1.2.5 Le contrôle et les traitements de la malaria

Au cours des dernières décennies, des efforts colossaux ont été déployés par les gouvernements et les chercheurs académiques afin de trouver un moyen de traiter, mais surtout de prévenir la malaria. Le meilleur moyen de prévention reste d'empêcher les contacts avec le moustique. L'utilisation de filets imprégnés d'insecticide, de vêtements longs et de répulsif anti-moustique reste la première ligne de défense contre l'infection. Ces techniques ont grandement contribué à diminuer le taux de mortalité et la morbidité de la malaria. Malheureusement, depuis les années 1950, on observe l'apparition de moustiques résistants aux insecticides couramment utilisés.

1.2.5.1 Les antimalariaux

Les antimalariaux peuvent être classés en trois catégories selon leurs cibles et leurs finalités (Tableau 1). De plus, leurs modes d'action sont très variés et agissent sur différents stades du parasite. Par exemple, certains affectent la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (atovaquone, primaquine)[74,75]. Cependant, la majorité des médicaments disponibles et utilisés agissent contre le cycle érythrocytaire et plus particulièrement sur la vacuole digestive (VD), avec pour objectif d'inhiber la polymérisation de l'hème en hémozoïne (chloroquine, méfloquine, quinine)[76]. La dégradation de l'hémoglobine contenue dans le globule rouge à l'intérieur de la VD du parasite permet la récupération d'acides aminés nécessaires à la croissance du parasite mais génère aussi un sous-produit toxique pour le parasite, l'hème. Afin de neutraliser l'effet toxique, le parasite séquestre l'hème sous forme d'hémozoïne, non toxique[77,78]. De ce fait, inhiber cette dernière étape résulte en une accumulation d'hème dans le parasite entrainant sa mort.

Depuis plusieurs décennies, on observe une forte augmentation de la résistance aux antimalariaux couramment utilisés. C'est pourquoi la stratégie actuellement recommandée par l'Organisation mondiale de la santé est celle de la thérapie combinée à base d'artémisinine (TCA). Il s'agit de combiner deux molécules dans un même traitement : une semi-synthétique dérivée de l'artémisinine et une autre synthétique, ayant des cibles différentes afin de ralentir l'apparition de résistance. Un exemple est l'utilisation d'artésunate (un dérivé d'artémisine) avec la méfloquine ou encore la dihydroartémisinine en combinaison avec la pipéraquine[54].

MCours.com

Tableau 1 : Modes d'action et cibles de certains antimalariaux[79,80].

Objectifs	Cibles	Antimalariaux
Empêcher l'infection (Prophylaxie)	Cycle exoérythrocytaire ; Cycle érythrocytaire	Atovaquone, Primaquine, Proguanil, Chloroquine, Méfloquine
Traiter la malaria	Cycle érythrocytaire	Chloroquine, Quinine, Arthémisine (ACT), Pyriméthamine, Méfloquine
Bloquer la transmission	Stade sexué	Primaquine, Chloroquine

1.2.5.2 La résistance aux antimalariaux

Depuis les 50 dernières années, des mesures drastiques ont été prises en vue d'éradiquer la malaria, impliquant entre autres la prise massive d'antimalariaux. Chaque fois, des bénéfices notables étaient observés, mais on assistait aussi au développement progressif de la résistance à ces mêmes médicaments. De telle sorte qu'aujourd'hui, *P. falciparum* a acquis une résistance à pratiquement tous les antimalariaux disponibles. C'est pourquoi la TCA est devenue le seul traitement recommandé pour traiter la malaria[81]. Malheureusement, au cours des dernières années, une apparition de souches résistantes à l'artémisinine et ses dérivés a été observée dans les pays d'Asie du Sud-Est. Aussi, de récentes évidences ont révélé la présence de souches multirésistantes dans la région du bassin du Mékong (Vietnam, Cambodge), chez lesquelles la TCA est inefficace[82–84]. Une dispersion de ces souches multirésistantes à l'Afrique et aux autres pays d'Asie entraînerait des conséquences de santé publique majeures et compromettrait les objectifs d'éradication de la malaria fixés par l'Organisation mondiale de la santé[85].

1.2.6 Les vaccins

Avec l'apparition de souches multirésistantes, il devient urgent de développer une stratégie vaccinale efficace. Cette stratégie peut être divisée en deux objectifs : induire une immunité contre la malaria clinique (cible les antigènes du stade exo-érythrocytaire et érythrocytaire) et induire une immunité afin de restreindre la transmission (cible les antigènes du stade exo-érythrocytaire, sexué et sporogénique) [86]. À ce jour, un seul candidat a réussi les essais cliniques de phase III et à être approuvé commercialement. Il s'agit du vaccin RTS,S.

1.2.6.1 Le Vaccin RTS,S

En 2015, le vaccin RTS,S/AS01E (adjuvant AS01), commercialisé sous le nom de Mosquirix par le groupe GlaxoSmithKline, a officiellement été homologué par les agences réglementaires européennes. Il s'agit d'un vaccin à base de protéines recombinantes ciblant la CSP, exprimée à la surface des sporozoïtes. La protéine recombinante correspond à une partie de la CSP fusionnée à la protéine S de l'enveloppe du virus de l'hépatite B (AgsHB) (RTS). Cette protéine fusion est ensuite

co-exprimée avec cette même AgsHB (S) (Figure 7)[87,88]. Finalement, lorsque co-exprimées ensemble dans la levure, les protéines RTS et S s'assemblent spontanément pour former des pseudoparticules virales mixtes qui constituent la base de la stratégie vaccinale[87].

L'étude clinique de phase III fût conduite sur une cohorte de bébés (6-14 semaines) et de jeunes enfants (5-17 mois) sur 11 sites africains. L'étude a démontré que le vaccin permettait de réduire de 39% les cas de malaria cliniques et de 31.5% les cas sévères chez les enfants de 5 à 17 mois ayant reçu quatre doses de vaccin. Cependant, aucun effet bénéfique notable n'a été observé chez la cohorte vaccinée entre l'âge de 6 à 14 semaines[89]. Ces résultats montrent que malgré le fait que le vaccin soit modérément efficace, il permet de réduire la mortalité et la morbidité de façon appréciable chez la population la plus à risque. Il représente donc, jusqu'au développement d'un vaccin grandement plus efficace, une stratégie importante dans la lutte contre la malaria[90].

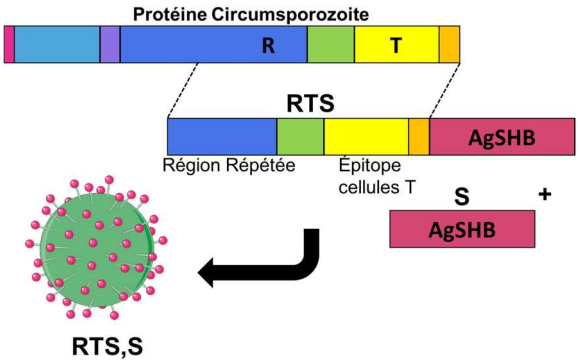

Figure 7 : Représentation schématique du vaccin RTS,S

1.3 La biologie du stade asexué de *P. falciparum*

Le stade asexué de *P. falciparum* est central dans la pathologie associée à la malaria. Il s'agit du principal stade étudié *in vitro* et représente une cible importante pour le développement de nouveaux traitements antimalariaux et de stratégies vaccinales. De ce fait, l'ensemble des projets présentés dans cette thèse ainsi que les caractéristiques biologiques et cellulaires décrient par la suite concerneront principalement le parasite lors du cycle érythrocytaire.

1.3.1 Le complexe apical

Le complexe apical est caractéristique et unique à la famille *Apicomplexa*. Il est composé de trois organites sécrétoires : les rhoptries, les micronèmes et les granules denses (Figure 8). Lors du stade érythrocytaire, ces organites et la majorité des protéines qu'ils contiennent sont essentiels à la survie du parasite et à l'invasion productive du globule rouge. De par ce rôle, les protéines apicales sont

synthétisées *de novo* et tardivement lors du cycle érythrocytaire (environ dix heures avant la rupture du globule rouge infecté).

1.3.1.1 Les rhoptries

Chez le mérozoïte, les rhoptries sont des organites en forme de poire et toujours présents en paire à l'extrémité apicale du parasite. Il s'agit d'un organite entouré d'une simple membrane qui peut être divisé en deux sous-régions : le bulbe (région basale) et le cou (région apicale) (Figure 8)[91]. Les protéines de rhoptries sont délibérément et spécifiquement localisées dans l'une ou l'autre de ces régions, et ce selon leur ordre de sécrétion lors de l'invasion.

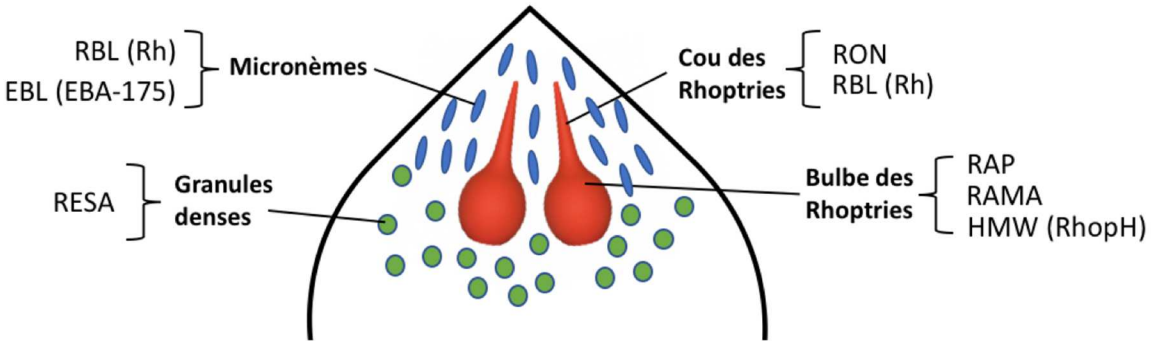

Figure 8 : Les organites du complexe apical et ses protéines

Les protéines RAP

Le complexe de protéines RAP (« Rhoptry associated protein ») ou « low molecular weight » (LMW) est localisé au bulbe des rhoptries et est composé des protéines RAP1, RAP2 et RAP3. Ce complexe est présent sous forme d'hétérodimère avec la protéine RAP1 : RAP1/RAP2 ou RAP1/RAP3. Le rôle de ces protéines n'est cependant pas bien déterminé. Par contre, il a été révélé que le complexe RAP1/RAP2 participe à l'invasion, d'une façon mal définie, puisque l'utilisation d'anticorps anti-RAP1 et anti-RAP2 inhibe l'invasion du globule rouge *in vivo*[92,93]. Cependant, de façon contradictoire, l'ablation du complexe RAP1/RAP2 ne semble pas affecter la capacité et le phénotype d'invasion du parasite, *in vitro*. De plus, il a été montré que RAP1 joue un rôle crucial dans le transport de la protéine RAP2 vers les rhoptries[94].

Les protéines RhopH

Une des composantes majeures du bulbe des rhoptries est le complexe de protéines « high molecular weight » (HMW) ou RhopH. Il est composé de trois protéines : RhopH1, RhopH2 et RhopH3[95,96]. Pour sa part, la protéine RhopH1 est encodée par la famille de gènes *clag* (« cytoadherence linked asexual gene »). Cette famille de gènes est composée de cinq différents variants, permettant de produire cinq différentes protéines RhopH1 (RhopH1/clag2, clag3.1, clag3.2, clag8, clag9)[97]. Suite au contact entre le mérozoïte et le globule rouge, le complexe RhopH est sécrété à la surface du

mérozoïte où, via la protéine RhopH3, il participe au processus d'invasion[98,99]. Par la suite, le complexe est transféré dans la VP puis transporté à l'intérieur de la cellule hôte à travers un translocon. Il a récemment été montré que suite à l'invasion, le complexe RhopH1/clag3-RhopH2-RhopH3 est retrouvé à la membrane plasmique du globule rouge et y forme un pore afin de favoriser l'import de nutriments pour le développement du parasite[98,100,101].

Les protéines RON

Parmi les protéines retrouvées dans la région du cou des rhoptries, l'on retrouve la famille de protéines RON (« Rhoptry neck protein ») formée par RON1 à 6. Contrairement aux protéines du bulbe, ces protéines ont un rôle précoce et bien défini lors de l'invasion. Il a en effet été montré qu'elles sont impliquées dans la formation de la jonction serrée en formant un complexe avec la protéine de micronèmes AMA1 (« apical membrane antigen 1 »). Suite à leur sécrétion, les protéines RONs sont transloquées dans la membrane de l'érythrocyte pour ensuite former un complexe avec la protéine micronèmale AMA1. La jonction serrée ainsi formée entre la membrane du parasite et celle du globule rouge permet de solidifier l'attachement, une étape cruciale dans le processus d'invasion[102,103].

Les protéines Rh

Un autre groupe de protéines, des adhésines, localisées au cou des rhoptries est la famille RBL (« Reticulocyte binding-like »). Le génome de *P. falciparum* code pour cinq larges protéines RBL (>200kDa) nommées Rh1, 2a, 2b, 4 et 5. Ensemble, ces protéines jouent un rôle essentiel dans la liaison directe avec les récepteurs de surface de l'érythrocyte. Cette interaction adhésine-récepteur serait importante pour induire une cascade de signalisation afin de susciter la formation de la jonction serrée[104,105].

La protéine RAMA

Finalement, RAMA (« Rhoptry-associated membrane antigen ») est une protéine atypique qui possède un groupement GPI (Glycosylphosphatidylinositol) à son extrémité C-terminale. Contrairement aux autres protéines de rhoptries, elle est exprimée de façon précoce et semble être impliquée à la fois dans l'invasion, mais aussi dans la biogenèse des rhoptries. Des études ont révélé que RAMA est exprimée avant la formation de rhoptries et est accumulée dans le système de sécrétion, à l'appareil de Golgi. De plus, au moment opportun, elle est en mesure d'y lier des protéines de rhoptries (les complexes LMW et HMW) suggérant ainsi un rôle dans le transport de protéines vers les rhoptries[106]. RAMA a aussi été détectée à la surface des globules rouges suite au relâchement des protéines de rhoptries proposant aussi un rôle d'attachement lors de l'invasion[107].

1.3.1.2 Les micronèmes

Les seconds organites apicaux sécrétoires sont les micronèmes. Ces dernières, beaucoup plus petites et allongées que les rhoptries, sont réparties de part et d'autre de celles-ci (Figure 8). La sécrétion de protéines de micronèmes dès les premiers instants de l'invasion est principalement associée aux évènements d'attachement. Parmi les protéines les plus étudiées, on retrouve les protéines AMA1 et EBA175. Tout d'abord, AMA1 est une protéine essentielle impliquée dans l'attachement du parasite à sa cellule hôte. Suite au contact initial avec l'érythrocyte, AMA1 interagit avec la protéine RON2 afin de former la jonction serrée[108]. Il a aussi été proposé que sa présence à la jonction serrée entraînerait le relargage de protéines de rhoptries[109].

Ensuite, on retrouve la protéine EBA175 qui interagit avec la protéine Glycophorine A à la surface du globule. Elle fait partie de la grande famille des EBL (« Erythrocyte binding-like ») dont fait aussi partie la protéine PfEMP1. Cette famille est caractérisée par la présence de domaines « Duffy binding-like » (DBL) riches en cystéines et habituellement impliqués dans les interactions avec les cellules hôtes[110,111].

1.3.1.3 Les granules denses

Finalement, les granules denses (GD) sont les derniers organites à sécréter leur contenu lors de l'invasion. De forme plutôt ronde, ces organites contienent des protéines qui vont exercer des fonctions lors des dernières étapes de l'invasion : la formation et le développement de la VP. De ce fait, la majorité des protéines de GD vont être sécrétées à l'intérieur de la VP nouvellement formée[112]. La première protéine de GD identifiée et la plus caractérisée est la protéine RESA (« Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen »)[113]. Elle est sécrétée dans la VP une fois l'invasion terminée puis est transportée via le translocon PTEX (« *Plasmodium* translocon of exported protein ») jusqu'au cytoplasme de l'érythrocyte[114]. Elle interagit alors avec la protéine spectrine de l'hôte de façon à stabiliser la membrane de l'érythrocyte afin d'éviter sa dégradation[115,116].

1.3.2 L'invasion du globule rouge

L'invasion du globule rouge par le mérozoïte est une étape critique qui est accomplie par les effecteurs contenus dans les organites du complexe apical. La sous-compartimentalisation et la sécrétion ordonnée sont primordiales afin de coordonner précisément les différentes étapes menant à l'établissement du cycle érythrocytaire. Ce processus d'invasion peut être décortiqué en 4 étapes : l'attachement, la réorientation, l'invasion et la post-invasion (Figure 9)[117,118].

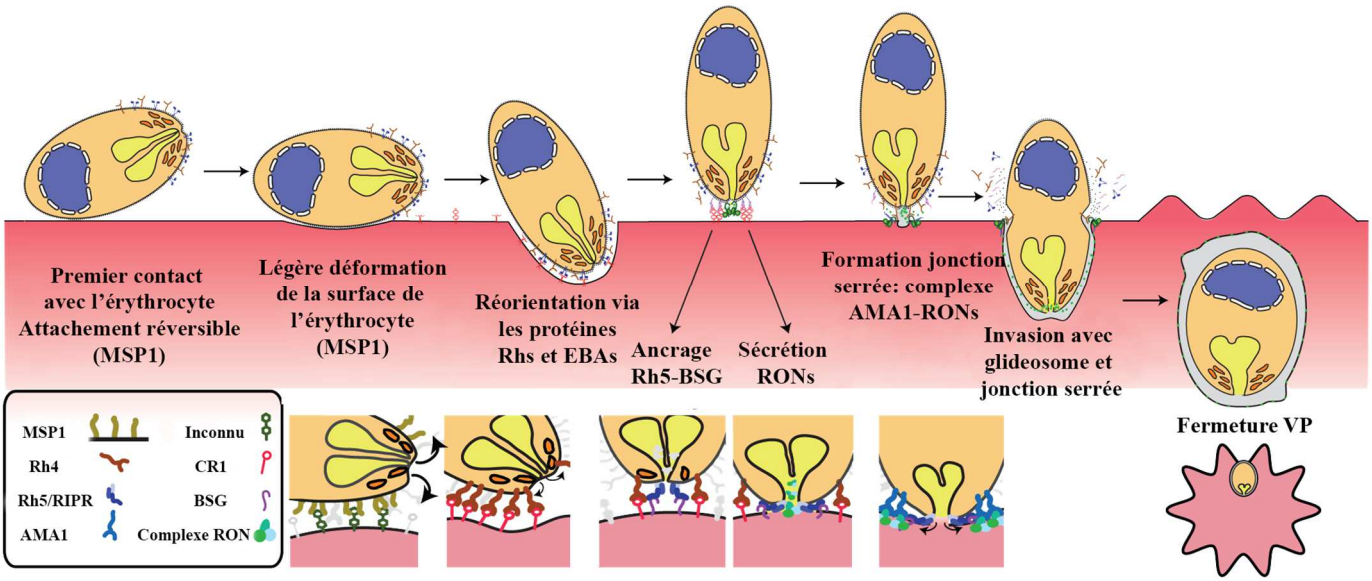

Figure 9 : L'invasion du globule rouge (Adaptée de [119])

1° L'étape d'attachement

Suite à la rupture du schizont, les mérozoïtes libérés dans le sang sont exposés à un environnement faible en ions potassium. Ce stimulus extérieur entraîne une augmentation de la concentration cytosolique en calcium. Cette hausse du niveau de calcium interne déclenche la translocation de protéines de micronèmes à la surface du mérozoïte. Parmi ces nouvelles protéines de surface, on retrouve les protéines EBA175 et AMA1. Leur sécrétion permet de restaurer le niveau basal en calcium en plus de provoquer le relâchement des protéines de rhoptries Rh à la surface[120].

Parallèlement, les mérozoïtes nouvellement expulsés sont non motiles et vont passivement diffuser dans le milieu jusqu'à ce qu'ils rencontrent un globule non infecté. Le premier contact entre le parasite et la cellule cible s'effectue via les protéines de surface du mérozoïte MSP (« merozoite surface protein ») et plus particulièrement la protéine MSP1. Il s'agit de la protéine la plus abondante à la surface du mérozoïte, où elle est attachée par une ancre GPI[121]. Ce premier contact est de faible affinité et permet au groupe de ligands EBL/Rh d'entrer en jeux. Ces groupes de ligands sont fonctionnellement redondants et définissent un ensemble de voies d'invasion alternatives selon les récepteurs présent à la surface de l'érythrocyte. Parmi ces paires ligands-récepteurs on retrouve EBA175/Glycophorine A pour la voie dépendante de l'acide sialique ou encore Rh4/Récepteur de complément 1, une voie indépendante de l'acide sialique[111,122]. Ces étapes de reconnaissance et d'adhésion permettent de s'assurer d'être attaché à la bonne cible et de sécuriser l'attachement.

2º L'étape de réorientation

Par la suite, le parasite doit se réorienter afin de mettre en contact son pôle apical avec la membrane de l'érythrocyte. Cette manœuvre se fait de façon passive sans l'aide du moteur d'actine-myosine. Une explication avancée pour expliquer ce mouvement est que la liaison des molécules Rh et EBL à l'étape précédente occasionne des déformations et des mouvements dans la membrane du globule rouge entraînant le parasite à bouger. De plus, comme la concentration en ligands est plus forte au pôle apical, le parasite est forcé de suivre ce gradient et se retrouve côté apical aligné avec la surface de l'érythrocyte[123]. Une fois le contact établi, on assiste à la formation de la jonction serrée, une étape cruciale qui permet au parasite de se lier de façon irréversible. La jonction serrée est principalement constituée des protéines AMA1 et RONs. Au moment de sa formation, les protéines RONs (RON2, 4 et 5) sont sécrétées puis transloquées et insérées dans la membrane de l'érythrocyte. La protéine AMA1 présente à la surface du parasite peut ensuite lier la surface de l'hôte via une interaction avec la protéine RON2 (Figure 9). Cette jonction serrée de forte affinité est stable et mobile au cours de l'invasion[102].

3º L'étape d'invasion

Lors de l'invasion, la jonction serrée va se déplacer du pôle apical au pôle basal au fur et à mesure de la progression du parasite à l'intérieur de l'érythrocyte. Le parasite se retrouve donc à passer au travers cette jonction serrée, et ce tout en formant la VP. Ce déplacement est causé par le moteur d'actine-myosine du parasite combiné à l'IMC (voir section 1.3.3.1). Situé directement sous la MPP, l'IMC est un complexe multiprotéique interagissant à la fois avec les molécules de la jonction serrée et celle du moteur d'actine-myosine. De cette façon, les molécules de myosine, attachées à l'IMC, vont marcher sur les filaments d'actine, liés aux adhésines de surface, propulsant le parasite vers l'avant. Au fur et à mesure de la progression, les adhésines sont clivées par des protéases afin de permettre au parasite d'avancer vers le prochain point d'adhésion[34,124]. C'est au moment de l'entrée du parasite à travers la jonction serrée que les protéines du bulbe des rhoptries (RAP et RhopH) vont être sécrétées à l'intérieur de la VP naissante[102]. Simultanément, lors du passage via la jonction serrée, il y a clivage des récepteurs à la surface du mérozoïte par un clivage protéolytique accompli par la famille de protéines « sheddase ». Par exemple, la protéine de micronèmes Sub2 (« subtilisin-like protease 2») est responsable de cliver les protéines AMA1 et MSP1[125].

4º L'étape post-invasion

Lors des dernières étapes de l'invasion, la jonction serrée est localisée à l'arrière du parasite, et le parasite se retrouve à l'intérieur du globule, dans la VP. C'est à ce moment que le contenu des granules denses est relargué. Finalement, la fermeture de la VP marque la fin de l'entrée du mérozoïte.

En somme, toutes ces étapes nécessaires à l'invasion se produisent dans un laps de temps très cours soit d'environ 10 minutes[102].

1.3.3 Le complexe intra-membranaire

L'IMC est une structure essentielle et conservée chez les apicomplexés. Elle est située directement sous la MPP et prend la forme d'alvéoles ou citernes aplaties. Plusieurs de ces structures membranaires sont juxtaposées et sont supportées par un réseau de microtubules. Chez le parasite l'IMC opère trois rôles majeurs. Tout d'abord, il assure une fonction structurale et confère sa stabilité et sa rigidité à la cellule. Ensuite, comme mentionné précédemment, il joue un rôle crucial lors de l'invasion du parasite en lui fournissant la mobilité nécessaire. Finalement, il est une composante de base lors de la division cellulaire au moment de la schizogonie.

1.3.3.1 L'IMC dans l'invasion

Au moment de l'invasion, l'IMC s'associe avec le moteur d'actine-myosine et forme une structure nommée glideosome, responsable de la locomotion du parasite lors de son entrée. Le glideosome est composé de cinq protéines : la myosine A (MyoA), la chaîne légère de la myosine (MTIP ou MLC), GAP45, GAP50 et GAP40[126] (Figure 10). Tout d'abord, il a récemment été montré que la protéine « glideosome-associated connector » (GAC) est responsable de lier à la fois le domaine cytoplasmique des adhésines (AMA1, Rh) ainsi que les molécules d'actine[127]. Ces filaments d'actine sont modulés de façon dynamique, c'est-à-dire qu'ils se polymérisent en aval du mouvement et se dépolymérisent en amont, au fil de la progression[128–131]. La protéine GAC assure donc la connexion entre les molécules de surface du parasite et le complexe moteur. À l'opposé, l'autre composante motrice, la MyoA, est rattachée à l'IMC via une interaction avec les autres composantes du glideosome. Cet échafaudage protéique s'ancre à la fois à la membrane de l'IMC, via la protéine transmembranaire GAP50 et à la MPP via GAP45 (Figure 10). La protéine GAP45 est donc à la fois attachée à la MPP (extrémité N-terminale) de par un motif de double acylation et à la membrane de l'IMC (extrémité C-terminale) via l'interaction avec GAP50, solidifiant ainsi le glideosome[126]. En résumé le moteur est fixé des deux côtés : à la MPP via l'interaction GAC-actine et à l'IMC de par l'interaction avec la myosine-glideosome.

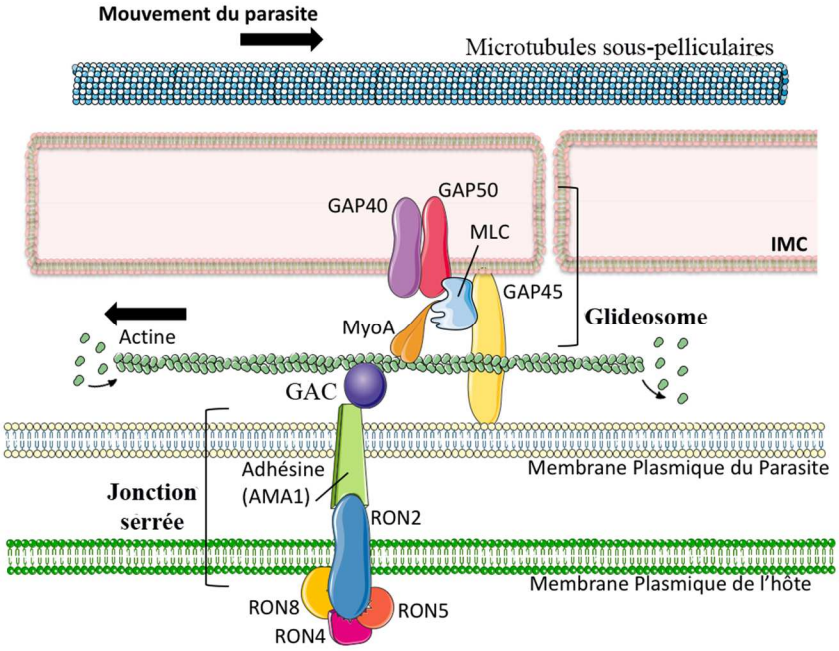

Figure 10 : Modèle de la structure du glideosome et de la jonction serrée

1.3.3.2 L'IMC lors de la division cellulaire

Chez *Plasmodium*, la division cellulaire s'effectue selon le principe de schizogonie, ce qui se traduit par plusieurs rondes de division nucléaire sans division cellulaire. C'est seulement lors du dernier cycle de division nucléaire que les cellules filles vont s'assembler afin de former les nouveaux mérozoïtes. À l'opposé, chez *Toxoplasma,* la division cellulaire s'effectue à chaque ronde de division nucléaire, c'est-à-dire que chaque cellule mère se divise pour donner deux cellules filles (endodyogénie).

La réplication par schizogonie implique que lors de la dernière division nucléaire, le parasite doit assembler les différents organites, et ce à l'intérieur d'une nouvelle MPP. Ce rôle d'échafaud pour la ségrégation des différentes structures et membranes est assuré conjointement par les microtubules sous-pelliculaires et l'IMC (Figure 11). Tout d'abord, les microtubules vont être ancrés au pôle apical par l'anneau polaire apical, un centre d'organisation des microtubules. Ensuite, appuyé par les microtubules, l'IMC progresse graduellement vers le pôle basal en formant derrière lui de nouvelles structures d'IMC[132,133]. Cependant, certaines protéines de l'IMC vont plutôt se concentrer au pôle basal une fois l'IMC formé. Des protéines comme MORN1 (« membrane occupation recognition nexus 1 ») , BTP1 (« basal complex transmembrane protein 1 ») et centrine 2 vont y accomplir une fonction contractile afin de fermer l'IMC et ainsi terminer la ségrégation de la cellule fille[134,135]. Finalement, la MPP va s'invaginer entre les cellules filles délimitées par l'IMC et ce afin que chaque mérozoïte soit entouré par sa propre membrane.

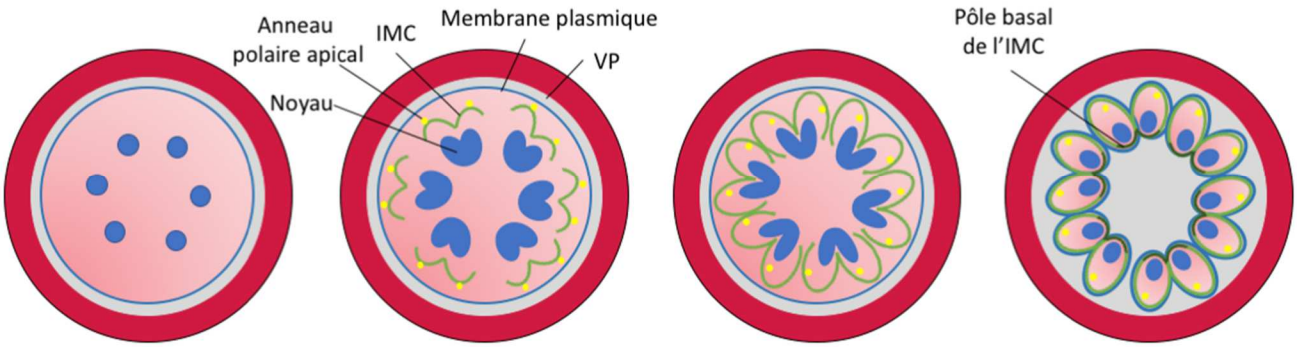

Figure 11 : L'IMC et la division cellulaire

1.3.4 L'exportome

Suite à l'invasion de l'érythrocyte, *Plasmodium* doit modifier son environnement afin d'y survivre. De ce fait, il remanie et modifie grandement sa cellule hôte en exportant des centaines d'effecteurs protéiques dans le cytoplasme du globule rouge infecté. Ces protéines exportées vont entres autres permettre de modifier la perméabilité cellulaire afin d'augmenter l'apport en nutriments en plus de renforcer le cytosquelette afin de diminuer la susceptibilité à la lyse cellulaire associée à cette augmentation de la perméabilité. Une autre modification importante imposée par le parasite est la formation de structures adhérentes « knob » à la surface de l'érythrocyte infecté. Cette structure est composée de la protéine transmembranaire PfEMP1 ainsi que des protéines KAHRP (« knob-associated histidine-rich protein »). Localisées sous la membrane plasmique du globule rouge, ces dernières sont responsables de réorganiser la membrane érythrocytaire en liant le cytosquelette et en édifiant des grappes de PfEMP1. Finalement, un nouvel organite dérivé du parasite va se former à l'intérieur du cytosol : les « Maurer's clefts ». Elles font ainsi partie de la machinerie de transport et exercent le rôle de station transitoire pour les protéines en route vers la membrane plasmique du globule rouge[15,136].

1.3.5 Autres structures et organites

1.3.5.1 La vacuole parasitophore

Le lieu de résidence du parasite à l'intérieur de l'érythrocyte, la VP, est délimitée à la fois par la membrane de la VP et la MPP. Elle contient de nombreuses protéines transmembranaires ayant à la fois un rôle dans le transport protéique entre le parasite et l'hôte et dans l'import de nutriments[137]. Parmi les protéines transmembranaires les plus abondantes de la membrane de la VP on retrouve les protéines ETRAMP (« early transcribed membrane protein »). Malgré une fonction encore méconnue, il est proposé que de par leur abondance, elles pourraient agir comme protéines de structure ou encore comme composantes majeures de microdomaines distincts impliqués dans l'export protéique[138].

Finalement, on retrouve les protéases de la famille SERA (« serine repeat antigen »). Malgré que leur rôle soit encore peu défini, il semble que cette famille, composée de neuf membres, soit la principale candidate pour assurer un rôle clé lors de la rupture de la membrane de la VP et de la membrane plasmique de l'érythrocyte[139,140].

1.3.5.2 Les exonèmes

Auparavant confondus avec les granules denses, les exonèmes ont récemment été caractérisés et identifiés comme un organite distinct. Les exonèmes sont principalement définis par la présence de la protéine SUB1 (« subtilisin-like protease 1 »), une serine protéase essentielle, impliquée dans les évènements de rupture du schizont. En effet, durant les quelques instants précédant la sortie du parasite, la protéine SUB1 est relâchée dans le lumen de la VP. Suite à sa sécrétion, SUB1 a pour rôle de cliver les protéines SERA, et plus particulièrement SERA4, 5 et 6. En somme, la sécrétion de SUB1 est une étape ultime et essentielle déclenchant une cascade protéolytique menant à la lyse du globule rouge infecté et à la libération de nouveaux mérozoites[141].

1.4 Le transport protéique

Afin d'effectuer leurs fonctions biologiques, les diverses protéines synthétisées par le parasite *Plasmodium* doivent être correctement transportées vers leur organite respectif. Ce mécanisme de transport de protéines est très semblable à celui observé chez les autres membres du domaine eucaryote. Comme le système de sécrétion eucaryote est conservé et bien caractérisé, il sera d'abord décrit dans les sections 1.4.1 et 1.4.2. Par la suite, les particularités et l'organisation de ce système de transport chez *Plasmodium* puis chez *Toxoplasma* seront expliquées plus en détail dans les sections 1.4.3 et 1.4.4 respectivement.

1.4.1 Le système de sécrétion protéique chez les eucaryotes

L'adressage des protéines vers les différents compartiments cellulaires est essentiel. Certaines de ces protéines possèdent une séquence peptidique dictant leur transport directement du cytosol, où elles sont traduites, vers leur destination finale. Ce mécanisme de transport est celui utilisé par les protéines de mitochondrie, du chloroplaste ou du noyau. Une autre voie de transport utilisée est celle assurée par le système de sécrétion de la cellule. Cette voie est celle empruntée par les protéines destinées à certains organites comme le lysosome, le Golgi ou le RE, mais aussi aux membranes ou encore les protéines sécrétées. Ces protéines possèdent un peptide signal (PS) ou encore un domaine transmembranaire dictant ainsi leur prise en charge par le système de sécrétion. De ce fait, elles sont transloquées au RE de façon co-traductionnelle. Puis, elles vont migrer vers l'appareil de Golgi où

elles vont être triées afin d'être correctement transportées à l'intérieur de vésicules, vers leur destination finale (Figure 12).

1.4.1.1 Le réticulum endoplasmique

Lors de la traduction, les protéines nouvellement traduites qui possèdent un PS ou une séquence hydrophobe associée à un domaine transmembranaire sont reconnues par le complexe de protéines et d'ARN cytosolique SRP (« signal recognition particle »). Cette interaction amène la SRP à lier son récepteur ancré dans la membrane du RE entraînant ainsi l'arrimage du ribosome. Cette proximité permet à la protéine en cours de traduction d'être directement transloquée à l'intérieur du RE. Si cette dernière possède un domaine transmembranaire, celui-ci est inséré dans la membrane du RE au cours de la traduction. Ensuite, si nécessaire, les protéines subissent différentes modifications post-traductionnelles telles de la N-glycosylation ou l'ajout de groupement GPI. Finalement, les protéines sont repliées avec l'assistance des protéines chaperonnes et des ponts disulfures sont formés par la protéine disulfide isomérase (PDI). Un rigoureux contrôle de la qualité des protéines est essentiel à cette étape, et ce afin d'éviter que des protéines mal pliées ou mal assemblées soient transportées vers le Golgi. Ce contrôle qualité est assuré par les chaperonnes qui sont en charge de lier les protéines en cours de repliement ou mal pliées. De ce fait, aucune protéine ne quitte le ER tant qu'une chaperonne y est attachée[142,143]. Parmi les chaperonnes les plus importantes l'on retrouve la famille HSP70 (« heat shock protein ») dont le membre le plus abondant est la protéine BIP[144].

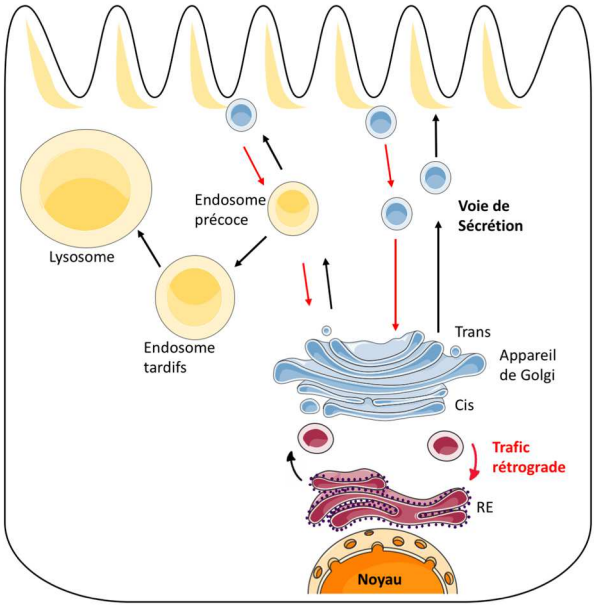

Figure 12 : Le système de sécrétion eucaryote

1.4.1.2 L'appareil de Golgi

Les protéines qui ont passé l'étape de contrôle qualité avec succès sont transportées, par trafic vésiculaire, à la face cis de l'appareil de Golgi. Si nécessaire, elles vont subir d'autres modifications post-traductionnelles en plus d'un clivage protéolytique. Les protéines poursuivent ensuite leur route vers le Golgi médian jusqu'à la face trans. Une fois à la face trans du Golgi ou réseau trans-golgien (TGN), les protéines sont triées et empaquetées dans d'autres vésicules, puis expédiées vers leur destination finale [145,146].

Parallèlement, le TGN assure aussi le rôle de plateforme de réception pour le transport rétrograde et l'endocytose. En effet, plusieurs des protéines résidentes du RE ou du Golgi accomplissent différents rôles au-delà de leur compartiment d'origine. Ces dernières ne sont pas synthétisées de *novo*, mais sont plutôt recyclées. C'est-à-dire qu'après avoir accompli leur rôle, elles sont transportées via le système de transport rétrograde, des endosomes vers le Golgi ou encore du Golgi vers le RE (Figure 12)[147].

1.4.1.3 Le transport intracellulaire

Les protéines assemblées au TGN vont ensuite bourgeonner et être prises en charge soit par la voie endocytaire ou la voie de sécrétion, selon la destination de la vésicule (voir section 1.4.2). Tout d'abord, les protéines destinées à la membrane plasmique ou encore les protéines sécrétées vont être transportées à l'intérieur des vésicules de sécrétion (figure 12). Cette voie de sécrétion peut être divisée en deux routes selon le contenu : la voie de sécrétion constitutive ou la voie régulée. Finalement, une autre voie majeure est celle empruntée par les protéines destinées au lysosome : la voie de transport endocytaire. Ces protéines sont transportées via le passage par les endosomes précoces, tardifs, puis vers le lysosome. Cependant, certaines vésicules sont directement dirigées vers les endosomes tardifs ou le lysosome, sans détour [143,148]. Le système endocytaire décrit ici est une voie à double sens. C'est-à-dire qu'elle est utilisée à la fois pour la sécrétion et le transport de matériel nouvellement synthétisé, mais aussi pour le transport rétrograde afin de récupérer des composantes du trafic vésiculaire ou encore pour l'endocytose de matériel extracellulaire.

1.4.2 Les composantes du trafic vésiculaire eucaryote

Le tri, la sélection et l'emballage des protéines à la membrane du TGN sont des étapes cruciales afin que chaque protéine soit correctement adressée à sa destination finale. Cette spécificité est assurée par les récepteurs de cargo, de concert avec les protéines adaptatrices et les molécules du manteau (Figure 13) (résumé dans le tableau 2). De plus, il a été démontré que des régions enrichies en sphingolipides et en cholestérol seraient aussi impliquées dans le processus de triage au TGN. En

effet, ces microdomaines de type radeaux lipidiques dans la membrane de l'appareil de Golgi permettraient de recruter et d'assembler les différentes composantes avec les protéines cargo[149].

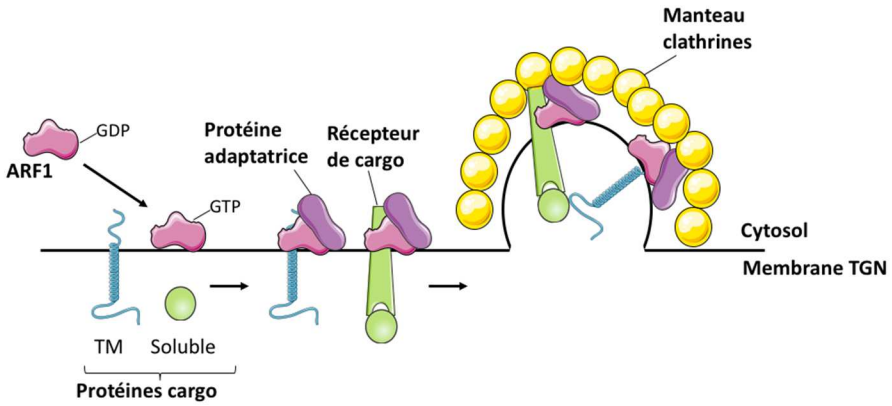

Figure 13 : La plateforme de tri au TGN

1.4.2.1 Les protéines du manteau

Les protéines du manteau (« coat protein ») sont les protéines recouvrant la face externe des vésicules, leur concédant leur forme sphérique en plus de participer à la sélection des molécules cargo. Ce manteau est constitué de complexes protéiques différents selon la destination et l'origine de la vésicule.

<u>COPI</u>

Ce complexe protéique composé de 7 sous-unités est engagé dans le transport rétrograde de protéines, du Golgi vers le RE. Recrutées par la protéine ARF1 («ADP-ribosylation factor 1») à la membrane du Golgi, les protéines du complexe COPI vont s'assembler à la membrane du cis-Golgi et incorporer les protéines devant être recyclées. Les protéines résidentes du RE possèdent un signal de récupération (K/HDEL) qui est reconnue par les récepteurs de K/HDEL du Golgi puis par le complexe COPI. Les vésicules ainsi formées par le complexe COPI sont finalement redirigées de la région cis de l'appreil de Golgi vers le RE[142,150].

<u>COPII</u>

Le complexe COPII agit à l'opposé du complexe COPI, en régissant le transport du RE vers le Golgi. Ce complexe constitué de cinq protéines assure le transport antérograde des vésicules provenant du RE et destinées au Golgi. Parmi les constituants du complexe, l'on retrouve la protéine SAR1, responsable de lier les récepteurs cargo, et les protéines structurales SEC13/SEC31[142,151].

Clathrines

Probablement les plus répandues, les clathrines sont les protéines du manteau qui recouvrent la majorité des vésicules bourgeonnant du TGN, en plus d'être présentent sur les endosomes dérivés de l'endocytose. Incapable de lier directement la membrane lipidique, une interaction avec des protéines adaptatrices est nécessaire (Figure 13). Suite au recrutement à la membrane par les protéines adaptatrices, les clathrines se polymérisent et s'assemblent donnant ainsi une courbure à la membrane, entraînant du coup la formation de vésicule[152–154].

Rétromère

Les composantes du rétromère sont associées aux vésicules du transport rétrograde, des endosomes vers le TGN. Ces vésicules permettent entre autres le recyclage des récepteurs de cargo et de différentes protéines au TGN afin d'être à nouveau utilisés. Le complexe rétromère est composé d'un dimère de protéines de la famille des « sorting nexin » (SNX) et du trimère de protéines VPS26/29/35. Ces dernières sont responsables de la liaison avec le récepteur cargo tandis que les SNX vont plutôt interagir avec les phosphoinositides de la membrane des endosomes[155].

1.4.2.2 Les protéines adaptatrices

Les protéines adaptatrices ont pour fonction d'attacher et de recruter les molécules du manteau (clathrines) à la surface des vésicules en plus de sélectionner le contenu des vésicules via les récepteurs de cargo ou directement en liant la protéine cargo (Figure 13). Situé sur la face cytosolique des vésicules, sous le manteau de clathrines, elles vont donc à la fois recruter et lier les protéines formant le manteau ainsi que le contenu cargo. Cette interaction peut être fait directement en liant le domaine cytoplasmique des protéines transmembranaires ou encore en liant la queue cytoplasmique des récepteurs de cargo dans le cas de cargos solubles. Ce rôle est principalement assuré par deux familles de protéines adaptatrices : les AP (« adaptator protein ») et les GGA (« Golgi-localized, γ ear-containing, ARF-binding protein »). La famille AP comporte cinq membres (AP-1 à 5), et chacun est composé de 4 sous-unités différentes. Les différentes AP sont impliquées dans des évènements distincts par exemple, AP-1 et AP-3 sont retrouvées sur les vésicules assurant le transport de protéines du TGN vers le lysosome et AP-2 sur les endosomes provenant de la membrane plasmique. Contrairement aux AP, les protéines GGA sont constituées d'une seule sous-unité, mais contenant plusieurs domaines de liaison. Recrutées à la membrane par la protéine ARF1, elles peuvent ensuite recruter les clathrines et les récepteurs de cargo à la membrane[156,157].

1.4.2.3 Les récepteurs de cargos

Le triage et la sélection des protéines au TGN nécessitent la présence d'une étiquette de tri (motif dileucine ou un motif tyrosine) afin d'être reconnues par les molécules adaptatrices. Les protéines

cargo transmembranaires possèdent habituellement ce motif dans leur domaine cytoplasmique. Cependant, chez les protéines solubles, une interaction avec les récepteurs de cargo transmembranaires, qui eux possèdent ce motif, est nécessaire (Figure 13). La majorité des récepteurs de cargo connus sont ceux impliqués dans la voie de transport au lysosome[158]. Contenant une soixantaine de différentes enzymes, le lysosome est un organite majeur et de ce fait le transport de ses enzymes est crucial[159–161]. Ces enzymes sont majoritairement de type hydrolases acides (protéases, lipases, phosphatases etc.) et sont responsables de la dégradation de macromolécules comme l'ADN, des protéines ou encore des polysaccharides[162]. Plusieurs de ces hydrolases lysosomales sont solubles et vont se voir ajouter un groupement mannose-6 phosphate (M6P) lors du transport dans le Golgi. À l'interface du TGN, le groupement M6P des protéines lysosomales est reconnu par les récepteurs de M6P (M6PR)[163]. Il s'agit de la voie de transport dépendante du M6P, qui est celle majoritairement utilisée pour le transport lysosomale. Les M6PR liés à leurs cargos sont ensuite recrutés par les protéines adaptatrices (AP-1 et GGA) suivie par l'assemblage du manteau et la formation de la vésicule[164165]. Une voie alternative, indépendante du M6P, est assurée par les récepteurs de cargo LIMP-2 (« lysosomal integral membrane protein ») et la sortiline[166]. Finalement, après avoir délivré leurs protéines à destination, les récepteurs cargo sont recyclés vers le TGN afin d'y être réutilisés[167].

1.4.2.4 La sortiline

La sortiline ou récepteur de neurotensine 3, fait partie de la famille VPS10 (« vacuolar protein sorting 10 »), un domaine retrouvé chez la protéine de levure VPS10P, un récepteur de la carboxypeptidase Y[168]. Chez les eucaryotes supérieurs, cette famille est composée de cinq protéines transmembranaires de type 1 : SorLA, SorCS1, SorCS2, SorCS3 et sortiline[169]. Cette dernière est impliquée à la fois dans le transport de protéines lysosomales en plus d'assurer la transduction de signaux chez une variété de types cellulaires dont les neurones, les cellules des testicules et les muscles squelettiques[170]. Elle est cependant majoritairement exprimée dans le système nerveux central où elle régule la survie et la mort neuronales. En effet, la sortiline exprimée à la surface des cellules neuronales lie le précurseur de neutrophine proNGF (« nerve growth factor ») extracellulaire et induit une cascade de signalisation afin de promouvoir la mort cellulaire[171]. À l'opposé, la sécrétion extracellulaire du facteur de croissance proBDNF (« brain-derived neurotrophic factor ») via la sortiline permet d'induire la survie et la croissance neuronales[172].

Comme précédemment mentionné, la sortiline est aussi impliquée dans la voie de transport lysosomale alternative, indépendante du M6P. De façon similaire au M6PR, la structure des protéines VPS10 est composée d'une petite queue cytoplasmique et d'un grand domaine de liaison protéique en N-terminal[173,174]. Il a été démontré que la région cytosolique, située à l'extrémité C-terminale,

interagit avec les protéines adaptatrices AP-1 et GGA ainsi que les composantes du rétromère, tandis que le domaine luminaire est plutôt associé aux interactions avec les molécules cargo[175,176]. Principalement localisée à l'appareil de Golgi, la sortiline y est présente sous forme de précurseur. Lors du clivage du propeptide, la sortiline devient mature et son domaine de liaison est alors exposé et prêt à accueillir les molécules cargo[177]. Elle joue donc un rôle important dans le transport de protéines du TGN vers les endosomes et vice versa, mais aussi dans l'internalisation de matériels extracellulaires vers le lysosome. Elle est donc à la fois associée au système de sécrétion ainsi qu'au système endocytaire (Figure 14) [167].

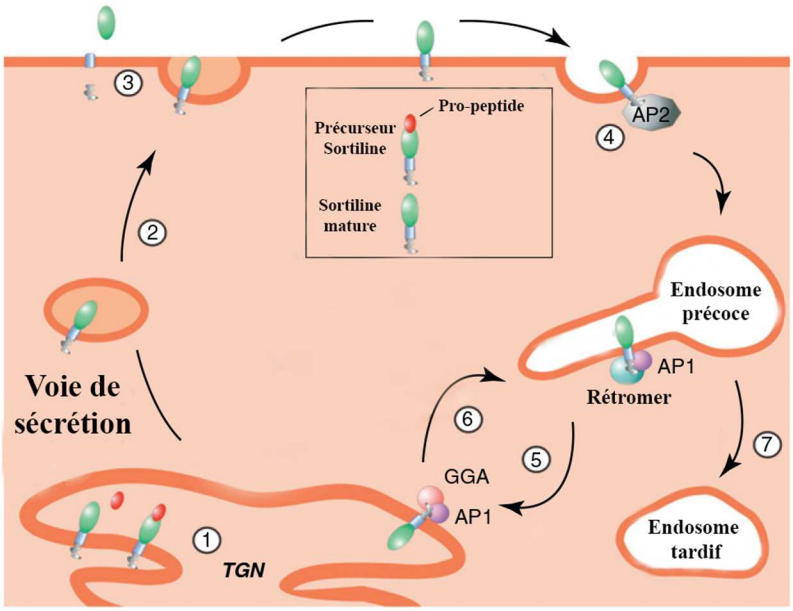

Figure 14 : La sortiline dans le système de transport (Adaptée de [172])

1.4.2.5 Les protéines Rab

Les protéines Rab, de la famille Ras, sont des GTPases qui oscillent entre la forme activée GTP et inactive GDP. Cet état cyclique fait des protéines Rab les principaux régulateurs du trafic membranaire. En effet, elles jouent des rôles lors du bourgeonnement, du transport, de l'arrimage et de la fusion des membranes. Sous forme inactive, la protéine Rab est localisée au cytosol, puis lorsque nécessaire, elle commute vers la forme active et se lie aux membranes des vésicules. Cette interaction avec les membranes lui permet d'interagir avec une grande variété de molécules effectrices afin de réguler les différentes étapes du trafic membranaire. De plus, les protéines Rab sont spécifiquement associées à un compartiment subcellulaire. Par exemple, Rab1 est retrouvée sur les endosomes voyageant du RE vers le Golgi tandis que Rab5 et Rab6 sont associées aux endosomes précoces et tardifs respectivement en plus d'être associées aux rétromères. De ce fait, les protéines Rab accordent une identité moléculaire aux différentes étapes et compartiments du trafic cellulaire[178,179].

1.4.2.6 Les autres composantes

Les SNAREs

Les étapes d'arrimage, de fusion et de bourgeonnement vésiculaires sont critiques et sont en partie assurées par les protéines transmembranaires de la famille SNARE (« Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor »). Leur implication est requise à toutes les étapes de la voie de sécrétion, à la fois pour le transport antérograde et rétrograde. L'on retrouve principalement deux types de SNAREs : les v-SNAREs (sur la vésicule) et les t-SNAREs (sur la membrane cible). Elles agissent de concert en interagissant l'une avec l'autre afin de rapprocher et lier les deux membranes[180,181].

La protéine ARF1

La GTPase ARF1, un membre de la famille ARF, agit à titre de recruteur principal lors des premières étapes de la formation vésiculaire. En effet, lorsque présente sous sa forme active (GTP) ARF1 recrute les protéines du manteau, via les protéines adaptatrices (AP-1 et GGA), à la membrane du TGN ou des endosomes. De plus elle est responsable de recruter le complexe COP1 au cis-Golgi lors du transport rétrograde. Il s'agit donc d'une protéine cruciale et centrale pour la formation des vésicules de sécrétion[182–184].

Tableau 2 : Résumé des principales composantes du transport vésiculaire eucaryote

Composantes	Famille de protéine	Membres	Rôle
Récepteurs de cargo	M6PR		Transport au lysosome – voie dépendante du M6P
	LIMP2		Transport au lysosome – voie indépendante du M6P
	VPS10	SorLA, Sortilin, SorCS1,2,3	Transport au lysosome – voie indépendante du M6P
Protéines adaptatrices	AP	AP-1, AP-2, AP-3, AP-4, AP-5	Lie cargo et manteau lors du transport vésiculaire et rétrograde
	GGA		Lie cargo et manteau lors du transport vésiculaire
Protéines du manteau	COP1		Transport rétrograde Golgi => ER
	COPII	SEC23/24, SAR1, SEC13/31	Transport antérograde ER => Golgi
	Clathrines		Transport endocytaire et sécrétion
	Rétromère	VPS26/29/35, SNX	Transport endosome => TGN
Autres	Rab-GTPase		Régulent arrimage, fusion, transport et bourgeonnement vésiculaire
	ARF	ARF1	Recrute AP, GGA et COPI pour la formation de vésicules
	SNARE	v-SNARE, t-SNARE	Arrimage et fusion des vésicules

MCours.com