stade, car il lui fournit des acides aminés importants en plus de faire de la place dans le GR pour la croissance du parasite. Ainsi, l'internalisation de l'Hb par endocytose et sa digestion dans la VD constituent des étapes essentielles du cycle de vie et seront discutées plus en détail plus loin (Section 1.2). C'est durant les dernières heures du cycle, soit de 36 à 48 heures, que le parasite se retrouve sous forme schizont et divise son génome et ses organites afin de former une vingtaine de cellules-filles<sup>6,35</sup>. Les mérozoïtes ainsi formés seront à nouveau libérés dans la circulation sanguine lors de la rupture de l'érythrocyte et pourront alors infecter de nouveaux GR et augmenter la parasitémie sanguine de façon exponentielle<sup>35</sup>. Sous l'effet d'un stress, une proportion des parasites au stade anneaux se différencient en gamétocytes, la forme absorbée par le moustique lors du repas sanguin et responsable de la propagation de la maladie<sup>36</sup>.



**Figure 3 : Le stade érythrocytaire du parasite de la malaria.**  
*Adaptée par Marie-Ève Crochetière. ©2006 Nature Publishing Group*

### 1.1.3. Prévention et traitements

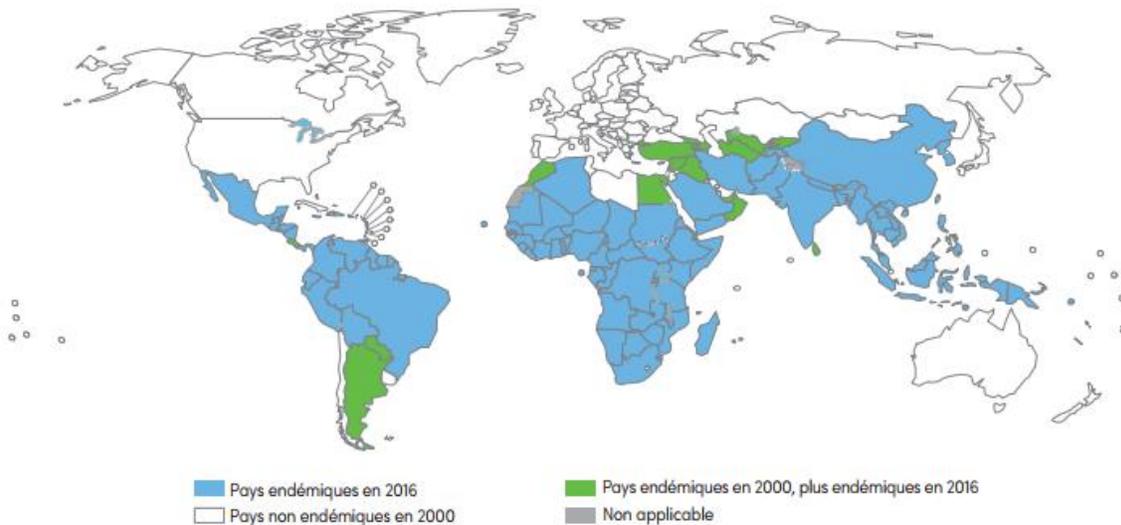
La lutte contre le paludisme ne date pas d'hier. En effet, avec les années, nous avons cumulé plusieurs programmes et outils de prévention, de nombreux traitements différents, mais aussi de nombreux revers notamment l'arrivée de la résistance aux traitements connus. Nos connaissances sur le parasite nous permettent maintenant d'entrevoir le jour où un vaccin sera disponible. Dans cette section, nous verrons les moyens de prévention et les traitements qui ont marqué les années et ceux qui sont toujours en vigueur aujourd'hui. Nous verrons aussi le frein majeur à l'élimination de ce fléau parasitaire, soit la résistance aux antimalariaux, et nous discuterons finalement de la recherche d'un vaccin.

#### 1.1.3.1. La prévention

Depuis sa fondation, l'OMS travaille sans relâche pour la mise en place de programmes et des interventions afin de sensibiliser la population aux risques de la maladie et à l'importance de se protéger. En 1955, l'organisme crée le *Global Malaria Eradication Program* (GMEP) qui permet d'éliminer complètement le paludisme de l'Europe et de l'Australie entre les

années 70 et 90<sup>37</sup>. Depuis le début du XXI<sup>e</sup> siècle et jusqu'à tout récemment, les nombreuses interventions pour combattre le parasite ont permis d'éliminer la malaria dans une dizaine de pays et de réduire sa transmission de façon drastique dans plusieurs autres, diminuant de près de 50% le taux de mortalité au niveau global (Figure 4)<sup>7</sup>. Ces résultats favorables sont notamment dus aux nombreux outils qui sont disponibles et grandement prônés par l'OMS dans les pays endémiques.

Le premier outil permettant de protéger l'individu et de cibler le vecteur de la maladie est la moustiquaire imprégnée d'insecticides. Cette option est grandement mise de l'avant par les programmes de prévention, car son utilisation est simple et peu demandante pour les populations. Les principales classes d'insecticides utilisées sont les organophosphorés, les carbamates, les organochlorés et les pyréthroïdes qui ciblent tous le système nerveux du moustique<sup>38</sup>. Selon les estimations, les moustiquaires représentent 69% de tous les cas de malaria évités par l'utilisation des outils de prévention<sup>39</sup>. Un autre outil qui donne de bons résultats est la pulvérisation d'insecticides intradomiciliaire permettant d'éliminer les moustiques femelles qui viendraient se poser sur les murs ou le plafond<sup>39,40</sup>. Bien qu'il soit plus efficace, cet outil est plus difficile à mettre en place que les moustiquaires, car la pulvérisation doit être répétée souvent et doit être instituée dans au moins 80% des habitations dans les zones ciblées pour entraîner une mort vectorielle de 45%<sup>38,40</sup>. Finalement, le dernier outil de prévention est le diagnostic rapide des cas de malaria dans la population. Des tests diagnostic faciles pouvant être faits dans des régions éloignées et peu équipées sont essentiels pour surveiller la propagation de la maladie<sup>37</sup>. Toutefois, certains patients ne montrent pas de symptômes de la maladie, ne sont jamais diagnostiqués ou possèdent une parasitémie trop faible pour être détectée par ces outils. Ces patients ne sont donc jamais pris en charge par le système de santé<sup>7</sup>.



**Figure 4 : La malaria autour du monde.**

©Base données de l’OMS, 2017

Malgré les outils de lutte disponibles, plus du tiers de la population africaine à risque de contracter le paludisme n’est pas protégé par des moustiquaires ou des pulvérisateurs<sup>39</sup>. L’OMS dénombre malheureusement une hausse du nombre de cas dans les régions les plus endémiques pour l’année 2017. En effet, une augmentation de 3,5 millions de cas comparativement à 2016 vient confirmer que les investissements dans la lutte contre le paludisme et l’accessibilité des outils de prévention restent insuffisants encore aujourd’hui<sup>3</sup>. Les programmes de prévention doivent donc redoubler d’ardeur afin d’informer les populations sur les symptômes à surveiller et l’importance de se protéger afin de limiter la propagation du parasite.

### ***1.1.3.2. Les traitements***

Les outils de prévention et les différents programmes instaurés par l’OMS ont permis de diminuer significativement la mortalité liée au paludisme, mais le nombre de cas est toujours alarmant et il faut aussi être capable de guérir lorsque la prévention échoue. Plusieurs traitements visant différentes composantes du parasite sont disponibles. Ceux-ci visent majoritairement le processus d’internalisation et de digestion de l’Hb et permettent de soigner les gens chez qui la transmission n’a pu être évitée.

#### 1.1.3.2.1. Quinine

Développé durant les années 1600, la quinine fut l'un des premiers antimalariaux. Cette découverte par les Indiens Quechuas du Pérou a marqué l'histoire, puisqu'il s'agit du premier composé chimique permettant de soigner une maladie infectieuse<sup>41</sup>. La quinine est un alcaloïde naturellement présent dans l'écorce de certains arbres et arbustes du genre *Cinchona* (Figure 5A). Ce composé agit sur le stade érythrocytaire de *Plasmodium* et aussi sur les gamétoctes de certaines espèces, mais pas ceux de *P. falciparum*<sup>41,42</sup>. Son mécanisme d'action reste toutefois inconnu, bien qu'on suppose qu'il possède une activité inhibitrice lors de la détoxification de l'hème dans la vacuole digestive<sup>42</sup>. Jusqu'au début du 20<sup>e</sup> siècle, la quinine constituait le traitement de première ligne pour vaincre la maladie. Toutefois, l'arrivée de nouveaux composés thérapeutiques plus efficaces et mieux tolérés, tel que la chloroquine et l'artémisinine, a rétrogradé la quinine comme traitement secondaire<sup>43</sup>.

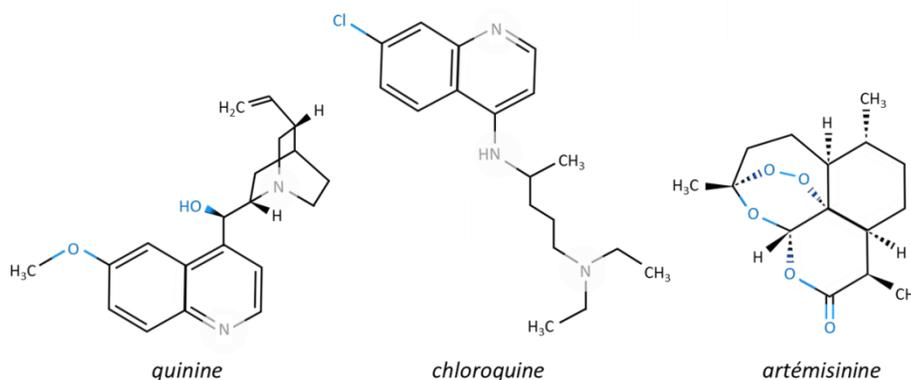
#### 1.1.3.2.2. Chloroquine

À la suite de la découverte de la quinine, une importante recherche d'antimalariaux est enclenchée. Introduite en 1945, la chloroquine (CQ) est un produit de synthèse faisant partie de la famille des 4-aminoquinolines (Figure 5B)<sup>42</sup>. Ce composé interfère dans la détoxification de l'hème, une étape importante de la digestion de l'Hb dans la VD. Puisqu'il s'agit d'une base faible, la CQ interagit avec les fragments toxiques de la ferriprotoporphyrine IX, empêchant ainsi leur dimérisation (Section 1.2.2)<sup>44</sup>. L'accumulation de CQ dans la VD entraîne alors la mort des parasites, empêchant ainsi la multiplication de ceux-ci dans l'hôte<sup>45</sup>. En remplacement de la quinine, ce nouveau composé fut utilisé comme traitement de première ligne jusqu'aux années 90, où la résistance à ce produit devint alarmante. Elle sera peu à peu remplacée par des traitements combinés, notamment l'artémisinine, dans la majorité des pays d'Asie et d'Afrique<sup>38,46</sup>.

#### 1.1.3.2.3. Traitements combinés à l'artémisinine

L'une des découvertes médicales les plus importantes du 20<sup>e</sup> siècle fut celle de l'artémisinine comme traitement contre la malaria (Figure 5C). Durant les années 1970, les Chinois ont extrait cette molécule de la plante *Artemisia*<sup>47</sup>. Depuis, plusieurs dérivés de ce produit (artésunate, artémether et dihydroartémisinine) sont utilisés en thérapie combinée

(*artemisinin-based combination therapy* (ACT)) avec d'autres antimalariaux afin de limiter l'apparition de résistance contre ces produits<sup>38,42,46</sup>. Bien que leur mécanisme d'action précis soit encore peu connu, leur fonction semble dépendante de l'hème. Celle-ci permet d'ouvrir la structure endopéroxyde des ACT. Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) ainsi formés entraineraient la mort des parasites qui semblent mourir par stress oxydatif<sup>47</sup>. L'artémisinine et ses dérivés sont particulièrement efficaces pour éliminer le parasite puisqu'ils affectent toutes les formes du stade érythrocytaire et également les gamétocytes<sup>42</sup>. Ainsi, depuis 2010, l'OMS recommande l'ACT comme traitement de première ligne contre *P. falciparum*<sup>48</sup>.



**Figure 5 : Structures moléculaires des composés thérapeutiques utilisés contre la malaria.**  
Image produite par Marie-Ève Crochetière

### 1.1.3.3. La résistance aux antimalariaux

L'un des freins majeurs de l'élimination du parasite de la malaria et l'un des fléaux mondiaux les plus importants est l'apparition de résistance à toute forme de traitement. En effet, les antimalariaux actuels ne font pas exception à la règle et voient leur efficacité rapidement diminuée, voire même annulée par les effets de la résistance des parasites à ces traitements qui s'avèrent toujours plus précoces. À ce jour, tous les composés thérapeutiques visant à soigner la malaria sont la cible de résistance, d'où l'importance de prôner la thérapie combinée afin de tenter de limiter ces effets et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques<sup>49</sup>.

Il faut savoir que plusieurs procédés peuvent mener à la résistance. Dans un premier temps, chez *Plasmodium*, la majeure partie de la résistance observée est due à une mutation de la cible ou à un transport plus efficace du composé hors de la cellule. C'est le cas pour la CQ décrit plus tôt. Bien que le mécanisme précis de résistance à la CQ soit encore peu défini, de

nombreuses études mettent en lumière le rôle de la protéine PfCRT mutée (*Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*) dans l'efflux de la CQ hors de la VD, l'empêchant ainsi d'interférer avec la détoxification de l'hème<sup>50,51,52</sup>. En second lieu, le moustique lui-même fait preuve de résistance face aux insecticides utilisés. En effet, on remarque l'émergence de mutations chez le moustique lui conférant une résistance aux insecticides couramment utilisés<sup>53,54</sup>. Ce phénomène est notamment causé par l'utilisation en masse des insecticides dans de nombreuses régions, favorisant ainsi l'adaptation des Anophèles<sup>55</sup>. De plus, on remarque une modification des habitudes de vie du moustique dans le but de contrer son élimination. Le moustique est non seulement plus exophagique<sup>54,56</sup>, c'est-à-dire qu'il préfère se nourrir à l'extérieur des bâtiments, mais il est aussi de moins en moins crépusculaire et nocturne<sup>57</sup>.

Ainsi, bien que le nombre de décès liés au parasite de la malaria diminuent depuis plusieurs années maintenant, l'apparition de souches multirésistantes<sup>58</sup> aux antimalariaux et l'adaptation des moustiques aux insecticides pourraient bien inverser la tendance dans les années à venir<sup>59</sup>. De plus, l'augmentation du nombre de cas de malaria dans la dernière année pourrait bien être expliquée par ces phénomènes, en partie du moins<sup>3</sup>. C'est pourquoi, il est primordial de redoubler d'effort afin de trouver de nouveaux composés thérapeutiques et idéalement un vaccin afin d'éradiquer définitivement ce parasite.

#### **1.1.3.4. La vaccination**

Avec l'apparition de souches résistantes aux composés thérapeutiques existants, il devient primordial de trouver un vaccin efficace contre le parasite de la malaria. En date d'aujourd'hui, seul un candidat a réussi les essais cliniques et a reçu une recommandation favorable de l'Agence européenne des médicaments (EMA)<sup>60</sup>. Le vaccin RTS,S/AS01 (Mosquirix) réalisé par GlaxoSmithKline en 2015 cible la protéine circumsporozoïte (CSP) qui est la protéine majoritaire à la surface des sporozoïtes<sup>61,62</sup>. Toutefois, la phase III des essais cliniques a révélé une efficacité plutôt décevante. En effet, l'étude réalisée sur de jeunes enfants a montré une protection d'à peine 50% contre la malaria clinique (fièvre, fatigue, maux de tête, vomissements et anémie) et de 35% contre la forme sévère (détresse respiratoire, le coma et la mort)<sup>63</sup>. Faute de mieux, ce vaccin fait aujourd'hui l'objet d'une

étude d'implémentation dans trois pays africains, soit au Ghana, au Kenya et au Malawi, pour ensuite faire l'objet d'un programme de vaccination plus élargie<sup>64</sup>.

De façon à optimiser sa portée et son efficacité, le vaccin par excellence devrait procurer une protection contre différentes formes du parasite<sup>62</sup>. En effet, en ciblant d'un côté la malaria clinique (stade hépatique et érythrocytaire) et de l'autre la transmission (stade sexué et sporogénique), on bloque toute possibilité d'infection et de propagation. Seul l'avenir nous dira si cette utopie peut devenir réalité. Une chose est sûre, il est important de pousser la recherche sur ce parasite afin d'identifier le plus de cibles possibles et de mieux comprendre sa physiologie.

## **1.2. Endocytose et dégradation de l'hémoglobine**

L'Hb est une métalloprotéine présente dans le sang, plus précisément dans les globules rouges, permettant le transport de l'oxygène. Tout au long de son développement dans l'érythrocyte, le parasite internalise et digère près de 80% de l'Hb contenue dans la cellule afin d'obtenir les nutriments essentiels à sa croissance<sup>65</sup>. En effet, l'Hb est une source d'acides aminés essentielle qui permet au parasite d'obtenir les éléments nécessaires à sa production protéique et par le fait même à son développement. Cette digestion n'est toutefois pas suffisante à elle seule pour permettre un apport en nutriment complet<sup>66</sup>. L'Hb étant faible en méthionine, cystéine, glutamate et glutamine, et ne contenant aucune isoleucine, le parasite doit donc compter sur un apport exogène pour ces acides aminés<sup>65,67</sup>. Bien qu'il s'agisse d'un mécanisme essentiel, l'internalisation et le transport de l'Hb restent à ce jour des phénomènes très complexes et énigmatiques. Nous verrons tout de même ce qui est connu sur le sujet et les différentes avenues proposées pour expliquer ces mécanismes. De plus, nous verrons plus en détail la digestion de l'Hb, une réaction en chaîne plutôt bien caractérisée.

### **1.2.1. L'endocytose et le transport de l'hémoglobine**

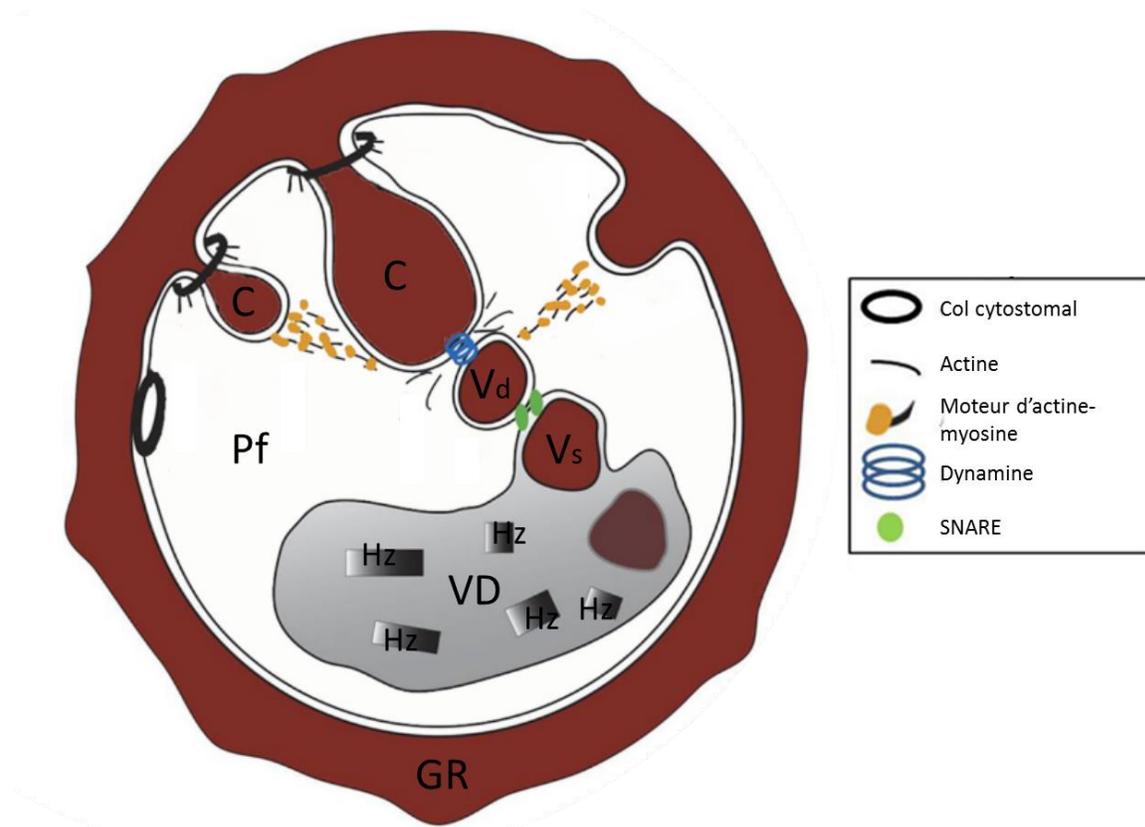
L'internalisation de l'Hb est un mécanisme complexe et encore peu compris à ce jour. Ce phénomène commence généralement à la fin du stade anneau et se termine à la fin du cycle de vie du parasite, bien que la grande majorité de l'Hb soit internalisée durant le stade

trophozoïte<sup>66,68</sup>. Son commencement au stade anneau suggère néanmoins que les protéines nécessaires pour l'endocytose et la digestion sont produites peu de temps après l'invasion du mérozoïte dans le GR<sup>66</sup>.

L'endocytose de l'Hb, illustrée à la figure 6, commence par la formation de cytotomes à la surface du parasite. Le cytotome est une invagination de la membrane externe du parasite, constituée de la VP et la membrane plasmique, qui possède une ouverture constante sur la cellule de l'hôte. Cette ouverture est bordée d'un col, région dense en électron, qui permet l'entrée du cytosol du GR contenant une grande quantité d'Hb<sup>34,69,70</sup>. Cette molécule est ensuite internalisée, possiblement via le bourgeonnement de vésicules à membrane double dérivées du cytotome, permettant le transport jusqu'à la VD<sup>66,71</sup>. Des vésicules contenant un cristal d'hémozoïne sont parfois observées. Ces cristaux correspondent aux déchets de digestion de l'Hb. Il est donc possible que ce processus commence en fait durant le transport de cette molécule vers la VD et non exclusivement dans cet organe<sup>66</sup>. Les vésicules semblent ensuite fusionner à la VD, ce qui forme ainsi une vésicule à une seule membrane qui sera digérée ainsi que l'Hb qu'elle contient<sup>68</sup>.

Certaines études suggèrent que le trafic de l'Hb serait possible grâce à un moteur d'actine-myosine et que la dynamine pourrait également jouer un rôle dans ce processus<sup>68,71,72</sup>. La dynamine est une protéine conservée de la levure jusqu'au mammifère qui possède une activité GTPase et un rôle essentiel dans la formation et le trafic des vésicules. La protéine PfDYN1, l'homologue de TgDrpB chez *Toxoplasma* et la première protéine semblable à la dynamine à être isolée chez *Plasmodium*, joue possiblement un rôle dans l'internalisation de l'Hb<sup>73,74</sup>. PfEps15, soit une protéine ayant un domaine semblable à la dynamine, est associée à la membrane et est transportée via des vésicules jusqu'à une structure près de la VD permettant l'entreposage des lipides neutres<sup>75</sup>. Cette protéine est située à proximité de Rab5a, un marqueur de la formation des endosomes précoces qui permettrait de réguler l'endocytose et le trafic de l'Hb<sup>70,76</sup>. Cette famille de GTPase, constituée de Rab5a, Rab5b et Rab5c, semble être affectée par les isoprénoïdes et par la kinase de PI3P, un phosphoinositide (Section 1.3). En effet, l'inhibition de ces composés organiques entraîne la délocalisation des protéines Rab5 en empêchant leur activation par la prénylation en plus de perturber la

morphologie de la VD<sup>77</sup>. Finalement, la protéine Epsine possède un domaine de liaison aux phosphoinositides, mais, contrairement à *Toxoplasma*, ne possède aucun motif NFP permettant la liaison avec Eps15 qui est impliqué dans l'endocytose. L'Epsine possède toutefois la caractéristique de lier la clathrine et d'autres protéines requises pour le trafic vésiculaire<sup>78</sup>.



**Figure 6 : L'endocytose et le transport de l'hémoglobine (Hb) via les vésicules.**

Pf : Plasmodium falciparum, GR : Globule rouge, C : Cytostome, Vd : Vésicule à membrane double, Vs : Vésicule à membrane simple, VD : Vacuole digestive, Hz : Hémozoïne. Traduite et adaptée par Marie-Ève Crochetière. Image tirée de <sup>69</sup>.

On constate donc que plusieurs études identifient différentes protéines pouvant possiblement avoir un rôle plus ou moins essentiel dans l'endocytose et le trafic de l'Hb. Néanmoins, les études permettant d'établir un lien clair et direct entre une protéine spécifique et le transport de l'Hb sont presque inexistantes. Une étude récente a toutefois permis d'identifier la protéine VPS45 comme étant essentielle au transport des vésicules vers la VD. Cette protéine permet le trafic de vésicules contenant du cytosol de l'hôte vers la VD du parasite. Ainsi,

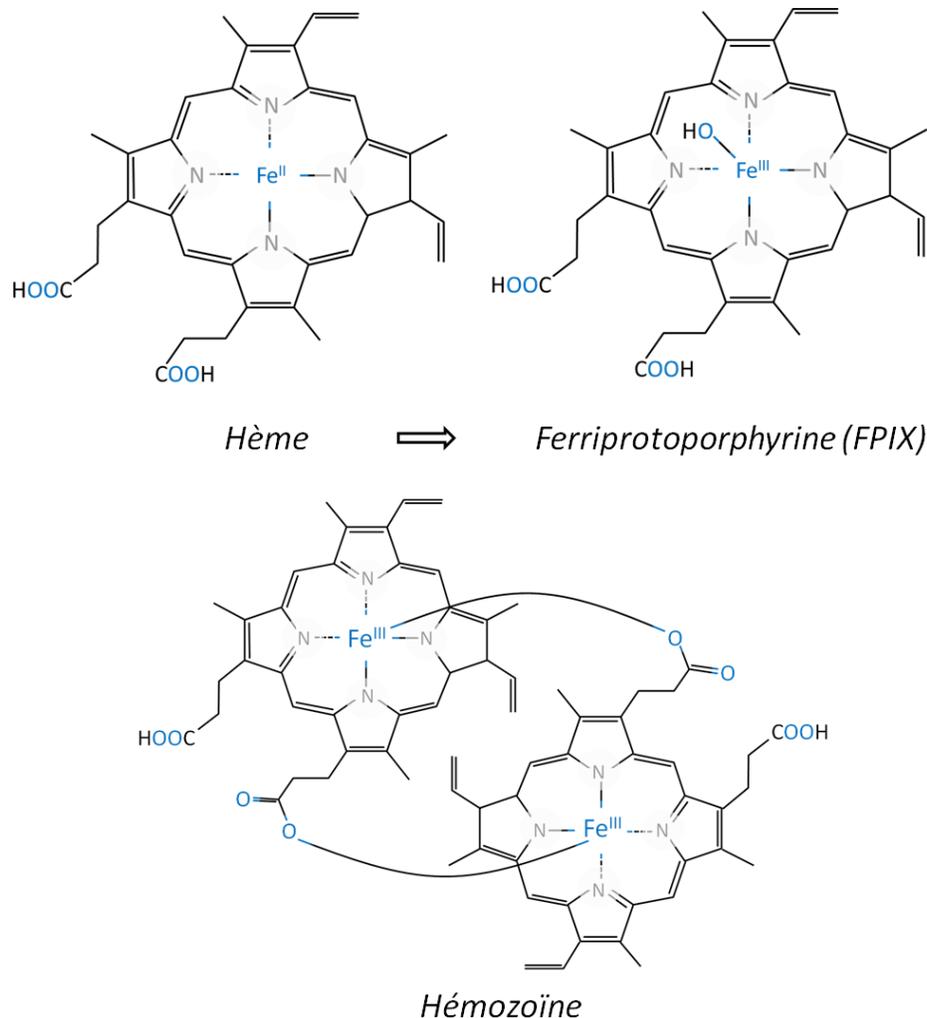
sans VPS45, les vésicules contenant de l'Hb s'accumulent de façon massive dans le parasite, venant ainsi diminuer grandement le volume de la VD durant le développement de l'organisme et menant ultimement à la mort du parasite<sup>79</sup>. Cette étude est donc une découverte majeure permettant de mieux comprendre le processus d'endocytose et de transport de l'Hb dans le parasite de la malaria. Il reste néanmoins beaucoup de travail à faire pour réellement comprendre chaque aspect de ces procédés complexes.

### **1.2.2. La digestion de l'hémoglobine par la vacuole digestive**

Après l'internalisation et le transport de l'Hb à la VD, vient sa digestion. Le catabolisme de l'Hb est essentiel pour le développement du parasite. Néanmoins, ce dernier en internalise et en digère beaucoup plus que nécessaire. En effet, moins de 20% de l'Hb digérée est utilisée dans la biosynthèse des protéines<sup>80</sup>. Ce catabolisme excessif permet notamment d'augmenter l'espace disponible dans le GR, laissant donc plus de place au parasite durant son développement et évitant ainsi une rupture prématurée du GR<sup>66,80</sup>.

La digestion, illustrée à la figure 7, se produit dans la VD, un organite acide possédant un pH autour de 5 et une activité caractéristique aux lysosomes<sup>66,81,82</sup>. L'absence d'activité phosphatase et hydrolase à la VD suggère que le parasite n'a pas besoin de dégrader ou de recycler d'autres macromolécules que l'Hb et que cet organite pourrait être spécialisé<sup>66</sup>. La digestion commence par la dégradation de l'Hb en acides aminés et en hème<sup>44</sup>. À ce jour, deux protéases aspartiques et une protéase cystéique ont été identifiées comme étant impliquées dans le clivage de l'Hb à la VD. En effet, les plasmepsines I et II (PM1 et PM2) représentent entre 60 et 80% de l'activité de dégradation à la VD et seraient les premières à cliver l'Hb avec une spécificité remarquable. La falcipaine, une protéase cystéique responsable de 20 à 40% de la dégradation, clive l'Hb seulement une fois qu'elle est dénaturée par les plasmepsines<sup>66,82</sup>. L'hème est ensuite oxydé en ferriprotoporphyrine IX (FPIX) ou hématine, un résidu toxique. Un processus de biominéralisation, aussi appelé cristallisation, permet ensuite la dimérisation des FPIX. Le produit ainsi formé est un pigment non toxique connu sous le nom d'hémozoïne<sup>51,81,83</sup>. C'est d'ailleurs à cette étape que la chloroquine et l'artémisinine exercent leur activité en bloquant la dimérisation des FPIX<sup>51</sup>. L'électron libéré durant l'oxydation se lie à l'oxygène pour former des DRO, une source de

stress oxydatif importante qui s'ajoute au stress formé par la FPIX. Néanmoins, la VD possède des superoxydes dismutases (SOD) permettant de convertir les DRO en peroxydes d'hydrogène<sup>82</sup>. Il est donc essentiel pour le parasite de bien coordonner les différentes étapes de la digestion de l'Hb, faisant intervenir une grande variété d'enzymes afin de prévenir les dommages oxydatifs à la VD et éventuellement la mort du parasite.

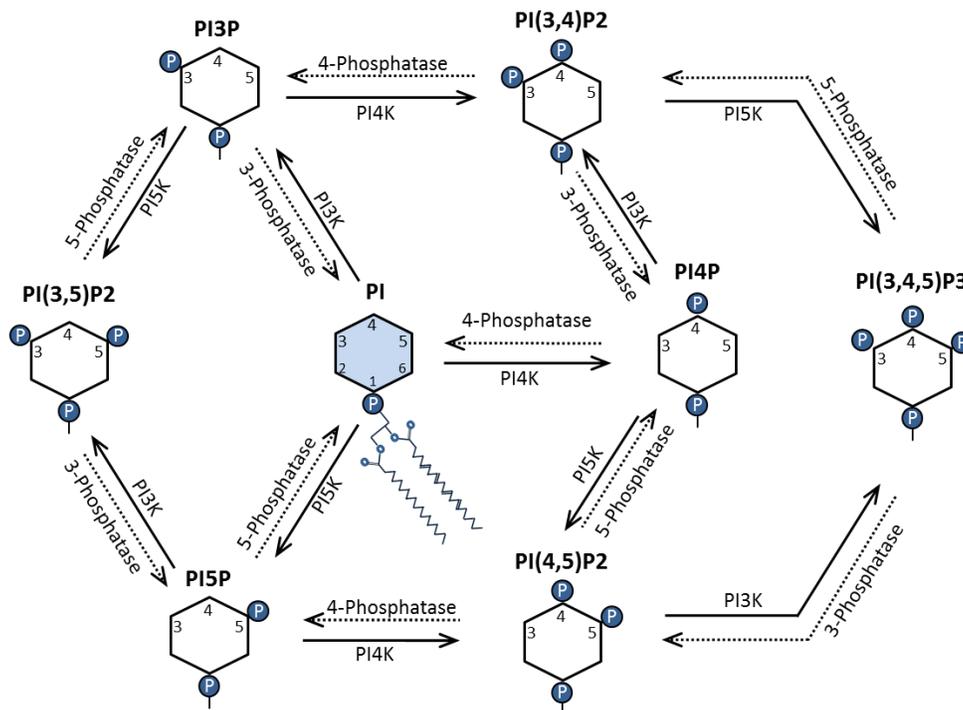


**Figure 7 : Structures moléculaires des produits de dégradation de l'hémoglobine (Hb).**  
*Image produite par Marie-Ève Crochetière*

### 1.3. Phosphoinositides

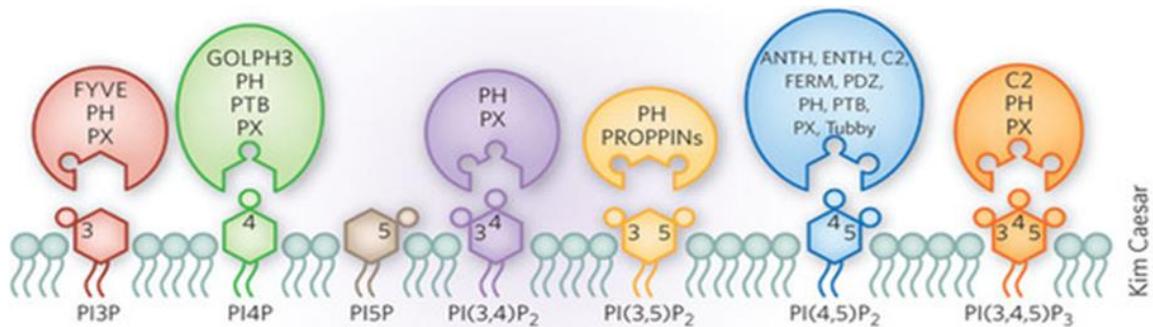
Maintenant que l'importance de l'endocytose de l'Hb et de sa dégradation a été établie, il serait important d'aborder d'autres composés essentiels à plusieurs fonctions de la cellule, soit les phosphoinositides. Ces derniers sont des lipides membranaires dérivés du

phosphatidylinositol (PI). Le PI est d'abord synthétisé dans le réticulum endoplasmique (RE) puis est acheminé à d'autres membranes dans la cellule eucaryote par transport vésiculaire ou par l'entremise d'une protéine de transport spécifique<sup>84</sup>. Il possède un squelette de glycérol et deux queues d'acide gras liées à une tête inositol par un groupement phosphate. La tête inositol, faisant face au cytosol, peut être phosphorylée sur trois sites : 3',4' et 5'<sup>85</sup>. Une phosphorylation unique ou multiple permet de former les sept espèces différentes de phosphatidylinositols phosphates (PIP) ou phosphoinositides. Toutefois, cette phosphorylation est réversible (Figure 8). En effet, trois enzymes différentes peuvent agir sur les PIP, soit les kinases et les phosphatases qui permettent respectivement l'ajout et le retrait d'un groupement orthophosphate et les lipases qui génèrent des seconds messagers<sup>86</sup>.



**Figure 8 : Structures des différents phosphoinositides (PIP) et leurs transformations**  
*Image produite par Marie-Ève Crochetière*

Chaque PIP possède une distribution spécifique et régulée dans les membranes des organelles ce qui permet d'assurer l'identité membranaire<sup>87</sup>. De plus, des protéines effectrices (Figure 9), comprenant des domaines de liaisons spécifiques aux différents phosphoinositides, permettent la compartimentation de plusieurs protéines à un endroit précis et définissent ainsi les fonctions des différents PIP dans la cellule<sup>88</sup>.



**Figure 9 : Les phosphoinositides et leurs domaines de liaisons spécifiques**  
Image tirée de <sup>68</sup>

### 1.3.1. Les phosphoinositides chez les eucaryotes

Bien qu'ils soient des composants lipidiques mineurs de la cellule, les phosphoinositides sont des constituants membranaires essentiels chez les eucaryotes<sup>87</sup>. Des études s'intéressant à la répartition intracellulaire des différents PIP ont permis d'associer le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) à l'appareil de Golgi, le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) aux endosomes et les phosphatidylinositols 4,5-biphosphates (PI(4,5)P<sub>2</sub>) et 3,4,5-triphosphates (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) à la membrane plasmique<sup>85</sup>. Cette distribution spécifique des PIP dans les différents composants de la cellule est liée à des rôles différents pour chacun d'entre eux.

#### 1.3.1.1. Rôles des différents phosphoinositides

##### 1.3.1.1.1. PI3P

Les proportions de PI3P dans la cellule peuvent varier en fonction des organismes, allant de moins de 15% chez les mammifères à près de 30% chez la levure<sup>89</sup>. Tel que mentionné plus tôt, ce phosphoinositide est localisé dans les endosomes précoces ainsi que dans les vésicules internes des corps multivésiculaires (CMV)<sup>90</sup>. En recrutant des protéines effectrices, le PI3P permet le transport membranaire et vésiculaire permettant la transition des endosomes en lysosomes, mais il intervient aussi dans l'autophagie des cellules<sup>91</sup>.

##### 1.3.1.1.2. PI4P

Le PI4P est l'un des deux phosphoinositides les plus abondants dans les cellules et est localisé à l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique<sup>89</sup>. Sachant que le Golgi est impliqué dans le trafic intracellulaire des protéines, il n'est pas surprenant que ce phosphoinositide ait une fonction dans la formation et le transport antérograde et rétrograde des vésicules entre la

membrane plasmique et le Golgi<sup>92</sup>. En étant localisé à la membrane de cet organelle, le PI4P permet d'en maintenir l'identité.

#### 1.3.1.1.3. PI5P

Le PI5P est le phosphoinositide le plus récemment identifié et le moins bien caractérisé. Son identification tardive est notamment due à sa faible concentration en condition basale dans les cellules de mammifère<sup>89</sup>. Une récente étude sur la protéine suppresseur de tumeur ING2 a permis de localiser une fraction de PI5P au noyau et d'établir son rôle potentiel dans la régulation de cette protéine. Celle-ci permet d'activer des composants de la voie de signalisation apoptotique en réponse au stress<sup>93</sup>. Les mécanismes exacts de sa fonction dans la cellule restent toutefois à élucider.

#### 1.3.1.1.4. PI(3,5)P<sub>2</sub>

Tout comme PI5P, PI(3,5)P<sub>2</sub> est présent en très faible quantité chez la levure, mais son rôle n'en est pas moins essentiel<sup>91</sup>. En effet, ce phosphoinositide localisé dans les endosomes tardifs, le CMV et les lysosomes possède un rôle essentiel dans la régulation du trafic des protéines membranaires entre les endosomes et la vacuole, ainsi qu'un rôle dans l'acidification et l'homéostasie vacuolaire et dans l'autophagie<sup>89</sup>.

#### 1.3.1.1.5. PI(4,5)P<sub>2</sub>

Au même titre que PI4P, PI(4,5)P<sub>2</sub> est un phosphoinositide majoritaire chez la levure et chez les mammifères. Il est localisé principalement du côté cytoplasmique de la membrane plasmique et joue un rôle important dans la majorité des fonctions liées à la surface cellulaire<sup>89</sup>. Ce PIP est notamment impliqué dans la formation du cytosquelette d'actine, l'endocytose et l'exocytose, la transduction de signaux extracellulaires, la régulation des protéines membranaires intégrales ainsi que dans la libération du calcium par l'action de la phospholipase C (PLC)<sup>87</sup>. Cette dernière possède un domaine spécifique qui permet de cliver PI(4,5)P<sub>2</sub> et de générer deux seconds messagers, soit Ins(1,4,5,)P<sub>3</sub> (IP3) et du diacylglycérol (DAG), qui permettent la prolifération et la survie de la cellule<sup>85</sup>.

#### 1.3.1.1.6. PI(3,4)P<sub>2</sub> et PI(3,4,5)P<sub>3</sub>

Le PI(3,4)P<sub>2</sub> et le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sont tous deux synthétisés principalement à la membrane plasmique et sont présents en faible quantité dans les cellules (voire même presque

indélectable). Le premier joue notamment un rôle de second messenger et pourrait également être impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, la survie, l'angiogenèse, la prolifération et le métabolisme du glucose<sup>89</sup>. Le deuxième, très bien caractérisé, contrôle la polarisation et affecte l'adhésion et la motilité en plus d'être impliqué dans de nombreuses voies de signalisation via ses effecteurs<sup>84</sup>. Ces deux phosphoinositides sont directement liés. En effet, leur équilibre intracellulaire via l'action de kinases et phosphatases joue un rôle essentiel dans la régulation des voies de signalisation impliquant entre autre la kinase Akt, importante dans plusieurs fonctions cellulaires<sup>89</sup>. Ensemble, ils sont importants pour la prolifération cellulaire, la survie et le métabolisme, mais une dérégulation de ceux-ci peut entraîner la formation de cancers<sup>88</sup>.

#### ***1.3.1.2. Les domaines de liaison aux phosphoinositides***

Bien qu'ils soient essentiels, les phosphoinositides ne travaillent pas seuls. En effet, une variété de domaines protéiques reconnaissent les PIP avec une affinité et une spécificité variable (Figure 9)<sup>85</sup>. Cette reconnaissance permet le recrutement et la rétention des protéines aux membranes intracellulaires et est liée à plusieurs fonctions, notamment la signalisation et le trafic cellulaire<sup>87,88</sup>. En réponse à cette interaction avec les phosphoinositides, les protéines peuvent changer de localisation ou d'activité enzymatique et sont ainsi régulées par l'action des PIP<sup>94</sup>. Généralement, un phosphoinositide peut lier différentes protéines effectrices possédant un domaine de liaison spécifique<sup>88</sup>.

Le domaine *Pleckstrin homology* (PH) fut le premier des 11 domaines connus à être identifié<sup>95</sup>. Il s'agit d'un des domaines les plus communs chez l'humain en plus d'être le domaine le plus caractérisé<sup>96</sup>. Moins de 10% des protéines possédant un domaine PH lient les PIP avec haute affinité et spécificité. Néanmoins, il semblerait que la liaison de ce domaine avec les PIP soit possible via le motif conservé  $KX_n(K/R)XR$ <sup>97</sup>. Le domaine PH se lie de façon plus spécifique, plus fortement et plus communément au  $PI(3,4)P_2$ , au  $PI(4,5)P_2$  et au  $PI(3,4,5)P_3$ <sup>85,86,94</sup>. La séquence hautement variable de ce domaine lui permet de se lier à une variété de ligands que ce soit des lipides, des protéines, des kinases, des phosphatases, des inositols phosphates, des régulateurs de GTPases et d'autres macromolécules. Ces interactions variées lui permettent aussi d'accomplir une variété de fonctions différentes

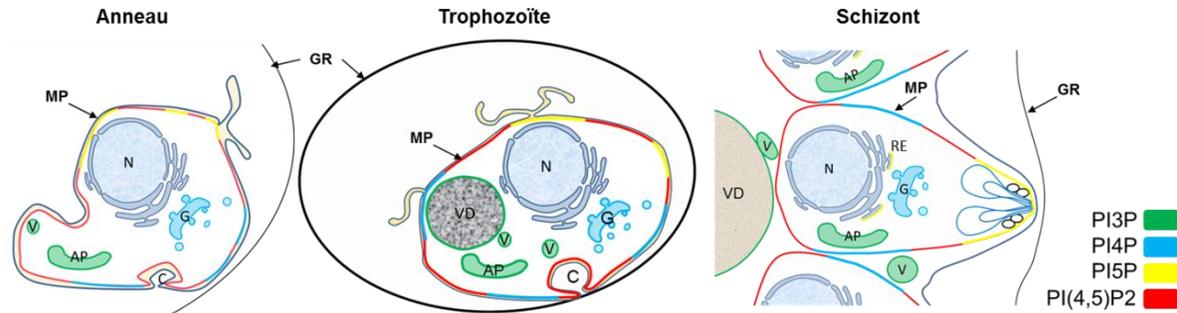
notamment dans le trafic membranaire, le signal intracellulaire, le réarrangement du cytosquelette, la croissance cellulaire, la prolifération, l'apoptose et bien d'autres<sup>86</sup>. Les protéines contenant un domaine PH sont nombreuses, on y compte notamment la *PIP-dependent kinase 1* (PDK1) et la plupart des facteurs d'échange de guanine (GEF)<sup>85</sup>.

Le domaine FYVE (Fab1, YOTB, Vac1 et EEA1) fait partie de la famille des doigts de zinc (*zinc-binding finger*)<sup>86</sup>. Moins commun que le domaine PH, ce domaine lie de façon spécifique et avec haute affinité le PI3P, retrouvé notamment dans les endosomes, les phagosomes et les corps multivésiculaires<sup>88</sup>. Le domaine FYVE est impliqué dans la régulation du trafic et de la fusion des endosomes en plus de jouer le rôle d'adaptateur dans la voie de signalisation TGF- $\beta$ <sup>86,94</sup>. Parmi la trentaine de protéines contenant ce domaine, on compte Hrs, PIKfyve et Rabenosyn-5 (Rab5), toutes retrouvées chez les mammifères<sup>94,96</sup>.

Finalement, le domaine *Phox* ou *phagocyte oxidase* (PX) est l'un des domaines les plus récemment identifié pour lier les phosphoinositides<sup>96</sup>. Ce dernier semble se lier au PI3P avec une affinité variable, bien que la spécificité de plusieurs domaines PX soit encore inconnue<sup>84,88</sup>. Ce domaine est impliqué dans le trafic membranaire et vésiculaire ainsi que dans la signalisation<sup>85,86</sup>. Une protéine possédant un domaine PX et étant bien caractérisée aujourd'hui est P40phox, présente chez la levure et impliquée dans le trafic membranaire. Son interaction avec le PI3P est également bien établie<sup>98</sup>.

### **1.3.2. Les phosphoinositides chez *Plasmodium falciparum***

Au vu des rôles essentiels que peuvent posséder des PIP chez les eucaryotes, on peut penser que leur rôle est tout aussi important chez le parasite de la malaria. Il existe toutefois peu d'études à ce jour s'intéressant aux rôles de ces lipides chez *Plasmodium* et ils sont donc peu caractérisés pour cet organisme. Les domaines de liaison aux PIP sont également moins connus. En effet, une seule protéine contenant un domaine FYVE et deux contenant un domaine PX furent identifiées à ce jour<sup>99</sup>. Bien que les PIP soient peu caractérisés, une étude menée dans notre laboratoire a toutefois permis d'établir un lien entre la distribution cellulaire des PIP chez la levure et celle chez *Plasmodium*, laissant ainsi penser qu'ils peuvent possiblement maintenir un rôle similaire chez différents organismes (Figure 10).



**Figure 10 : Distribution des phosphoinositides chez *Plasmodium falciparum*.**

N : Noyau, G : Golgi, AP : Apicoplaste, V : Vésicule, C : Cytostome, MP : Membrane plasmique, VD : Vacuole digestive, GR : Globule rouge, Traduite et adaptée par Marie-Ève Crochetière, Image tirée de <sup>81</sup>

En effet, il semblerait que les PIP ont une localisation similaire chez la levure et chez le parasite de la malaria et cette localisation est stable tout au long du cycle érythrocytaire, à l'exception de PI5P qui est retrouvé au RE seulement au stade schizont, soit à la fin du cycle du parasite<sup>100</sup>.

### ***1.3.2.1. Les protéines effectrices connues chez Plasmodium***

Malgré le manque d'information sur les phosphoinositides chez *Plasmodium*, certaines études ont tout de même identifié des effecteurs des PIP qui jouent différents rôles importants, voire même essentiels, pour le parasite.

#### **1.3.2.1.1. PI3K (PI3P)**

*Plasmodium* produit une kinase de PI3P (PI3K) de classe III qui n'a pu être inactivée du génome du parasite, laissant donc penser que cette kinase est essentielle au stade érythrocytaire<sup>99</sup>. Quelques études s'intéressant au rôle de PI3K ont révélé de nombreux rôles importants pour la croissance et la formation de l'organisme. En effet, cette kinase serait impliquée dans le trafic vésiculaire, processus impliqué dans le transport de protéines et de lipides. Une inhibition de la PI3K semble mener à une accumulation des vésicules transportant l'Hb (Section 1.2.1)<sup>90</sup>, mais aussi à la malformation de l'apicoplaste<sup>91,101</sup>, un organe essentiel pour sa survie. En d'autres mots, cette kinase est essentielle pour la biogenèse de l'apicoplaste et pour l'apport en nutriments fournis par l'Hb, le tout médié par le trafic des vésicules dans le parasite. La PI3K semble également impliquée dans la résistance à l'artémisinine, le traitement de première ligne contre *Plasmodium*. En effet, les

niveaux de PI3P et de PI3K semblent être un bon indicateur de la résistance. Ainsi, plus ces niveaux sont élevés, plus les marqueurs associés à la résistance à l'artémisinine le sont également<sup>102</sup>. Ces différents rôles essentiels de la kinase permettent d'envisager l'usage de celle-ci comme cible thérapeutique prometteuse pour l'élimination de la malaria<sup>99,102</sup>.

#### 1.3.2.1.2. PI4K (PI4P)

Une autre kinase qui semble fort prometteuse comme cible thérapeutique est celle de PI4P (PI4K). Cette dernière permet de contrôler la concentration ainsi que la distribution intracellulaire de PI4P et offre la possibilité à la membrane plasmique d'entourer les mérozoïtes en formation de façon efficace<sup>103</sup>. Cette dernière est, tout comme PI3K, envisagée comme traitement potentiel pour vaincre le parasite puisqu'elle peut être visée par une nouvelle classe d'antimalariaux, les imidazopyrazines<sup>103</sup>. Le composé MMV048 est même en essai clinique de phase II tandis que d'autres composés constituent de bons candidats pour des études précliniques<sup>104,105</sup>. Un autre aspect fort comparable à la kinase précédente est le fait que PI4K semble également tenir un rôle dans la résistance à l'artémisinine. En effet, son rôle dans un sentier métabolique lié à la résistance a récemment été établi<sup>106</sup>. Ainsi, deux kinases différentes peuvent avoir des rôles différents, mais des répercussions similaires. Elles peuvent ainsi constituer deux cibles thérapeutiques intéressantes.

#### 1.3.2.1.3. Phospholipase C (PI(4,5)P<sub>2</sub>)

Tel que mentionné précédemment, la PLC possède un domaine permettant de cliver le PI(4,5)P<sub>2</sub> en seconds messagers<sup>85</sup>. Cette lipase est également liée à la cascade de signalisation du calcium, une étape essentielle à plusieurs étapes du cycle cellulaire, notamment dans l'activation et la différenciation des gamétocytes<sup>107</sup> ainsi que dans la libération des mérozoïtes<sup>108</sup>. La PLC constitue également un élément important de la voie de signalisation de *P. falciparum* permettant une invasion efficace<sup>109</sup>. L'absence de cette lipase pourrait donc possiblement entraîner plusieurs problèmes dans la différenciation, la croissance et la propagation du parasite dans ses hôtes.

Toutes ces informations sur les PIP et leurs effecteurs, tant chez les eucaryotes que ce qui est connu à ce jour chez *Plasmodium*, nous laissent entrevoir le rôle essentiel de ces molécules dans la survie du parasite de la malaria. L'étude plus poussée de celles-ci pourrait ainsi

constituer un grand avancement dans notre compréhension de cette maladie et dans l'élimination de ce fléau.

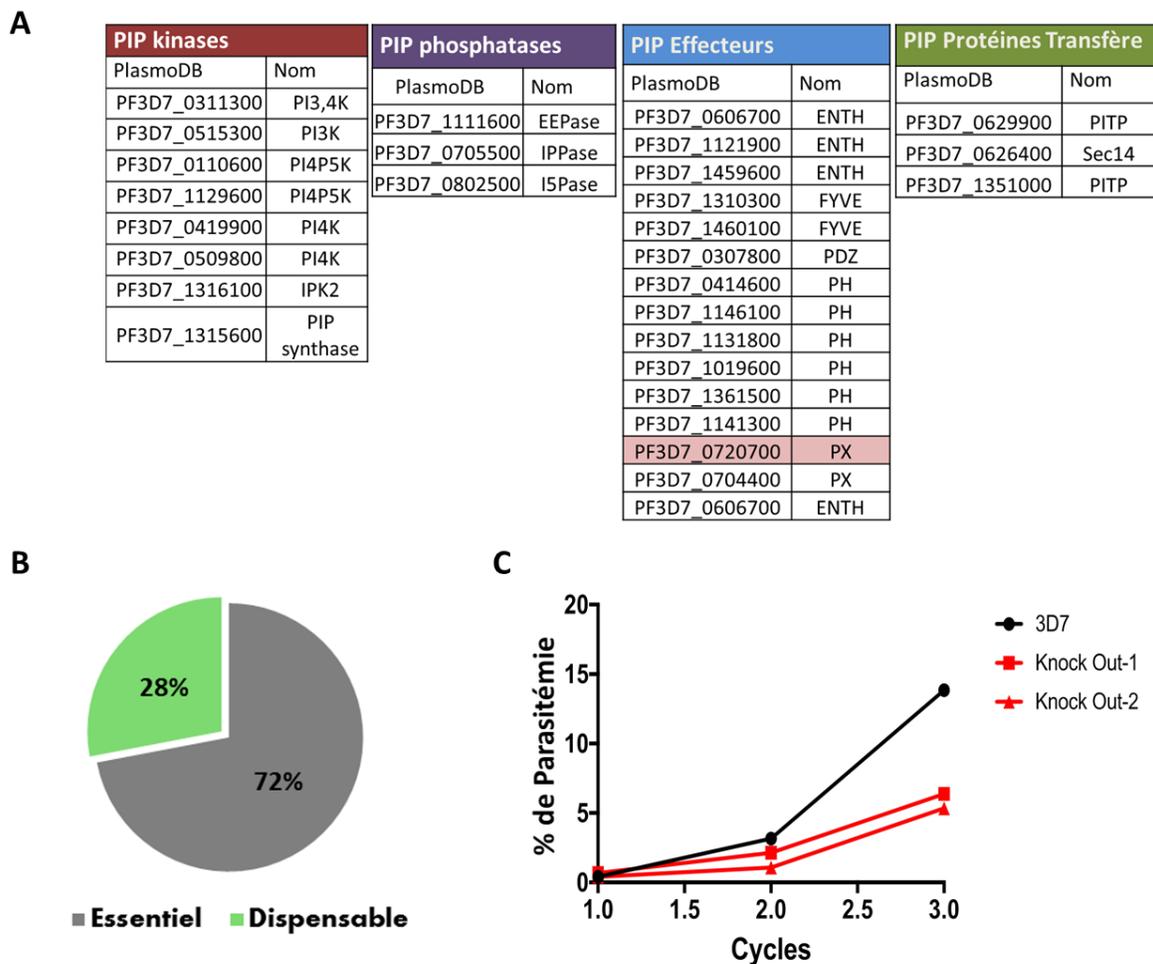
## **1.4. Problématique**

Face à l'augmentation récente du nombre de cas de malaria, il devient urgent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette recherche s'avère toutefois être une course contre la montre entre la découverte de nouveaux traitements et le développement de la résistance aux traitements existants. L'apparition de plus en plus rapide de la résistance force les chercheurs à redoubler d'ardeur dans la recherche d'un vaccin efficace contre ce fléau mondial.

Le peu d'étude sur les PIP et leur rôle possiblement essentiel dans plusieurs fonctions du parasite ont poussé mon équipe à s'intéresser davantage à ces lipides et à leurs effecteurs. Pour ce faire, une étude bio-informatique élargie dans la base de données PlasmoDB a permis d'identifier 36 effecteurs potentiels de la voie métabolique des PIP (Figure 11A). Pour chacun des candidats, une inactivation génique a été tentée afin d'établir quelles protéines sont essentielles au stade érythrocytaire du parasite. Pour ce faire, la transfection d'un vecteur contenant seulement un petit segment N-terminal du gène, permet la recombinaison homologue dans le parasite et la translation du gène sauvage loin de son promoteur, le rendant ainsi inactif. Dans 72% des cas, il fut impossible d'inactiver le gène d'intérêt, signe que la protéine est essentielle à la survie du parasite (Figure 11B). Parmi les gènes dispensables, des courbes de croissance ont été effectuées afin de vérifier si l'inactivation du gène, bien qu'il ne soit pas essentiel, pourrait avoir une répercussion sur le développement et la prolifération du parasite. Une protéine en particulier, soit Pf3D7\_0720700, a montré une croissance du parasite grandement ralentie à la suite de son inactivation génique, suggérant que celle-ci pourrait avoir un rôle important pour le microorganisme (Figure 11C). Comme cette protéine contient un domaine de liaison aux PIP de type *Phox*, nous l'avons renommé PfPX. Ce domaine est souvent lié au PI3P, qui possède un rôle dans l'endocytose et le trafic de l'Hb. De plus, cette protéine est unique à *Plasmodium* et n'est pas présente chez *Toxoplasma*, un organisme faisant partie de la même famille des apicomplexés. Ce dernier est généralement mieux caractérisé, car il est plus facile à manipuler génétiquement.

Cette étude vise donc à caractériser la protéine PfpX chez le parasite de la malaria *Plasmodium falciparum*. Notre hypothèse de recherche est que la protéine PfpX jouerait un rôle important dans le développement du parasite par sa liaison avec les phosphoinositides, possiblement PI3P. Afin de bien caractériser cette protéine, nous avons deux buts précis :

1. Déterminer la localisation intracellulaire de PfpX tout au long du cycle érythrocytaire.
2. Caractériser une souche de parasite où le gène codant pour la protéine a été inactivé.



**Figure 11 : Résultats préliminaires de l'étude sur les effecteurs des PIP. A)** Listes des candidats de l'étude bio-informatique effectuée sur PlasmoDB avec PfpX en rouge, **B)** Pourcentage de gènes indispensables (essentiels) et dispensables selon les résultats des inactivations géniques effectuées, **C)** Courbe de croissance de PfpX-KO comparativement à la souche contrôle 3D7, *Image tirée des résultats obtenus par l'équipe de Dave Richard, Traduite par Marie-Ève Crochetière*



## 2. Matériels et méthodes

---

Cette étude est approuvée par le comité d'éthique de la recherche de la Société canadienne du sang (projet numéro 2015.001) et par le Comité éthique du CHU de Québec - Université Laval (projet numéro 2015-2230, B14-12-2230, SIRUL 104595).

### **2.1. Culture cellulaire de *Plasmodium falciparum***

Les parasites asexués de *Plasmodium falciparum* 3D7 sont maintenus dans 4% d'hématocrites (groupe sanguin O+) dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) complété avec 0.5% (m/v) d'Albumax (Invitrogen) et du NaHCO<sub>3</sub>. Le milieu est changé tous les deux jours. Les cultures sont incubées à 37°C dans un mélange gazeux contenant 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> et 90% N<sub>2</sub>. Les parasites sont observés par un microscope à fond clair trois fois par semaine par coloration de frottis sanguin avec 15% Giemsa, afin d'en déterminer le stade et la parasitémie. Lorsque la parasitémie est trop élevée, les parasites sont dilués dans du milieu frais afin de diminuer le nombre de cellules infectées et d'ainsi favoriser la survie et la croissance du parasite.

### **2.2. Synchronisation des parasites**

Les parasites peuvent être synchronisés avec une solution de 5% D-sorbitol. Cette dernière élimine la forme trophozoïte et schizont permettant d'obtenir une culture où tous les parasites sont sous la forme anneau, soit de 0 à 24 heures. Pour ce faire, la culture est centrifugée à 1200 rotations par minute (rpm) pour 5 minutes puis le culot de GR est resuspendu dans 3 volumes de D-sorbitol. Les parasites sont ensuite placés à 37°C de 5 à 10 minutes puis à nouveau centrifugés pour enlever l'excès de sorbitol. Le culot de parasite est ensuite remis en culture. Afin de diminuer l'intervalle de temps entre les parasites, une seconde synchronisation peut être effectuée 18 heures plus tard afin d'obtenir des parasites âgés de 18 à 24 heures. Différentes combinaisons de synchronisation furent effectuées dépendamment de la forme de parasite et de l'intervalle souhaités.

### **2.3. Construction des vecteurs pSLI et transfection**

Afin de marquer notre protéine d'intérêt avec une protéine fluorescente verte (GFP), environ 350 pb de l'extrémité C-terminale de PfPX ont été amplifiées avec les amorces 5'NotI-6999-PfPX et 3'MluI-stopless-PfPX et clonées en phase avec la GFP dans le vecteur pSLI-GFP-

hDHFR digéré avec NotI-MluI<sup>76</sup>. Les parasites ont été transfectés et les intégrants ont été sélectionnés comme décrit dans une étude précédente avec quelques modifications<sup>76</sup>. En bref, les parasites *P. falciparum* 3D7 ont été transfectés avec 100 µg de plasmide pSLI-PfPX-GFP purifié. La sélection positive des transfectants a été réalisée en utilisant 5nM WR99210 (WR). Afin de générer la souche PfPX-smHA, la GFP a pu être digérée du plasmide pSLI-PfPX-GFP avec MluI-SalI et remplacée par le marqueur smHA, soit une suite de 10 hémagglutinines provenant du virus de l'influenza. Le marqueur smHA a été amplifié du plasmide pJR118<sup>110</sup> avec les amorces 5'MluI-atgless-smHA et 3'SalI-smHA. Afin que la GFP soit couplée avec la protéine PfPX entière, et non pas seulement un segment de 350pb, le parasite doit intégrer le vecteur à son génome par recombinaison homologue.

**Tableau 1** : Amorces utilisées pour la construction des vecteurs pSLI

Amplification	Amorces	Séquences
<b>PfPX C-terminal</b>	5'NotI-6999-PfPX	ATAGCGGCCGCTTTTAGGTGGGACGATAAAAATC
	3'MluI-stopless-PfPX	ATAACGCGTAAAAAGTTGACAATCATTTCATC
<b>smHA</b>	5' MluI-atgless-smHA	ATACGCGTTACCCTTATGATGTGCCCGA
	3'revSalI-stopless-smHA	TAGTCGACAGCGTAGTCCGGGACATCGTAC

\_ : sites de digestion

## **2.4. Intégration du plasmide pSLI au génome du parasite**

Le plasmide pSLI est conçu pour permettre de sélectionner facilement les quelques parasites qui auront eu un évènement d'intégration, c'est-à-dire les parasites qui auront intégré dans leur génome le plasmide d'intérêt. Pour ce faire, la culture est divisée en trois de façon à atteindre environ 2% de parasitémie dans chacun d'entre eux. La faible portion de parasites où le plasmide a naturellement intégrée le génome est ensuite sélectionnée par l'ajout de 400 µg/ml de sel G418 disulfate (Néomycine, Sigma Aldrich). Après avoir changé le milieu durant 5 à 7 jours consécutifs, les parasites intégrants réapparaissent normalement dans les jours suivants (environ 10 jours). Une fois réapparus, les parasites sont à nouveau sélectionnés par l'ajout de WR afin de s'assurer que l'intégration soit complète. Il est ensuite possible de vérifier ces parasites intégrants par PCR (Section 2.6). Parfois, l'intégration

s'avère incomplète et la souche native est toujours détectée, c'est pourquoi la culture est divisée en trois afin d'augmenter les chances d'avoir au moins une bonne intégration (Figure 12B).

## **2.5. Isolation des parasites**

Afin d'isoler les parasites des GR, ces derniers sont lysés avec de la saponine 0.0375%. Pour ce faire, la culture est centrifugée à 1200 rpm pour 5 minutes puis le culot de GR est resuspendu dans 8ml de saponine et incubé sur glace pour 15 minutes. Après l'incubation, une centrifugation à 3000 rpm pour 5 minutes permet de culoter les parasites isolés. De nombreux lavages au PBS sont nécessaires pour éliminer les résidus de GR. Lorsque le surnageant devient clair, le culot peut être congelé à -80°C jusqu'à son analyse.

## **2.6. Vérification de l'intégration de PfpX par PCR**

L'intégration de pSLI-PfpX-GFP/smHA dans l'ADN des parasites est confirmée par PCR. Pour ce faire, de l'ADN génomique de la souche d'intérêt est produit à partir du culot de saponine à l'aide du kit *GenElute Blood Genomic DNA* (Sigma-Aldrich, SLBP4803V). L'ADN génomique est ensuite analysé par PCR afin de vérifier l'intégration du plasmide en 5', en 3' ainsi que la présence de la forme épisomale et la présence de la forme WT. Les paires d'amorces utilisées pour ce test sont les suivantes (Figure 12C-D):

**Tableau 2** : Amorces utilisées pour la confirmation de l'intégration des vecteurs pSLI-PfpX-GFP et pSLI-PfpX-smHA

Vérifications	Amorces	Séquences
WT	5' BglII-6378-PfpX	GCAGATCTGATTTCTAGAAATATTTGATATC
	3'UTR-PfpXint-rev	CATATGACGTTAGGAATGTGC
5'	Forintest-6643-PfpX	ATATACAAAACGATCAGAG
	3' revSall-stopless-smHA ou GFP85-rev	TAGTCGACAGCGTAGTCCGGGACATCGTAC ACCTTCACCCTCTCCACTGAC
3'	5' pARL-seq	TGGAATTGTGAGCGGATAAC
	3'UTR-PfpXint-rev	CATATGACGTTAGGAATGTGC
Épisome	5' pARL-seq	TGGAATTGTGAGCGGATAAC
	3' revSall-stopless-smHA ou GFP85-rev	TAGTCGACAGCGTAGTCCGGGACATCGTAC ACCTTCACCCTCTCCACTGAC

## **2.7. Construction de la souche pLN-PX-GFP**

Afin de marquer le domaine Phox de notre protéine d'intérêt avec une GFP, le domaine de PfPX a été amplifié avec les amorces 5'AvrII-PfPX et 3'XhoI-390-PfPX et cloné en phase avec la GFP dans pLN-GFP-BSD digéré avec AvrII-XhoI. Les parasites *P. falciparum* 3D7 ont été transfectés avec 100 µg de plasmide pLN-PX-GFP purifié. La sélection positive des transfectants a été réalisée en utilisant 200µg/ml de Blastocidine S. HCl (Wisent, 450-190-XL).

**Tableau 3** : Amorces utilisées pour la construction du vecteur pLN-PX-GFP

Amplification	Amorces	Séquences
PX domaine seul	5'AvrII-PfPX	ATACCTAGGATGATGGAAAGTTATTCAACATATGAATTTAAAG
	3'XhoI-390-PfPX	ATACTCGAGTTTTGTTATATTATCTAAGCAC

\_ : sites de digestion

## **2.8. Détermination de l'expression de PfPX par microscopie**

À l'aide de la microscopie, il nous est possible de vérifier l'expression de PfPX-GFP à différents stades du cycle érythrocytaire. Pour ce faire, 500µl de culture est incubé avec 1µl de 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich, 100ng/µl) pour 10 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. La culture est ensuite centrifugée à 1200 rpm pour 2 minutes et lavée une fois avec du milieu RPMI pour enlever le surplus de DAPI. Finalement, 2µl du culot sont placés sur lame et recouverts d'une lamelle pour être observés immédiatement au microscope GE Applied Precision Deltavision Elite qui comprend un objectif 100X 1.4NA et une caméra sCMOS. Les images sont ensuite déconvolutionnées avec le logiciel SoftWorx. La calibration chromatique du microscope a été effectuée avant les expériences d'imagerie. Une culture mixte ou synchronisée peut être utilisée dans le mesure où chaque stade du cycle soit observé.

## **2.9. Détermination de l'expression de PfPX par Western Blot**

Afin de confirmer l'expression de la protéine observée par microscopie, une analyse est faite par Western Blot. Des parasites pSLI-PfPX-smHA synchronisés aux différents stades du cycle ont été récoltés par saponine puis solubilisés dans du Sample Buffer (SB) (0.5M EDTA, 1M Tris, 4% SDS, 20% (v/v) glycérol, 6% (v/v) β-mercaptoéthanol, 0.2% bleu de

bromophénol). Les parasites sont ensuite incubés à 100°C pour 5 minutes afin de lyser les cellules et dénaturer les protéines. Les échantillons sont ensuite placés sur gel de 7% polyacrylamide avec un marqueur de taille (Precision plus Protein All blue, Bio-rad, 161-0373) et transférés toute la nuit à 4°C, 20V, sur une membrane PVDF (Immobilon, K5SA0968D) activée au méthanol. La membrane est lavée trois fois dans une solution de TBS-T (200mM Tris, 3M NaCl, 1% Tween-20), puis bloquée dans une solution contenant 4% de lait en poudre dans du TBS-T. La membrane est ensuite incubée environ 3 heures à température pièce avec un anticorps reconnaissant la portion HA (mouse 1 :2000, Cedarlane, CLH104AP). Après trois lavages de 5 minutes dans le TBS-T, la membrane est traitée avec l'anticorps secondaire approprié, jumelé à une peroxydase (Horse radish peroxydase). Tous les anticorps sont préparés dans la solution de blocage. Finalement, la membrane est lavée trois fois au TBS-T puis traitée à l'ECL (Clarity western ECL, BioRad) pour permettre à la peroxydase de produire de la lumière pouvant être détectée par des films photosensibles (Blu-Lite UHC, MTC Bio, A8815) indiquant la présence de notre protéine d'intérêt.

## **2.10. Quantification de la dégradation de PfPX**

La quantification de la dégradation de PfPX-smHA dans le Western blot généré plus tôt fut calculée à l'aide du logiciel Fiji et du protocole établi par M. Davarinejad<sup>111</sup>. Pour ce faire, les films de Western blot ont été numérisés et analysés avec le logiciel. Les paramètres de mesure sont modifiés afin de seulement acquérir la valeur de gris moyenne (Analyse→Set Measurements→Grey Mean Value seulement). Un rectangle est dessiné autour des bandes de dégradation les plus larges, afin que celui-ci puisse convenir à toutes les régions à analyser par la suite. Le rectangle est sauvegardé afin d'utiliser toujours les mêmes dimensions pour toute l'analyse. Ainsi, on vient entourer avec notre rectangle la région dégradée pour chaque échantillon sur le gel et on prend la mesure pour chacune (Analyse→Measure). La même procédure est suivie pour une région sans bande en dessous ou au-dessus de la région dégradée qui sera considérée comme le bruit de fond. On fait de même avec la bande non dégradée et l'aldolase, avec la même grandeur de rectangle et une région adjacente. Par la suite, on inverse chacune des mesures prises (255-X) et on soustrait le bruit de fond à la mesure des protéines. Les résultats sont ensuite normalisés par rapport à la quantité d'aldolase. Pour ce faire, on ramène la valeur d'aldolase à 1 pour les anneaux et l'on ajuste pour les autres stades avec un produit croisé. Enfin, on multiplie les valeurs de protéines

complètes ou celles dégradées par le facteur de normalité. Le ratio des protéines dégradées sur les protéines totales (dégradées + non-dégradées) sont calculés pour chaque échantillon. Le graphique est ensuite généré sur Microsoft Excel.

### **2.11. Localisation de PfPX par immunofluorescence**

Pour les tests d'immunofluorescence, les parasites pSLI-PfPX-GFP ont été fixés sur des lames à l'aide de paraformaldéhyde à 4% (ProSciTech) et perméabilisés avec du Triton 0.1%. Après blocage dans l'albumine de sérum bovin à 3% (BSA) (Sigma Aldrich), les cellules ont été incubées pendant 1 heure avec un anti-Centrin de souris (1 :100) (Milipore, 04-162-4MI), un anti-ERD2 de lapin (1 :2000) (MRA-72), un anti-MSP1 de lapin (1 :2000) (Sash) et un anti-RAP1 de souris (1 :2000) (Cowman). Les lames sont finalement montées en ajoutant 5µl de milieu de montage Vectashield contenant 0,1µg/ml de Dapi (Vector Labs). Pour la colocalisation avec les protéines Rab5 (A, B et IP), une transfection des plasmides pHSP86-mCherry-Rab5x-DHODH dans les parasites pSLI-PfPX-GFP fut nécessaire. Par la suite, ces parasites peuvent être incubés avec du DAPI et observés au microscope tel que décrit dans la section *Détermination de l'expression de PfPX par microscopie*. La prise d'image fut la même que dans cette section.

### **2.12. Décompte des vésicules contenant l'hémoglobine par IFA**

Pour déterminer la présence et la localisation de l'Hb dans les vésicules et à la membrane de la VD, les parasites sont synchronisés une première fois puis resynchronisés 30 heures plus tard pour avoir des parasites de 0 à 6 heures. Après 24 heures (24-30h) et 30 heures (30-36h) en culture, ceux-ci sont isolés par traitement saponine 0.1%, incubés 10 minutes sur glace puis lavés plusieurs fois avec du PBS. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1 ml de PBS et immobilisé par centrifugation à 1200 rpm pour 2 minutes sur des lamelles traitées la veille à la poly-L-lysine. Les parasites non attachés sont enlevés par lavage avec du PBS puis les parasites sont fixés 15 minutes dans du PBS contenant 4% (m/v) de paraformaldéhyde et 0.25% (m/v) de glutaraldéhyde. Après un lavage au PBS, la membrane des parasites fixés est perméabilisée avec du PBS 0.5% (v/v) Triton 100X suivi de 20 minutes dans le PBS 0.15M glycine pour neutraliser les aldéhydes. La lamelle est ensuite incubée dans la solution de blocage (3% BSA dans du PBS) pour 30 minutes suivi d'une incubation d'une heure dans la solution de blocage contenant une dilution 1:1000 d'anti-Hb Humaine produit chez la chèvre

(Cedarlane). Après quelques lavages au PBS, la lamelle est incubée une autre heure dans la solution de blocage contenant une dilution 1:500 d'anti-chèvre-IgG-Alexafluor-594 d'âne (Cedarlane). Finalement, la lamelle est lavée plusieurs fois au PBS, puis montée sur une lame de microscope tel que décrit précédemment (voir *Localisation de PfPX par immunofluorescence*).

### **2.13. Cavitation à l'azote**

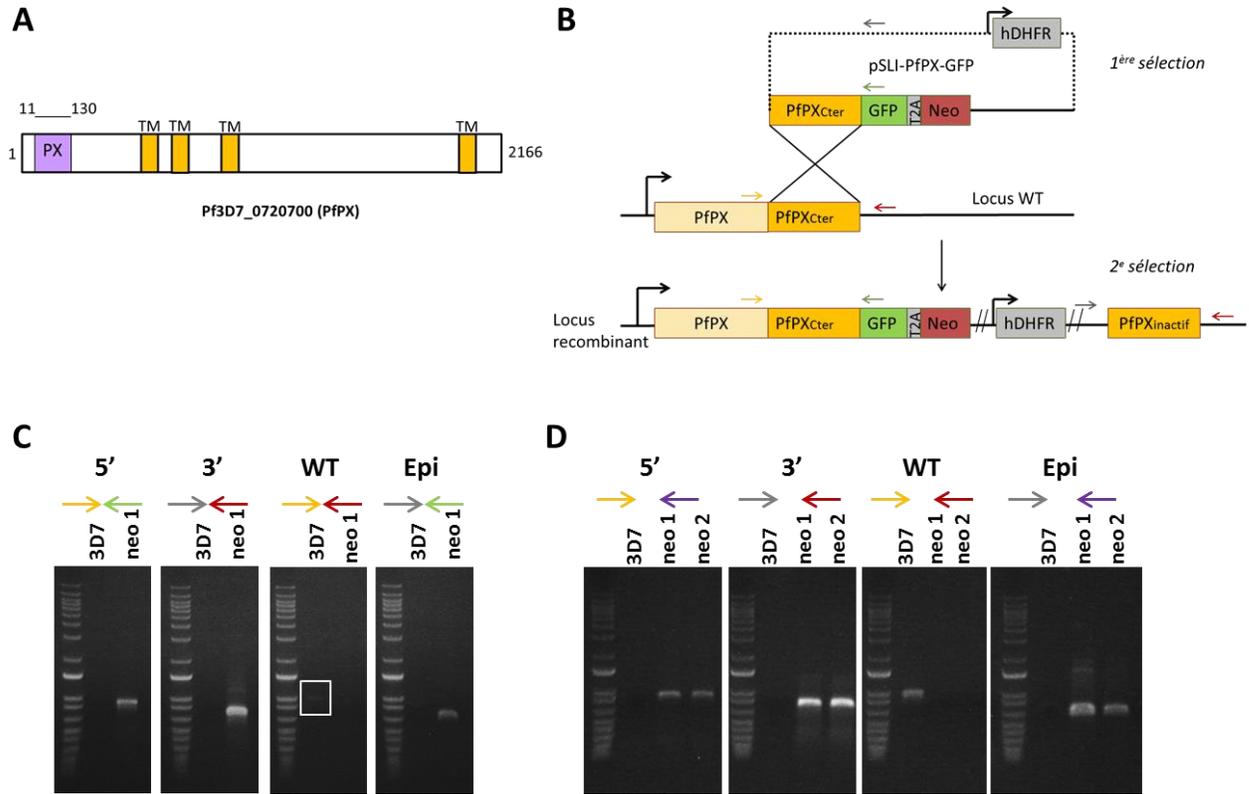
Afin de déterminer si la dégradation de PfPX observée par Western blot est causée par sa dégradation dans la VD lors du trafic des vésicules d'Hb à cet endroit, la VD fut séparée du reste du parasite par la formation de cavité dans la membrane grâce à l'azote (cavitation à l'azote). Les parasites sont synchronisés une première fois puis resynchronisés 30 heures plus tard pour avoir des parasites de 0 à 6 heures. Après 24 heures (24-30h), ceux-ci sont isolés par traitement saponine 0.1%, incubés 10 minutes sur glace puis lavés plusieurs fois avec du PBS. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1.7ml de tampon de cavitation (10mM Hepes, 10mM KCl, 1mM EDTA, 250mM sucrose, pH 7.4) et 0,3ml d'inhibiteur de protéase 7X (Roche, 11836170001). La chambre sous-pression est rincée avec le tampon avant d'y ajouter l'échantillon. L'azote est ajouté à la chambre à une pression de 49bar/800psi durant 30mins. L'échantillon est ensuite récupéré délicatement sur glace puis centrifugé à 2600 rpm pendant 10 minutes à 4°C (culot 1). Le surnageant est récolté et centrifugé une deuxième fois (culot 2). Le surnageant est finalement récolté et les échantillons sont solubilisés dans du SB avant d'être placés sur gels de 7% polyacrylamide. La suite est similaire à la méthode décrite à la section *Détermination de l'expression de PfPX par Western Blot*, sauf qu'un gel est incubé avec un anti-HA (mouse 1 :2000, Cedarlane, CLH104AP) et l'autre avec un anti-PM2 (rabbit 1 :2000, D. Goldberg<sup>112</sup>) à titre d'anticorps primaires.

## 3. Résultats

---

### **3.1. Génération de lignées PfPX-GFP et PfPX-smHA**

La base de données *PlasmoDB* nous a permis d'avoir une première idée des caractéristiques structurales de la protéine PfPX (Figure 12A). En effet, celle-ci nous informe que la protéine de 2166 acides aminés possède un domaine Phox en N-terminale ainsi que quatre domaines transmembranaires, soit trois suivant le domaine PX et un en C-terminale. À partir de ces données, nous avons pu générer deux lignées de parasite exprimant la protéine PfPX en fusion avec une GFP ou une chaîne de dix hémagglutinines (smHA) tel que décrit dans la section 2.3. Les plasmides pSLI-PfPX-GFP et pSLI-PfPX-smHA ont été ensuite transfectés et sélectionnés à l'aide de la méthode *SLI* tel que décrit précédemment (Figure 12B). L'intégration de ces plasmides dans le génome des parasites fut ensuite confirmée par PCR à l'aide de différentes paires d'amorces. Tel que le démontrent les résultats PCR, les deux souches de parasites, soit PfPX-GFP (Figure 12C) et PfPX-smHA (Figure 12D), ont bien intégré leur plasmide respectif dans leur génome, au niveau du gène *PfPX*. Ces souches ne présentent plus la forme native du gène (WT), mais possèdent toujours le plasmide sous forme épisomal. Ainsi, les parasites expriment maintenant la protéine en phase avec un marqueur GFP ou smHA. Ces résultats nous permettront d'établir l'expression et la localisation de PfPX dans le cycle de vie du parasite.

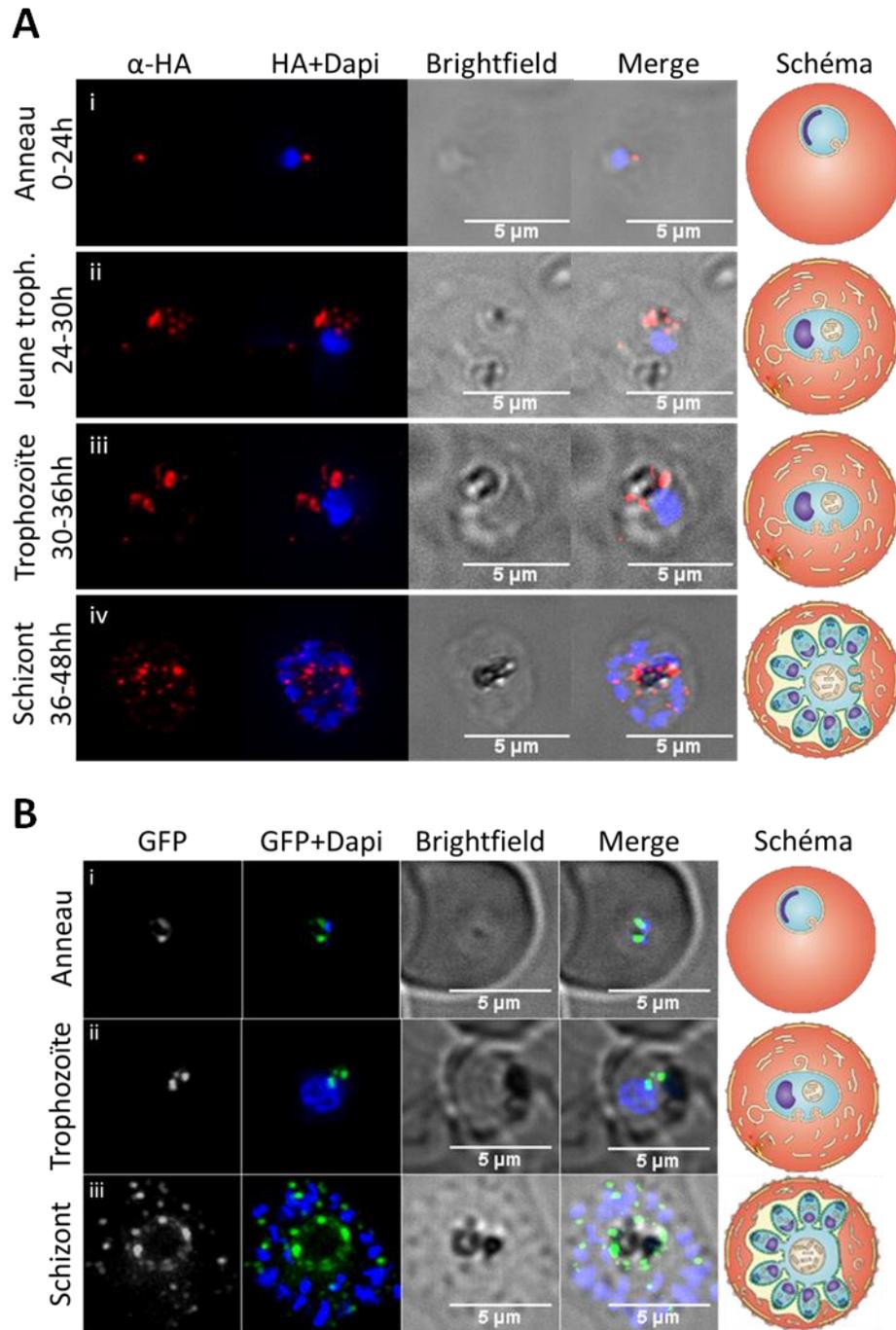


**Figure 12 : Génération et confirmation des souches de parasites PfPX étiquetées.**

**A)** Représentation schématique de PfPX selon les informations de la base de données *PlasmoDB*, PX : Domaine Phox, TM : Domaines Transmembranaires. **B)** Méthode d'intégration SLI pour les souches PfPX-GFP et PfPX-smHA, flèches : amorces utilisées pour tests PCR. **C)** Test d'intégration PCR de pSLI-PfPX-GFP, WT : *Wildtype*. Epi : Épisomale. 3D7 : souche contrôle, Neo 1-2 : Clone de sélection à la néomycine, Encadré : signal faible, mais positif. **D)** Test d'intégration PCR de pSLI-PfPX-smHA. Images produites par Marie-Ève Crochetière

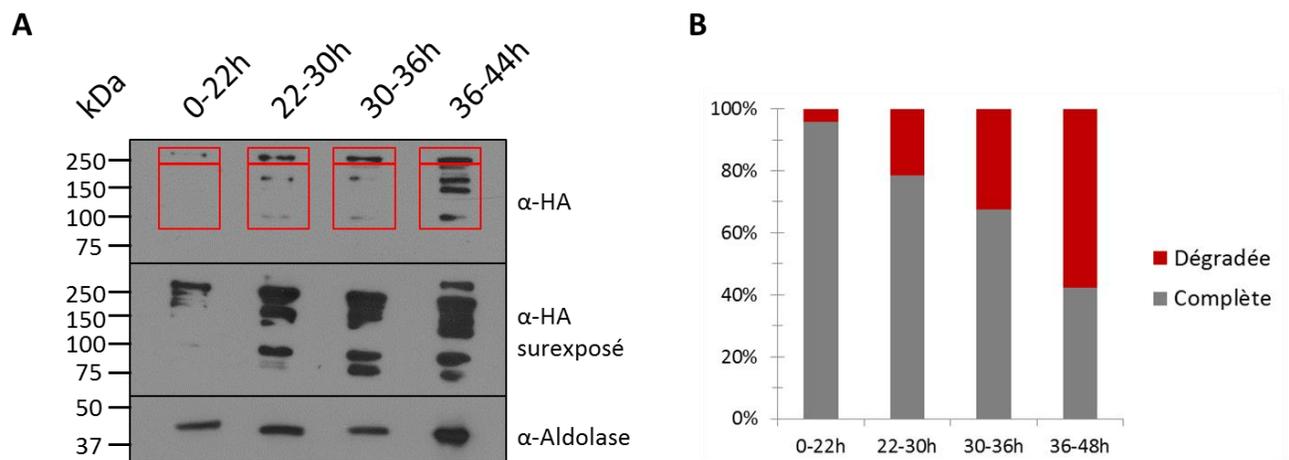
### 3.2. La protéine PfPX est exprimée tout au long du cycle érythrocytaire

Nous avons ensuite voulu vérifier l'expression intracellulaire de la protéine d'intérêt tout au long du cycle érythrocytaire à l'aide de la microscopie. Les souches PfPX-smHA (Figure 13A) et PfPX-GFP (Figure 13B) montrent un signal concentré autour de la vacuole digestive facilement visible en contraste de phase (Brightfield) et sous forme de points semblables à des vésicules.



**Figure 13 : Expression intracellulaire de PfpX tout au long du cycle érythrocytaire par microscopie. A) Essai d'immunofluorescence sur pSLI-PfpX-smHA avec un anticorps  $\alpha$ -HA. B) Microscopie Live sur pSLI-PfpX-GFP montrant l'expression de la GFP. Dapi : marqueur fluorescent d'ADN, Échelle de 5 $\mu$ m, Schémas tirés de ©2006 Nature Publishing Group, Images produites par Marie-Ève Crochetière**

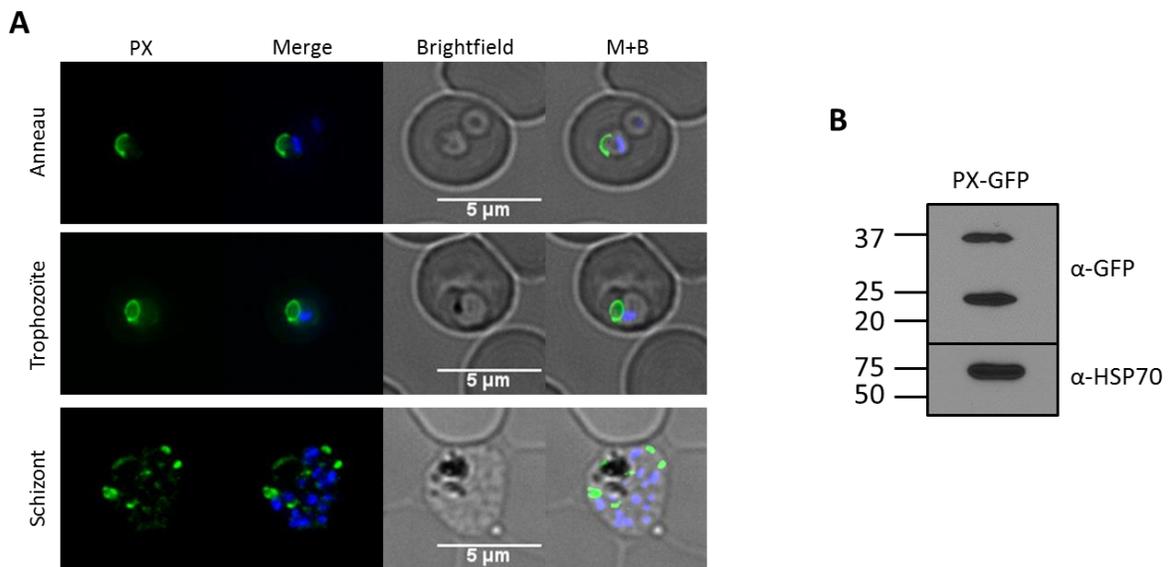
Pour confirmer les résultats d'expression obtenus par microscopie, un Western blot sur des extraits protéiques de parasites à différents stades du cycle a été effectué. Pour ce faire, des parasites synchronisés sont récoltés à différents moments du cycle afin de voir la progression de l'expression avec le temps. La protéine aldolase, exprimée de façon constitutive, est utilisée comme contrôle de charge afin de confirmer que les protéines extraites d'un même nombre de parasites soient placées sur gel pour chaque stade. Encore une fois, on remarque que la protéine PfPX est détectée à tous les stades du cycle (Figure 14A). Néanmoins, on remarque une accumulation des produits de dégradation plus le cycle progresse. En effet, au stade anneau, très peu de dégradation est observée même lorsqu'on surexpose le film. Les trophozoïtes montrent quelques produits de dégradation plus faibles que la protéine complète (~275kDa). Au stade schizont, les produits de dégradation prennent beaucoup plus d'ampleur, mais l'aldolase nous indique un nombre légèrement plus élevé de protéines dans cette fraction qu'il faudra normaliser. En quantifiant et normalisant la protéine complète et les produits de dégradation avec le logiciel Fiji, on observe bien l'augmentation de la dégradation au cours du cycle de vie du parasite (Figure 14B). Ainsi, plus le parasite se développe, plus la protéine PfPX est dégradée, une caractéristique qui pourrait être un indicateur du rôle de cette protéine.



**Figure 14 : Expression intracellulaire de PfPX et sa dégradation tout au long du cycle de vie.** A) Western blot de pSLI-PfPX-smHA à différents stades avec les anticorps  $\alpha$ -HA et  $\alpha$ -Aldolase (contrôle parasitaire), Encadrés : régions utilisées pour la quantification de la dégradation. B) Pourcentage de PfPX complète et dégradée basé sur les bandes identifiées sur l'immunobuvardage, normalisé selon l'aldolase et quantifié avec le logiciel Fiji. *Images produites par Marie-Ève Crochetière*

### 3.3. Le domaine PX seul est suffisant pour la localisation de la protéine

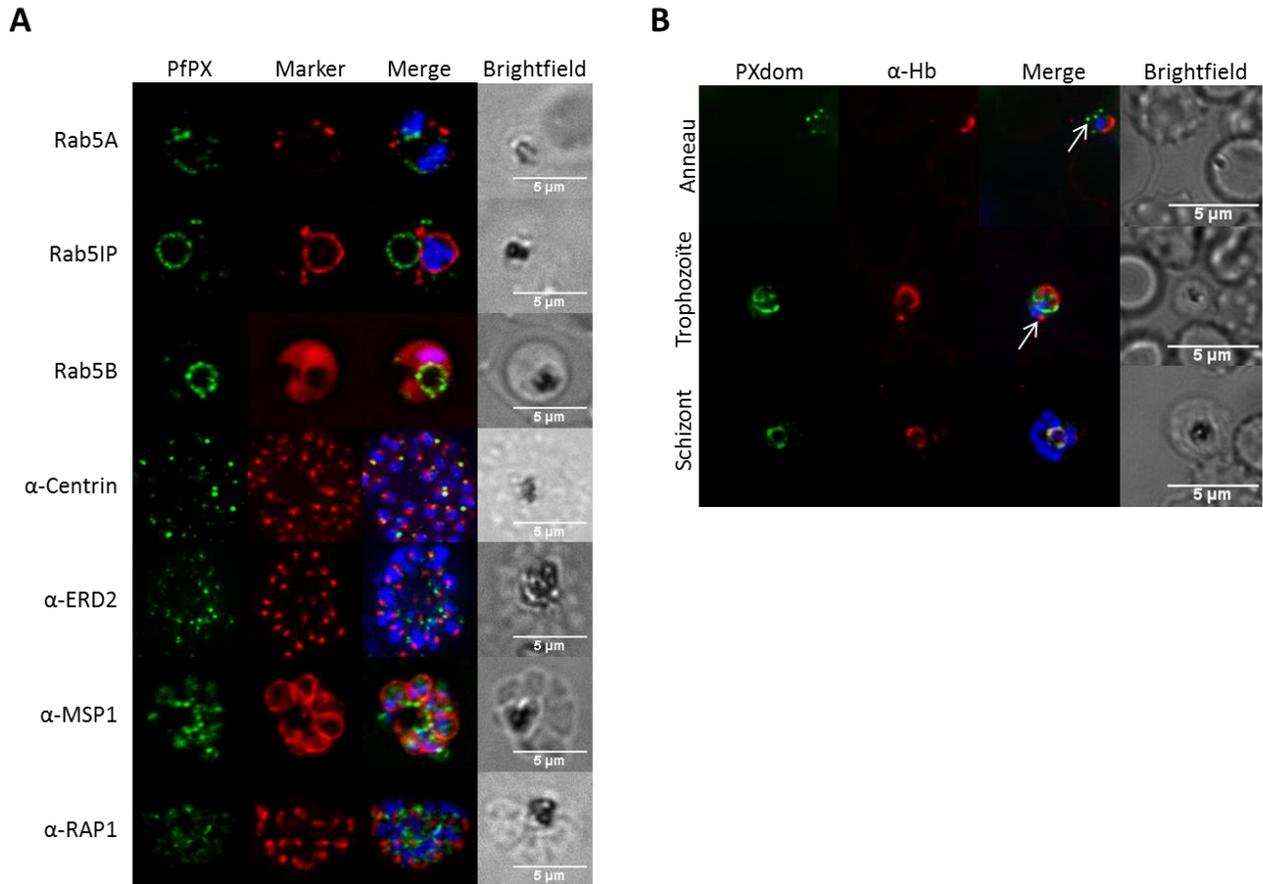
Nous avons également tenté de voir si le domaine PX que contient la protéine est important pour sa localisation. Ainsi, un plasmide pLN-PX-GFP a été transfecté dans une souche de parasite sauvage (3D7) tel que mentionné précédemment. La localisation du domaine seul a pu être observée par microscopie grâce à la GFP qui lui est fusionnée (Figure 15A). Cela nous a permis d'observer une localisation à la VD et dans des vésicules tel qu'observer précédemment chez la protéine complète, et cela pour chaque stade du cycle érythrocytaire (Figure 13). Le signal de la protéine complète semble toutefois plus ponctué comparativement au domaine seul qui forme une arc à la membrane de la VD. Un Western blot a également été effectué afin de vérifier l'expression du domaine PX (Figure 15B). La protéine HSP70, exprimée tout au long du cycle, sert ici de contrôle parasite, au même titre que l'aldolase précédemment. Cette expérience a permis d'observer la bande désirée, soit d'environ 37kDa, mais aussi de détecter un produit de dégradation équivalent à la GFP seule.



**Figure 15 : Expression du domaine PX seul durant le cycle érythrocytaire. A)** Microscopie sur pLN-PX-GFP montrant l'expression de la GFP tout au long du cycle érythrocytaire, Dapi : marqueur fluorescent d'ADN, M+B : Merge et Brightfield ensemble, Échelle de 5µm. **B)** Western blot α-GFP et α-HSP70 (contrôle parasite) montrant la dégradation du domaine PX. *Images produites par Marie-Ève Crochetière*

### **3.4. La protéine PfPX pourrait être impliquée dans le trafic de l'hémoglobine**

Nous avons ensuite tenté de déterminer plus précisément la localisation de la protéine dans le parasite. À l'aide de différents marqueurs intracellulaires spécifiques et de la microscopie, nous avons pu comparer la localisation du signal de différents organites du parasite avec le signal de PfPX observé. Les différents essais d'immunofluorescences présentés à la figure 16A nous permettent de voir que la protéine PfPX ne colocalise avec aucun des marqueurs testés. Ainsi, la protéine ne semble pas localisée aux rhoptries (RAP1), au Golgi (ERD2), au réticulum endoplasmique (Rab5IP), au centrosome (Centrin), au cytosol (Rab5B) ni à la membrane plasmique (MSP1). Elle ne colocalise pas non plus avec la protéine Rab5A connue pour être impliquée dans le transport des endosomes. Il faut remarquer que Rab5B est situé au niveau du cytosol et non dans les endosomes. Nous avons aussi tenté une colocalisation avec un marqueur de l'apicoplaste, mais nous n'avons pas réussi à obtenir une bonne expression de ce dernier. Puisque le domaine PX seul possédait un signal GFP très fort et très semblable au signal de PfPX-GFP, nous avons procédé à une immunofluorescence sur cette souche avec un anticorps contre l'Hb (Figure 16B). Cela nous a permis de constater que PfPX était localisé à proximité de l'Hb dans la VD, mais que les points observés pour la protéine d'intérêt ne semblent pas correspondre à des vésicules d'Hb. Néanmoins, la localisation particulière de PfPX, soit à la membrane de la VD et dans des structures semblables à des vésicules (Figure 15), ainsi que sa proximité avec l'Hb nous laisse penser que la protéine pourrait avoir un lien avec cette molécule essentielle au parasite. Nous avons donc émis une nouvelle hypothèse étant que la protéine PfPX pourrait être impliquée dans la fusion des vésicules d'Hb avec la VD.

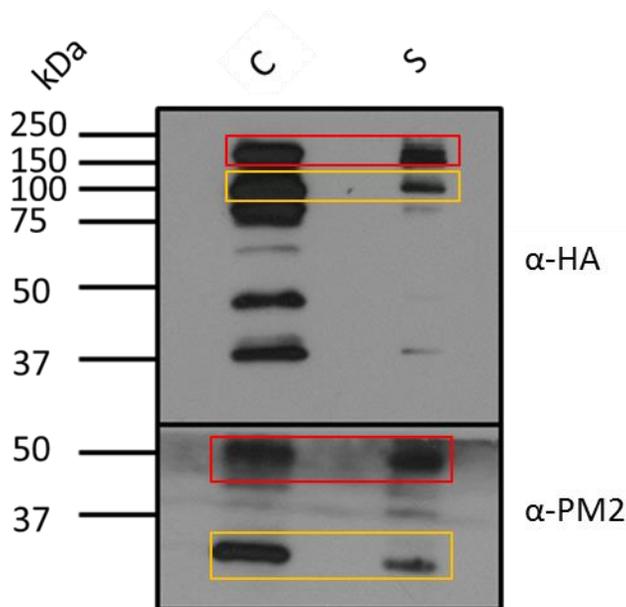


**Figure 16 : Localisation intracellulaire de la protéine PfPX. A)** Essais d’immunofluorescence pour déterminer s’il y a colocalisation entre PfPX (GFP : Vert) et des marqueurs de différentes structures cellulaires (Rouge), Rab5A : endosomes, Rab5IP : RE, Rab5B : cytosol, Centrin : centrosome, ERD2 : golgi, MSP1 : membrane plasmique, RAP1 : rhoptrie. **B)** Essai d’immunofluorescence entre la GFP de pLN-PX-GFP (PXdom : Vert) et l’hémoglobine (Rouge), Flèches : vésicules. Dapi : marqueur fluorescent d’ADN, Échelle de 5µm. *Images produites par Marie-Ève Crochetière*

### 3.5. PfPX est dégradée dans la vacuole digestive

Afin de tenter de valider notre nouvelle hypothèse et d’expliquer la dégradation de PfPX observée pour les deux immunobuvardages effectuées (Figure 14 et 15), nous avons séparé la fraction vésiculaire du parasite de la fraction contenant la vacuole digestive. Sachant que l’Hb est dégradée par des protéases à la VD, nous pensons que si la protéine PfPX est impliquée dans son transport, elle pourrait aussi être dégradée à la VD. Ainsi, par cavitation à l’azote, nous avons séparé la VD des vésicules selon la méthode décrite plus haut. La PM2 a été utilisée comme contrôle puisqu’il est connu que cette protéine est dégradée à la VD<sup>112</sup>. Celle-ci nous permet donc de vérifier la contamination éventuelle par la VD dans nos échantillons. On peut voir que la fraction soluble (S), soit la fraction vésiculaire où la VD a

été retirée, contient beaucoup moins de produits de dégradation que le culot (C), soit la VD séparée (Figure 17).

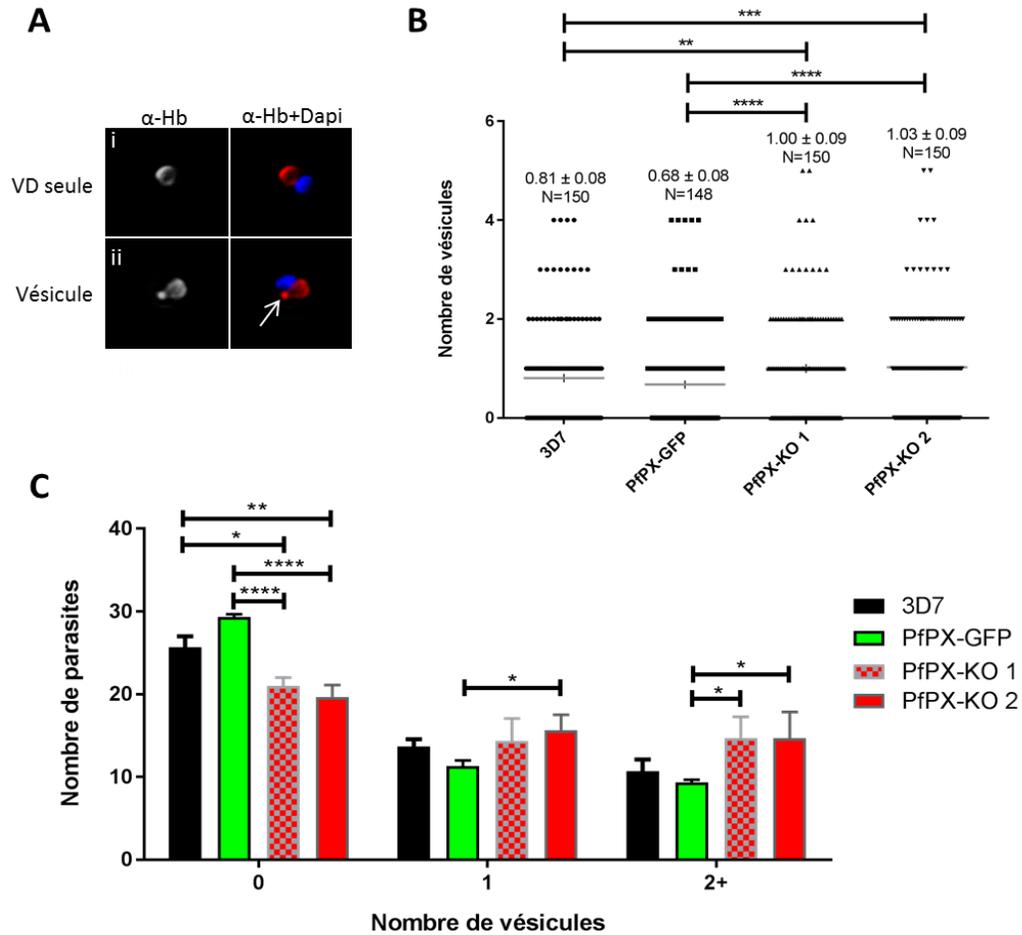


**Figure 17 : Dégradation de PfPX observée avec ou sans la vacuole digestive (VD).** Western blot avec les anticorps  $\alpha$ -HA et  $\alpha$ -Plasmepsine II (PM2, contrôle) sur les échantillons de la cavitation à l'azote, C : culot ou VD, S : soluble ou fraction vésiculaire, PM2 : plasmepsine II, kDa : kilodalton, Encadrés rouges : protéines complètes, Encadrés jaunes : produits de dégradation. *Images produites par Marie-Ève Crochetière*

En effet, on détecte PfPX entier dans la fraction soluble avec très peu de produits de dégradation, comparativement au culot dans lequel on détecte de la protéine complète, mais majoritairement des produits de dégradation à 37, 50, 75 et 100 kDa. Le produit de dégradation à 100kDa est environ 10 fois plus faible dans la fraction vésiculaire alors que les bandes de protéine complète possède une différence moindre. Cette fraction du contrôle PM2 semble montrer la même tendance, soit une quantité plus faible du produit de dégradation (~35kDa) comparativement à la quantité de protéine entière (50kDa) contrairement au culot qui contient une part égale de chacun. Puisque la quantité de protéine totale dans les deux fractions est différente, on ne considère pas l'absence de bande dans notre analyse, mais bien le ratio entre la protéine complète et les produits de dégradation.

### **3.6. En absence de PfPX, l'hémoglobine tend à s'accumuler dans le parasite**

Nous avons ensuite tenté de caractériser davantage le rôle de la protéine PfPX en analysant une souche *knock-out* (KO), soit une souche où le gène codant pour la protéine est inactivé. Afin de confirmer notre nouvelle hypothèse que PfPX serait impliqué dans la fusion de l'Hb avec la VD, nous nous sommes intéressés à la quantité d'Hb présente chez deux clones de parasites PfPX-KO comparativement aux souches contrôles PfPX-GFP et 3D7. Pour ce faire, des immunofluorescences avec l'anticorps contre l'Hb ont été effectuées et le nombre de vésicules a été dénombré tel que décrit précédemment (Figure 18A). Ce dénombrement a permis de démontrer que les souches PfPX-KO comptent plus de vésicules que les souches contrôles (Figure 18B). Ce phénotype est toutefois observé seulement chez les jeunes trophozoïtes (24-30h), soit durant les premières heures d'une endocytose plus soutenue. Ces résultats ont également été démontrés par immunobuvardage par mon équipe de recherche (Annexe A). Il est également possible d'observer une différence dans le nombre de parasites ne contenant aucune vésicule d'Hb (Figure 18C). En effet, les souches contrôles possèdent plus de parasites sans vésicule que les souches PfPX-KO. Ces dernières possèdent toutefois plus de parasites contenant 2 vésicules ou plus. La microscopie nous a aussi permis d'observer des structures semblables à des vésicules géantes, contenant une grande quantité d'Hb (Annexe B). Cette caractéristique ne semble toutefois pas être spécifique aux souches PfPX-KO, bien que celles-ci possèdent parfois plus de vésicules géantes qu'une des souches contrôles. La granularité des parasites ainsi que le volume occupé par la VD ont également été analysés et ne démontrent pas de différences marquées entre les souches contrôles et les PfPX-KO (Annexe C).



**Figure 18 : Dénombrement des vésicules d'hémoglobine (Hb) dans les souches PfPX-KO et dans les souches contrôles pSLI-PfPX-GFP et 3D7. A)** Essai d'immunofluorescence avec  $\alpha$ -Hb permettant d'observer différents phénotypes et de dénombrer les vésicules visibles, **B)** Graphique du décompte des vésicules selon les différentes souches, KO 1 et 2 : proviennent de 2 clones différents **C)** Graphique du nombre de parasites contenant 0, 1 ou 2 et plus vésicules, N=50, 3 réplicats biologiques, graphiques effectués sur GraphPad, test statistique : Two-way ANOVA, intervalle de confiance 95%, \* : 0.0332, \*\* : 0.0021, \*\*\* : 0.0002, \*\*\*\* : <0.0001, *Images produites par Marie-Ève Crochetière*

## 4. Discussion

---

La caractérisation de la protéine PfPX a permis de démontrer que celle-ci est exprimée et semble dégradée durant tout le cycle érythrocytaire. Elle est localisée à la membrane de la vacuole digestive et dans des structures de type vésiculaire. Les vésicules observées chez PfPX-GFP et smHA ne semblent toutefois pas correspondre à des vésicules d'Hb. De plus, en absence de la protéine, les vésicules d'Hb tendent à s'accumuler dans le parasite, ralentissant ainsi son développement. Ces résultats suggèrent un rôle possible dans la fusion des vésicules d'Hb avec la VD. Néanmoins, la protéine n'est pas essentielle à la survie du parasite, suggérant ainsi un rôle secondaire. Nous proposerons ici différentes théories permettant d'expliquer nos résultats ainsi que les expériences permettant de vérifier ces théories.

### **4.1. Rôle possible de PfPX dans le trafic de l'hémoglobine**

Plusieurs caractéristiques de la protéine PfPX suggèrent un rôle dans le trafic de l'Hb de la cellule hôte vers la VD du parasite. En effet, la protéine est exprimée durant tout le cycle érythrocytaire suggérant un rôle dans un mécanisme précoce. L'endocytose et le transport de l'Hb est connu pour commencer au stade anneau, bien que la majorité de l'internalisation se produise au stade trophozoïte<sup>66,68</sup>. Les protéines nécessaires à ce mécanisme sont donc exprimées possiblement très tôt dans le cycle de vie comme c'est le cas pour PfPX. La base de données PlasmoDB montre d'ailleurs un patron d'expression similaire entre PfPX et les enzymes de digestion de l'Hb, soit PM1, PM2 et la falcipaine.

La localisation de la protéine à la membrane de la VD ainsi que dans des structures semblables à des vésicules vient également appuyer l'hypothèse du rôle de PfPX dans la fusion des vésicules d'Hb avec la VD. De plus, cette localisation est très similaire à celle de PX40, soit une protéine connue pour lier le PI3P, qui se localise à la VD, dans les endosomes et à l'apicoplaste<sup>100</sup>. Nous avons tenté d'établir une colocalisation entre la protéine PfPX et PX40, mais nous n'avons pas réussi à obtenir un bon signal pour cette protéine. Face à cet échec et devant les résultats de colocalisation avec l'Hb qui suggèrent que les vésicules

contenant PfPX ne sont pas des vésicules d'Hb, on ne peut qu'émettre la supposition que ceux-ci correspondent à des vésicules permettant exclusivement le transport de la protéine. En effet, il est possible que PfPX soit sécrétée par le Golgi ou le RE et ensuite transportée à l'aide de vésicules vers la VD où elle exercerait sa fonction. Certaines études mettent en évidence la variété de voies de sécrétion permettant la distribution des protéines liées au transport ou à la digestion de l'Hb. Que ce soit de l'appareil de Golgi vers les endosomes pour les protéines Rab<sup>113</sup>, du RE vers la VD pour une polymérase de l'hème potentielle<sup>114</sup> et pour le PfCRT<sup>115</sup> ou encore du RE vers les cytotomes puis vers la VD pour PM1<sup>116</sup>, plusieurs voies de sécrétion et de transport ont été identifiées à ce jour pour différentes protéines jouant un rôle dans l'internalisation et la digestion de l'Hb. Il ne serait donc pas étonnant que PfPX utilise un système de transport semblable afin d'atteindre la membrane de la VD, où elle jouerait potentiellement son rôle. Puisque nous n'avons pas vraiment observé la protéine à la membrane ou dans les cytotomes, il serait plus probable d'envisager que la protéine soit acheminée du RE ou de l'appareil de Golgi directement vers la VD. Néanmoins, aucune colocalisation n'a été observée entre notre protéine d'intérêt et ces organites. De plus, nous avons tenté d'inhiber le transport antérograde du RE à l'aide de la bréfeldine A (BFA) (BioLegend, 420601). Toutefois, nous n'avons pas pu établir de différence entre les échantillons traités et non-traités. Considérant l'expression très précoce de la protéine dans le parasite, il est possible que le traitement à la BFA n'ait pas l'effet escompté, car la protéine a potentiellement déjà quitté cet organite lors de l'initiation du traitement. Cette expression prématurée pourrait également expliquer pourquoi aucune colocalisation n'avait été établie entre ces composantes. En effet, il est souvent difficile de voir le stade anneau en microscopie et comme nous avons observé un phénotype de dégradation et d'accumulation de vésicule au début du stade trophozoïte, nous nous sommes attardés sur ce stade et les suivants pour les tests de colocalisation. Le test avec la BFA effectué sur de jeunes anneaux nous a toutefois permis d'observer une colocalisation occasionnelle entre PfPX et le RE dans de jeunes parasites, suggérant tout de même le passage de la protéine dans cet organite et sa sécrétion possible dans des vésicules par la suite.

L'hypothèse qui veut que PfPX joue un rôle dans la fusion des vésicules d'Hb est également appuyée par la présence de dégradation de la protéine tout au long du cycle de vie du parasite.

En effet, considérant que l'Hb est transporté à la VD pour y être digérée afin de fournir les nutriments nécessaires à la croissance du parasite, il est raisonnable de penser qu'une protéine impliquée dans sa fusion sera également digérée dans la VD. De plus, il existe une relation directement proportionnelle entre la dégradation de la protéine PfPX et son développement. Cela pourrait être expliqué par l'augmentation du transport de l'Hb vers la VD dès les premières heures du stade trophozoïte. Ce phénomène engendrerait également une augmentation de la fusion des vésicules et de la digestion de celles-ci avec l'Hb qu'elles contiennent. Ainsi, si PfPX permet cette fusion, qu'elle est localisée à la VD et qu'elle y est internalisée au même titre que les vésicules d'Hb, la dégradation de celle-ci serait proportionnelle à la dégradation de l'Hb. Cette théorie est également appuyée par le résultat de la cavitation à l'azote qui montre une dégradation fortement diminuée dans la fraction vésiculaire, suggérant ainsi que la majorité de la dégradation observée chez PfPX serait causée par la VD. Ce phénomène est également observé chez d'autres protéines, notamment PM1 et PM2. En effet, ces protéines de 50kDa sont exprimées dans le RE comme des pro-enzymes qui sont éventuellement transportées vers la VD via le cytotosome, où le faible pH permet de former des enzymes matures de 37kDa pouvant cliver l'Hb<sup>66,112</sup>. Le même phénomène est observé pour la protéase cystéique, la falcipaine qui fait 56kDa lors de son expression, puis est clivée à 28kDa dans la VD<sup>66</sup>. Ces enzymes jouent toutefois leur rôle dans la VD et ne sont pas entièrement digérées dans cet organite comme PfPX le serait potentiellement. Il pourrait être intéressant de reproduire cette expérience avec l'Hb comme contrôle de digestion. Aussi, pour vérifier une potentielle colocalisation entre PfPX et l'Hb, des gradients de sucrose pourraient être faits afin d'établir si ces deux molécules sont détectées dans les mêmes fractions vésiculaires. Il s'agit d'une méthode généralement plus sensible que la microscopie. La microscopie électronique avec des billes d'or pourrait également permettre de vérifier la présence de PfPX à la VD et son internalisation dans celle-ci.

Finalement, le rôle possible de PfPX dans la fusion des vésicules d'Hb est renforcé par l'accumulation de celles-ci en absence de la protéine. En effet, cette dernière semble avoir un rôle dans la fusion des vésicules avec la VD puisqu'on remarque une plus grande quantité de vésicules en microscopie et d'Hb totale par Western blot dans les parasites PfPX-KO. Ces

expériences ne semblent toutefois pas montrer d'autres répercussions à l'absence de la protéine chez le parasite puisque la granularité, le volume de la VD ainsi que la présence ou non de vésicules géantes ne semblent pas être affectés. Néanmoins, des expériences additionnelles ont permis de démontrer que l'absence de la protéine entraînait une sensibilité accrue à un inhibiteur de PI3K (LY294002) ainsi qu'une croissance plus faible dans un milieu pauvre en acides aminés. Ces résultats appuient notre hypothèse comme quoi PfPX joue un rôle dans le transport de l'Hb puisque les parasites qui ont déjà de la difficulté à assimiler l'Hb sont d'autant plus sensibles face à un deuxième traitement venant affecter ce mécanisme. Ces résultats renforcent le rôle secondaire, mais important, qu'exerce notre protéine chez *Plasmodium*. Ainsi, cette protéine dispensable pourrait permettre de stabiliser la liaison entre les vésicules et la VD le temps de leur fusion, constituer une liaison préliminaire ou encore faire partie d'un mécanisme de transport secondaire de l'Hb. Le rôle de PfPX pourrait donc être complémentaire à d'autres protéines, tel que VPS45 qui semble avoir un rôle essentiel dans le trafic vésiculaire de l'Hb<sup>79</sup>. Afin de prouver ces hypothèses, une analyse des partenaires d'interaction de PfPX, par immunoprécipitation et via le système BioID, serait nécessaire afin de mieux comprendre son rôle dans l'endocytose et le transport de l'Hb.

## **4.2. Rôle important des phosphoinositides pour PfPX**

Les phosphoinositides sont des éléments essentiels des cellules eucaryotes et possèdent une multitude de fonctions permettant la survie des cellules<sup>84,85,89</sup>. Une variété de domaines protéiques reconnaissent les PIP, ce qui permet le recrutement des protéines aux membranes intracellulaires et l'exécution de plusieurs fonctions importantes<sup>87,88</sup>. De ce fait, le domaine de liaison aux PIP joue, à lui seul, un rôle essentiel chez les différentes protéines effectrices. Ce phénomène fut prouvé en isolant le domaine PX de la protéine PfPX et en analysant la localisation de celui-ci. Nos résultats démontrent que le domaine PX seul possède la même localisation que la protéine PfPX entière. Cela suggère que ce domaine de liaison est suffisant et essentiel à la localisation de la protéine. Ce résultat appuie aussi notre hypothèse comme quoi PfPX joue un rôle important dans la cellule par sa liaison aux PIP, puisque la localisation particulière de celui-ci semble être déterminée par son domaine PX et par sa liaison avec les PIP dans des organites spécifiques de la cellule. Il serait toutefois intéressant d'analyser la

localisation de différents segments de notre protéine, avec ou sans domaines PX et transmembranaires, afin de mieux comprendre l'importance de chaque composante de PfPX dans sa localisation et sa fonction.

De plus, le rôle possible des PIP dans la fonction de PfPX est en partie appuyé par la localisation et le rôle de celui-ci, fort similaire à ce qui est connu de PI3P. En effet, le PI3P est localisé à la VD et dans les endosomes<sup>100</sup>. Ce PIP est aussi connu pour avoir un rôle dans l'endocytose et le transport vésiculaire<sup>91</sup>. Ainsi, la localisation de PfPX à la VD et dans des vésicules suggère que le domaine PX de la protéine pourrait lier le PI3P. L'accumulation des vésicules en absence de la protéine d'intérêt suggère également un rôle dans le transport vésiculaire, un rôle qui semble être partagé entre les deux sujets. Afin de confirmer la liaison de PfPX aux différents PIP, mon équipe de recherche a procédé à une technique nommée PIPstrips (Echelon Biosciences) qui permet de vérifier la liaison d'une protéine avec une variété de PIP sur une même membrane<sup>117</sup>. En purifiant le domaine PX de PfPX fusionné à la glutathion-s-transférase (GST) de façon recombinante et en l'exposant à cette membrane recouverte des différents PIP, on peut ensuite révéler avec un anticorps anti-GST, comme un Western blot, la présence ou l'absence de la protéine dans les régions prédéfinies des PIP. Cette méthode nous a permis de confirmer la liaison préférentielle de PfPX avec le PI3P, et des liaisons plus faibles avec quelques autres PIP. Il faut toutefois considérer que cette méthode utilise le domaine PX isolé et non la protéine complète. Dans cette perspective, nous testons présentement la liaison de PfPX aux PIP par les liposomes ainsi que par résonance des plasmons de surface (SPR). Par conséquent, la structure de la protéine PfPX entière pourrait venir restreindre ses liaisons avec les PIP et crée une plus grande spécificité. Cependant, tel que mentionné précédemment, le domaine PX isolé semble avoir la même localisation en microscopie que la protéine PfPX complète, ce qui suggère que la structure plus complexe de cette dernière ne modifie pas de façon significative sa liaison aux PIP dans le parasite.

### **4.3. Perspectives**

Depuis plusieurs années, l'objectif commun de la recherche sur le parasite de la malaria est la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Face à l'apparition de plus en plus rapide de la résistance aux antimalariaux existants et l'augmentation du nombre de cas dans les

dernières années, il devient urgent de redoubler d'efforts pour atteindre cet objectif. Puisqu'une grande partie des antimalariaux disponibles visent le transport et la digestion de l'Hb, il semble logique de penser que ce procédé constitue une cible idéale pour le développement de nouveaux traitements. Néanmoins, nos connaissances sur ce mécanisme sont limitées. L'étude du rôle de la protéine PfPX dans la fusion des vésicules d'Hb permet ainsi une meilleure compréhension de ce mécanisme essentiel dans le but d'éventuellement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes. Plusieurs expériences présentées dans cette étude ont permis d'établir le rôle dispensable de PfPX dans le transport de l'Hb chez *Plasmodium falciparum*. Cependant, il est possible que l'inhibition *in vivo* de PfPX soit létale pour le parasite, puisque les conditions *in vitro* sont beaucoup plus permissives et moins complexes que celles dans le corps humain. D'autres tests doivent toutefois être effectués afin de mieux comprendre les implications de la protéine dans la fusion des vésicules d'Hb en plus de définir ses partenaires d'interactions qui pourraient représenter des cibles thérapeutiques potentielles.

#### **4.3.1. Caractérisation plus poussée du rôle de PfPX.**

La caractérisation de la protéine PfPX effectuée jusqu'à présent nous a permis d'établir que celle-ci joue possiblement un rôle dispensable dans le transport de l'Hb dans la VD. Une caractérisation plus poussée de la protéine nous permettrait cependant de comprendre davantage son rôle dans le parasite. Tel que mentionné plus haut, le domaine PX semble être essentiel à la localisation de la protéine à la VD. Il serait toutefois intéressant de vérifier la localisation de la protéine en absence de son domaine PX et d'un ou de plusieurs domaines transmembranaires. Ainsi, de la même façon que nous avons généré la souche pLN-PX-GFP, nous sommes en voie de produire différentes souches de parasites contenant différentes parties de la protéine afin d'en analyser la localisation. Cela nous permettrait de mieux comprendre le rôle des différents domaines de la protéine et d'identifier les régions essentielles et dispensables de celle-ci dans le but de mieux comprendre son rôle dans le parasite. Cela nous permettrait par le fait même d'établir si la liaison de la protéine avec les phosphoinositides est vraiment essentielle à sa fonction ou si elle joue un rôle secondaire.

Puisque nous avons étudié exclusivement le rôle de la protéine dans les stades asexués du parasite, il pourrait être intéressant de vérifier si PfPX est présent chez les gamétocytes, le stade sexué de *Plasmodium*, et s'il semble y jouer un rôle. En effet, les jeunes gamétocytes, tout comme les stades asexués, internalisent et digèrent l'Hb afin d'obtenir les nutriments nécessaires à la synthèse protéique. Il est donc possible que PfPX joue également un rôle dans le trafic de cette molécule au stade sexué<sup>118</sup>. Afin de vérifier cette théorie, il nous suffit de soumettre nos parasites à un stress nutritif répété, en limitant les nutriments dans le milieu, afin d'induire la production de gamétocytes. Par la suite, la microscopie nous permettrait rapidement de voir si la protéine est toujours exprimée à ce stade et si elle semble avoir une localisation particulière. En effectuant la même chose chez les parasites PfPX-KO, nous pourrions voir si la production et la croissance des gamétocytes semblent affectées par l'absence de la protéine.

#### **4.3.2. Spécificité du domaine PX.**

Comme mentionné précédemment, la conformation de la protéine totale de PfPX pourrait affecter sa liaison aux PIP comparativement au domaine PX isolé. Toutefois, le génome de *Plasmodium* est riche en séquences AT. Puisque ce phénomène est rare chez les procaryotes, il serait difficile d'introduire la construction de la protéine complète d'une taille considérable dans les bactéries. Nous avons donc fait appel à d'autres techniques, en cours de réalisation par des collaborateurs, afin de démontrer la spécificité du domaine PX et de la protéine PfPX pour les différents PIP.

En premier lieu, l'utilisation de différents PIP sous forme de liposomes<sup>120,121</sup> permettrait d'imiter les membranes, comparativement aux PIPstrips où les différents lipides sont séchés à la surface d'une membrane de nitrocellulose. Pour ce faire, des vésicules multilamellaires contenant différents PIP sont placées en contact avec la protéine et peuvent ensuite être culotées pour vérifier la présence de PfPX à leur surface et ainsi déterminer les liaisons possibles avec les PIP. Cette expérience possède plusieurs avantages notamment le faible coût de la procédure, sa simplicité, sa spécificité et sa capacité à imiter les conditions physiologiques. Par la suite, la méthode de SPR<sup>119</sup> permet une étude approfondie des caractéristiques de liaison de la protéine comme le calcul d'affinité. Pour ce faire, des

vésicules lipidiques unilamellaires sont utilisées à la surface d'un capteur permettant de calculer la constante de dissociation. Cette méthode nous permet de vérifier la capacité du domaine PX à se lier aux PIP, mais également la spécificité et la force de ces liaisons. En plus, pour ces deux méthodes, il est possible d'analyser les répercussions d'une mutation dans le domaine PX sur ces liaisons avec les PIP et sur sa spécificité.

Ces différentes méthodes prises ensemble permettraient d'établir de façon claire et précise la spécificité du domaine PX de PfPX pour les PIP et d'ainsi préciser son rôle dans le parasite. En effet, si l'on démontre que ce domaine lie spécifiquement le PI3P, cela permettrait de venir appuyer notre hypothèse comme quoi PfPX joue possiblement un rôle dans le trafic de l'Hb vers la VD.

#### **4.3.3. Identification des partenaires d'interaction.**

Selon les résultats obtenus jusqu'à présent, plusieurs suppositions et théories ont été proposées pour tenter d'expliquer le rôle précis de la protéine dans la fusion des vésicules d'Hb avec la VD. L'identification des différents partenaires d'interaction de PfPX nous permettrait de mieux comprendre le rôle de celle-ci dans la fusion des vésicules d'Hb et de possiblement identifier d'autres protéines impliquées dans ce processus qui pourraient représenter de bonnes cibles thérapeutiques. Il existe plusieurs stratégies pouvant identifier les différentes protéines interagissant avec PfPX. Nous verrons donc les deux méthodes privilégiées chez *Plasmodium*.

La première méthode consiste à bloquer les liaisons entre la protéine PfPX et ses partenaires d'interaction avec du DSP (Dithiobis(succinimidyl propionate)). Cette molécule réagit avec les amines primaires présents sur différents acides aminés et permet une liaison amide stable entre les différentes protéines de l'échantillon. Par la suite, les parasites peuvent être récoltés et notre protéine isolée de l'échantillon à l'aide de billes recouvertes d'anticorps reconnaissant la GFP ou les HA, dépendamment de la souche de PfPX choisie. Les billes peuvent ensuite être purifiées et envoyées en spectrométrie de masse afin d'identifier les différents peptides présents sur les billes. Cette méthode nous permet ainsi de définir la nature des différentes protéines liant PfPX.

La deuxième méthode que nous testons présentement dans le laboratoire est nommée BioID<sup>122-125</sup>. Il s'agit d'une méthode testée sur *Toxoplasma* que nous tentons de transposer à notre étude de *Plasmodium*. Cette méthode nécessite la fusion de notre protéine d'intérêt avec la biotine ligase BirA de la même façon que nous avons fusionné PfPX avec la GFP et smHA. Cette ligase permet l'ajout de biotine aux protéines avoisinantes lorsque le milieu est enrichi de D-biotine. Il est ensuite possible de purifier ces protéines à l'aide de billes recouvertes de streptavidine, une protéine pouvant lier la biotine. Ultérieurement, de la même façon que pour la méthode précédente, les billes sont précipitées et envoyées en spectrométrie de masse afin de déterminer la nature des protéines avoisinant PfPX.

Finalement, il serait intéressant de vérifier la colocalisation de notre protéine d'intérêt avec la protéine VPS45 qui semble également affecter la fusion des vésicules d'Hb avec la VD. En effet, ces deux protéines semblent avoir une localisation et un rôle très semblable dans le parasite bien que VPS45 soit essentiel et présente un phénotype plus marqué<sup>79</sup>. De ce fait, comme nous avons fait pour le domaine PX seul, il nous faudrait fusionner la protéine VPS45 avec une GFP et transfecter cette construction dans la souche de parasite pSLI-PfPX-smHA. Il nous serait ensuite possible de voir la colocalisation de ces protéines par immunofluorescence avec un anticorps contre les HA fusionnés à PfPX et avec la GFP jumelée à VPS45 et exprimée en temps réel. Comme les tests précédents, cela nous permettrait d'établir la proximité ou l'interaction des deux protéines et d'ainsi confirmer le rôle possiblement complémentaire de PfPX.

## Conclusion

---

En somme, nous avons caractérisé une protéine effectrice des phosphoinositides, PfPX, qui semble avoir un rôle secondaire dans la fusion des vésicules d'Hb avec la vacuole digestive chez *Plasmodium*. Nous avons démontré que cette protéine dispensable est exprimée tout au long du cycle érythrocytaire et est localisée à la membrane de la vacuole digestive ainsi que dans des structures semblables à des vésicules. Nous avons également montré que PfPX semble dégradée surtout durant le stade trophozoïte et schizont ce qui nous indique que la protéine est possiblement internalisée et digérée dans la vacuole digestive. De plus, en absence de PfPX, les vésicules d'Hb tendent à s'accumuler dans le parasite durant les premières heures d'une endocytose plus soutenue. Toutefois, il ne semble pas y avoir d'autres répercussions de l'absence de la protéine, suggérant un rôle secondaire de PfPX dans ce mécanisme. Afin de confirmer et préciser le rôle de la protéine dans l'internalisation de l'Hb, il est primordial de déterminer ses partenaires d'interaction qui pourraient potentiellement constituer de bonnes cibles thérapeutiques.

En terminant, le combat contre le parasite de la malaria est loin de s'achever. Il est essentiel de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques afin de combattre le parasite plus rapidement qu'il développe une résistance contre les traitements. Pour ce faire, il est indispensable de bien connaître les mécanismes essentiels du parasite, notamment l'endocytose et le trafic de l'Hb. Notre équipe se concentre sur l'étude des effecteurs des phosphoinositides et sur la biogenèse du complexe apical, car nous croyons que ces mécanismes essentiels peuvent constituer des cibles importantes dans la recherche de traitements. Il existe néanmoins une multitude d'études à travers le monde s'intéressant à divers processus de la biologie de *Plasmodium* permettant d'améliorer chaque jour notre compréhension de la maladie et nos connaissances sur le parasite. Ces efforts nous permettent d'espérer trouver un jour un traitement efficace contre cette maladie. Nous devons toutefois redoubler d'efforts si nous voulons voir un monde sans malaria un jour.

# Bibliographie

---

1. Cox, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites and Vectors* **3**, 1–9 (2010).
2. OMS, U. Atteinte de la cible des OMD pour le paludisme: Inversion de la tendance entre 2000 et 2015. 1–33 (2015).
3. World Health Organization. *World malaria Report 2018*. (2018). doi:ISBN 978 92 4 1564403
4. OMS | Mortalité de l'enfant. *Who* (2013).
5. Sharma, P. & Chitnis, C. E. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 432–437 (2013).
6. Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D. & Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **167**, 610–624 (2016).
7. Organisation mondiale de la Santé. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030. 39 (2016).
8. OMS | Malaria. *Who* (2018).
9. Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. & Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**, 673–679 (2002).
10. Pouvelle, B., Buffet, P. A., Lépolard, C., Scherf, A. & Gysin, J. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* ring-stage-infected erythrocytes. *Nat. Med.* **6**, 1264–1268 (2000).
11. Melcher, M. *et al.* Identification of a role for the PfEMP1 semi-conserved head structure in protein trafficking to the surface of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Cell. Microbiol.* **12**, 1446–1462 (2010).
12. Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X. & Wellems, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med.* 2013 **19**, 156–167 (2013).
13. Perignon, J. L. & Druilhe, P. Immune Mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **89**, 51–53 (1994).
14. Ferreira, A. *et al.* Sickle hemoglobin confers tolerance to plasmodium infection. *Cell* **145**, 398–409 (2011).
15. Luzzatto, L. Sickle cell anaemia and malaria. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **4**, (2012).

16. Piel, F. B. *et al.* Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat. Commun.* **1**, (2010).
17. Taylor, S. M., Parobek, C. M. & Fairhurst, R. M. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **12**, 457–468 (2012).
18. Sinka, M. E. *et al.* A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and Vectors* **5**, 69 (2012).
19. Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G. & Sinden, R. E. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology* **115**, 1–7 (1997).
20. Billker, O. *et al.* Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**, 289–292 (1998).
21. Smith, R. C., Vega-Rodríguez, J. & Jacobs-Lorena, M. The *Plasmodium* bottleneck: Malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **109**, 644–661 (2014).
22. Sterling, C. R., Aikawa, M. & Vanderberg, J. P. The passage of *Plasmodium berghei* sporozoites through the salivary glands of *Anopheles stephensi*: an electron microscope study. *J. Parasitol.* **59**, 593–605 (1973).
23. Pimenta, P. F. P. *et al.* An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 23–47 (2015).
24. Frischknecht, F. *et al.* Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell. Microbiol.* **6**, 687–694 (2004).
25. Vanderberg, J. P. Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites. *J. Protozool* **21**, 527–537 (1974).
26. Parker, G. A. & Picut, C. A. Liver Immunobiology. *Toxicol. Pathol.* **33**, 52–62 (2005).
27. Mota, M. M. *et al.* Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science (80- )*. **291**, 141–144 (2001).
28. Rankin, K. E., Graewe, S., Heussler, V. T. & Stanway, R. R. Imaging liver-stage malaria parasites. *Cell. Microbiol.* **12**, 569–579 (2010).
29. White, N. J. & Imwong, M. *Relapse. Advances in Parasitology* **80**, (Elsevier, 2012).
30. Paul, A. S., Egan, E. S., Duraisingh, M. T. & Diseases, I. Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. *Curr Opin Hematol* **22**, 220–226 (2016).
31. Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W. H. & Duraisingh, M. T. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host Microbe* **22**, 232–245

- (2017).
32. Gaur, D. & Chitnis, C. E. Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 422–428 (2011).
  33. Riglar, D. T. *et al.* Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe* **9**, 9–20 (2011).
  34. Bakar, N. A., Klonis, N., Hanssen, E., Chan, C. & Tilley, L. Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Cell Sci.* **123**, 441–450 (2010).
  35. Cowman, A. F. & Crabb, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**, 755–766 (2006).
  36. Haldar, K., Murphy, S. C., Milner, D. A. & Taylor, T. E. Malaria: Mechanisms of Erythrocytic Infection and Pathological Correlates of Severe Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2**, 217–249 (2007).
  37. Ahead, L. Impact. (2011).
  38. Enayati, A. & Hemingway, J. Malaria Management: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 569–591 (2010).
  39. OMS. Journée mondial de lutte contre le paludisme 2017. 1–5 (2017).
  40. CISMeF. OMS | Paludisme. *Who* (2016).
  41. Achan, J. *et al.* Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. *Malar. J.* **10**, 144 (2011).
  42. World Health Organization. Treatment of Severe Malaria. *Guidel. Treat. Malar.* 71–88 (2015). doi:10.1016/0035-9203(91)90261-V
  43. Achan, J. *et al.* Effectiveness of quinine versus artemether-lumefantrine for treating uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children: Randomised trial. *BMJ* **339**, 283 (2009).
  44. Pagola, S., Stephens, P. W., Bohle, D. S., Kosar, A. D. & Madsen, S. K. Structure of Malaria Pigment B-Haematin 2000.Pdf. 307–310 (2000).
  45. Waller KL, Lee S, Fidock DA (2004) Molecular and cellular biology of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. In *Malaria Parasites: Genomes and Molecular Biology*, Waters AP, Janse CJ (eds) pp 501–540. Wymondham, U. C. A. P. No Title.
  46. WHO. ANTIMALARIAL DRUG COMBINATION THERAPY Report of a WHO Technical Consultation. *World Heal. Organ. Geneva WHO* 36 (2001). doi:10.1016/S1474-4422(08)70069-3
  47. Su, L. C. and X. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of

- artemisinin. **7**, 999–1013 (2010).
48. WHO. *Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance : 2000-2010*. (2010). doi:10.1016/j.str.2009.10.008.Identification
  49. Petersen, I., Eastman, R. & Lanzer, M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett.* **585**, 1551–1562 (2011).
  50. Fidock, D. A. *et al.* Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell* **6**, 861–871 (2000).
  51. Lakshmanan, V. *et al.* A critical role for PfCRT K76T in Plasmodium falciparum verapamil-reversible chloroquine resistance. *EMBO J.* **24**, 2294–2305 (2005).
  52. Martin, R. E. *et al.* Chloroquine Transport via the Malaria Parasite’s Chloroquine Resistance Transporter. *Source Sci. New Ser. Carbon Capture Sequestration* **325**, 1680–1682 (2009).
  53. Corbel, V. *et al.* Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: A cluster randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* **12**, 617–626 (2012).
  54. Hemingway, J., Field, L. & Vontas, J. An Overview of Insecticide Resistance The Anopheles Genome and Comparative Insect Genomics. *Science (80-. )*. **298**, 96–97 (2002).
  55. Diabate, A. *et al.* The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in Anopheles gambiae s.l. in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**, 617–622 (2002).
  56. T.L., R. *et al.* Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar. J.* **10**, 80 (2011).
  57. Fornadel, C. M., Norris, L. C., Glass, G. E. & Norris, D. E. Analysis of Anopheles arabiensis blood feeding behavior in southern zambia during the two years after introduction of insecticide-treated bed nets. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 848–853 (2010).
  58. Thu, A. M., Phyto, A. P., Landier, J., Parker, D. M. & Nosten, F. H. Combating multidrug-resistant Plasmodium falciparum malaria. *FEBS J.* **284**, 2569–2578 (2017).
  59. Alout, H., Roche, B., Dabiré, R. K. & Cohuet, A. Consequences of insecticide resistance on malaria transmission Malaria burden and control The threat of insecticide resistance. 3–7 (2017). doi:10.1371/journal.ppat.1006499
  60. European Medicines Agency. Mosquirix. **44**, (2015).

61. White, N. J. A Vaccine for Malaria. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1926–1927 (2011).
62. Hill, A. V. S. Vaccines against malaria. *Philos. Trans. R. Soc. B* **366**, 2806–2814 (2011).
63. Selidji Todagbe Agnandji, Bertrand Lell, S. S. S. and all. First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1863–1875 (2011).
64. WHO. Update on RTS , S Malaria Vaccine Implementation Programme. *Malar. Policy Advis. Comm. Meet.* (2018).
65. Sherman, I. W. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bull. World Health Organ.* **55**, 265–276 (1977).
66. Francis, S. E., Sullivan, D. J. & Goldberg, and D. E. Hemoglobin Metabolism in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum . *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 97–123 (2002).
67. Divo, A. A., Geary, T. G., Davis, N. L. & Jensen, J. B. Nutritional Requirements of Plasmodium falciparum in Culture. I. Exogenously Supplied Dialyzable Components Necessary for Continuous Growth. *J. Protozool* 59–64 (1985).  
doi:10.1006/expr.2001.4669
68. Milani, K. J., Schneider, T. G. & Taraschi, T. F. Defining the Morphology and Mechanism of the Hemoglobin Transport Pathway in Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes. *Eukaryot. Cell* **14**, 415–426 (2015).
69. Aikawa, M., Peter, K. H., Clay, G. H. & Helmuth, S. THE FEEDING MECHANISM OF AVIAN MALARIAL PARASITES. *J. Cell Biol.* **28**, 355–373 (1966).
70. Elliott, D. A. *et al.* Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2463–2468 (2008).
71. Lazarus, M. D., Schneider, T. G. & Taraschi, T. F. A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite Plasmodium falciparum Michelle. *J. Cell Sci.* **121**, 1937–1949 (2008).
72. Smythe, W. A., Joiner, K. A. & Hoppe, H. C. Actin is required for endocytic trafficking in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Cell. Microbiol.* **10**, 452–464 (2008).
73. Li, H. *et al.* Isolation and functional characterization of a dynamin-like gene from Plasmodium falciparum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 664–671 (2004).
74. Zhou, H. C., Gao, Y. H., Zhong, X. & Wang, H. Dynamin like protein 1 participated in the hemoglobin uptake pathway of Plasmodium falciparum. *Chin. Med. J. (Engl).* **122**, 1686–1691 (2009).

75. Thakur, V. *et al.* Eps15 homology domain containing protein of *Plasmodium falciparum* (PfEHD) associates with endocytosis and vesicular trafficking towards neutral lipid storage site. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 2856–2869 (2015).
76. Birnbaum, J. *et al.* A genetic system to study *Plasmodium falciparum* protein function. *Nat. Methods* **14**, 450–456 (2017).
77. Howe, R., Kelly, M., Jimah, J., Hodge, D. & Odoma, A. R. Isoprenoid biosynthesis inhibition disrupts Rab5 localization and food vacuolar integrity in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* **12**, 215–223 (2013).
78. Kibria, K. M. K., Hossain, M. U., Oany, A. R. & Ahmad, S. A. I. Novel insights on ENTH domain-containing proteins in apicomplexan parasites. *Parasitol. Res.* **115**, 2191–2202 (2016).
79. Jonscher, E. *et al.* PfVPS45 Is Required for Host Cell Cytosol Uptake by Malaria Blood Stage Parasites. *Cell Host Microbe* 1–8 (2019).  
doi:10.1016/j.cois.2017.06.009
80. Lew, V. L., Tiffert, T. & Ginsburg, H. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum* - Infected red blood cells. *Blood* **101**, 4189–4194 (2003).
81. Misbahi, H. Paludisme : mode d'action de la chloroquine et mécanisme de la chloroquinorésistance Malaria: mode of action of chloroquine and mechanism of chloroquine resistance. *J Pharm Clin* **32**, 143–53 (2013).
82. Rosenthal, P. J. & Meshnick, S. R. Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**, 131–139 (1996).
83. Fong, K. Y. & Wright, D. W. Hemozoin and antimalarial drug discovery. *Future Med. Chem.* **5**, 1437–1450 (2013).
84. Balla, T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.* **93**, 1019–1137 (2013).
85. Lietha, D. Phosphoinositides - The Seven Species: Conversion and Cellular Roles. *Encycl. Life Sci.* 1–11 (2011). doi:10.1002/9780470015902.a0023177
86. Kutateladze, T. G. Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 507–513 (2010).
87. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).
88. Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 99–111 (2008).
89. Bertazzi, D. L. *et al.* Les phosphoinositides, des lipides acteurs essentiels du trafic

intracellulaire. *Biol. Aujourd'hui*. **209**, 97–109 (2015).

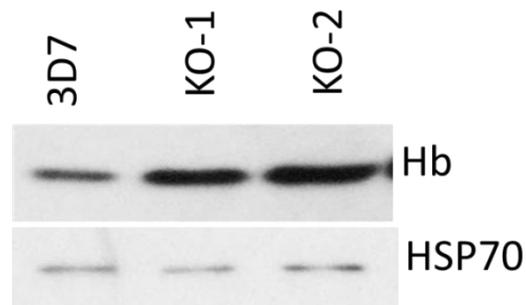
90. Vaid, A., Ranjan, R., Smythe, W. A., Hoppe, H. C. & Sharma, P. PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from *Plasmodium falciparum*, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. *Blood* **115**, 2500–2507 (2010).
91. Daher, W. *et al.* Lipid kinases are essential for apicoplast homeostasis in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* **17**, 559–578 (2015).
92. Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J. & Novick, P. Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev. Cell* **18**, 828–840 (2010).
93. Gozani, O. *et al.* The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**, 99–111 (2003).
94. Itoh, T. & Takenawa, T. Phosphoinositide-binding domains. *Cell. Signal.* **14**, 733–743 (2002).
95. Shewan, A., Eastburn, D. J. & Mostov, K. Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–17 (2011).
96. Peter J. Cullen, Gyles E. Cozier, G. B. and H. M. Modular phosphoinositide-binding domains – their role in signalling and membrane trafficking. *Curr. Biol.* R882–R893 (2001). doi:10.2337/db15-0553
97. Lemmon, M. A. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem. Soc. Symp.* **74**, 81–93 (2015).
98. Ago, T. *et al.* The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 733–738 (2001).
99. Tawk, L. *et al.* Phosphatidylinositol 3-phosphate, an essential lipid in *Plasmodium*, localizes to the food vacuole membrane and the apicoplast. *Eukaryot. Cell* **9**, 1519–1530 (2010).
100. Ebrahimzadeh, Z., Mukherjee, A. & Richard, D. A map of the subcellular distribution of phosphoinositides in the erythrocytic cycle of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* **48**, 13–25 (2018).
101. Lebrun, M. *et al.* Phosphatidylinositol 3-Monophosphate Is Involved in *Toxoplasma* Apicoplast Biogenesis. *PLoS Pathog.* **7**, e1001286 (2011).
102. Mbengue, A. *et al.* A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **520**, 683–687 (2015).
103. McNamara, C. W. *et al.* Targeting *Plasmodium* PI(4)K to eliminate malaria. *Nature* **504**, 248–253 (2013).
104. Mullard, A. Malaria medicine box expands. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 693–695

- (2018).
105. Brunschwig, C. *et al.* Uct943, a next-generation plasmodium falciparum pi4k inhibitor preclinical candidate for the treatment of malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
  106. Rogov, P. *et al.* Longitudinal genomic surveillance of Plasmodium falciparum malaria parasites reveals complex genomic architecture of emerging artemisinin resistance. *Genome Biol.* **18**, 1–13 (2017).
  107. Raabe, A. C., Wengelnik, K., Billker, O. & Vial, H. J. Multiple roles for Plasmodium berghei phosphoinositide-specific phospholipase C in regulating gametocyte activation and differentiation. *Cell. Microbiol.* **13**, 955–966 (2011).
  108. Agarwal, S., Singh, M. K., Garg, S., Chitnis, C. E. & Singh, S. Ca<sup>2+</sup>-mediated exocytosis of subtilisin-like protease 1: A key step in egress of Plasmodium falciparum merozoites. *Cell. Microbiol.* **15**, 910–921 (2013).
  109. Vaid, A., Thomas, D. C. & Sharma, P. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *J. Biol. Chem.* **283**, 5589–5597 (2008).
  110. Jonathan A. Robbins, Sabrina Absalon, Vincent A. Streva, J. D. D. The Malaria Parasite Cyclin H Homolog PfCyc1 Is Required for Efficient Cytokinesis in Blood-Stage Plasmodium falciparum. *MBio* **8**, 1–12 (2017).
  111. Davarinejad, H. *Quantifications of Western Blots with ImageJ.* (2015).
  112. Banerjee, R. *et al.* Plasmepsin II, an Acidic Hemoglobinase from the Plasmodium falciparum Food Vacuole, Is Active at Neutral pH on the Host Erythrocyte Membrane Skeleton . *J. Biol. Chem.* **274**, 14218–14223 (2002).
  113. Krai, P., Dalal, S. & Klemba, M. Evidence for a Golgi-to-endosome protein sorting pathway in Plasmodium falciparum. *PLoS One* **9**, (2014).
  114. Akompong, T. *et al.* Trans expression of a Plasmodium falciparum histidine-rich protein II (HRPII) reveals sorting of soluble proteins in the periphery of the host erythrocyte and disrupts transport to the malarial food vacuole. *J. Biol. Chem.* **277**, 28923–28933 (2002).
  115. Lanzer, M. *et al.* Trafficking of the Phosphoprotein PfCRT to the Digestive Vacuolar Membrane in Plasmodium falciparum . *Traffic* **11**, 236–249 (2009).
  116. Klemba, M., Beatty, W., Gluzman, I. & Goldberg, D. E. Trafficking of plasmepsin II to the food vacuole of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J. Cell Biol.* **164**, 47–56 (2004).
  117. Dowler, S., Kular, G. & Alessi, D. R. Protein Lipid Overlay Assay. *Sci. STKE* **2002**, PL6 (2002).

118. Liu, Z., Miao, J. & Cui, L. Gametocytogenesis in malaria parasite: commitment, development and regulation. *Futur. Microbiol.* **6**, 1351–1369 (2011).
119. Adu-Gyamfi, E. *et al.* Host Cell Plasma Membrane Phosphatidylserine Regulates the Assembly and Budding of Ebola Virus. *J. Virol.* **89**, 9440–9453 (2015).
120. Busse, R. A. *et al.* Analyzing Protein-Phosphoinositide Interactions with Liposome Flotation Assays. *Methods Mol. Biol.* **1376**, 155 (2016).
121. Julkowska, M., Rankenberg, J. & Testerink, C. Liposome-binding assays to assess specificity and affinity of phospholipid-protein interactions. *Methods Mol Biol* **1009**, 261–271 (2013).
122. Chakravarty, V. & Cronan, J. E. The wing of a winged helix-turn-helix transcription factor organizes the active site of BirA, a bifunctional repressor/ligase. *J. Biol. Chem.* **288**, 36029–36039 (2013).
123. Roux, K. J., Kim, D. I., Burke, B. & May, D. G. BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Curr. Protoc. protein Sci.* **19**, 1–14 (2013).
124. Lilley, K. S., Jackson, A. P., Rees, J. S., Li, X.-W. & Perrett, S. Protein Neighbors and Proximity Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 2848–2856 (2015).
125. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. & Burke, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **196**, 801–810 (2012).

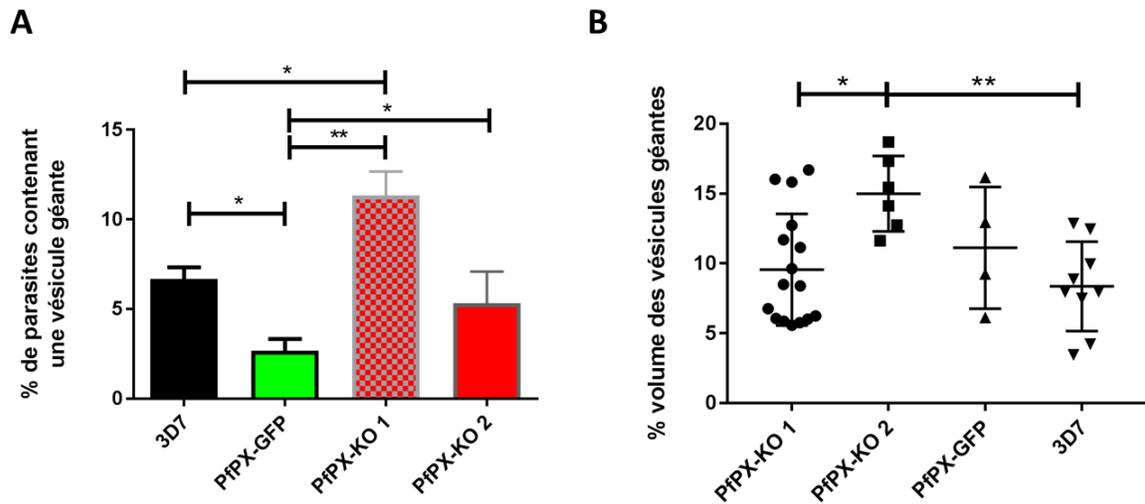
## Annexes

## Annexe A: Confirmation de l'accumulation de l'hémoglobine par Western blot.



**Accumulation de l'hémoglobine (Hb) dans les souches PfPX-KO comparativement à la souche contrôle 3D7.** Western blot avec  $\alpha$ -Hb permettant d'observer une augmentation de la quantité d'hémoglobine dans les souches KO comparativement à la souche sauvage 3D7 pour une même quantité de parasite (HSP70), KO 1 et 2 : proviennent de 2 clones différents. *Image produite par Angana Mukherjee de l'équipe de Dave Richard.*

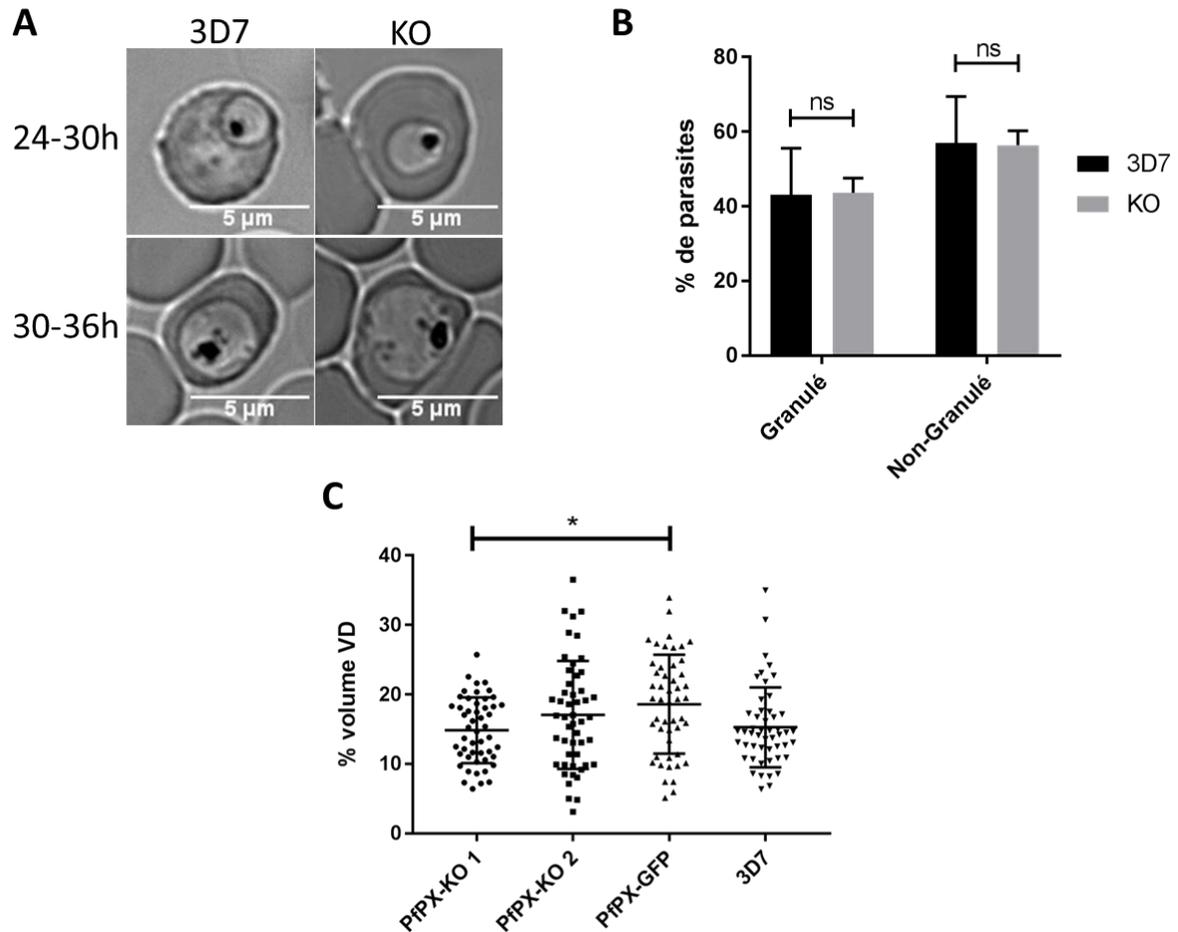
## Annexe B: Observation de vésicules géantes contenant de l'hémoglobine dans les parasites PfPX-KO et contrôles.



### Présence de vésicules géantes dans les parasites PfPX-KO comparativement aux contrôles.

**A)** Pourcentage de parasites contenant au moins une vésicule géante, produit en triplicata. **B)** Pourcentage du volume des vésicules géantes sur le volume des parasites qui les contiennent, KO 1 et 2 : proviennent de 2 clones différents,  $N_{KO1} = 16$ ,  $N_{KO2} = 6$ ,  $N_{PfPX} = 4$ ,  $N_{3D7} = 9$ , Volumes calculés avec Fiji, Graphiques produits avec GraphPad Prism, Test statistique One-way Anova, \* : 0.0332, \*\* : 0.0021. Images produites par Marie-Ève Crochetière

## Annexe C: Analyse de la granularité et du volume de la vacuole digestive des souches PfPX-KO comparativement aux contrôles.



### Analyse de la granularité des parasites PfPX-KO ainsi que le volume de leur vacuole digestive.

**A)** Microscopie en DIC (Differential interference contrast) permettant de voir la granularité des parasites de 24 à 30h et de 30 à 36h comparativement à la souche sauvage 3D7. Échelle de 5µm. **B)** Pourcentage de parasites présentant une certaine granularité ou non pour les souches PfPX-KO et 3D7, basé sur les images de microscopie en DIC. **C)** Pourcentage du volume des vacuoles digestives sur le volume des parasites qui les contiennent, KO 1 et 2 : proviennent de 2 clones différents,  $N_{KO1}$ ,  $N_{KO2}$  et  $N_{3D7} = 50$ ,  $N_{PfPX} = 49$ , Volumes calculés avec Fiji, Graphiques produits avec GraphPad Prism, Tests statistiques One-way Anova, ns : 0.1234, \* : 0.0332. *Images produites par Marie-Ève Crochetière*

## Annexe D: Contribution dans un article scientifique publié.

***Ebrahimzadeh Z, Mukherjee A\*, Crochetière M-E\*, Sergerie A\*, Gaumond D, Thompson L, Amiar S., Gagnon D., Dacks J, Stahelin R. and Richard D. Septembre 2018. A pan-apicomplexan phosphoinositide-binding protein acts in malarial microneme exocytosis. EMBO Report, Accepté le 12 avril 2019.***

\* Ces auteurs ont contribué à ce travail de façon égale.



À: Marie-Eve Crochetière  
Dear Ms. Crochetière:

Here is a copy of the decision letter for manuscript "A pan-apicomplexan phosphoinositide-binding protein acts in malarial microneme exocytosis," by Zeinab Ebrahimzadeh, Angana Mukherjee, Marie-Eve Crochetière, Audrey Sergerie, Souad Amiar, L. Thompson, David Gaumond, Dominic Gagnon, Robert Stahelin, Joe Dacks, and Dave Richard [Paper #EMBOR-2018-47102V3], on which you are a Contributing Author.

Sincerely,

EMBO Reports  
Administration

Subject: Decision for EMBOR-2018-47102V3

Dr. Dave Richard  
Laval University  
Microbiologie-Infectiologie et Immunologie  
2705 Boul. Laurier  
R-0705  
Quebec, Quebec G1V4G2  
Canada

Dear Dr. Richard,

I am very pleased to accept your manuscript for publication in the next available issue of EMBO reports. Thank you for your contribution to our Journal.

At the end of this email I include important information about how to proceed. Please ensure that you take the time to read the information and complete and return the necessary forms to allow us to publish your manuscript as quickly as possible.

As part of the EMBO publication's Transparent Editorial Process, EMBO reports publishes online a Review Process File to accompany accepted manuscripts. As you are aware, this File will be published in conjunction with your paper and will include the referee reports, your point-by-point response and all pertinent correspondence relating to the manuscript.

If you do NOT want this File to be published, please inform the editorial office within 2 days, if you have not done so already, otherwise the File will be published by default [contact: emboreports@embo.org]. If you do opt out, the Review Process File link will point to the following statement: "No Review Process File is available with this article, as the authors have chosen not to make the review process public in this case."

Should you be planning a Press Release on your article, please get in contact with emboreports@wiley.com as early as possible, in order to coordinate publication and release dates.

Thank you again for your contribution to EMBO reports and congratulations on a successful publication. Please consider us again in the future for your most exciting work.

Yours sincerely,

Martina Rembold, PhD  
Editor  
EMBO reports

Dans cet article, j'ai analysé la sécrétion de la protéine PfAMA1 dans le parasite par immunofluorescence et effectué les tests de sécrétion de PfEBA175 sur des mérozoïtes libres par Western blot. J'ai également contribué aux expériences de localisation de la protéine PfPH2 dans les mérozoïtes en plus de faire l'analyse de nombreuses images et de produire certains graphiques. J'évalue ma contribution à cet article de 10%.