

SOMMAIRE

Liste des Abréviations	p. 4
Liste des Figures et Tableaux	p. 5
Introduction	p. 8
Matériel et Méthodes	p. 33
1. Le matériel biologique	p. 33
2. Culture in vitro de <i>Plasmodium falciparum</i>	p. 33
3. Détection de protéines CFTR et CIC-2 dans la membrane cellulaire des érythrocytes humains	p. 34
3.1. Le Western-Blot	p. 34
3.2. Préparation des membranes plasmiques	p. 34
3.3. Extraction des protéines membranaires	p. 35
3.3.1. Préparation du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et réalisation du transfert liquide	p. 36
3.3.2. Le marquage immunologique	p. 37
3.4. Immunofluorescence	p. 38
4. <i>Patch-clamp</i>	p. 38
4.1. Principe	p. 38
4.2. Enregistrement des courants et anatomie du poste de <i>patch-clamp</i>	p. 41
4.3. Protocole	p. 43
4.4. Analyse des courants ioniques traversant un canal	p. 43
4.5. Analyse des caractéristiques électriques unitaires d'un canal en configuration <i>cell-attached</i> et <i>inside-out</i>	p. 46
4.6. Analyse des caractéristiques électriques de la membrane en configuration <i>whole-cell</i>	p. 50
5. Présentation des données et analyse statistique des résultats	p. 51
6. Produits chimiques utilisés au cours des différentes expériences	p. 51

Résultats

Liste des Publications	p. 52
------------------------	-------

Chapitre I : Caractérisation des canaux CFTR-like dans la membrane des érythrocytes humains : rôle physiologique et implication dans la nouvelle voie de perméabilité induite au cours de l'infection par <i>Plasmodium falciparum</i>	p. 54
---	-------

Introduction	p. 54
--------------	-------

Résultats	p. 55
-----------	-------

1. Mise en évidence de protéines de type CFTR dans la membrane des érythrocytes humains	p. 55
---	-------

2. Mise en évidence de canaux CFTR(-like) dans la membrane des érythrocytes humains	p. 56
---	-------

2.1. Activation d'une conductance chlorure en présence de forskoline en configuration <i>cell-attached</i>	p. 56
--	-------

2.2. Activation d'une conductance chlorure par la sous unité catalytique de la Protéine Kinase A (PKA)	p. 58
--	-------

2.2.1 Activation d'une conductance chlorure en présence de PKA en configuration <i>inside-out</i>	p. 58
---	-------

2.2.2 Activation d'une conductance chlorure en présence de PKA et d'ATP en configuration <i>whole-cell</i>	p. 59
--	-------

2.3 Conclusions	p. 61
-----------------	-------

3 Propriétés et rôles physiologiques des canaux CFTR-like dans la membrane des érythrocytes humains	p. 62
---	-------

3.2 La mécano-sensibilité des canaux CFTR-like	p. 63
--	-------

3.3 Le transport d'ATP	p. 64
------------------------	-------

3.4 Conclusions	p. 65
-----------------	-------

4 Canaux CFTR-like et nouvelles voies de perméabilité dans la membrane de globules rouges infectés par <i>Plasmodium falciparum</i>	p. 66
---	-------

4.2 Recherche d'une nouvelle voie de perméabilité dans la membrane des érythrocytes CF infectés par <i>Plasmodium falciparum</i>	p. 67
--	-------

4.3 Comparaison des conductances membranaires globales de cellules contrôle et CF infectées en configuration <i>whole-cell</i>	p. 67
--	-------

4.4 Conclusions	p. 68
-----------------	-------

Chapitre II : Malaria, érythrocytes, canaux ioniques et kinases	p. 70
Article I : « Anionic channels in malaria-infected human red blood cells »	
Chapitre III : Effets du potentiel de maintien et du sérum sur les conductances activées par <i>Plasmodium falciparum</i>	p. 73
Article II : « Modulation of whole-cell currents in <i>Plasmodium falciparum</i> -infected human red blood cells by holding potential and serum »	
Conclusions et Perspectives	p. 76
Références bibliographiques	p. 97
Annexe	
Article III : « A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite <i>Plasmodium falciparum</i> »	

ABREVIATIONS

9-AC:	<u>9</u> - <u>A</u> mino <u>c</u> ampto <u>th</u> écine
Å:	Angstrom
AMP _c :	<u>A</u> dénosine- <u>m</u> onophosphate <u>c</u> yclique
ATP:	<u>A</u> dénosine- <u>t</u> riphosphate
CFTR:	<u>C</u> ystic <u>F</u> ibrosis <u>T</u> ransmembrane <u>R</u> egulator
CIC:	<u>C</u> hloride <u>C</u> hannel
CYT:	<u>C</u> ytosome
DIDS:	Acide 4,4' <u>D</u> iisothiocyanatostilbène-2,2'- <u>d</u> isulfonique
DPC:	<u>D</u> iphénylamine-2- <u>c</u> arboxylate
E _{rev} :	Potentiel d'inversion (<u>r</u> eversal potential)
FM:	<u>F</u> enêtre <u>m</u> étabolique
FV:	Vacuole digestive (<u>F</u> ood <u>V</u> acuole)
GΩ	<u>G</u> iga <u>O</u> hm
IBMX:	3- <u>i</u> sobutyl-1- <u>m</u> éthyl <u>x</u> anthine
IC ₅₀ :	<u>I</u> nhibitory <u>c</u> oncentration 50
K _{Ca} :	Canal potassique calcium-dépendant (<u>C</u> a ²⁺ -dependent <u>K</u> ⁺ channel)
kDa:	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
mbar:	<u>M</u> illib <u>a</u> r
mc:	<u>M</u> aurer's <u>c</u> left
mV:	<u>M</u> illi <u>V</u> olt
NBD:	<u>N</u> ucleotide <u>B</u> inding <u>D</u> omain
NPP:	<u>N</u> ew <u>P</u> ermeation <u>P</u> athway
NPPB:	Acide 5- <u>N</u> itro-2-(3-phénylpropylamino) <u>b</u> enzoïque
NSC:	Canal cationique non-sélectif (<u>N</u> on- <u>S</u> elective <u>C</u> ation channel)
ORCC:	<u>O</u> utwardly <u>R</u> ectifying <u>C</u> hloride <u>C</u> hannel
P:	<u>P</u> arasite
pA:	<u>P</u> ico <u>A</u> mpère
PD:	<u>P</u> arasitophorous <u>D</u> uct
PESAC:	<u>P</u> lasmodial <u>E</u> rythrocyte <u>S</u> urface <u>A</u> nion <u>C</u> hannel
PGE ₂ :	<u>P</u> rostaglandine <u>E</u> ₂
PKA:	<u>P</u> rotéine <u>K</u> inase <u>A</u>
P _o :	<u>P</u> robabilité d' <u>o</u> uverture
PPM:	Membrane Plasmique du parasite (<u>P</u> arasite <u>P</u> lasma <u>M</u> embrane)
pS:	<u>P</u> ico <u>S</u> iemens
PVM:	Membrane Vacuolaire (<u>P</u> arasitophorous <u>V</u> acuolar <u>M</u> embrane)
RBCM:	Membrane érythrocytaire (<u>R</u> ed <u>B</u> lood <u>C</u> ell <u>M</u> embrane)
re:	<u>R</u> éticulum <u>e</u> ndoplasmique
SDS-PAGE:	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate- <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
TVN:	Réseau tubovésiculaire (<u>T</u> ubovesicular <u>N</u> etwork)
VRAC:	<u>V</u> olume- <u>R</u> egulated <u>A</u> nionic <u>C</u> hannel

Liste des Figures et Tableaux

FIGURES :

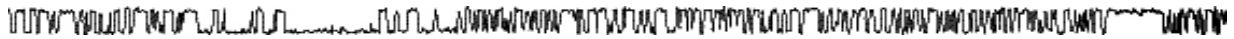
- Figure 1 :** Les transporteurs membranaires de la membrane du globule rouge.
- Figure 2 :** Cycle de développement sexué de *Plasmodium falciparum*.
- Figure 3 :** Cycle de développement asexué de *Plasmodium falciparum*.
- Figure 4 :** Mécanismes d'absorption et de transformation de l'hémoglobine en cristaux d'hémozoïne.
- Figure 5 :** Voies de transport alternatives de solutés dans un globule rouge infecté par *P. falciparum*.
- Figure 6 :** Les différentes voies de transport utilisées par le parasite intracellulaire *P. falciparum* pour l'acquisition de solutés à partir du cytosol de son hôte.
- Figure 7 :** Conséquences physiologiques du développement de *P. falciparum* sur le transport de solutés tels que le Na⁺ et le K⁺.
- Figure 8 :** Modifications du transport de solutés de faible poids moléculaire dans une cellule infectée par *P. falciparum*.
- Figure 9 :** Le TVN: rôle dans l'exportation de protéines et les échanges de solutés entre *P. falciparum*, son hôte et le milieu environnant.
- Figure 10 :** Effet d'inhibiteurs de canaux chlorure sur la conductance globale induite dans la membrane des globules rouges infectés.
- Figure 11 :** Le canal ORCC.
- Figure 12 :** Composition du milieu utilisé pour la culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum* et contrôle de la parasitémie par coloration de Giemsa.
- Figure 13 :** Mode d'action des différents détergents utilisés pour l'extraction des protéines membranaires.
- Figure 14 :** Technique de séparation des protéines membranaires et détection par *immunoblot*.
- Figure 15 :** Représentation des différentes configurations utilisées en *patch-clamp*.
- Figure 16 :** Anatomie du poste de *patch-clamp*.
- Figure 17 :** Représentation des différents constituants électroniques du poste de *patch-clamp*.
- Figure 18 :** Enregistrement de l'activité unitaire d'un canal ionique.
- Figure 19 :** La technique du *whole-cell*.
- Figure 20 :** Localisation de canaux CFTR dans la membrane du globule rouge humain.
- Figure 21 :** Structure et mécanismes d'activation d'un canal CFTR.
- Figure 22 :** Activation de la Protéine Kinase A.

- Figure 23 :** Activation, en *cell-attached*, du canal CFTR-like présent dans la membrane de globules rouges contrôle et CF, par augmentation du taux d'AMP_c intracellulaire.
- Figure 24 :** Inhibition en configuration *cell-attached* de l'activité de canaux CFTR-like présents dans la membrane de cellules CF, préalablement activés par augmentation de la concentration intracellulaire en AMP_c.
- Figure 25 :** Caractérisation en configuration *cell-attached* de la cinétique des canaux CFTR-like de la membrane des érythrocytes contrôle et CF, activés par augmentation du taux d'AMP_c intracellulaire.
- Figure 26 :** Activation, en configuration *inside-out*, du canal CFTR-like présent dans la membrane de globules rouges contrôle et CF, en présence de la sous unité catalytique de la PKA (100 nM) et d'ATP (1mM) au niveau cytosolique.
- Figure 27 :** Inhibition, en configuration *inside-out*, de canaux CFTR-like présents dans la membrane de globules rouges CF, préalablement activés par phosphorylation.
- Figure 28 :** Caractérisation en configuration *inside-out* de la cinétique des canaux CFTR-like présents dans la membrane des érythrocytes contrôle et CF, activés par application de PKA et d'ATP au niveau de sa face cytosolique.
- Figure 29 :** Activation et évolution au cours du temps, en configuration *whole-cell*, d'une conductance anionique dans la membrane de globules rouges contrôle et CF, par phosphorylation.
- Figure 30 :** Caractérisation de la mécano-sensibilité, en configuration *inside-out*, du canal CFTR-like présent dans la membrane d'érythrocytes humains contrôle et CF.
- Figure 31 :** Comparaison, en configuration excisée, de la mécano-sensibilité du canal CFTR-like présent dans la membrane de globules rouges contrôle et CF.
- Figure 32 :** Rôle physiologique du canal : le transport d'ATP.
- Figure 33 :** Caractérisation des courants anioniques spontanément enregistrés en configuration *cell-attached* dans la membrane d'une cellule CF infectée par *P. falciparum*.
- Figure 34 :** Caractérisation, en configuration *whole-cell*, des courants membranaires anioniques de globules rouges contrôle et CF infectés par *P. falciparum*.
- Figure 35 :** Inhibition de la conductance membranaire globale de cellules CF infectées par *P. falciparum*.
- Figure 36 :** Effet des inhibiteurs des processus de phosphorylation sur les courants membranaires induits par *P. falciparum*.
- Figure 37 :** Détection de protéines CIC-2 et CFTR dans des extraits membranaires de globules rouges contrôle et de cerveau de rat.
- Figure 38 :** Représentation schématique de l'organisation présumée des principales protéines du cytosquelette érythrocytaire.

TABLEAUX :

- Tableau 1 :** Modifications du transport de solutés de faible poids moléculaire dans une cellule infectée par *P. falciparum*.
- Tableau 2 :** Inhibiteurs du NPP et transport de solutés de haut poids moléculaire.
- Tableau 3 :** Composition des solutions de bain et de pipette utilisées lors des expériences de *patch-clamp*.
- Tableau 4 :** Liste des différents produits testés au cours des expériences de *patch-clamp*.
- Tableau 5 :** Comparaison des caractéristiques électrophysiologiques du canal anionique de faible conductance présent dans la membrane des globules rouges humains à celles d'autres canaux chlorure.
- Tableau 6 :** Comparaison des caractéristiques électrophysiologiques des différents canaux observés dans la membrane de globules rouges infectés par le parasite *P. falciparum*.

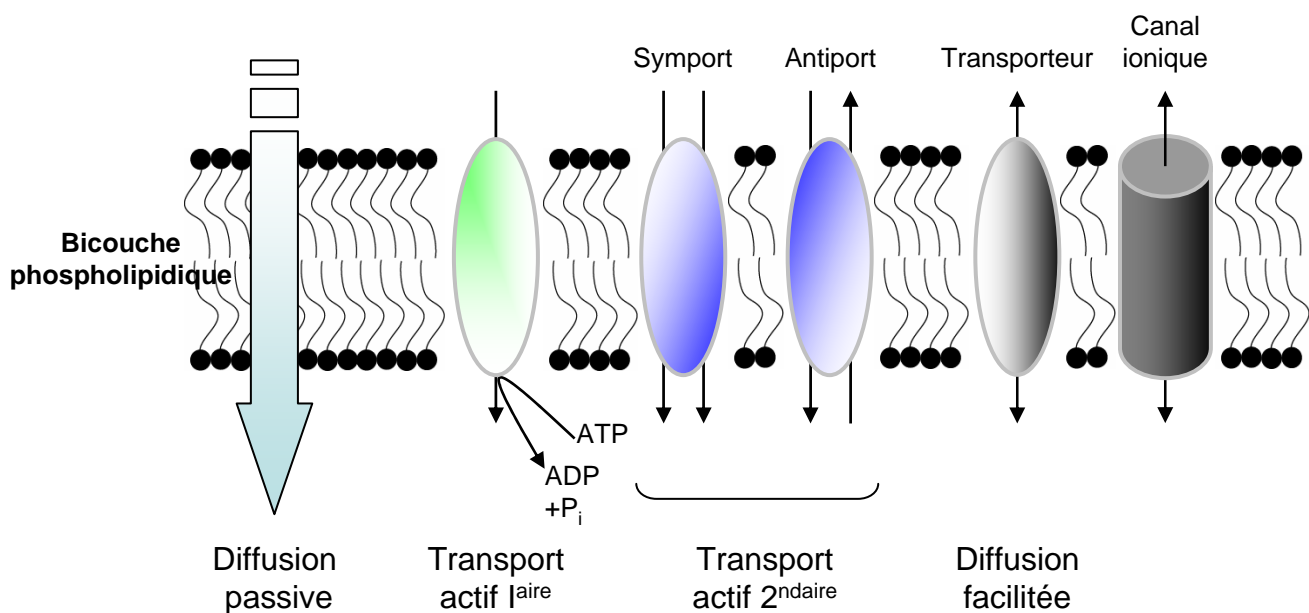
Introduction



Introduction

Le sang est un tissu particulier de l'organisme. Il remplit d'importantes fonctions telles que le transport de nombreuses substances (gaz dissous, nutriments, produits métaboliques, vitamines, électrolytes, ...), le transport de chaleur (thermorégulation), la transmission des signaux hormonaux. Il joue également le rôle de système tampon et permet la bonne marche du système immunitaire. Ces fonctions sont réparties entre le plasma qui constitue la phase aqueuse du sang et les cellules sanguines dont les globules rouges font partie. Ces cellules sont produites de façon continue chez les mammifères au cours de l'érythropoïèse (Orkin, 1995; Neildez-Nguyen *et al.*, 2002). Cette production peut-être accrue dans le cas d'un déficit en oxygène (hypoxie, Nikinmaa, 1990), ce qui entraîne la libération d'une hormone : l'érythropoïétine (ou EPO, produite à 90% par les reins et à 10% par le foie, chez l'adulte). Cette hormone stimule la formation de globules rouges au niveau de la moelle osseuse. L'érythropoïétine a pour cible des cellules souches du tissu hématopoïétique. Sous son action, ces cellules vont commencer à se différencier (Klinken, 2002) en érythroblastes en passant successivement par les stades de proérythroblastes, érythroblastes basophiles (qui commencent à produire de l'hémoglobine), polychromatophiles et acidophiles. Ces derniers perdront leur noyau, donnant ainsi naissance à des réticulocytes qui seront libérés dans la circulation sanguine. Dès lors, ces cellules vont continuer leur maturation pendant 24 à 48 heures permettant ainsi la constitution du stock final d'hémoglobine. Finalement, après la perte de leurs organites cellulaires (mitochondries, ribosomes, ...), les érythrocytes matures participeront aux échanges gazeux. La perte du noyau cellulaire offre néanmoins de nombreux avantages à une cellule « circulante », dont notamment une flexibilité accrue (résultant également de modifications de son cytosquelette), lui permettant ainsi de passer à l'intérieur de capillaires sanguins de diamètre réduit (d'un diamètre interne inférieur à leur propre diamètre : 8 μm), mais aussi de réduire l'effort cardiaque nécessaire au maintien de la

A



B

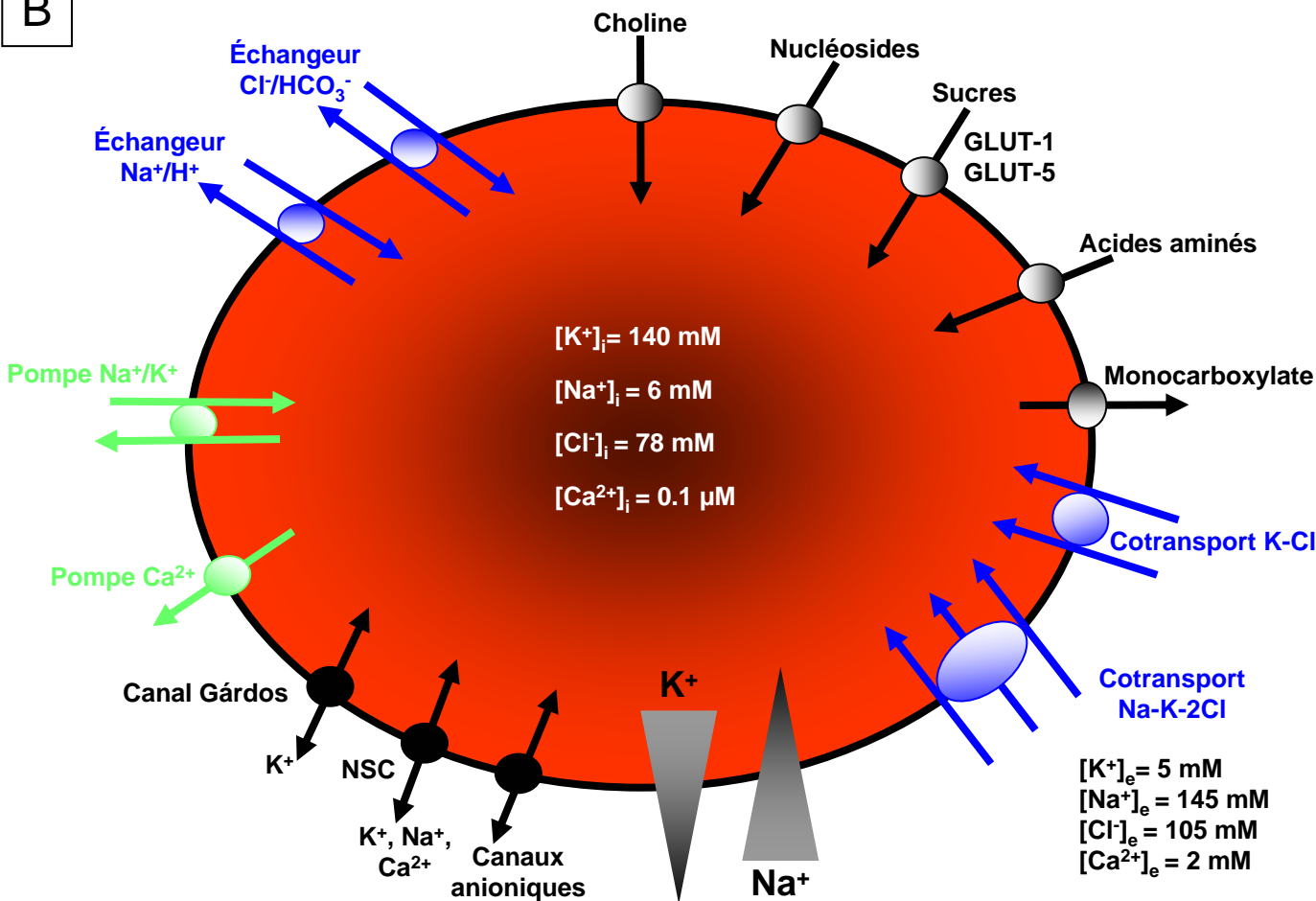


Figure 1 : Représentation schématique des principales voies de transport à travers la membrane des érythrocytes :

A : Schéma des différents mécanismes de transport de solutés à travers la bicouche lipidique constituant la membrane des globules rouges.

B : Représentation des principaux transporteurs identifiés dans la membrane cytoplasmique de globules rouges humains.

Introduction

circulation sanguine. Cependant, privés de toute machinerie cellulaire, les érythrocytes sont dans l'incapacité de synthétiser de nouvelles protéines ou de renouveler leur stock protéique. Ainsi, les érythrocytes sont des cellules hautement spécialisées dans deux fonctions : le transport de l'oxygène des voies respiratoires vers les tissus et le transport « inverse » du dioxyde de carbone (CO_2) produit par le métabolisme cellulaire. Ceci est rendu possible grâce à la présence de deux systèmes moléculaires particuliers : l'hémoglobine qui est le pigment respiratoire fixant l'oxygène (Gershon, 2001; Ho et Lukin, 2001) et l'échangeur d'anions (Bande 3 ou capnophorine) qui, associé à l'anhydrase carbonique (Gershon, 2001; Galtieri *et al.*, 2002) permet l'interconversion et le transport du CO_2 en bicarbonate. La membrane des globules rouges, constituée d'une bicouche phospholipidique (la phosphatidylsérine en est l'un des composants essentiels), forme une barrière de perméabilité (Lane, 2001) mais crée aussi un environnement permettant l'insertion de nombreuses protéines (Reithmeier, 2001) spécialisées dans les échanges transmembranaires afin de garantir le maintien de ces deux fonctions. Le bon fonctionnement de ces transporteurs permet alors de conserver la composition ionique, le pH cytoplasmique et sanguin, le potentiel membranaire et le volume cellulaire constants tout au long des 120 jours de la vie d'un globule rouge humain. Notons que ces transporteurs ne sont pas tous actifs simultanément et certains ne constituent probablement que des vestiges de transporteurs qui étaient actifs lors de stades précoces du globule rouge (Kirk *et al.*, 1992c; Drew *et al.*, 2002). Les érythrocytes ont toujours été considérés comme un excellent modèle pour l'étude des mécanismes de transports membranaires. C'est pourquoi leurs transporteurs sont parmi les plus étudiés à ce jour (Lew *et al.*, 1986; Nikinmaa, 1990). Ainsi, ces voies de transport peuvent être classées en 3 catégories :

- La perméabilité basale (**Fig. 1 A**) ou diffusion passive (*i.e. electrodiffusional leak*) peut être définie comme le flux résiduel mesuré lorsque tous les transporteurs membranaires connus sont inhibés. Aucun transporteur n'intervient dans ce processus où seul un gradient

Introduction

électrochimique¹ permet le passage de solutés ou de petites molécules à travers la bicouche lipidique qui constitue la membrane plasmique des globules rouges. Si les substances lipophiles ou apolaires diffusent très facilement à travers cette dernière (c'est le cas des gaz dissous tels que l'oxygène, le CO₂ ou l'azote, mais aussi de certaines hormones ou encore des acides gras), en revanche, les ions et les molécules d'eau ne diffusent que très lentement. Ce processus est peu spécifique dans le sens où n'importe quelle molécule hydrophobe passera la membrane (Lodish *et al.*, 1997) à un taux proportionnel à sa propre solubilité dans la bicouche lipidique (Gershon, 2001).

- Les transports passifs jouent un rôle important dans le fonctionnement cellulaire. Cependant, ces mécanismes sont des processus relativement lents. Ainsi, si une perturbation survient, ce type de transport ne peut en aucun cas s'opposer à de nouveaux gradients (par exemple, lorsque les globules rouges passent dans les reins). Dans ce cas, l'équilibre peut être recouvré ou même maintenu grâce à l'existence de transports actifs (**Fig. 1 A**) qui sont à même de véhiculer diverses molécules contre leur propre gradient électrochimique en consommant de l'énergie. On distingue deux types de transports actifs : les transports actifs primaires d'une part et secondaires d'autre part. Les transports actifs primaires (**Fig. 1 A**) sont saturables, ils ne peuvent assurer qu'un taux de transport maximal déterminé. De plus, ils sont plus ou moins spécifiques d'une substance donnée (ou de ses analogues). De tels transporteurs sont dépendants de l'apport d'énergie, si ce dernier est défaillant, le transport s'en trouvera perturbé. Ce type de transport communément appelé « pompe ionique » tire son énergie de l'hydrolyse directe de l'ATP, d'où leur appellation ATPases. Il est admis que la pompe sodium/potassium (Na⁺/K⁺) et la calcium-ATPase constituent les principales pompes ioniques des globules rouges (Brugnara, 1997, **Fig. 1 B**). La Na⁺/K⁺-ATPase joue un rôle important dans la régulation du volume car elle intervient

¹ Ce gradient résulte de la somme de deux composantes : 1) un gradient de concentrations, c'est-à-dire une différence de concentrations entre deux milieux pour une substance donnée induisant, un déplacement de cette substance du milieu où elle est le plus concentrée vers le milieu où elle est le plus diluée ; 2) un gradient électrique résultant de la répartition inégale des charges présentes à chaque face de la membrane.

Introduction

dans le concept de pompe-fuite mis en évidence par Tosteson et Hoffman (1960). De plus, elle génère et maintient les gradients de sodium et potassium à travers la membrane des érythrocytes, étant ainsi à l'origine du potentiel de membrane. La pompe calcique fait sortir les ions calcium de la cellule, elle maintient ainsi une concentration de calcium libre cytoplasmique inférieure à $0,1 \mu\text{M}$. Sa distribution et sa capacité maximale à extraire le calcium de la cellule sont assez hétérogènes chez les érythrocytes humains (Lew *et al.*, 2003a).

Le fonctionnement des transports actifs secondaires (**Fig. 1 A**) est couplé au mécanisme de transport passif d'un ion. Ainsi, le gradient chimique d'un ion (par exemple le gradient entrant de sodium) constitue une force motrice permettant le transport d'un autre ion. Ce transport électroneutre est appelé symport si la substance impliquée est déplacée dans le même sens que l'ion moteur et antiport si la substance et l'ion sont échangés en sens contraire. La membrane des globules rouges humains est dotée de 4 grands types de transports actifs secondaires : l'échangeur d'anions (AE1) ou Bande 3 (ou encore échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), l'échangeur Na^+/H^+ , le cotransport K-Cl et le cotransport Na-K-2Cl. Ces transporteurs jouent un rôle précis dans la physiologie de la cellule. L'échangeur d'anions est la protéine la plus abondante chez les globules rouges ; elle est en effet présente à plus d'un million d'exemplaires par cellule. Son rôle principal est de transporter le dioxyde de carbone sous forme de bicarbonate. Ainsi, la bande 3 est la protéine la mieux caractérisée dans la membrane des érythrocytes (Galtieri *et al.*, 2002), tant au niveau biochimique (Jay et Cantley, 1986) que cristallographique (Zhang *et al.*, 2000). D'autres études ont visées à déterminer les effets de certains inhibiteurs sur ce transporteur (Falke et Chan, 1986; Culliford *et al.*, 2003). Le cotransport K-Cl extrait du potassium et du chlore hors de la cellule. Il joue un rôle important dans la régulation du volume cellulaire (il est activé lors de l'augmentation de ce dernier, ainsi que par les variations de pH).

Introduction

- Enfin, la diffusion facilitée (**Fig. 1 A**) constitue la dernière catégorie de transport membranaire. Ce sont des transporteurs spécifiques (appelés uniports) qui permettent le passage de solutés d'un côté à l'autre de la membrane. Ces mécanismes possèdent des vitesses de transport très élevées. De plus, ils sont spécifiques d'une espèce moléculaire ou d'une seule catégorie de molécules étroitement apparentées. Ainsi, Cabantchik (1999) distingue sept catégories d'uniporteurs majeurs dans la membrane des hématies humaines (**Fig. 1 B**): un transporteur de choline, des transporteurs d'hexoses (GLUT 1 et 5), divers transporteurs d'acides aminés, un transporteur (GSTP) de glutathion oxydé (GSSG), un transporteur de monocarboxylate (MCAT), un transporteur de nucléosides (NT1) et un transporteur d'urée. Ces transporteurs sont en étroite relation avec le fonctionnement cellulaire du globule rouge. En effet, la glycolyse anaérobie (Harper et Harris, 2001) est la seule voie métabolique permettant de couvrir les besoins énergétiques de l'érythrocyte² (Weber, 2001). Cette dernière est alimentée par les transporteurs GLUT 1 et NT 1 qui importent du glucose et des acides nucléiques dans la cellule. Les transporteurs d'acides aminés fournissent les éléments indispensables à la biosynthèse de glutathion (GSH) indispensable pour protéger l'hémoglobine, certains lipides et protéines de l'oxydation (Gershon, 2001). Le transporteur de monocarboxylate quant à lui intervient dans l'élimination de déchets métaboliques tels que le lactate ou le pyruvate produits au cours de la glycolyse. Ces transporteurs sont donc directement associés aux fonctions propres du globule rouge, ils servent à fournir les sources d'énergie nécessaires à la machinerie permettant la synthèse de l'ATP. Ce dernier sert d'une part à maintenir le cytosquelette fonctionnel grâce à la phosphorylation des protéines membranaires et d'autre part à alimenter en énergie les transports actifs primaires.

Toutefois, cette liste reste incomplète sans les canaux ioniques (**Fig. 1 A & B**) qui font l'objet de cette étude. Les canaux ioniques sont des protéines ubiquistes (Lipscombe,

² Les globules rouges ne possèdent plus de mitochondries pour produire de l'énergie. De plus, leur présence serait contreproductive car leur activité consommerait une fraction importante de l'oxygène transporté par les érythrocytes.

Introduction

2001; Jentsch *et al.*, 2002; Nilius et Droogmans, 2003), qui se rencontrent dans la plupart des types cellulaires. Ils se situent dans la membrane plasmique et permettent le passage d'ions (ou d'eau dans le cas des aquaporines, King et Agre, 2001) d'un côté à l'autre de la membrane. Ils peuvent être ouverts ou clos et ainsi, exercer un contrôle sur le mouvement des ions. La membrane plasmique est une barrière séparant le milieu intracellulaire de l'extérieur, elle permet donc le maintien de concentrations ioniques intracellulaires à des niveaux différents de ceux du milieu extérieur (**Fig. 1 B**). Il existe donc une différence de potentiels entre ces compartiments, qui constitue, combinée avec le gradient de concentrations, un gradient électrochimique spécifique à chaque espèce ionique. La cellule fait une utilisation considérable de ces gradients dans ses systèmes de contrôle. Ainsi, lorsque les canaux sont ouverts, les ions suivent leur propre gradient pour entrer ou sortir de la cellule, beaucoup plus rapidement que par la plupart des autres systèmes de transport (on estime que le flux à travers un canal peut atteindre des valeurs allant jusqu'à plusieurs centaines de millions d'ions à la seconde). D'une manière générale, un canal se compose d'un pore aqueux central qui peut être ouvert par changement conformationnel et d'un filtre de sélectivité. Les ions étant des molécules chargées (positivement dans le cas des cations ou négativement dans le cas des anions), leur mouvement génère un courant qui peut être mesuré par la technique du *patch-clamp*, contrairement à d'autres systèmes de transports électroneutres. Notons que les canaux varient considérablement par leur *gating* (Lipscombe, 2001), c'est-à-dire par les facteurs qui régulent leur fonctionnement. Il peut s'agir soit d'une combinaison de substances chimiques présentes à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule (par exemple : les canaux à récepteur nicotinique), soit de changements du potentiel membranaire (comme les canaux sodique voltage-dépendants), ou encore d'autres facteurs comme des stimuli sensitifs tels que la mécano-stimulation (comme les canaux SACs : *Stretch-Activated Channels*). Enfin, les canaux peuvent être caractérisés par leur sélectivité, il s'agit de leur spécificité vis-à-vis des ions qu'ils laissent passer (Heinemann, 2001). Ils peuvent être très spécifiques comme la plupart des canaux potassique, sodique ou calcique

Introduction

(du fait de leur filtre de sélectivité très restrictif, Miller, 2001) ou au contraire peu spécifiques comme certains canaux cationiques non-sélectifs (appelés NSC) qui sont perméables à une grande variété de cations mono- ou divalents. Il convient de noter que les canaux anioniques sont généralement appelés canaux chlorure, car les ions Cl^- sont les anions majoritaires à l'intérieur des différents compartiments biologiques, néanmoins, l'étude de la sélectivité de ces canaux est importante car ils peuvent présenter une perméabilité non négligeable à d'autres anions.

Au début de cette étude, seuls trois types de canaux ioniques avaient été recensés (en utilisant la technique du *patch-clamp*) dans la membrane des érythrocytes humains : un canal potassique activé par le calcium (Grygorczyk et Schwarz, 1983) un canal cationique non-sélectif voltage-dépendant (Christophersen et Bennekou, 1991), et enfin une conductance anionique a été observée pour la première fois par Schwarz *et al.*, (1989).

Le canal érythrocytaire le plus étudié est sans conteste le canal potassique calcium-dépendant, appelé canal Gárdos (Gardos, 1956; Maher et Kuchel, 2003) ou IK_{Ca} . En effet, ce canal possède une conductance intermédiaire de 25 pS (Grygorczyk et Schwarz, 1983) et a été récemment identifié au niveau moléculaire comme le hSK4 (*human Small conductance calcium-activated K^+ channel 4* ou KCNN4, Hoffman *et al.*, 2003) Ce canal intervient dans une maladie génétique nommée anémie falciforme (*sickle cell disease*). Cette maladie résulte d'une mutation du gène codant pour l'hémoglobine, produisant une hémoglobine S (Hb S) différente de l'hémoglobine A conventionnelle. Joiner (1993) explique que cette hémoglobine S polymérise lorsque les globules rouges se trouvent dans les zones de la circulation où la pression partielle en oxygène (PO_2) est faible. La première conséquence de ce phénomène est une élévation de la viscosité cytoplasmique et une détérioration des fonctions rhéologiques (rigidité cellulaire et fonctionnement anormal du cytosquelette) liée à une perte de leur contenu en potassium et en eau. Selon Gibson et Ellory (2002) plusieurs voies de transport cationiques interviennent dans l'augmentation de la perméabilité au

potassium de ces cellules. Tout d'abord, une voie de transport permettant une perte passive de potassium et une entrée de sodium et de calcium est activée par de faibles PO_2 . Le transporteur responsable des ces flux non sélectifs de cations serait un canal ionique appelé P_{sickle} , jamais observé en *patch-clamp* et dont l'identité reste encore à définir. Cette conductance accrue aux cations permet ensuite l'activation conjointe du cotransport K-Cl (Apovo *et al.*, 1994; Brugnara, 1997) et du canal Gárdos sensible à l'élévation de la concentration intracellulaire en calcium (Bookchin *et al.*, 1987). Dès lors, les pertes en potassium et en eau s'accroissent, accélérant la formation d'hémoglobine S dont la concentration augmente, conduisant à l'hémolyse (éclatement des hématies) et à la vaso-occlusion (Brugnara *et al.*, 1986). L'inhibition de ces deux transporteurs amène une normalisation partielle de l'hydratation des cellules *sickle* (Dunn, 1998; Bennekou *et al.*, 2000; Bennekou *et al.*, 2001; Brugnara, 2001; Brugnara *et al.*, 2001; Vichinsky, 2002).

Un autre canal cationique décrit par Christophersen et Bennekou (1991), peut être défini comme un canal non-sélectif voltage-dépendant couplé à un récepteur à acétylcholine de type nicotinique (Bennekou, 1993). Il est perméable aussi bien aux cations monovalents (Na^+ et K^+) que divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} et Ba^{2+} , (Kaestner *et al.*, 2000; Kaestner *et al.*, 2002). Sa probabilité d'ouverture est directement liée au potentiel de membrane. Cependant, son rôle physiologique reste encore à l'heure actuelle indéterminé. Ainsi, du fait de sa grande perméabilité cationique (au Na^+ , K^+ et Ca^{2+}), ce canal pourrait intervenir dans la régulation de l'activité du cotransport K-Cl et du canal Gárdos. Enfin, notons que dans certaines situations, une diminution du volume cellulaire peut être engendrée par l'activation des canaux NSC et K_{Ca} sous l'action de prostaglandines (PGE_2) libérées par les plaquettes sanguines. Cette réduction du volume cellulaire des érythrocytes interviendrait dans les mécanismes de coagulation (Kaestner *et al.*, 2002). Huber *et al.*, (2001) observent également l'existence d'une conductance cationique non sélective régulée par le volume cellulaire et la concentration interne en chlore.

Introduction

Le troisième type de canal présent dans la membrane des érythrocytes est un canal anionique de faible conductance linéaire (6 pS). Peu d'informations sont disponibles sur ce canal, cependant, Schwarz *et al.*, (1989), estiment qu'il est présent à 100 exemplaires dans la membrane des globules rouges humains. Les travaux réalisés en flux par Freedman *et al.*, (1994) ainsi que par Bennekou *et al.*, (2000) semblent confirmer l'existence d'une conductance chlorure voltage-dépendante dans la membrane des érythrocytes humains.

Plus récemment, les travaux menés au sein de l'équipe de Florian Lang ont mis en évidence l'existence de deux nouvelles conductances dans la membrane des érythrocytes humains : une conductance chlorure activée par oxydation membranaire (Huber *et al.*, 2002b) et une conductance cationique perméable au Na^+ et Ca^{2+} , dépendante de la concentration extracellulaire de chlore et sensible à l'oxydation³ (Duranton *et al.*, 2002). De plus, il semblerait que ces canaux jouent un rôle non négligeable dans la mort cellulaire (sénescence) des érythrocytes (Lang *et al.*, 2003).

Les canaux ioniques interviennent dans de nombreux processus physiologiques tels que l'homéostasie, la régulation du volume cellulaire, le transport membranaire, la régulation de l'excitabilité électrique, du cycle cellulaire ou encore de l'apoptose ..., (pour revue : Heinemann, 2001; Sardini, 2003; Jentsch *et al.*, 2002, Nilius et Droogmans, 2003; Lipscombe, 2001). Bien que tous ces processus ne soient pas encore élucidés, ces rôles clés en font cependant des éléments indispensables au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire. Ainsi, leur activité assure la bonne marche des autres transporteurs membranaires essentiels au globule rouge pour lui permettre de mener à bien sa fonction principale. L'équilibre physiologique de la cellule peut rapidement être bouleversé si l'un de ses composants présente un dysfonctionnement. Dès lors, les canaux ioniques peuvent être impliqués dans diverses pathologies. Dans certains cas, lorsqu'un élément cellulaire est

³ Cette conductance pourrait être impliquée dans certaines pathologies hémolytiques induisant de forts stress oxydatifs comme la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Introduction

dérégulé, le fonctionnement « normal » d'un canal ionique peut avoir de lourdes conséquences sur cet élément, comme nous l'avons vu précédemment dans le cas du canal Gárdos et de l'anémie falciforme. A l'opposé se trouvent les canalopathies (Ashcroft, 2000), où le canal est à l'origine même de la pathologie. C'est le cas du CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*, seul canal appartenant à la famille des transporteurs ABC, *ATP-Binding cassette transporter*), dont le gène codant peut être touché par plus de 700 mutations différentes (Riordan *et al.*, 1989), la plupart provoquent un mauvais adressage de cette protéine à la membrane plasmique (Kopito, 1999) entraînant de graves anomalies au niveau des épithélia sécréteurs (poumon, pancréas, tissu hépatique, ... Pilewski et Frizzell, 1999), connues sous le nom de mucoviscidose. Bien que ce canal soit défini comme étant propre aux cellules épithéliales, certains auteurs se sont penchés sur l'étude des conséquences de la mutation $\Delta F508$ sur la physiologie des globules rouges (Sprague *et al.*, 1998; Abraham *et al.*, 2001; Sprague *et al.*, 2001). Assef *et al.*, (2003) décrivent également une activité CFTR dans la membrane des cellules K562⁴ qui peuvent se différencier en érythroïdes.

Les canaux ioniques peuvent aussi être impliqués dans certaines parasitoses. Ainsi, au cours de la dernière décennie une nouvelle théorie émerge à propos de leur rôle dans le développement de *Plasmodium falciparum*, organisme responsable de la malaria (*i.e.* paludisme). Ce parasite utilise les érythrocytes afin de croître et de se diviser tout en évitant le système immunitaire (Kirk, 2001). Pour cela, les premières études réalisées en flux isotopiques ont permis de mettre en évidence que ce parasite est capable de détourner et de sur-activer certains transporteurs endogènes de son hôte (Kanaani et Ginsburg, 1991; Kirk *et al.*, 1991a; Kirk *et al.*, 1991b; Kirk *et al.*, 1992a; Kirk *et al.*, 1992c; Ginsburg, 1994; Kirk et Horner, 1995a;1995b; Kirk *et al.*, 1996), mais également d'induire de nouvelles voies de perméabilité (*New Permeation Pathways*, NPPs) présentant les caractéristiques

⁴ Lignée cellulaire humaine myéloïde, isolée par culture de cellules leucémiques issues de l'épanchement pleural d'un patient au stade de transformation blastique.

Introduction

fonctionnelles de canaux anioniques (Kirk *et al.*, 1992b; Kirk *et al.*, 1993; Kirk *et al.*, 1994). En 2000, Desai, a pu observer de tels canaux dans la membrane de globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum*. Ces canaux sont spontanément actifs, dépendants du voltage et probablement impliqués dans l'acquisition de substances nutritives. Aussi ces travaux amènent-ils de nouvelles questions : quelle est l'origine des canaux ioniques impliqués dans ces NPPs ? Sont-ils synthétisés *de novo* par le parasite et exportés dans la membrane érythrocytaire ? Ou, au contraire, sont-ils endogènes à la cellule hôte ? Telles sont les questions auxquelles nous essaierons de répondre dans la présente étude. Auparavant, il convient de détailler l'état des connaissances concernant les relations hôte-parasite dans le cadre de cette pathologie.

Comme nous venons de le voir, la malaria est une maladie causée par un parasite protozoaire Apicomplexe du genre *Plasmodium*. Ce parasite est transmis à l'homme par l'intermédiaire de femelles moustiques du genre *Anopheles* au cours de leur repas sanguin. Ces moustiques sont présents dans la plupart des pays tropicaux et subtropicaux. Il existe approximativement 380 espèces d'*Anopheles*, mais seules 60 sont vecteurs du paludisme. Il existe plus de 120 espèces de *Plasmodium*, 4 d'entre elles peuvent infecter l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*. Parmi ces 4 espèces, *Plasmodium falciparum* est de loin l'espèce la plus virulente, tant par le nombre d'infections que par la mortalité qui en résulte (Ursos et Roepe, 2002). Le paludisme touche l'homme depuis plus de 5000 ans (Sherman, 2001), et en tant que tel, est considéré comme l'une des principales pressions sélectives sur le génome humain (Clark *et al.*, 2003). Les premiers indices concernant l'agent responsable ne furent obtenus qu'en 1880 par Louis Laveran. Ce dernier, en observant au microscope, le sang de soldats souffrants de fièvres intermittentes, découvrit des corps en forme de croissant (gamétocytes) ainsi que des filaments mobiles transparents émergeant de corps sphériques (exflagellation de microgamètes). Six ans plus tard, Camillo Golgi caractérisa le développement asexué et la multiplication de *Plasmodium malariae* et de

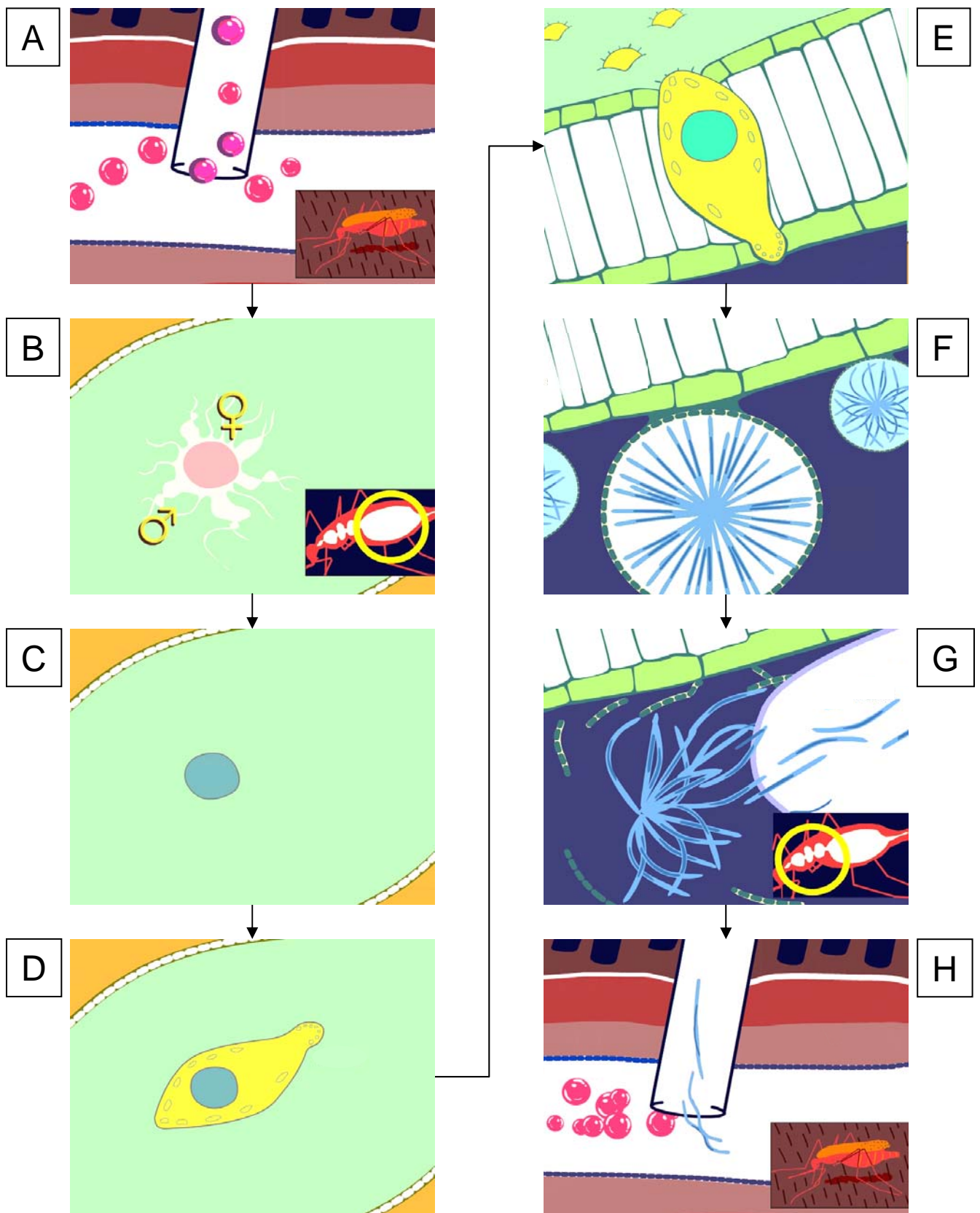


Figure 2. : Cycle de développement sexué de *Plasmodium falciparum* à l'intérieur de son vecteur arthropode : une femelle moustique *Anopheles* sp., tiré du site www.nature.com/nsu/malaria/ (Wellcome Trust).

Introduction

Plasmodium vivax, et déduisit de ses observations que la poussée de fièvre coïncide avec la rupture des érythrocytes qui entraîne la libération de mérozoïtes (Sherman, 2001). En 1897, Ronald Ross, démontre que les moustiques *Anopheles* sont les vecteurs utilisés par *Plasmodium*.

A l'heure actuelle, la malaria se rencontre dans plus de 100 pays. 500 millions de personnes, en Afrique majoritairement, mais aussi en Inde, Asie du Sud-est et Amérique du Sud sont infectées chaque année. On estime le nombre de décès à 2.5 millions dont environ 1 million touchent des enfants de moins de 5 ans (Trigg et Kondrachine, 1998; Kirk, 2001). L'incidence de la maladie a été multipliée par 4 ces cinq dernières années. Ceci est principalement dû à 3 trois facteurs : les résistances développées par les moustiques aux insecticides (comme le DDT, Kanzok et Zheng, 2003) ainsi que celles des parasites aux traitements les plus courants comme la chloroquine (ter Kuile *et al.*, 1993, et pour revue : Ursos et Roepe, 2002) et la plus grande mobilité des populations humaines. On notera toutefois que certaines personnes semblent être immunisées contre les infections liées à *Plasmodium*. On distingue d'une part, une immunité naturelle, liée à d'autres pathologies comme l'anémie falciforme, certaines thalassémies, la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase, ... (Sherman, 2001). D'autre part, il existe également une immunité acquise, il s'agit d'une réponse immunitaire dirigée contre le parasite, qui varie selon l'endémicité, l'âge (Hviid et Staalsoe, 2004) et les caractéristiques génétiques de la personne, et qui dépend de l'espèce et de la souche de *Plasmodium* (Clark *et al.*, 2003). Cependant, les mécanismes de défense mis en œuvre par l'organisme restent encore inexpliqués. Actuellement, les génomes de *Plasmodium falciparum* et d'*Anopheles gambiae*⁵ ont été complètement séquencés (Bahl *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 2002; Holt *et al.*, 2002; Mongin *et al.*, 2004), et ouvrent de nouvelles perspectives dans l'étude des processus complexes régulant le cycle cellulaire du parasite (Doerig *et al.*, 2000) et permettent de

⁵ *Anopheles gambiae* est le premier vecteur de paludisme en Afrique sub-saharienne, où 90% de la mortalité mondiale due à la malaria prévaut.

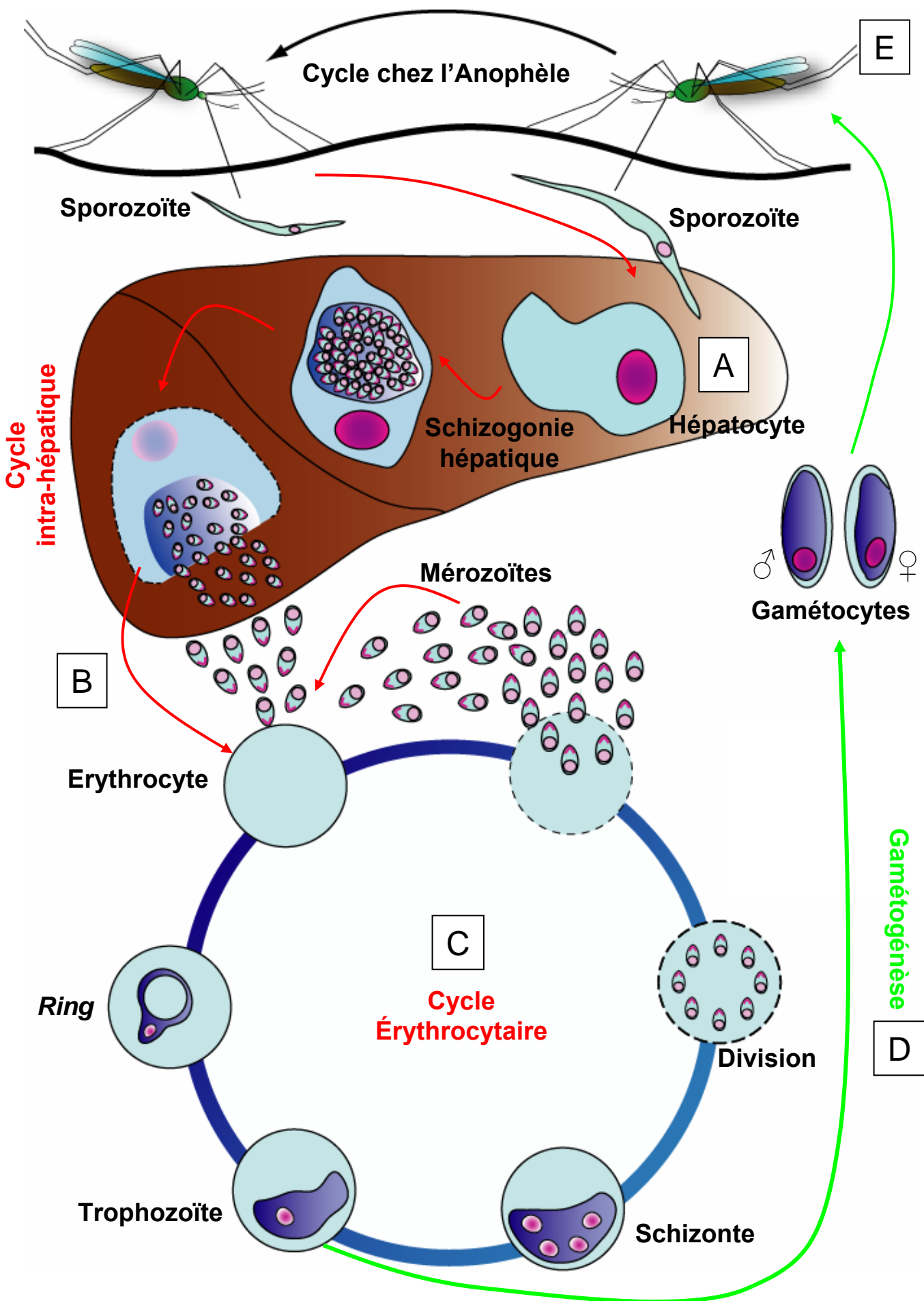


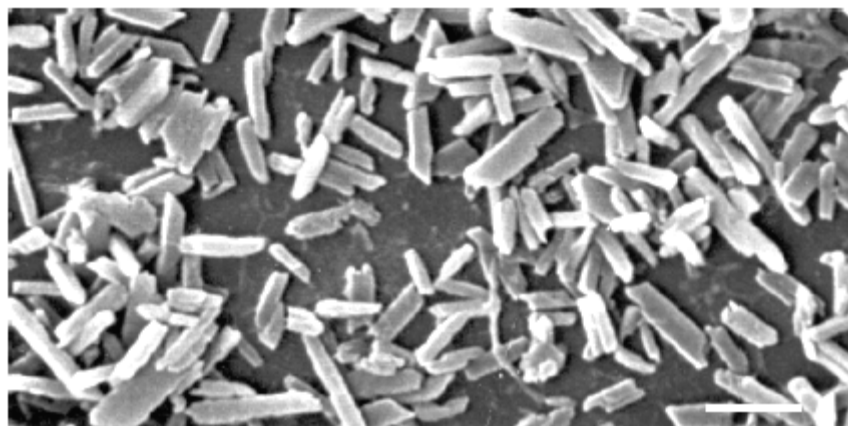
Figure 3. : Cycle de développement asexué de *Plasmodium falciparum* à l'intérieur de son hôte humain.

Introduction

mieux comprendre les interactions parasite-vecteur jusqu'à présent délaissées (Kanzok et Zheng, 2003) au profit de l'étude des relations hôte-parasite.

Le cycle de développement de *Plasmodium falciparum* a été abondamment décrit (Bannister *et al.*, 2000; Chitnis et Blackman, 2000; Bannister, 2001; Kirk, 2001; Kanzok et Zheng, 2003). Ce cycle comprend deux phases intimement liées : une phase sexuée qui se déroule dans le vecteur arthropode (**Fig. 2**) et une phase asexuée à l'intérieur de son hôte humain (**Fig. 3**). La première phase se déroule principalement à l'intérieur de l'organisme vecteur, c'est-à-dire une femelle moustique *Anopheles*. Ainsi, lorsqu'un moustique pique une personne atteinte de paludisme, en plus de son repas sanguin, il absorbe des gamétocytes présents dans la circulation (**Fig. 2 A**). Ces gamétocytes subissent une première transformation en gamètes (**Fig. 2 B**) dans l'appareil digestif du moustique, leur rencontre (fécondation) donnera un zygote (**Fig. 2 C**), puis un ookinète (*i.e.* zygote mobile, **Fig. 2 D**), ce dernier est alors capable de traverser l'épithélium de l'appareil stomacal du moustique pour s'attacher aux parois internes de ce dernier (**Fig. 2 E**). Le zygote passe alors au stade oocyste (**Fig. 2 F**) qui donnera, 10 à 15 jours plus tard, des sporozoïtes qui seront libérés dans l'hémolymphe du vecteur pour atteindre les glandes salivaires (**Fig. 2 G**). Ils seront enfin libérés dans la circulation sanguine de leur futur hôte, au cours du prochain repas sanguin de la femelle *Anopheles* (**Fig. 2 H**). A cet instant débute la phase asexuée du cycle de vie du parasite (**Fig. 3**). Les sporozoïtes, transportés par le sang, vont envahir les cellules hépatiques (**Fig. 3 A**) afin de s'y multiplier. Ainsi, chaque sporozoïte donnera des dizaines de mérozoïtes qui à leur tour seront libérés dans le système circulatoire (**Fig. 3 B**). Dès lors, chaque mérozoïte va pénétrer à l'intérieur d'un globule rouge (**Fig. 3 C**). Pour cela, le parasite utilise son complexe apical constitué d'une paire de rhoptries, de micronèmes et de granules denses (Haldar, 1998). Ces organites lui permettent de s'orienter par rapport à la cellule hôte et facilitent son invasion. Lors de l'invasion, on suppose que le parasite est capable de prélever un fragment de la membrane érythrocytaire afin de s'en servir comme

A



1 μm

B

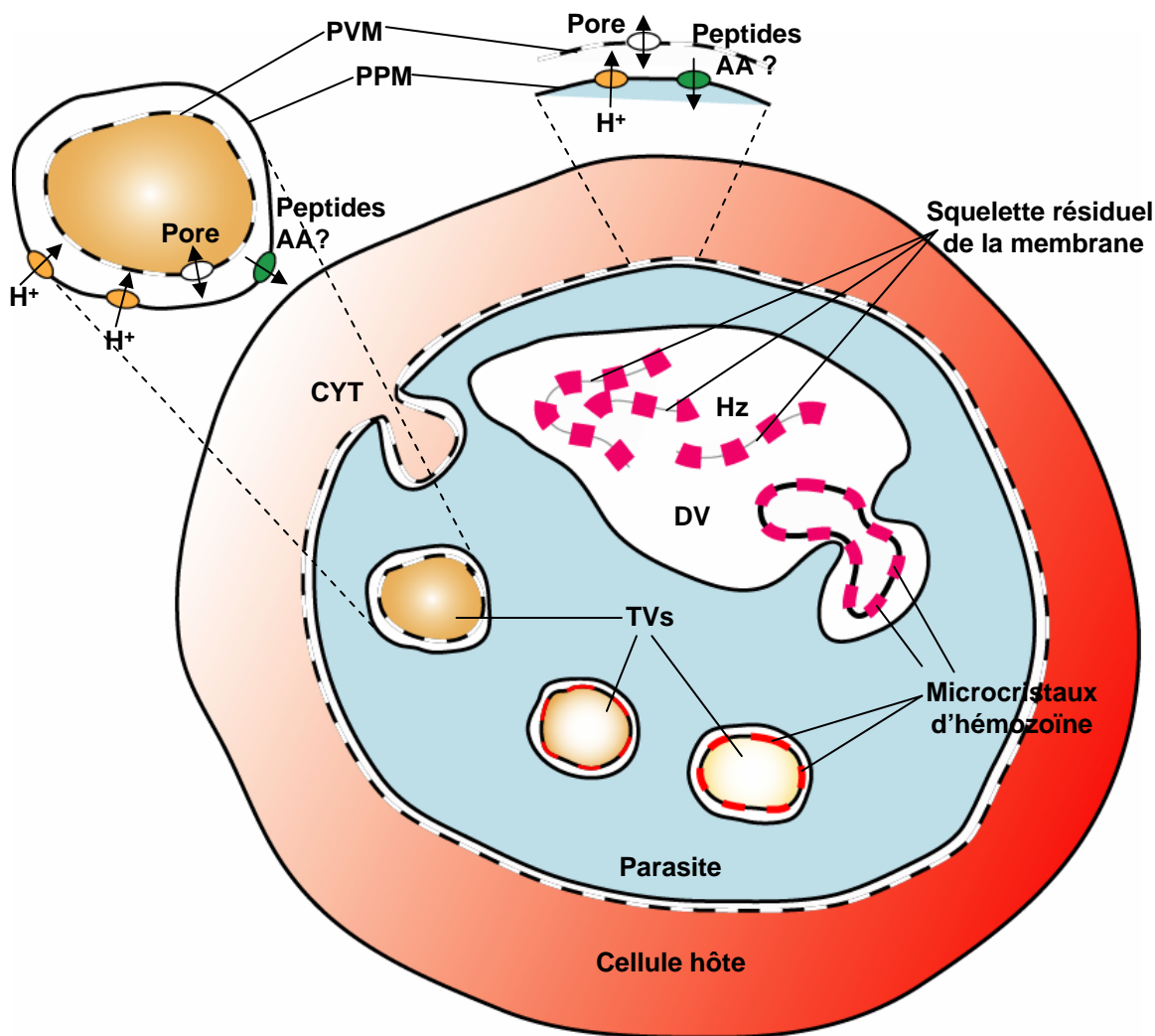


Figure 4. : Mécanismes d'absorption et de transformation de l'hémoglobine en cristaux d'hémozoïne, d'après Hempelmann et collaborateurs (2003) :

A : Cristaux d'hémozoïne observés en microscopie électronique, prélevés sur des trophozoïtes matures de *Plasmodium falciparum* (souche K1), (dimensions estimées : 1.0 μm x 0.6 μm x 0.2 μm).

B : Mécanisme supposé de biogenèse des cristaux d'hémozoïne. Le cytoplasme de la cellule hôte est ingéré par le cytosome (CYT) et est encapsulé dans une vésicule de transport (TV) formée de deux membranes. La membrane interne (tirets noirs) et externe (ligne noire) de cette TV sont dérivées, respectivement, de la PVM et de la membrane plasmique du parasite (PPM). La TV est acidifiée sous l'action de pompes vacuolaires à H^+ . La dégradation de l'hémoglobine se déroule à l'intérieur de la membrane interne, et l'hème se dépose sur la paroi que forme cette dernière. Les peptides et/ou les acides aminés (AA) sont transportés à travers les membranes de la TV pour être libérés dans le cytoplasme du parasite. L'augmentation de la concentration en hème au niveau de la membrane interne de la TV induit la formation de microcristaux d'hémozoïne (Hz). La digestion s'achève quand la membrane externe de ces vésicules fusionne avec la vacuole digestive (DV), délivrant les cristaux d'hémozoïne et le squelette résiduel de la membrane interne à l'intérieur de la DV.

Introduction

matrice pour constituer sa future vacuole parasitaire (*Parasitophorous Vacuolar Membrane* ou PVM). Cette vacuole joue le rôle de barrière entre sa propre membrane plasmique et le cytosol de la cellule hôte. C'est à partir de ce moment que les signes cliniques de la maladie apparaissent. Quelques heures après l'invasion, le premier stade de développement, appelé *ring* (nom dérivé de la forme des parasites à l'intérieur du globule rouge), est atteint. Quinze heures post-invasion, une augmentation progressive de l'activité métabolique et de biosynthèse est mesurable (Doerig *et al.*, 2000), c'est le stade trophozoïte. Avec la maturation, le taux d'utilisation du glucose et de production de l'acide lactique sont multipliés par 100 (Krishna *et al.*, 2000) par rapport à une cellule non infectée. Cela est en partie dû à la forte demande métabolique du parasite qui ne possède qu'une seule mitochondrie dont le cycle de l'acide citrique n'est pas fonctionnel, obligeant ainsi le parasite à consommer de grandes quantités de glucose pour alimenter la fermentation lactique indispensable à la production d'énergie. A ce stade, le parasite acquiert des portions du cytoplasme de son hôte par endocytose grâce aux *cytosomal vesicles* (**Fig. 4 B**) qui transportent notamment de l'hémoglobine dont le parasite extrait les fractions protéiques pour ses besoins en acide aminés. L'autre fraction toxique (ferriprotoporphyrine IX) est recyclée sous forme de cristaux d'hémozoïne non toxiques (**Fig. 4 A**) visibles en microscopie lorsque ces vacuoles fusionnent avec la vacuole digestive du parasite (Hempelmann *et al.*, 2003). Ces phénomènes s'accompagnent d'une production intensive d'ADN et d'ARN par le parasite. Les protéines qui en résultent sont exprimées non seulement à l'intérieur du parasite mais sont aussi exportées vers la PVM où elles peuvent être dispatchées vers le cytosol, le cytosquelette et la membrane plasmique du globule hôte voire même dans la circulation sanguine (Zhao *et al.*, 1994; Deitsch et Wellems, 1996; Deuticke, 1999; Wiser *et al.*, 1999). 33 à 36 heures après l'invasion, on observe que le parasite est capable d'absorber des solutés de haut poids moléculaires (Kirk *et al.*, 1999, Taraschi, 1999). A ce stade, le parasite occupe environ un tiers du volume de la cellule hôte. De nouvelles structures membranaires apparaissent dans le cytoplasme de cette dernière : certaines s'étendent à partir du PVM

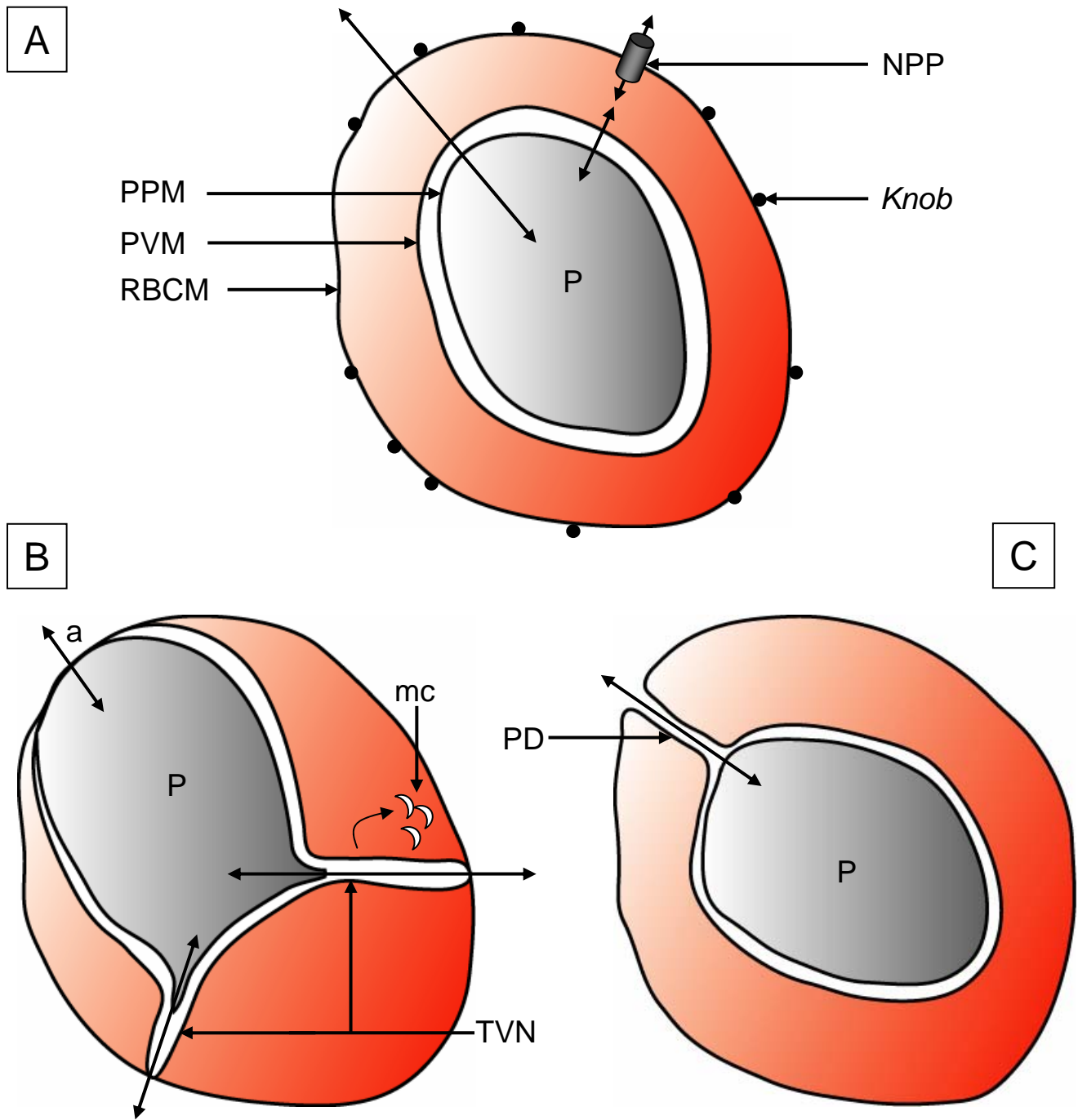


Figure 5 : Représentation schématique des voies de transport alternatives de solutés dans un globule rouge infecté par *Plasmodium falciparum*, modifié d'après Kirk (2001) :

A : Vue des voies de passage traditionnelles (*sequential pathways*) des solutés de faible poids moléculaire. Ces solutés sont transportés soit par les transporteurs endogènes de l'hôte ou par les nouvelles voies de perméabilité (NPPs) induites par le parasite. (P : parasite ; PPM : membrane plasmique du parasite ; PVM : membrane vacuolaire du parasite ; RBCM : membrane plasmique du globule rouge).

B et C : Voies de transport « parallèles », permettant le transport de solutés de haut poids moléculaire sans passer par le cytoplasme de la cellule hôte. **B** montre différentes fenêtres métaboliques constituées de régions membranaires spécialisées permettant l'échange de solutés entre le parasite et le milieu extraérythrocytaire. Au niveau de la région **a** la PPM et la PVM sont apposées à la RBCM. La PVM peut également présenter certaines extensions formant un réseau tubovésiculaire (TVN). Ce réseau peut localement fusionner avec la RBCM pour former une jonction spécialisée dans l'échange de solutés. (Ce réseau donne également naissance au *Maurer's cleft* (mc)). **C** représente le *parasitophorous duct* (PD), une structure tubulaire offrant un accès direct à l'espace vacuolaire sur le milieu extérieur.

Introduction

pour constituer un réseau tubovésiculaire (*Tubovesicular Network*, TVN), dont les *Maurer's cleft* forment un sous domaine (**Fig. 5 A & B**, Haldar, 1998). La surface de l'érythrocyte subit également de profondes modifications avec la formation *Knobs* qui sont des zones très localisées riches en protéines dérivées du parasite (**Fig. 5 A**). Ces *Knobs*, favoriseraient la séquestration des cellules infectées au niveau des lits vasculaires et seraient impliqués dans les mécanismes de *rosetting*. Ces structures permettent l'agglutination d'érythrocytes non infectés autour d'une cellule infectée, offrant ainsi de nouvelles cibles aux futurs mérozoïtes (Deutsch et Wellems, 1996). D'autres observations ont également permis de mettre en évidence une modification structurale de la membrane érythrocytaire. Ces changements touchent le fonctionnement de la bande 3 accompagné d'altérations de la déformabilité cellulaire liées à des modifications de la composition lipidique de la membrane et du cytosquelette (Sherman et Winograd, 1990). Enfin, le parasite entre en schizogonie, 40 heures après l'invasion. Il va alors se diviser en 20 à 30 nouveaux mérozoïtes qui 8 heures plus tard entraîneront l'éclatement de la cellule hôte et par la même occasion seront libres, pouvant à leur tour infecter de nouveaux globules rouges. Parfois, le cycle asexué s'interrompt, et les trophozoïtes donnent naissance à des gamétocytes (cellules sexuées libres, **Fig. 3 D**), qui seront absorbés par des femelles *Anopheles* (**Fig. 3 E**) et commenceront ainsi un nouveau cycle sexué.

Comme nous venons de le voir *Plasmodium falciparum* utilise les érythrocytes dans le but de pouvoir se multiplier à l'abri du système immunitaire de son hôte. Cependant, au cours de ce cycle asexué, le parasite développe d'importants besoins métaboliques pour parachever son développement et se multiplier. De plus, durant cette phase de vie intraérythrocytaire, le parasite met en place différents systèmes membranaires, aussi, les échanges entre ces différents compartiments constituent un challenge pour l'acquisition de nutriments essentiels et l'élimination de ses déchets métaboliques. Les voies de transport

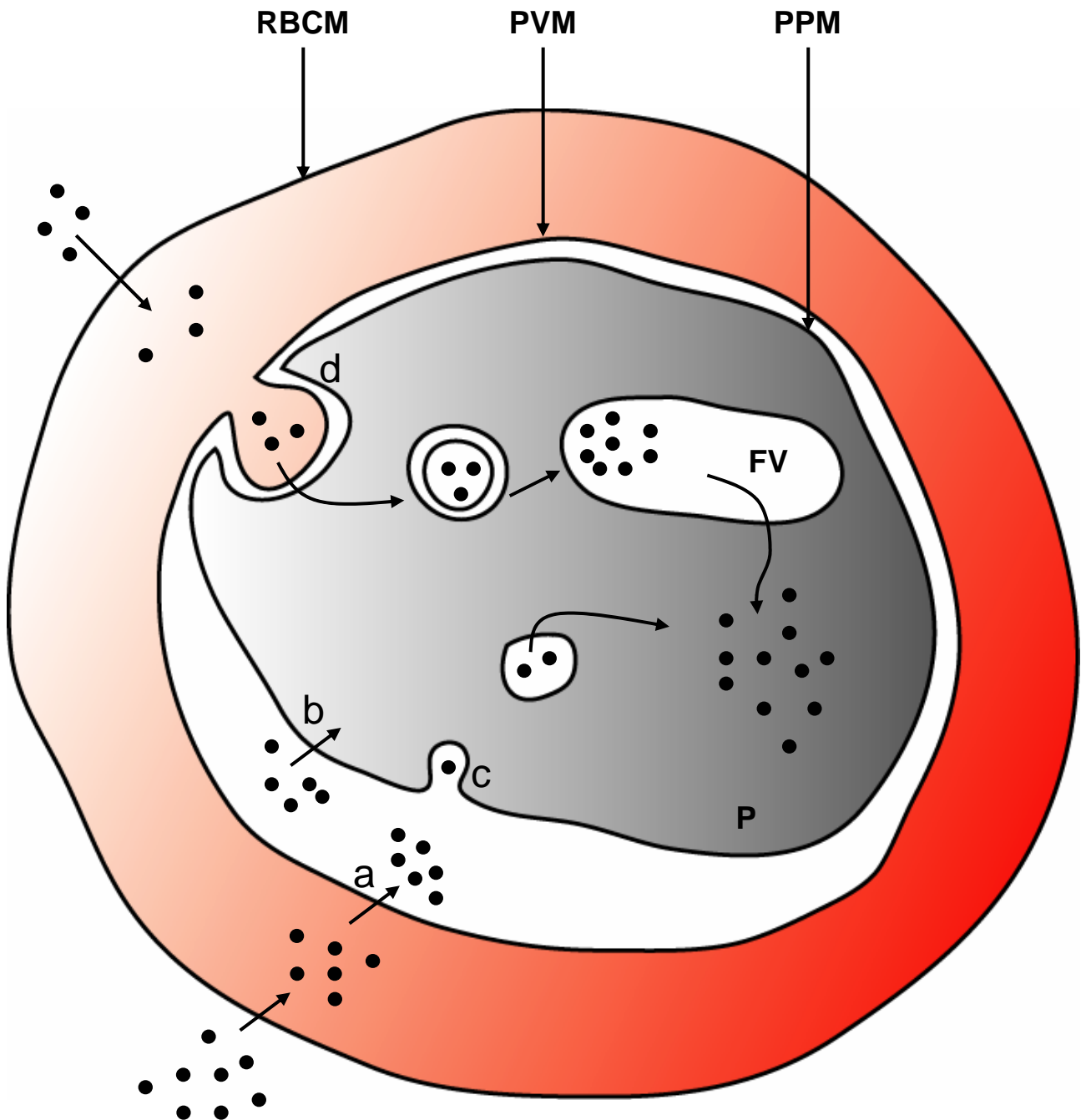


Figure 6. : Schéma des différentes voies de transport utilisées par le parasite intracellulaire *Plasmodium falciparum* pour l'acquisition de solutés à partir du cytosol de son hôte, d'après Kirk (2001) :
 Les solutés sont transportés dans l'espace vacuolaire (a) (par des transporteurs spécialisés ou par le canal décrit par Desai *et al.* (1993)). Là, ils sont amenés dans le cytoplasme du parasite, soit par des protéines de transport (b) ou sont absorbés par internalisation de la PPM (c), puis libérés dans le cytoplasme du parasite. Une voie alternative d'absorption, permet l'absorption directe, par endocytose, du contenu cytoplasmique de la cellule hôte (d). (P : parasite ; FV : vacuole digestive).

Introduction

utilisées par *Plasmodium falciparum* pour se nourrir font actuellement l'objet de nombreuses études car elles constituent des cibles thérapeutiques potentielles.

Ainsi, un canal ionique présent à très forte densité a été découvert dans la PVM (Desai *et al.*, 1993; Desai et Rosenberg, 1997; Desai, 1999). Ce canal se révèle peu sélectif, il est perméable à la fois aux cations et aux anions. Il présente une conductance de 140 pS, son diamètre est estimé à 23 Å et est ouvert dans plus de 95% du temps au potentiel de repos de la PVM. Il est capable de transporter des acides aminés, des monosaccharides et également du lactate. Il permet donc les échanges entre le cytoplasme du globule rouge et l'espace situé entre la membrane vacuolaire et la membrane plasmique du parasite. Peu d'informations sont disponibles sur les transporteurs de cette dernière. Toutefois, le cytoplasme parasitaire présente une composition ionique différente de celle de l'espace vacuolaire : il existe des gradients de Na^+ , K^+ , H^+ (une activité H^+ -ATPase a été détectée Saliba et Kirk, 2001) et de Mg^{2+} qui sont maintenus. Il est donc certain qu'il existe des transporteurs qui contrôlent les flux de solutés (comme le glucose, les acides aminés, l'ATP et l'ADP, le lactate et l'acide pantothénique, Ginsburg, 1999) entre l'intérieur et l'extérieur du parasite intracellulaire. A cela, il convient d'ajouter deux voies d'endocytose. La première appelée cytosome (*cytosomal vesicles*) résulte de l'invagination conjointe de la PVM et de la membrane plasmique du parasite. Ce cytosome permet l'absorption de fractions protéiques (dont l'hémoglobine) présentes dans le cytoplasme du globule rouge (Hempelmann *et al.*, 2003). La seconde consiste en une endocytose « classique » de la membrane parasitaire, permettant l'absorption de substances présentes dans l'espace vacuolaire (Kirk, 2001; **Fig. 6**).

Plasmodium falciparum est également capable de modifier la composition ionique du cytoplasme de la cellule hôte afin de favoriser le fonctionnement de ses propres transporteurs membranaires.

Ainsi, au cours des premières heures qui suivent l'invasion, le trafic de solutés est maintenu par les transporteurs endogènes de la cellule hôte (Cabantchik, 1990). Entre 6 et 10 heures

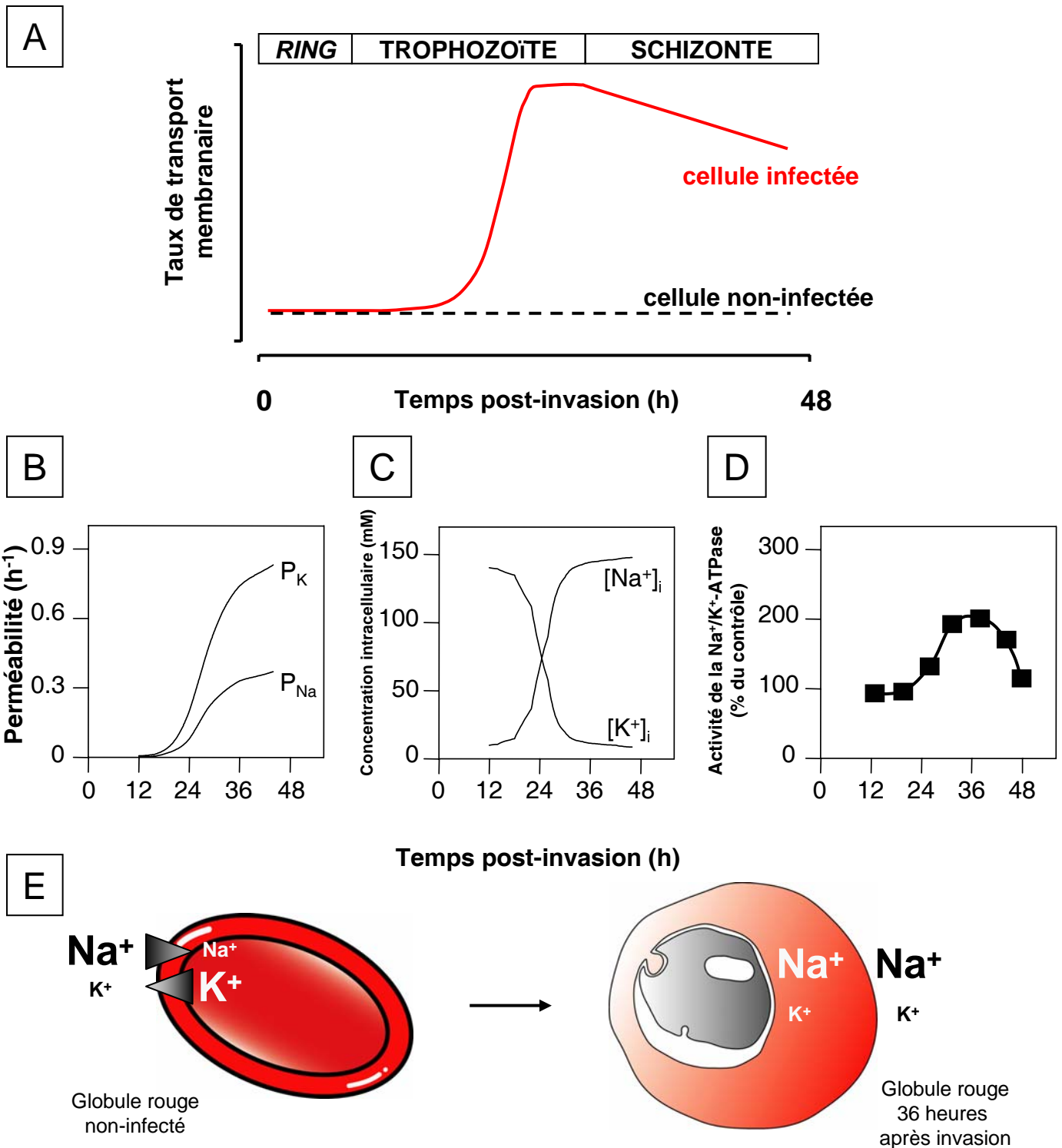


Figure 7 : Représentation des changements induits par *Plasmodium falciparum* dans le transport de solutés (dont le Na^+ et le K^+) et des conséquences physiologiques de ces modifications au cours de son cycle de développement :

A : Représentation schématisée de l'évolution du taux de transport de solutés à travers la membrane d'un globule rouge infecté, en fonction du stade de développement du parasite, d'après ter Kuile *et al.*, (1993).

B : Représentation de l'augmentation de la perméabilité au Na^+ et au K^+ due au NPP, d'après Staines *et al.*, (2001, modélisation mathématique).

C : Evolution en fonction du temps des concentrations internes en Na^+ et K^+ , d'après Staines *et al.*, (2001, modélisation mathématique).

D : Variation prédictive au cours du temps de l'activité de la pompe Na^+/K^+ de la cellule hôte (la courbe représente le pourcentage d'activité calculé par rapport à des mesures réalisées avec des cellules non-infectées), d'après Staines *et al.*, (2001, modélisation mathématique).

E : Représentation schématisée de la répartition des gradients de Na^+ et K^+ , avant et 36 heures après l'infection d'un érythrocyte par *Plasmodium falciparum*.

Introduction

après l'invasion, un accroissement de la perméabilité membranaire de la cellule infectée apparaît pour atteindre un maximum au stade trophozoïte (**Fig. 7 A**). Cette perméabilité accrue est liée à la forte activité métabolique du parasite (influx de nutriments et efflux de produits métaboliques potentiellement toxiques) mais est également due aux changements que le parasite opère sur son environnement, à savoir le cytoplasme et la membrane de son hôte. A ce stade il est alors possible d'observer une augmentation de la perméabilité basale aux ions Na^+ et K^+ , qui ne peut être compensée par l'accroissement de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase endogène (**Fig. 7 B,C & D**, Staines *et al.*, 2001). De ce fait, le milieu intracellulaire de l'hématie, naturellement riche en K^+ et pauvre en Na^+ (**Fig. 1 B**), se voit considérablement transformé. Les gradients pour les ions Na^+ et K^+ s'annulent entre le plasma et le cytosol (**Fig. 7 E**), garantissant ainsi au parasite le fonctionnement de ses transports actifs secondaires qui utilisent le gradient de Na^+ comme moteur et lui permettant aussi de régler son potentiel de membrane (Kirk, 2001).

Les travaux actuels permettent de discerner 3 voies de transport mises en œuvre dans la membrane des cellules infectées (**Fig. 5**). Deux d'entre elles sont qualifiées de séquentielles (*sequential pathways*) car elles impliquent un passage obligatoire (des substances qu'elles véhiculent) par le cytoplasme de l'hôte (**Fig. 5 A**). Ces deux voies ne permettent le passage que de solutés de faible poids moléculaire. Leur activité a été révélée par les expériences de lyse isosmotique et de mesures de flux isotopiques. La première de ces deux voies, saturable, présente rigoureusement la même pharmacologie que celle des transporteurs endogènes, seul leur taux de transport, est beaucoup plus élevé. Les données dont nous disposons permettent de dire qu'il s'agit effectivement des transporteurs érythrocytaires dont le fonctionnement est suractivé par le parasite. C'est par exemple le cas de la Na^+/K^+ -ATPase dont l'activité est doublée (Staines *et al.*, 2001) ou du transporteur de glutathion (GSSG). En effet, *Plasmodium falciparum* génère 100 fois plus vite de glutathion que la cellule hôte. Ainsi pour prévenir toute inhibition des processus cellulaires, ce glutathion est éliminé du cytoplasme de la cellule hôte à une vitesse 10 fois supérieure à l'activité

Glucides	Anions	Nucléosides	Cations	Acides aminés	Autres
Glycérol	Cl ⁻	D/L-Adénosine	Na ⁺	L/D-Alanine	Thiourée
Erythritol	Gluconate	D/L-Thymidine	K ⁺	Asparagine	Phloridzine
D/L-Arabitol	Lactate	Uridine	Rb ⁺	Aspartate	Di- et tripeptides
Arabinose	DNDS	NBMPR	Mg ²⁺	Cystéine	Glutathion
Ribose	Dipicolinate		Ca ²⁺	Glutamate	Glutathion oxydé
Sorbitol			Fe ²⁺ /Fe ³⁺	Glutamine	Polypeptides
Xylitol			Choline	Glycine	Oligonucléotides
Mannitol			Polyamines	Isoleucine	Chélateurs
Dulcitol				Leucine	
D/L-Glucose				Serine	
2-Déoxyglucose				Taurine	
3-o-Méthylglucose				Thrénine	
Myoinositol				Valine	
Rhamnose				NBD-taurine	
Sedohéptulose				NBD-alanine	
				Carnitine	

Tableau 1. : Modifications du transport de solutés de faible poids moléculaire dans une cellule infectée par *Plasmodium falciparum* : Récapitulatif des solutés pour lesquels, les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*, présentent une perméabilité altérée ou augmentée. D’après Ginsburg et Kirk, 1991. (DNDS: acide 4,4'-dinitro-stilbene-2,2'-disulfonique ; NBMPR: nitrobenzylthiorinosine).

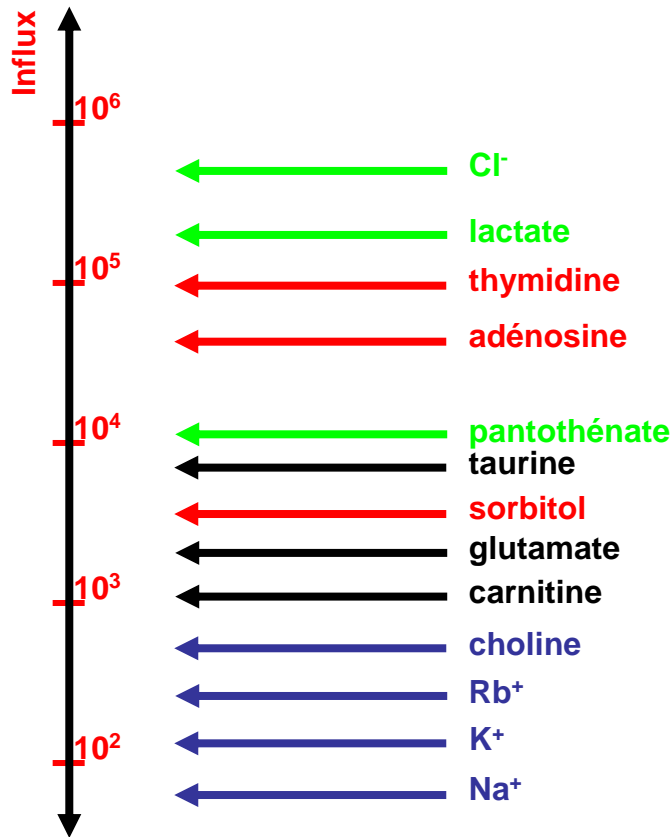


Figure 8. : Modifications du transport de solutés de faible poids moléculaire dans une cellule infectée par *Plasmodium falciparum* : Représentation des taux de transport relatifs, de solutés de faible poids moléculaire, par le NPP induit par *Plasmodium falciparum* dans la membrane des cellules infectées. Les flux sont estimés pour une concentration extracellulaire de 1 mM, à 22°C, sur des cellules au stade trophozoïte, (influx en [μmol.(10¹³ HRBCs infectés)⁻¹.h⁻¹], d’après Kirk, 2001, (les anions sont en vert, les solutés neutres en rouge, les zwitterions en noir et les cations en bleu).

Introduction

maximale des transporteurs de glutathion d'un globule rouge non infecté (Cabantchik, 1990). Néanmoins, certains transporteurs endogènes du globule rouge présentent un flux suffisant pour pallier à la surcharge d'activité qu'impose l'infection. C'est le cas de GLUT 1, dont la vitesse de transport est telle qu'elle permet d'équilibrer la concentration en glucose à travers la membrane érythrocytaire en quelques secondes (Kirk *et al.*, 1996; Krishna *et al.*, 2000). Par contre, les transporteurs de choline et de monocarboxylate (lactate et pyruvate) se révèlent insuffisants face aux besoins croissants du parasite, ainsi Kirk (Kirk *et al.*, 1991b) a observé la mise en place de nouvelles voies de perméabilité (*New Permeability Pathways*, NPPs) non saturables⁶ dans la membrane des érythrocytes infectés. L'analyse des données pharmacologiques, cinétiques et de la sélectivité semblent indiquer qu'il n'existerait qu'une seule sorte de NPP. Ginsburg et Kirk (Ginsburg et Kirk, 1998; Kirk, 2001) ont synthétisé l'ensemble des informations disponibles sur cette nouvelle voie de transport. Ce NPP semble responsable de la majorité de l'augmentation de perméabilité membranaire de l'érythrocyte aux solutés de faible poids moléculaire. Son activité devient mesurable entre 10 et 20 heures après l'invasion. Il présente une large spécificité, il est en effet, perméable à une large gamme d'ions monovalents organiques et inorganiques, tant anioniques que cationiques, mais aussi aux zwitterions⁷ et à certains éléments neutres (**Tab. 1**). Il semble toutefois plus perméable aux anions qu'aux cations (**Fig. 8**). La perméabilité aux cations est dépendante des anions présents au niveau de la face extracellulaire (Kirk et Horner, 1995b). De plus, le taux de perméation dépend d'une corrélation hautement positive entre la taille et l'hydrophobicité du soluté. Les flux à travers le NPP peuvent être inhibés par la phloretine et la phloridzine⁸ mais aussi par des inhibiteurs de transporteurs anioniques tels que le furosémide, l'acide niflumique, la glibenclamide (Kirk *et al.*, 1993), la famille des arylaminobenzoates (Kirk *et al.*, 1994; Kirk et Horner, 1995a), ... (**Tab. 2 A**). Si le glucose,

⁶ Pour des concentrations physiologiques.

⁷ Molécule, comme un acide aminé, porteur à la fois d'une charge positive et négative.

⁸ La phloretine bloque certains canaux calcium et la phloridzine inhibe la synthèse de l'ATP (et bloque la réabsorption du glucose au niveau épithélial).

A

Inhibiteurs	IC ₅₀ (en µM)
Phloridzine	3 - 17
Dérivés de la Phloridzine	2 – 140
Acide niflumique	20
Furosémide	1 – 5
Acide 5-nitro-2-(3-phénylpropylamino)benzoïque	0.14 – 0.8
Acide 5-nitro-2-(4-phénylbutylamino)benzoïque	0.1
Acide 5-nitro-2-(3,3-diphénylpropylamino)benzoïque	0.17
Acide 2-[2-(4-Méthoxyphényl)éthylamino]-5-nitrobenzoïque	0.26
Autres arylaminobenzoates	0.4 – 11
Glibenclamide	39
Méglitinide	0.2 x 10 ³
Pipérine	13 – 50
Quinine	0.3 x 10 ³ – 1 x 10 ³
Tétrabutylammonium	30 x 10 ³
Tétrapentylammonium	1.8 x 10 ³
Butan-1-ol	43 x 10 ³
Héxan-1-ol	7 x 10 ³
Octan-1-ol	1.1 x 10 ³

B

Solutés	Preuves expérimentales
-Oligonucléotides:	
ARN antisense	Inhibition séquence spécifique de la croissance de <i>P.f.</i>
Ribosomes	Inhibition séquence spécifique de la croissance de <i>P.f.</i>
-Oligopeptides / protéines:	
Anticorps	Inhibition de la croissance du parasite et <i>quenching</i> de sondes fluorescentes au niveau de la membrane de <i>P.f.</i>
Rhodamine-protéine 1	Micrographes en fluorescence
Gélonine	Inhibition de la croissance du parasite
Dermaseptines	Inhibition de la croissance du parasite
ALAD-ΔNC	Inhibition de la croissance du parasite et absorption de radio-isotopes
-Autres:	
Ruthénium rouge	Micrographes
Dextranes (marquage fluorescence)	Micrographes en fluorescence
Billes de latex (marquage fluorescence)	Micrographes en fluorescence

Tableau 2. : Inhibiteurs du NPP et du transport de solutés de haut poids moléculaire :

A : Tableau récapitulatif des IC₅₀ (en µM) de différents inhibiteurs connus du NPP, d'après Kirk (2001).

B : Preuves expérimentales de l'absorption de solutés de haut poids moléculaire par *Plasmodium falciparum*, d'après Kirk (2001).

Introduction

les nucléosides et quelques acides aminés sont puisés dans le plasma par les transporteurs endogènes à un taux suffisant pour répondre aux besoins du parasite, ce n'est pas le cas de tous, comme nous l'avons vu précédemment. Ainsi le NPP intervient pour suppléer à cette limitation, il permet ainsi d'exporter le lactate et le pyruvate produits par l'activité glycolytique du parasite, mais intervient également dans l'efflux en excès d'acides aminés (provenant de la digestion de l'hémoglobine) et de petites protéines⁹ (Lew *et al.*, 2003b). Ces caractéristiques (non saturable, sensible aux inhibiteurs de certains canaux ioniques, ...) ne sont pas sans rappeler un canal ionique comme le souligne Kirk (Kirk *et al.*, 1994; Kirk, 2000).

Enfin, une troisième voie de transport entre en jeu 30 à 33 heures après l'invasion. Cette voie est dédiée au transport de solutés de haut poids moléculaire tels que les acides gras et certaines protéines (**Tab. 2 B**). Les observations réalisées en microscopie mettent en évidence l'existence controversée de deux structures membranaires potentiellement impliquées dans ces flux. Certains auteurs (Lauer *et al.*, 1997; Haldar *et al.*, 2001) supposent qu'ils sont rendus possibles grâce au TVN et à la PVM qui peuvent être en contact direct avec la membrane érythrocytaire dont la perméabilité serait localement modifiée pour permettre le passage de composés plus lourds que ceux véhiculés par les voies séquentielles (**Fig. 5 B**). D'autres auteurs (Elford *et al.*, 1995; Taraschi, 1999) supposent que le parasite est à même de produire un système tubulaire appelé *parasitophorous duct* formant une ouverture à la surface de l'érythrocyte permettant de relier l'espace vacuolaire du parasite au milieu extracellulaire (**Fig. 5 C**).

Si tous ces mécanismes servent à transporter les éléments indispensables à la maturation et à la différenciation du parasite, certains auteurs proposent que ces routes sont également utilisées par *Plasmodium falciparum* pour exporter ses propres protéines dans le

⁹ L'élimination de ces composés peptidiques permet d'éviter tout accroissement de la pression osmotique à l'intérieur de la cellule hôte dont l'accumulation entraînerait à terme un éclatement du globule rouge infecté, empêchant ainsi le parasite d'achever son développement.

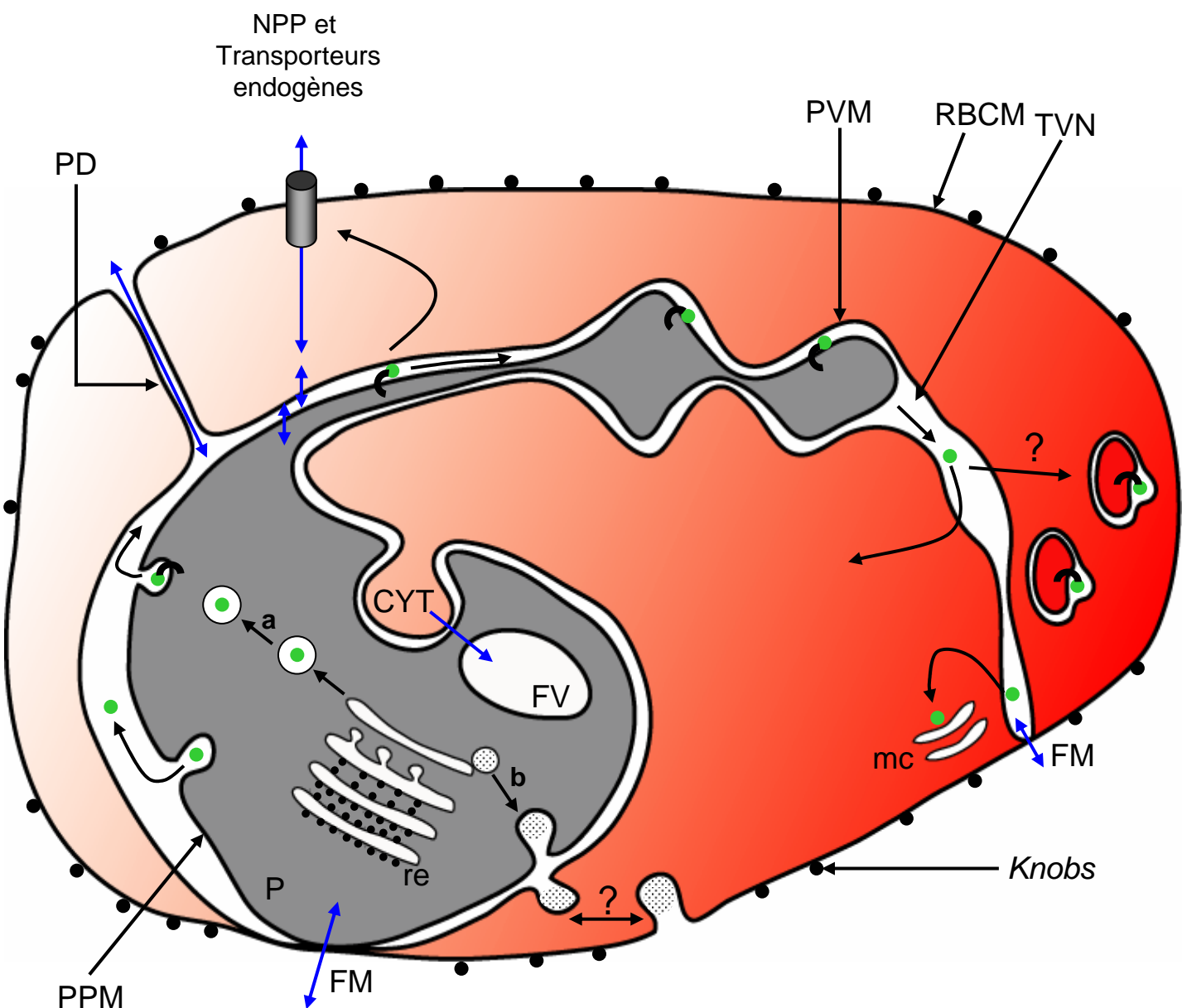




Figure 9 : Illustration du système tubovésiculaire (TVN), et de son rôle dans l'exportation de protéines et les échanges de solutés entre *Plasmodium falciparum*, son hôte et son milieu environnant :

a et **b** représentent respectivement 2 routes sécrétoires possibles pour l'exportation de protéines *membrane-bound* (représentées par ) et de protéines plasmodiales solubles (représentées par ) exportées par exocytose dans le cytoplasme de l'érythrocyte ou à l'extérieur de ce dernier. Dans la situation **a**, les protéines sont acheminées le long de la PVM qui peut, avec le milieu vacuolaire, constituer leur destination finale, ou au contraire, être acheminées vers la membrane du parasite (PPM), le cytoplasme du globule rouge et sa membrane (RBCM) ou encore à l'intérieur des *maurer's cleft* (mc) et des *Knobs*. Les flèches bleues rappellent les différentes voies d'échanges de solutés (transporteurs endogènes ; NPP ; *parasitophorous duct* (PD) ; TVN et la PPM formant des fenêtres métaboliques vers l'extérieur (FM) ; le cytosome (CYT)) entre le parasite, sa cellule hôte et le milieu extérieur. (re : réticulum endoplasmique ; FV : vacuole digestive, P : parasite).

Introduction

cytoplasme, la membrane de son hôte voire dans le milieu extracellulaire. Wiser et *al.*, (1999) supposent qu'il existe deux voies de synthèse pour les protéines plasmodiales (**Fig. 9**). La première « classique » passe par son réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ces protéines sont ensuite insérées dans sa membrane ou ses autres organites. La seconde voie est spécialisée dans l'export de protéines vers l'hôte. En effet, la sphingomyéline synthase, une enzyme de l'appareil de Golgi, a été détectée au niveau de la PVM, du TVN, des *Maurer's cleft* et des *knobs*. Ainsi, Van Dooren et *al.*, (2000) montrent que l'utilisation de brefeldine A¹⁰ (BFA) entraîne une accumulation de protéines dans le réticulum et l'appareil de Golgi du parasite sans pour autant stopper l'exportation de protéines vers la membrane de la cellule hôte. Ces auteurs proposent que ces dernières sont transportées par les *Maurer's cleft* ou par l'intermédiaire des vésicules d'exocytose (60 à 100 nm de diamètre) qui bourgeonnent à la surface de la PVM. La présence de protéines kinases plasmodiales au niveau de la membrane érythrocytaire conforte ces hypothèses. Ainsi, Zhao et *al.*, (1994) montrent que la protéine kinase calcium dépendante exprimée par le parasite (*PfcPK*) est capable de phosphoryler certaines protéines membranaires telles que la β spectrine, les bandes 4.1 et 4.9 et potentiellement l'ankyrine.

Si le parasite est capable d'exporter certaines protéines au niveau de la membrane de la cellule hôte, en est-il de même pour le NPP ? En effet, différentes hypothèses concernant son origine sont envisageables :

- comme nous venons de le supposer ce NPP pourrait être une protéine plasmodiale, exportée dans la membrane plasmique de la cellule hôte ;
- l'infection révélerait une population de transporteurs endogènes de la cellule hôte, présents à l'état quiescent et activés (ou modifiés) au cours du développement parasitaire de *Plasmodium* ;

¹⁰ Substance qui perturbe la structure et le fonctionnement de l'appareil de Golgi.

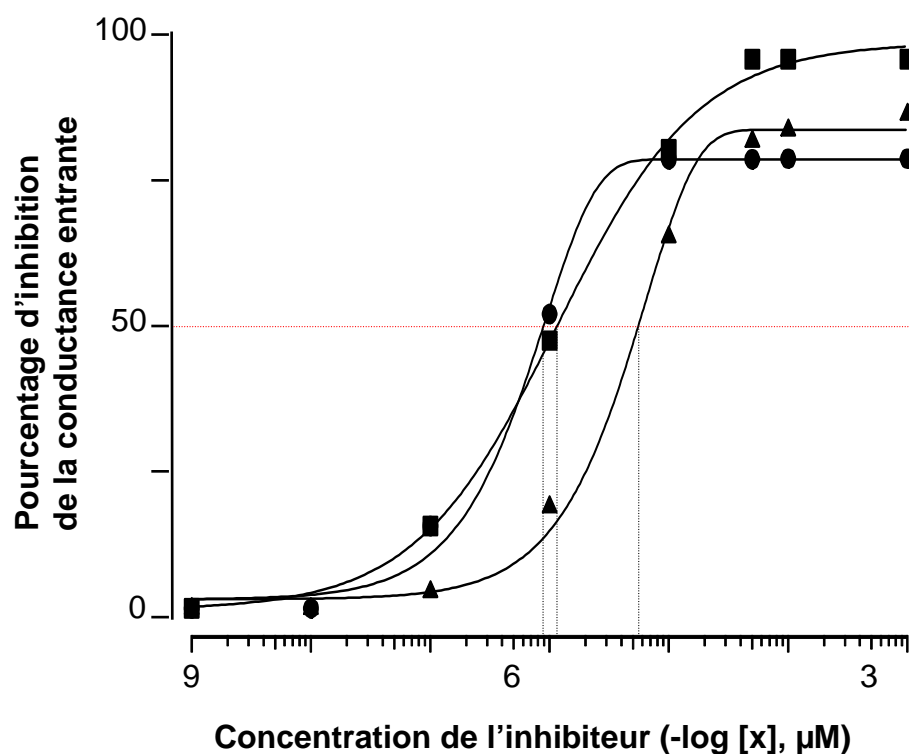


Figure 10.: Etude, en configuration *whole-cell*, de l'effet d'inhibiteurs de canaux chlorure sur la conductance membranaire globale de globules rouges induite lors de l'infection par *Plasmodium falciparum* :

Calculs de l' IC_{50} du NPPB (0.8 ± 0.3 μM, $n = 4$), de l'acide niflumique (2.5 ± 0.3 μM, $n = 4$), et de la glibenclamide (35.0 ± 8.7 μM, $n = 3$) à partir de la conductance entrante mesurée sur des cellules infectées par *Plasmodium falciparum*.

- *Plasmodium falciparum* infecterait certaines sous-populations de cellules (telles que les réticulocytes et les jeunes érythrocytes) dont les transporteurs présentent un plus haut degré d'activité ;
- Ou encore le parasite serait capable d'induire une augmentation du nombre de transporteurs natifs.

Toutefois, cette dernière hypothèse semble la moins probable étant donné l'absence totale de machinerie nécessaire à la synthèse et à l'adressage de nouvelles protéines à l'intérieur de la cellule hôte.

Les données accumulées grâce aux mesures de flux isotopiques indiquent que le NPP possède les caractéristiques fonctionnelles d'un canal ionique. Or, trois études électrophysiologiques (Desai *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2002b; Egee *et al.*, 2002, Annexe I) démontrent que les globules rouges infectés présentent une conductance fortement supérieure à celle des hématies non infectées. Ainsi, avons nous pu établir, tout comme les équipes de Sanjay Desai et de Stephan Huber, que les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* présentent une forte conductance membranaire entrante spontanément active (5300 ± 140 pS). La séquence de sélectivité que nous avons déterminée par substitution en conditions bi-ioniques donne une séquence d'Eisenmann I (Wright et Diamond, 1977) : $I^- > Br^- > Cl^-$. De plus, le NPPB, l'acide niflumique et la glibenclamide, trois inhibiteurs de canaux chlorure ont été testés afin de déterminer leur IC_{50}^{11} (**Fig. 10**). Les valeurs obtenues respectivement : 0.8 ± 0.3 μM ($n = 4$); 2.5 ± 0.3 μM ($n = 4$) et 35.0 ± 8.7 μM ($n = 3$), sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par des mesures de flux isotopiques ou de lyse isosmotique (**Tab. 2 A**, Kirk et Horner, 1995a). Le furosémide (200 μM), connu comme étant un puissant inhibiteur¹² des transporteurs de solutés induits par *Plasmodium falciparum* s'est révélé moins efficace que les trois autres inhibiteurs testés, puisqu'il ne réduit que de 45% les courants mesurés. Les enregistrements

¹¹ Concentration pour laquelle les courants entrants sont réduits de moitié.

¹² Son IC_{50} , calculée à partir de mesures de flux, est comprise entre 1 et 5 μM , Kirk (2001).

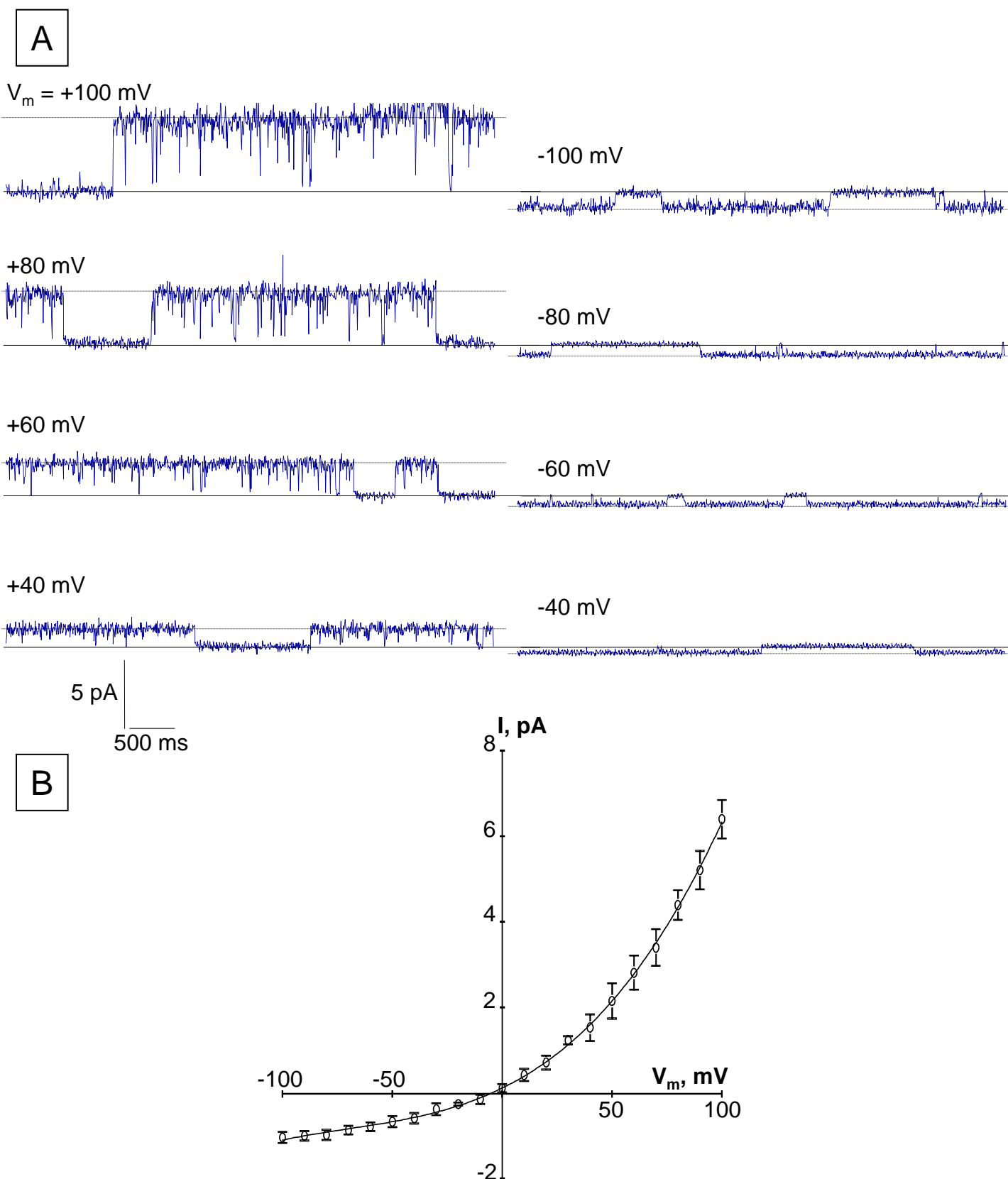


Figure 11. : Caractérisation, en configuration *inside-out*, du canal anionique rectifié sortant, spontanément actif dans la membrane de globules rouges non infectés:

A : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal pour différents potentiels de membrane (V_m). (La ligne continue indique l'état fermé du canal).

B : Relation courant-voltage correspondante. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) de 10 enregistrements.

Introduction

unitaires réalisés en configuration excisée (*inside-out*) montrent des canaux spontanément actifs de 12 pS de conductance linéaire. De tels résultats conjointement à ceux obtenus par les équipes de Sanjay Desai et de Stephan Huber, nous permettent de supposer que ces canaux sont en partie responsables de l'augmentation des échanges membranaires observés au cours du développement parasitaire de *Plasmodium*.

Contrairement aux érythrocytes infectés, la conductance membranaire globale des cellules non infectées est négligeable du fait du faible nombre de canaux anioniques naturellement actifs, et ce quelque soit la configuration de la technique du *patch-clamp* utilisée. Ainsi, la conductance membranaire globale des érythrocytes, mesurée en *whole-cell*, est faible (environ 45 pS), ce qui est en accord avec la valeur calculée par Bennekou (1999). Pourtant, à l'inverse de Desai et collaborateurs, il nous a été possible d'observer deux types de canaux chlorure dans la membrane des érythrocytes non infectés.

Le premier, rare, rectifié sortant a pu être observé dans moins de 5% des cellules étudiées en configuration excisée. Ce canal, spontanément actif, présente une conductance entrante d'environ 11 pS (mesurée entre -100 et 0 mV) et une conductance sortante d'environ 80 pS aux potentiels de membrane positifs (**Fig. 11**). L'application d'inhibiteurs de canaux chlorure, au niveau de la face cytosolique du canal, tels que le NPPB (100 μ M, n= 4), DIDS (100 μ M, n= 4) et le 9-AC (100 μ M, n= 3), entraîne une inhibition totale de l'activité du canal en quelques secondes. Ces caractéristiques nous permettent de supposer que ce canal appartient à la famille des canaux ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channels*). Ce canal, comme nous le verrons dans le chapitre 3, pourrait expliquer la forte conductance rectifiée sortante, observée par Huber et collaborateurs, sur de nombreuses cellules infectées (Huber *et al.*, 2002b).

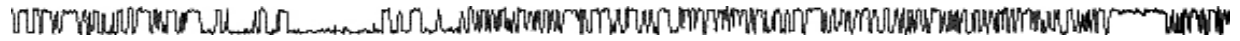
Le second canal, plus fréquent, a pu être observé lorsqu'une déformation membranaire est appliquée par l'intermédiaire d'une dépression calibrée à l'intérieur de la pipette de *patch* ou en présence de la sous-unité catalytique de la protéine kinase A de bœuf (PKA_c, 100 nM) et d'ATP (1 mM) au niveau de la face cytosolique de la membrane. En revanche l'ATP seul se

Introduction

révèle sans effet sur les courants membranaires mesurés en configuration *whole-cell* et ne permet pas l'activation de canaux ioniques en configuration excisée. En *whole-cell*, les courants mesurés en présence de PKA_c et d'ATP dans la pipette sont multipliés par 40 par rapport à ceux de cellules non stimulées (la conductance membranaire passe en effet de 44 ± 1 pS à 1700 ± 40 pS) et présentent une rectification entrante. Cette conductance membranaire, bien que 2.5 à 3 fois plus faible que celle des globules rouges infectés (notons que l'ajout de PKA_c et d'ATP n'a pas d'effet sur les courants membranaires de ces cellules), présente la même séquence de sélectivité de type Eisenmann I. De plus, elle possède le même profil pharmacologique que celui des cellules infectées. Les enregistrements unitaires réalisés en *inside-out* dans les mêmes conditions, permettent d'observer une conductance linéaire de 12 pS proche de celle mesurée sur des cellules infectées, toutefois, contrairement à ces dernières, un lent *run-down* apparaît 5 minutes après activation par la PKA_c.

L'étude des canaux observés dans la membrane des cellules intactes et infectées présente un intérêt double. D'une part, les cellules non infectées possèdent des canaux anioniques de faible conductance, mécano-sensibles et activés par la sous-unité catalytique de la PKA. Ces caractéristiques ne sont pas sans rappeler l'activité de type CFTR détaillée par Sprague (Sprague *et al.*, 1998; Sprague *et al.*, 2001) dans la membrane de globules rouges humains. En effet, cette activité peut être induite lorsque les hématies sont soumises à un stress mécanique ou par l'intermédiaire d'une voie AMP_c dépendante. Or, cette dernière constitue une condition *sine qua none* pour permettre l'activation des canaux CFTR présents au niveau de la face apicale de cellules épithéliales (Sheppard et Welsh, 1999). D'autre part, ces canaux sont fortement similaires à ceux observés chez les cellules infectées. Ceci, conjointement aux travaux de Huber *et al.*, (2002b) et de Thomas *et al.*, (2001) sur *P. gallinaceum*, constituent un fort faisceau de présomption en faveur d'une origine

Introduction



endogène de l'accroissement du flux de solutés de faible poids moléculaire à travers la membrane plasmique d'un érythrocyte infecté.

Introduction

Le présent mémoire a pour double objectif de déterminer tout d'abord l'identité des canaux de faible conductance présents dans la membrane des globules rouges non infectés : ces canaux peuvent-ils être qualifiés de CFTR-like¹³ ? Pour tenter de répondre à cette question, une comparaison systématique du comportement et des caractéristiques électrophysiologiques du canal chlore de 12 pS de conductance a été effectuée sur deux types de globules rouges. Les premiers servant de contrôles positifs proviennent de donneurs en bonne santé, les seconds proviennent de patients volontaires atteints de mucoviscidose (Quinton, 1999), porteurs de la mutation $\Delta F508$. Le choix de ce type de cellules est motivé par le fait que cette mutation entraîne la synthèse d'une protéine « anormale » qui n'est plus correctement exportée, ce qui en diminue la quantité présente dans la membrane cellulaire. Si de tels canaux sont présents dans la membrane des globules rouges, leur rôle physiologique reste encore indéterminé.

Le second objectif de cette étude est de consolider l'hypothèse selon laquelle le NPP n'est pas une xénoprotéine de transport exprimée par *Plasmodium falciparum* et exportée dans la membrane de la cellule hôte, mais bien un transporteur endogène propre à cette dernière. Nous tenterons également d'appréhender les mécanismes mis en œuvre par le parasite pour en contrôler l'activité.

¹³ Le terme CFTR est strictement réservé pour désigner les canaux présents dans la membrane de cellules épithéliales.

Matériel et Méthodes

A

Composition du milieu de culture incomplet (préparation de 5 litres):

- 52.2g de RPMI 1640 en poudre, avec L-glutamine et HEPES, mais sans bicarbonate de sodium (Gibco)
- 250 mg d'hypoxanthine (6-hydroxypurine) en poudre
- Eau de volvic

Préparation du milieu de culture complet:

Pour 400 ml de milieu incomplet, ajouter:

- 10 ml d'albumax II à 20% (Gibco)
- 16.6 ml de NaHCO_3 à 5%
- 3 ml de sulfate de gentamicine (50 mg/ml stock)
- Hepes (concentration finale 35 mM)

B

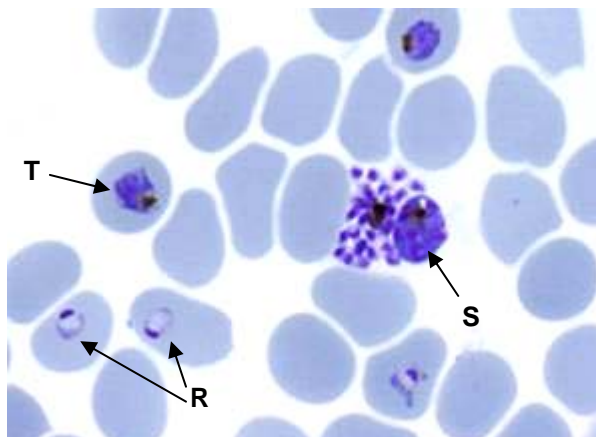
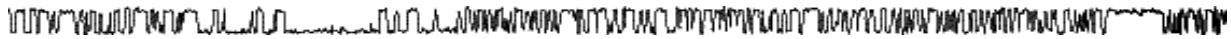


Figure 12. : Composition du milieu de culture utilisé pour la culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum* et contrôle de la parasitémie par coloration de Giemsa :

A : Détails de la composition du milieu de culture utilisé pour la maintenance *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Un milieu de culture incomplet est élaboré dans un premier temps, puis est complété par l'ajout d'antibiotique, de bicarbonate de sodium et d'albumax II. Le pH est ajusté par équilibration à l'air (7.4), pendant une nuit à 4°C, sous agitation modérée. Finalement, le milieu est filtré (0.2 μM) sous une hotte stérile, et est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

B : La parasitémie constitue un facteur important pour le maintien *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Aussi, est elle contrôlée quotidiennement afin de la maintenir à une valeur voisine de 5%. Cette parasitémie est calculée grâce à la coloration de Giemsa qui permet de distinguer les cellules infectées des cellules intactes. Ainsi, la chromatine de *Plasmodium falciparum* est colorée en violet foncé et son cytoplasme apparaît en bleu pâle. Différents stades de développement sont visibles dans l'exemple présenté : T : trophozoïte, R : ring, S : schizonte.



Matériel et Méthodes

1. Le matériel biologique :

Les globules rouges utilisés dans le cadre de cette étude, proviennent de volontaires en bonne santé ainsi que de patients atteints de mucoviscidose porteurs de la mutation $\Delta F508$. Le sang est collecté par ponction veineuse au niveau du plexus brachial et est récolté dans un tube sous-vide hépariné. Le sang est lavé trois fois dix minutes à 5000 tours.min⁻¹ dans le même milieu de culture que celui utilisé pour la maintenance de *Plasmodium falciparum* (**Fig. 12 A**). Entre chaque étape de centrifugation le surnageant ainsi que le *buffy coat* sont aspirés afin de retirer tous les éléments figurés du sang autres que les globules rouges. L'hématocrite est ajusté à 50% et les échantillons sont conservés à 4°C pendant 7 jours au maximum.

2. Culture in vitro de Plasmodium falciparum :

La culture de *Plasmodium falciparum* in vitro est basée sur les protocoles modifiés initialement développés par Haynes, Trager et Jensen (Haynes *et al.*, 1976; Trager et Jensen, 1976) la **figure 12 A** présente la composition du milieu de culture utilisé). La souche de *Plasmodium* utilisée est la souche 3D7. Cette souche présente la propriété d'être sensible à la chloroquine et est la souche utilisée pour l'établissement du génome complet de *Plasmodium falciparum* (plasmoDB, <http://plasmodb.org/>).

Les cellules infectées sont maintenues dans des flasques de culture cellulaire (25 cm²), à un hématocrite de 2.5%, à l'intérieur d'une enceinte thermostatée à 37°C et 5% de CO₂. La parasitémie est maintenue autour de 5% et est contrôlée quotidiennement, au moment du renouvellement du milieu de culture, par coloration de Giemsa (**Fig. 12 B**).



3. Détection de protéines CFTR et CIC-2 dans la membrane cellulaire des érythrocytes humains :

Afin de compléter les mesures réalisées en *patch-clamp*, des techniques d'immunodétection (*western-blot* et immunofluorescence) ont été utilisées afin de détecter la présence des protéines CFTR et CIC-2 dans la membrane des globules rouges humains.

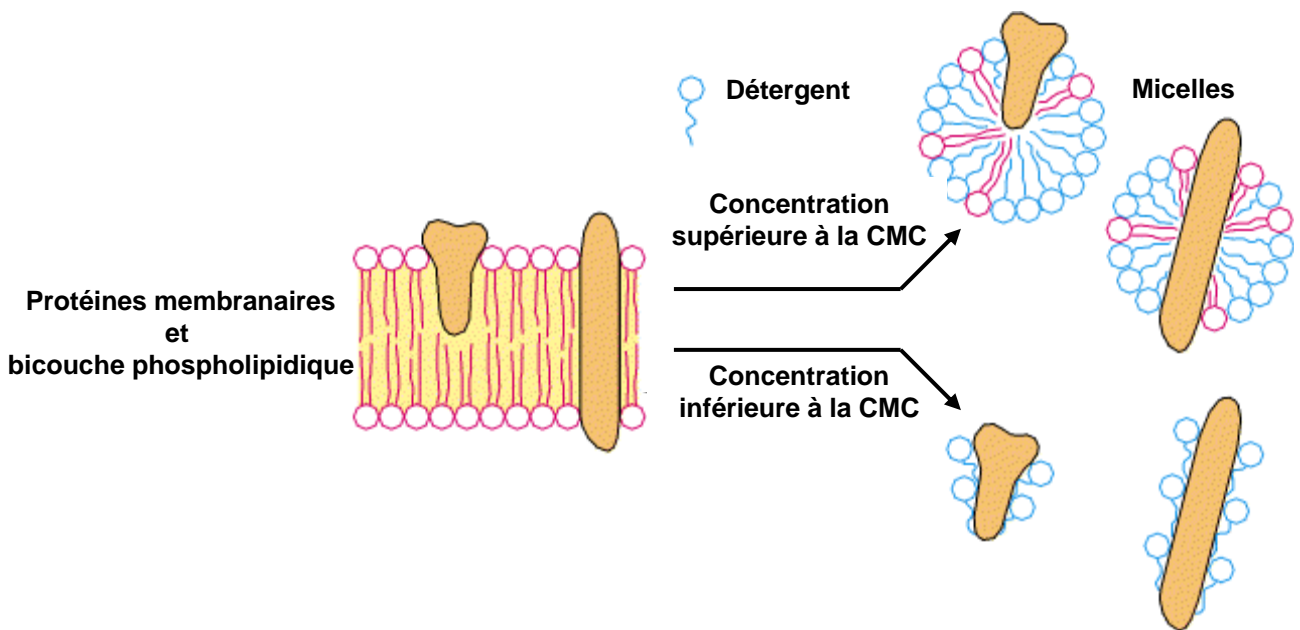
3.1. Le Western-Blot :

3.1.1. Préparation des membranes plasmiques :

La première étape avant l'extraction de protéines membranaires consiste à préparer des *ghosts*, soit des cellules dépourvues de leur contenu cytoplasmique, après cette étape, seule la membrane cellulaire est récupérée.

Les *ghosts* sont préparés par lavages successifs des globules rouges dans un tampon de lyse 5P8. Ce tampon est préparé à partir d'un tampon 5P8 x100 constitué de NaH_2PO_4 0.5 M titré à pH 8.0. L'obtention des membranes est réalisée par lavage dans ce tampon additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases composé de : benzamidine (100 mM), leupeptine (10 mg/ ml), aprotinine (10 mg/ml) et l'inhibiteur de trypsine (SBTI, 10 mg/ml ; *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* de Roche). Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 25000 g pendant 30 minutes à 4°C. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un surnageant incolore, et d'un culot blanc opalescent. Les membranes ainsi obtenues peuvent être congelées à -80°C jusqu'à l'étape de solubilisation des protéines membranaires.

A



B

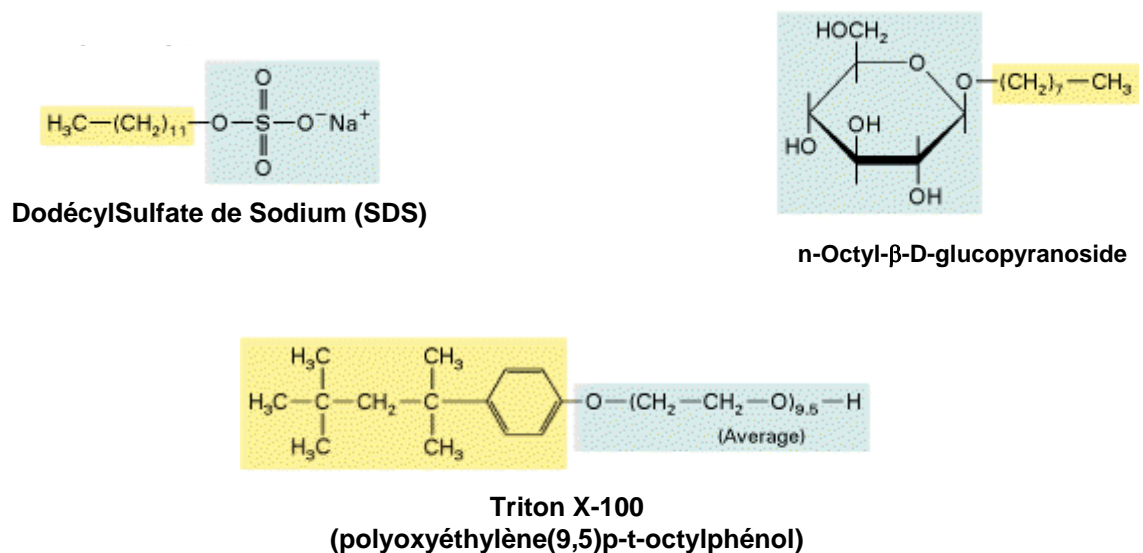
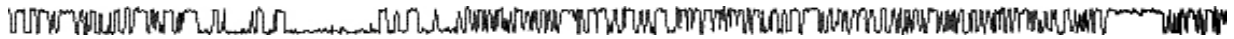


Figure 13. : Mode d'action des différents détergents utilisés pour l'extraction des protéines membranaires, d'après Lodish *et al.*, (1997) :

A : Solubilisation de protéines membranaires intégrales par un détergent non-ionique. Pour une concentration supérieure à la valeur critique de formation de micelle (CMC), le détergent solubilise les lipides et les protéines membranaires, formant ainsi des micelles mixtes contenant un mélange de molécules de détergents, de lipides et de protéines. Pour une concentration inférieure à la CMC, de nombreux détergents (comme l'octylglucoside) peuvent dissoudre les protéines membranaires sans former de micelles, en s'associant aux régions membranaires (hydrophobes) des protéines.

B : Le SDS, Triton X-100 et l'octylglucoside sont les 3 détergents utilisés pour l'extraction de protéines membranaires. Le Triton et le glucoside appartiennent à la famille des détergents non-ioniques, tandis que le SDS est un détergent ionique. La portion hydrophobe de chaque molécule est indiquée en jaune, tandis que la portion hydrophobe est représentée en bleu.



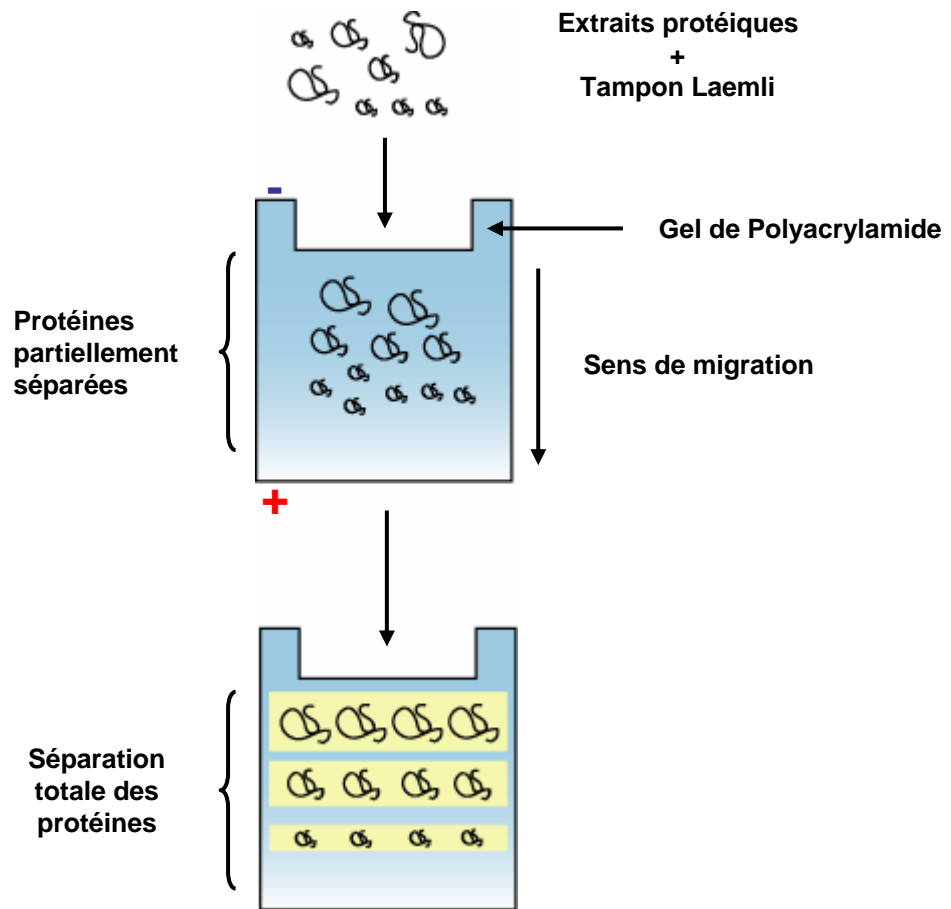
3.1.2. Extraction des protéines membranaires :

Les canaux ioniques sont des protéines intrinsèques. Un ou plusieurs de leurs segments sont enfouis dans la bicouche phospholipidique. La plupart de ces protéines comportent des acides aminés à chaîne latérale hydrophobe, qui, en prenant contact avec les chaînes aliphatiques d'acides gras des phospholipides membranaires, ancrent la protéine à la membrane. Les canaux peuvent également être qualifiés de protéines transmembranaires car leur chaîne occupe l'épaisseur de la bicouche phospholipidique. Elles comprennent un ou plusieurs domaines transmembranaires et des domaines de quatre à quelques centaines de résidus baignant dans la phase aqueuse de chaque côté de la bicouche.

En vue d'identifier certaines protéines membranaires, telles que les canaux ioniques, il convient de les isoler et de les purifier (Ohlendieck, 1996). Cependant, les protéines membranaires intrinsèques posent un problème particulier. En effet, en les extrayant de leur membrane, leur région hydrophobe est mise à nue, de ce fait, les molécules protéiques s'agrègent et précipitent en solution aqueuse. On peut mettre ces protéines en solution à l'aide de détergents qui ont une affinité à la fois pour les groupes hydrophobes et pour l'eau (Hjelmeland, 1990; Neugebauer, 1990). Les détergents sont des molécules amphipatiques qui disloquent les membranes en s'insérant dans la bicouche lipidique et en rendant solubles lipides et protéines (**Fig. 13 A**). Nous avons utilisé deux types de détergents pour l'extraction des protéines : le SDS (DodécylSulfate de Sodium, **Fig. 13 B**, SIGMA) qui est chargé positivement et qui a la particularité de dénaturer les protéines, et deux détergents neutres non-dénaturants : triton X-100 (**Fig. 13 B**, SIGMA) et le n-Octyl-D-glucopyranoside (**Fig. 13 B**, SIGMA), ce dernier n'a été que peu utilisé du fait des difficultés techniques liées à sa conservation.

En conditions dénaturantes, les membranes sont solubilisées dans un tampon SDS 4.5 % (SDS 4.5% (150 mM), NaPi (150 mM), EDTA 3 (mM), DTT (1mM), pH 7.6). Deux

A



B

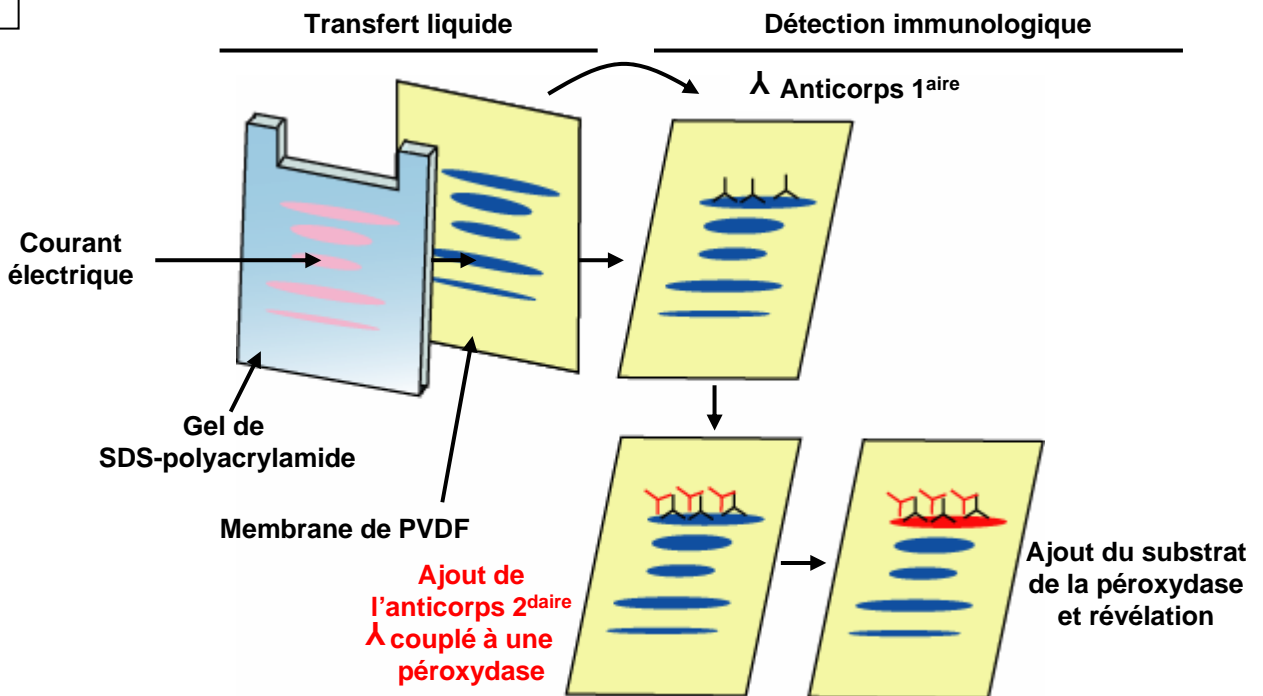


Figure 14. : Technique de séparation des protéines membranaires et détection par *immunoblot*, d'après Lodish *et al.*, (1997) :

A : Les protéines membranaires en présence de SDS sont chargées négativement, il est ainsi possible de les faire migrer et de les séparer en fonction de leur poids moléculaire lorsqu'un courant électrique est appliqué au gel d'électrophorèse (*SDS-page*).

B : Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF, sur laquelle les anticorps primaires vont interagir avec leur épitope. Cette relation est ensuite révélée grâce à un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Une réaction lumineuse résulte de l'activité de cet enzyme en présence de son substrat.

volumes d'extraits membranaires sont ainsi solubilisés dans un volume de SDS, pendant 10 minutes avec quelques étapes de vortex.

En conditions non dénaturantes, les membranes sont solubilisées dans une solution de n-Octyl à 3% (solution stock à 10%, SIGMA). Ainsi, 300 µl d'extraits membranaires sont incubés en présence de 100 µl de n-Octyl à 3%, pendant 30 minutes à température ambiante.

Finalement, les différents mélanges sont centrifugés à 20°C pendant 30 minutes à 45000 g, afin de se débarrasser des lipides membranaires. La concentration totale en protéines est ensuite calculée à l'aide d'un kit BCA (Pierce) et d'une gamme étalon de BSA (*Bovine Serum Albumine*, SIGMA).

3.1.3. Préparation du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et réalisation du transfert liquide :

Les systèmes d'électrophorèse que nous avons utilisés reposent sur le matériel développé par Biorad pour réaliser des gels de petite taille (Miniprotean II). Des gels composés à 7.5% de polyacrylamide de 0.75 mm d'épaisseur ont été utilisés. Une fois polymérisés, les gels sont placés dans le système d'électrophorèse en présence de *running buffer*. Les extraits sont dilués à une concentration précise et chauffés à 100°C pendant 2 minutes avant d'être chargés. Cette dilution est réalisée grâce au tampon de charge, appelé tampon de *Laemli*¹⁴. La migration est ensuite lancée à voltage constant de 200 V (**Fig. 14 A**). Une fois le front de migration sorti, le gel est mis en contact avec une membrane de difluorure de polyvinylidène (ou PVDF) placée dans une cassette utilisée pour réaliser le transfert liquide. L'ensemble est humidifié avec le même tampon que celui utilisé au cours du transfert : le *transfer buffer*. La cassette est placée dans le système de transfert, pendant

¹⁴ Les échantillons sont traités à 100°C afin d'être dénaturés. De plus le β-mercaptoéthanol ainsi que le SDS qui composent le tampon *Laemli* permettent de linéariser les protéines et de les charger négativement, ainsi la migration des protéines se fait uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

une heure à un ampérage constant de l'ordre de 200 mA (**Fig. 14 B**). Après cette étape, le *blot* est récupéré pour être placé dans une solution de blocage (TBS / Tween 20 + 0.2% de lait en poudre + 4.5% de BSA ou + 5% de lait en poudre), sur un agitateur orbital pendant 30 à 60 minutes à température ambiante avant de procéder à l'étape de marquage immunologique.

3.1.4. Le marquage immunologique :

Le tampon de blocage est ensuite éliminé, et remplacé par l'anticorps primaire dilué dans ce même tampon. Le *blot* est ainsi incubé pendant 1 heure sous agitation à température ambiante ou pendant une nuit entière à 4°C. Deux anticorps différents ont été utilisés. Le premier est un anticorps monoclonal dirigé contre un segment de 14 acides aminés [(103)GRIIASYDPDNKEER(117)] de la première boucle extracellulaire de la protéine CFTR de souris (MA1-935, Affinity BioReagents, Inc.). Le second est un anticorps polyclonal reconnaissant un épitope constitué de 18 acides aminés [(888)RSRHGLPREGTPSDSDDKC(906)] de la partie N-terminale du canal ClC-2 de rat (ACL-002, Alomone Labs). Ces anticorps sont utilisés à une dilution de 1/400^{ième} (**Fig. 14 B**). Après cette période d'incubation, le *blot* est rincé, 5 fois (chaque lavage durant 5 minutes minimum) avec une solution de TBS / Tween 20, avant d'être incubé avec l'anticorps secondaire (conjugué à l'anticorps primaire et couplé à une peroxydase) dilué dans la solution de blocage au 1/2000^{ième}, pendant 60 minutes, sous agitation continue à température ambiante. Le *blot* est de nouveau rincé suivant la même procédure que précédemment. Une fois l'humidité en excès retirée, la solution contenant le réactif chémoluminescent (ECL, fabrication maison) est ajoutée. La réaction nécessite environ 1 minute avant de se développer. Enfin, un film Kodak XOMAT AR est déposé sur le *blot* (la période d'exposition est déterminée expérimentalement), et est révélé suivant les instructions du fournisseur (**Fig. 14 B**).

3.2. Immunofluorescence :

Le même anticorps anti-CFTR que celui utilisé pour les *western-blots* est utilisé pour réaliser des marquages fluorescents de la membrane des érythrocytes humains. Des frottis sont réalisés à partir de globules rouges conservés dans du milieu de culture, dont l'hématocrite est au préalable amené à une valeur proche de 5%. Les cellules sont fixées dans un bain de méthanol pendant quelques secondes. Après séchage, les frottis sont saturés dans du sérum à 2% préparé dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 30 minutes à température ambiante. Après saturation, les lames sont incubées en présence de l'anticorps primaire anti-CFTR (dilué au 1/250^{ième} dans la solution de saturation) pendant 45 minutes à 20°C. Après 3 rinçages de 5 minutes avec du PBS, les frottis sont exposés à l'anticorps secondaire couplé à une sonde TRITC (utilisé à une dilution de 1/300^{ième} ; T 7782, SIGMA). Enfin, les lames sont de nouveau rincées suivant le même protocole que précédemment avant d'être observées au microscope à fluorescence.

4. Patch-clamp :

4.1. Principe :

La technique du *patch-clamp*, mise au point par Neher et Sakman (1976) et décrite par Hamill (1981) permet l'enregistrement des sauts de courant transmembranaires survenant lorsque, à potentiel constant, l'état d'un canal ionique se modifie, passant d'un état non-conducteur (état fermé) à un état conducteur (état ouvert). Avant de pouvoir réaliser une mesure de l'activité électrique de ces canaux, il est indispensable de passer par une étape d'approche. Elle consiste à apposer une électrode sur la membrane d'une cellule et à appliquer une légère succion à l'intérieur de cette dernière afin d'accroître le contact avec la cellule. Le fragment de membrane (*patch*) situé sous la pipette de *patch* est alors isolé, non

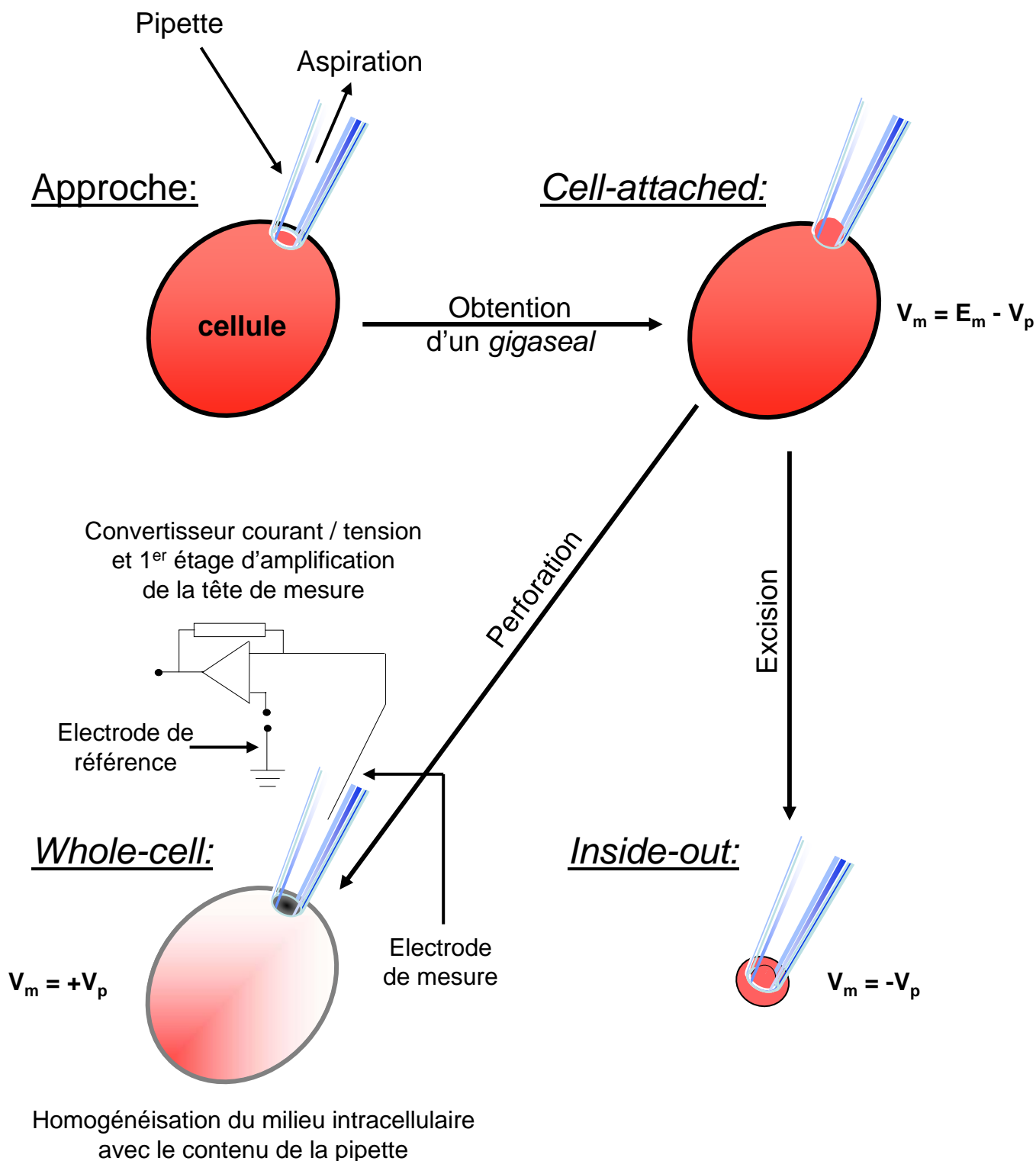


Figure 15.: Schéma représentatif des différentes configurations utilisées en *patch-clamp*, d'après Hamill *et al.*, (1981) : L'électrode de mesure, placée à l'intérieur de la pipette de patch est reliée au *headstage* contenant un convertisseur courant / tension permettant de mesurer les courants générés par le passage des ions à travers le pore de conduction des canaux ioniques.

seulement physiquement mais également d'un point de vue électrique : l'obtention d'un scellement de 10 à 20 gigaOhms ($G\Omega$, *gigaseal*), permet de mesurer les courants de faible amplitude (de l'ordre du picoampère, pA), induits par le passage d'ions à l'intérieur du pore de conduction qui constitue le canal. De la qualité du scellement dépend la qualité de l'enregistrement. En effet, le scellement conditionne non seulement la qualité de l'isolation électrique du *patch* mais également la stabilité mécanique du scellement, ainsi que la compartimentation de la préparation.

L'obtention d'un *gigaseal* permet différentes approches expérimentales selon quatre configurations membranaires différentes. La membrane forme alors une barrière de diffusion élevée qui isole deux compartiments distincts de compositions ioniques et chimiques différentes.

La configuration initiale du *patch-clamp* appelée *cell-attached* (**Fig. 15**), est obtenue immédiatement après la formation du scellement. Pour la portion de membrane isolée, le milieu extracellulaire se trouve donc être le milieu de remplissage de la pipette. En revanche, le milieu intracellulaire reste quant à lui inchangé. L'intégrité de la cellule étant préservée, les courants ioniques ainsi enregistrés sont obtenus dans des conditions relativement physiologiques. Cette configuration permet notamment de connaître les fréquences d'ouverture des canaux au potentiel spontané de repos de la membrane, c'est-à-dire lorsque aucun potentiel n'est imposé à la cellule. Toutefois, des dépolarisations ou des hyperpolarisations peuvent être appliquées à la cellule. Le potentiel de membrane de la cellule V_m (en mV) est dans cette configuration défini par l'équation (1) :

$$V_m = E_m - V_p \quad (1)$$

Où, E_m est le potentiel de membrane spontané de la cellule, et V_p est le potentiel appliqué à la pipette, (tous deux sont exprimés en mV).

Cependant, cette configuration n'offre pas la possibilité de tester l'effet de modulateurs au niveau de la face cytoplasmique ou extracellulaire du canal pour en étudier le

fonctionnement. Aussi, après formation du scellement, la pipette peut être rapidement sortie et replongée dans la solution de bain, ainsi, la cellule éclate, seul reste le *patch* présent à l'extrémité de la pipette. Dès lors, la face cytosolique du canal est accessible, permettant ainsi l'emploi d'agonistes ayant un mode d'action intracellulaire. Dans cette configuration excisée ou *inside-out* (**Fig. 15**) la valeur du potentiel de membrane V_m est uniquement fonction de la valeur du potentiel imposé à la pipette (V_p mesuré en mV) et est égale à :

$$V_m = -V_p \quad (2)$$

La configuration *whole-cell* (**Fig. 15**) est également obtenue à partir de la configuration *cell-attached*, lorsqu'une forte aspiration est pratiquée à l'intérieur de la microélectrode, ou quand un *zap* est appliqué, c'est-à-dire une impulsion électrique d'un volt pendant un laps de temps de l'ordre de la milliseconde (sa durée est définie par l'expérimentateur). Le milieu cytoplasmique se trouve ainsi « dilué » par la solution remplissant la microélectrode, le contenu intracellulaire est alors entièrement contrôlé. Dans ce cas, il est possible d'observer l'activité électrique résultant du fonctionnement de la totalité des canaux actifs présents dans la membrane plasmique. Le potentiel de membrane V_m est alors égal au potentiel appliqué à la pipette (V_p) :

$$V_m = +V_p \quad (3)$$

A partir de cette configuration, une seconde configuration excisée peut être obtenue en procédant de la même façon que pour passer en *inside-out*. Cette dernière configuration du *patch-clamp* est appelée *outside-out*. Seul, le fragment membranaire situé autour de la pipette résiste à l'éclatement cellulaire lorsque la cellule est sortie hors de la solution de bain. La face externe de ce fragment de membrane se « reconstitue » dès qu'il se retrouve en contact avec la solution de bain. Cette dernière configuration n'a pas été utilisée lors de cette étude.

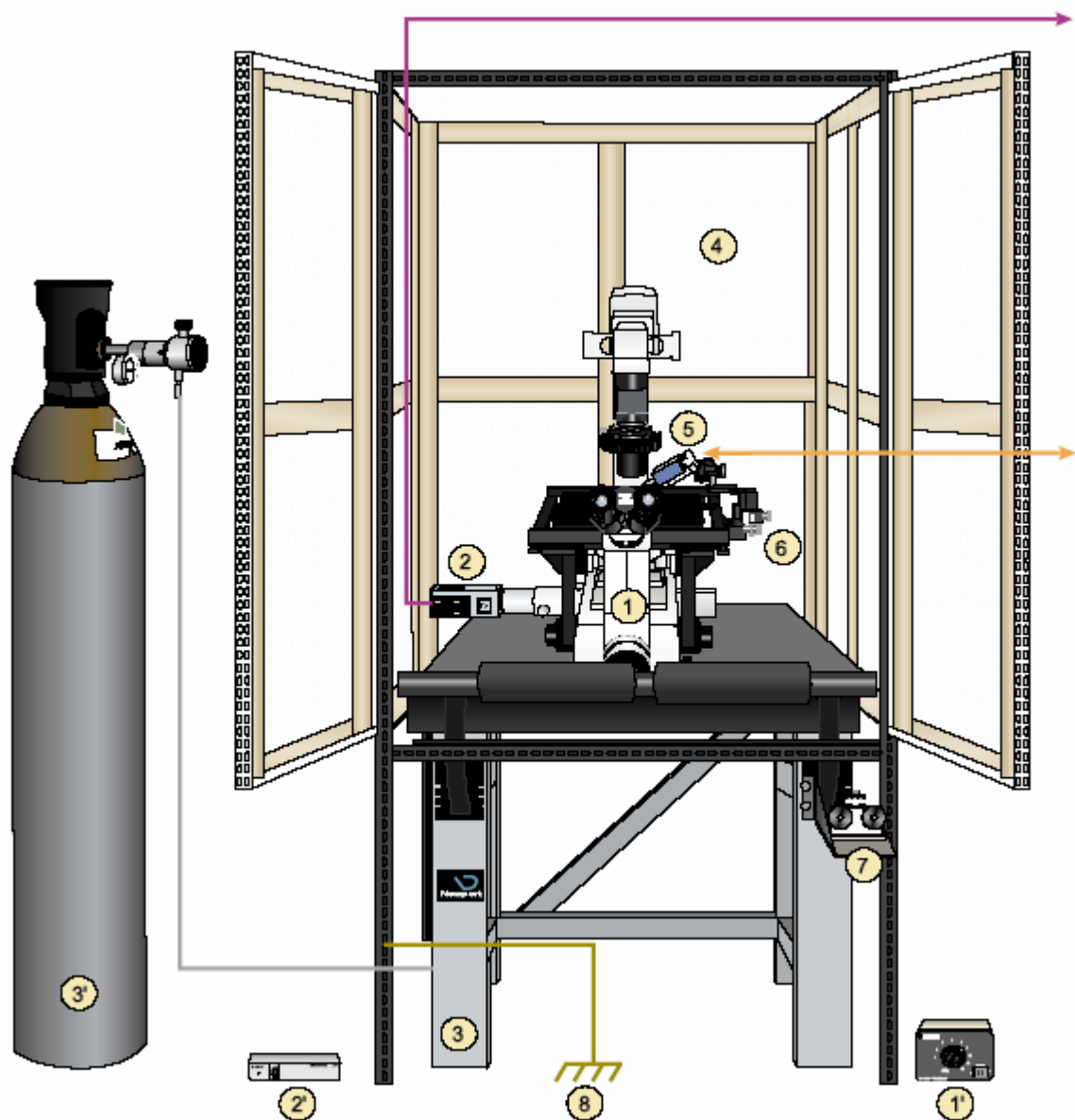


Figure 16. : Anatomie du poste de *patch-clamp* :

1 : Optique - Microscope inversé : Nikon Diaphot 300

1' : Variateur d'intensité de l'éclairage

2 : Caméra reliée au moniteur TV

2' : Alimentation extérieure de la caméra

3 : Table antivibration : isolation de tout mouvement extérieur

3' : Bouteille d'azote: gaz utilisé pour la suspension de la table

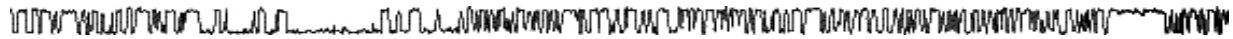
4 : Cage de Faraday : isolation de tout rayonnement électromagnétique extérieur

5 : Tête de mesure (*Headstage*) : conversion courant/tension, amplification du signal

6 : Macromanipulateur

7 : Micromanipulateur

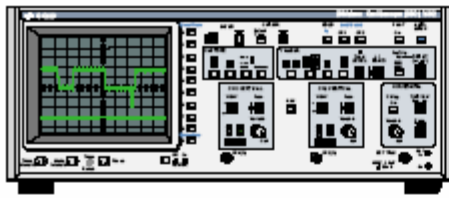
8 : Masse de mesure haute qualité



4.2. Enregistrement des courants et anatomie du poste de patch-clamp :

Les pipettes de *patch* sont étirées à partir de capillaires en borosilicate (GC 150F-10, Clark Electromedical Instrument) d'un diamètre externe de 1.5 mm et d'un diamètre interne de 0.86 mm, à l'aide d'une étireuse horizontale programmable (DMZ puller, Werner Zeitz, Augsburg, Allemagne). Après rodage, les pipettes sont remplies de Ringer NMDG. Comme son nom l'indique cette solution contient du NMDG ou N-méthyl-D-glucamine (SIGMA), qui est un cation imperméant. L'utilisation de cette solution permet de s'affranchir au cours de l'enregistrement des courants cationiques. La résistance de ces pipettes plongées dans du Ringer NaCl (**Tab. 3**) est de 8 à 20 MOhms ($M\Omega$). La réalisation du scellement, dans cette solution de Ringer NaCl¹⁵, s'effectue par succion (une dépression de 30 mbar, calibrée grâce à un vacuomètre, est appliquée à l'intérieur de la pipette, dès que cette dernière entre en contact avec la membrane cellulaire), sous un double contrôle optique (grâce à la camera qui relie le microscope du poste de *patch* à un moniteur, **Fig. 16**) et électrique. Des impulsions électriques carrées (*pulses*) de 10 mV sont imposées lors du scellement afin de contrôler l'évolution de la résistance du système pipette/membrane jusqu'à l'obtention du *gigaseal*. Simultanément, un potentiel négatif de 30 mV est imposé à la membrane durant la formation du *seal*. Les scellements ainsi réalisés présentent une résistance de l'ordre de 10 à 20 G Ω . Le potentiel imposé à la pipette (V_p) se réfère à la masse constituée par une électrode de référence située dans le bain (**Fig. 15**). Cette électrode de référence est constituée d'une électrode Ag/AgCl et d'un pont d'Agar (Agar à 3% dans du KCl 1M). Une fois le scellement obtenu, la solution de bain (Ringer NaCl) est remplacée par une solution de Ringer NMDG, afin de réaliser les enregistrements en présence de concentrations ioniques symétriques pour les ions chlorure.

¹⁵ Les cations divalents (calcium et magnésium) qu'il contient peuvent former des liaisons, sous forme de ponts salins, avec les charges négatives du verre et la surface membranaire. Ces interactions favorisent et facilitent l'obtention d'un *seal* de bonne qualité.

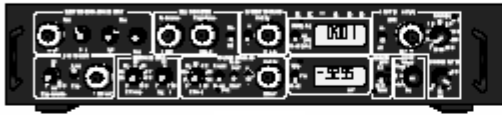


Oscilloscope:

Visualisation du signal $I_{\text{mesuré}}$
sans filtration

$V_{\text{imposé}}$

$I_{\text{mesuré}}$ sans filtration



Amplificateur RK-400:

- compensation électrique (capacitances, potentiels de jonction)
- étage d'amplification et de filtration
- réglage du $V_{\text{imposé}}$



Enregistrement sur cassette DAT:

- des paramètres $I_{\text{mesuré}}$ et $V_{\text{imposé}}$
- commentaires audio



Filtre Bessel:

Filtration de $I_{\text{mesuré}}$, enregistré sur DAT



Convertisseur Analogique / Digital:

Figure 17. : Schéma représentatif des différents constituants électroniques du poste de *patch-clamp* nécessaires à l'obtention et à l'analyse du signal.

L'électronique du poste de *patch-clamp* (**Fig. 16 & 17**) s'articule autour d'un amplificateur (RK-400, Biologic, France), pièce centrale du dispositif. Il est constitué :

- d'une tête de mesure ou *head-stage* fixée à un micromanipulateur. Cette tête de mesure contient un amplificateur opérationnel monté en convertisseur courant-tension dont la fonction est double : permettre à la fois une préamplification des courants mesurés (de l'ordre du picoampère, pA) en les transformant en tensions (exprimées en milliVolts (mV)), mais il permet aussi d'ajuster automatiquement le potentiel de la microélectrode à celui imposé par l'expérimentateur, en effet, le RK-400 permet de faire varier les potentiels imposés à la membrane isolée sous la pipette ;
- et d'un second étage d'amplification et de filtration permettant de compenser les caractéristiques électriques de l'ensemble pipette/cellule/solution de bain qui pourraient nuire à la mesure (potentiel de jonction, courants capacitifs).

A la sortie du RK-400, deux signaux sont disponibles : la tension V_i imposée à la membrane et le signal de mesure I_m , courant passant à travers le canal isolé sous la pipette. Ces deux signaux sont dirigés vers un DAT (DTR 1240 Biologic, France) où ils sont enregistrés sous forme brute (digitale) avec comme seule restriction l'étape de filtration sur le RK-400. Le DAT présente une conversion analogique/digitale avec une fréquence d'échantillonnage de 48 kHz, limitant ainsi l'enregistrement à des événements supérieurs à 50 μ s. Le DAT permet en outre l'enregistrement de commentaires lors de l'expérimentation.

A la sortie du DAT, les deux signaux sont dirigés vers l'oscilloscope pour une visualisation brute des deux signaux V_m et I_m . Le signal I_m , est également dirigé vers un filtre Bessel passe bas variable (Kemo, France) puis vers un convertisseur analogique/digital (CED 1401, Cambridge Electronic Design, Angleterre) pour une conversion numérique avant visualisation, enregistrement et analyse sur PC à l'aide des logiciels : PAT V7.4c (John Dempster, University of Strathclyde, Ecosse) pour le *single* (enregistrements unitaires en

	Ringer NaCl	Ringer NMDG _{int} (pCa 7)	Ringer NaX (pCa 7)	Ringer NMDG _{ext} (pCa 3)	Ringer NaX (pCa 3)
NaCl	115	-	-	-	-
Na ⁺ X ⁻	-	-	145	-	155
NMDG-Cl	10	145	-	155	-
MgCl ₂	5	1.15	1.15	1	1
CaCl ₂	20	1.89	1.89	1.4	1.4
Na-Hepes	-	-	-	10	10
EGTA	-	5	5	-	-
Hepes / Tris*	10	10	10	-	-
D-glucose		10	10	10	10
pH	7.4	7.2	7.2	7.4	7.4
Osmolarité	275	320	320	320	320

Tableau 3. : Composition des solutions de bain et de pipette utilisées lors des expériences de *patch-clamp*, (X⁻ représente l'anion de substitution pour les mesures de sélectivité : I⁻, Br⁻, F⁻, NO₃⁻, gluconate, les concentrations sont exprimées en mM, et l'osmolarité est mesurée en mOsm ; * : mélange composé à 35% d'Hepes et à 65% de Tris).

cell-attached ou *inside-out*), ou WCP V3.2.4 (John Dempster, University of Strathclyde, Ecosse) pour le *whole-cell*.

4.3. Protocole :

Les cellules, stockées dans du milieu de culture à 4°C ou maintenues à 37°C lorsqu'elles sont infectées, sont prélevées quotidiennement, rincées trois fois dans du Ringer NaCl et diluées jusqu'à obtention d'une densité relativement faible (hématocrite $\leq 5\%$). Quelques microlitres de ces cellules sont alors prélevés et placés dans une boîte de pétri contenant une cupulette en matériau composite neutre. Cette boîte de pétri est placée sur la platine d'un microscope inversé (Diaphot 300, Nikon) équipé d'un micromanipulateur Narishige (**Fig. 16**). La composition des solutions utilisées pour les expériences réalisées en *patch-clamp* est présentée dans le **tableau 3**. Avant utilisation, toutes les solutions sont filtrées sur des filtres en cellulose de 0.22 μm . La concentration en calcium libre des solutions est calculée à l'aide du logiciel Calcium version 1.1 (Chang *et al.*, 1988). Par convention, cette concentration sera exprimée par la valeur de pCa donnée par $\text{pCa} = -\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$. Lors des changements de solution de bain, les nouvelles solutions sont progressivement perfusées à l'intérieur de la boîte de pétri, grâce à une pipette. Le volume du liquide est maintenu constant par une canne d'aspiration métallique spécialement usinée, et reliée à une pompe péristaltique.

4.4. Analyse des courants ioniques traversant un canal :

Si on considère un transporteur uniquement perméable aux ions Cl^- présent dans la membrane, un canal anionique ouvert en permanence par exemple, les ions chlorure vont diffuser selon leur gradient chimique (du milieu où ils sont le plus concentrés vers le milieu où ils sont le plus dilués). Ce flux d'ions est appelé courant de diffusion. Les autres ions ne

pouvant pas traverser la membrane, il se développe alors un excès de charges négatives au niveau de la face interne de la membrane et un excès de charges positives à l'extérieur. Un gradient de charges apparaît, et induit un mouvement d'anions en sens inverse, c'est le courant de conduction. Le courant global d'ions traversant la membrane est la somme de ces deux courants : c'est le gradient électrochimique. Ainsi, lorsqu'un canal ionique est ouvert, le mouvement des ions qui le traversent est induit par leur seul gradient électrochimique. Ce gradient résulte de deux effets :

- du gradient de concentrations de l'espèce ionique considérée de part et d'autre de la membrane ;
- de la différence de potentiels à travers la membrane, liée à l'inégale répartition des charges de chaque côté de cette dernière, cette différence est également appelée potentiel de membrane.

Tant que ces deux gradients chimique et électrique sont différents, c'est-à-dire que le gradient électrochimique n'est pas nul, le canal est traversé par des ions, il est alors possible de mesurer un courant ionique (sauf dans le cas particulier de canaux dont le *gating* est régit par le voltage ou la fixation d'un ligand). On aboutit à un équilibre lorsque le gradient chimique et le gradient électrique sont égaux et opposés, soit un gradient électrochimique nul, et donc un courant ionique nul. Pour une espèce ionique donnée, le gradient de potentiels auquel cet équilibre est atteint est appelé potentiel d'équilibre. Il peut être calculé à partir de l'équation de Nernst (4).

$$V_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_{\text{ext}}}{[X]_{\text{int}}} \quad (4)$$

Avec :

V_x : potentiel d'équilibre de l'ion considéré ;

z : valence de l'ion ;

T : température en Kelvin $T = 273.16 + T(^{\circ}\text{C})$;

R : constante des gaz parfaits ($8.31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) ;

F : constante de Faraday (96500 Cb) ;

$[X]_{\text{ext}}$ et $[X]_{\text{int}}$ concentration extracellulaire et intracellulaire de l'ion considéré.

La loi de Nernst est fondamentale pour l'étude des canaux ioniques car lorsqu'ils sont ouverts, le potentiel transmembranaire tend vers le potentiel d'équilibre de l'ion correspondant. Ainsi, pour tout potentiel de membrane V_m , la force nette qui tend à refouler un type particulier d'ions hors de la cellule est proportionnelle à la différence entre V_m et le potentiel d'équilibre pour l'ion décrit par l'équation de Nernst. Le courant effectif de chaque type d'ion dépend non seulement de cette force motrice, mais encore de la facilité avec laquelle l'ion traverse les canaux membranaires, facilité qui est fonction de la conductance des canaux. A un potentiel donné, l'amplitude du courant est l'indice de la facilité avec laquelle un ion perméant diffuse au travers du pore. Cette facilité croît lorsque le potentiel de membrane s'éloigne du potentiel d'équilibre. Ainsi d'après la loi d'Ohm, le courant I à travers la membrane est égal à (5) :

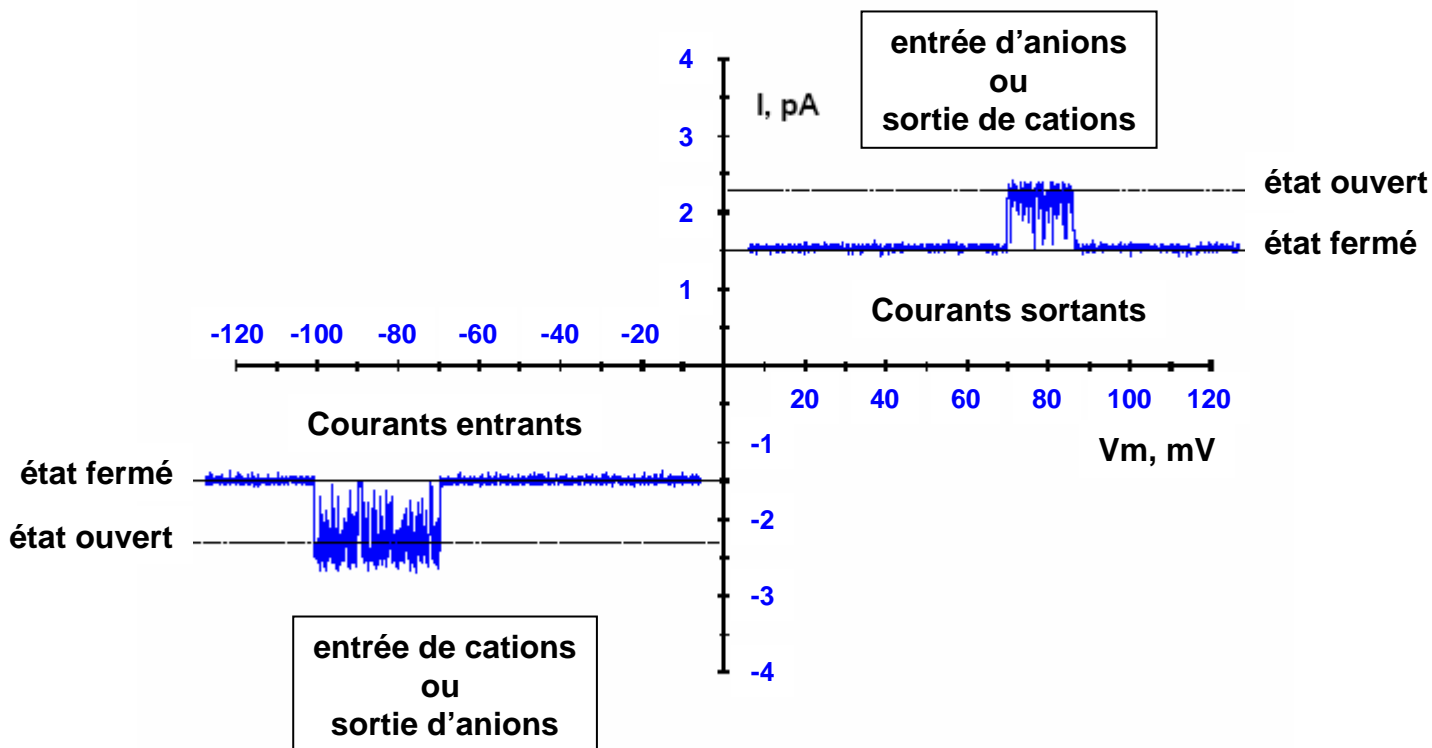
$$I = \gamma_x (V_m - V_x) \quad (5)$$

Où γ_x est la conductance élémentaire du canal (exprimée en Siemens, S).

Les courbes courant-voltage (I/V) unissant le courant I traversant le canal à chacun des potentiels V_m permettent ainsi de déterminer la conductance élémentaire du canal isolé sous la pipette.

Toutefois, si la loi d'Ohm prédit une relation courant-voltage linéaire, ceci n'est pas une règle générale. En effet, les canaux peuvent présenter une rectification, tant dans le sens des courants entrants que dans le sens des courants sortants, le flux d'ions à travers la membrane étant plus facile au départ du compartiment ayant la plus forte concentration en cet ion. L'équation de Goldman, Hodgkin et Katz (GHK) rend compte de cette rectification (6). Elle est dérivée de l'équation de Nernst (équation 4), qui permet d'exprimer le potentiel membranaire en tenant compte de la perméabilité de cette membrane aux différents ions qui la traversent.

A



B

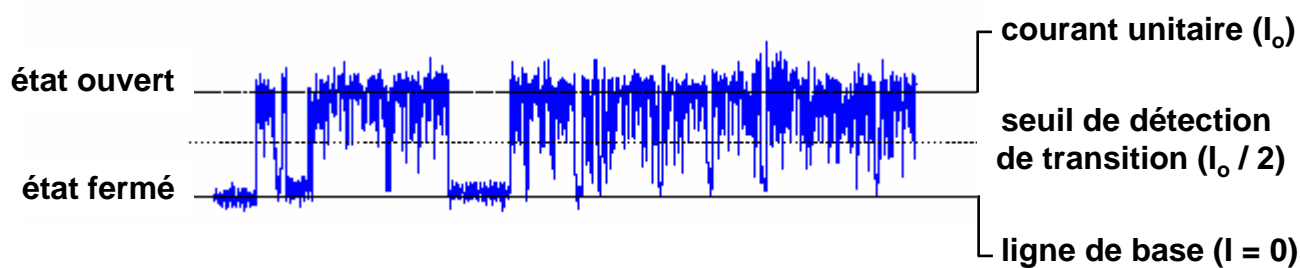


Figure 18. : Enregistrement de l'activité unitaire d'un canal ionique et convention pour le mouvement des ions le traversant :

A : Sens des courants enregistrés et mouvements des ions à travers la membrane plasmique des cellules. Par convention, on se réfère toujours au sens de déplacement des cations.

B : Enregistrement de l'activité unitaire d'un canal. A l'état ouvert, les ions traversent le canal en suivant leur propre gradient électrochimique. L'amplitude constante du courant unitaire (I_o) ainsi générée peut être mesurée par détection de transitions, quand le canal passe de l'état conducteur à l'état fermé. Ici, le seuil de détection est fixé à 50%.

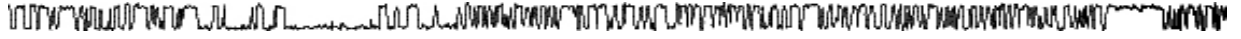
$$E_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_{ext} + P_{Na} [Na^+]_{ext} + P_{Cl} [Cl^-]_{int}}{P_K [K^+]_{int} + P_{Na} [Na^+]_{int} + P_{Cl} [Cl^-]_{ext}} \quad (6)$$

Où, E_r est le potentiel d'inversion, c'est-à-dire le potentiel auquel le courant change de sens et, P_x la perméabilité de la membrane à un ion X.

Par convention, le sens des courants en électrophysiologie est donné par le sens de déplacement des charges positives. Ainsi, un courant entrant peut être aussi bien dû à une entrée de cations qu'à une sortie d'anions de la cellule. Dans les configurations expérimentales utilisées (*cell-attached* et *inside-out*), les courants sortants sont visualisés par une déflexion (ou ouverture) vers le haut par rapport à la ligne de base du courant (**Fig. 18 A**).

4.5. Analyse des caractéristiques électriques unitaires d'un canal en configuration *cell-attached* et *inside-out*:

L'activité d'un canal est mesurée sous la forme d'une succession de signaux rectangulaires de durée aléatoire et d'amplitude fixe correspondant au courant unitaire I_o pour un potentiel membranaire donné. Cette activité électrique se compose d'une suite de transitions entre l'état ouvert et l'état fermé du canal (**Fig. 18 A & B**). L'analyse des enregistrements de l'activité des canaux ioniques nécessite donc dans un premier temps de déterminer la durée et l'amplitude de chacune de ces transitions. Pour un potentiel imposé V_m donné, le courant unitaire (I_o) correspondant est déterminé par la construction d'histogrammes d'amplitude du courant pour l'ensemble des données digitalisées lors de l'enregistrement. Ces distributions peuvent ensuite être décrites sous la forme de courbes de Gauss (une pour chaque état de conduction), à l'aide d'un algorithme itératif utilisant la méthode des moindres carrés tel que :



$$Y_{(i)} = \frac{A\omega}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \cdot e^{-\left(\frac{(I_i - I_{\text{moyen}})^2}{2\sigma^2}\right)} \quad (7)$$

Avec :

$Y_{(i)}$: courbe d'ajustement gaussien ;

A : aires fractionnées ;

I_i : le courant unitaire de l'événement i ;

σ : l'écart-type du $i^{\text{ème}}$ composant de la Gaussienne ;

ω : largeur de l'événement i.

La qualité de l'ajustement est testée par une méthode dérivée de celle de Levenberg-Marquardt (Dempster, 1993). Connaissant ainsi, pour un canal donné, la valeur du courant unitaire aux différents potentiels imposés à la membrane, il est possible d'établir la relation unissant la valeur du courant à celle du voltage imposé. La courbe I/V ainsi construite constitue une caractéristique de ce canal pour les concentrations des différentes espèces ioniques présentes au niveau de chaque face du canal. Il est alors possible de déterminer la conductance unitaire du canal à partir de l'équation (8) :

$$\gamma_x = \frac{I_x}{(V_m - V_x)} \quad (8)$$

La conductance indique la facilité avec laquelle un ion traverse un canal ionique et constitue une grandeur propre à chaque canal. Elle est évaluée graphiquement sur les courbes courant-voltage en prenant la pente de la courbe au potentiel d'inversion E_r . La conductance peut aussi être établie pour les courants sortants ($\gamma(+)$ ou $\gamma[E_{rev}; +100]$) et les courants entrants ($\gamma(-)$ ou $\gamma[-100; E_{rev}]$) en calculant la pente de la courbe lorsque, dans ces deux régions, la courbe I/V peut être assimilée à une droite.

L'activité du canal est également caractérisée par sa probabilité d'ouverture (P_o). En effet, l'analyse des enregistrements qui représentent l'activité des canaux isolés montre que les canaux ioniques fluctuent entre différents états (ouverts ou fermés). Ces transitions sont régies par des lois de nature probabiliste. Pour déterminer la probabilité d'ouverture, il convient de distinguer les états ouverts des états fermés et de définir leurs durées

respectives. La détection des transitions entre ces deux états est déterminée par le franchissement d'un seuil de détection fixé à 50 % correspondant à $I_0/2$ (**Fig. 18 B**). Tout événement dont l'amplitude dépasse ce seuil est caractérisé comme un état ouvert du canal, dans le cas contraire il est considéré comme un état fermé. La probabilité d'ouverture est calculée à partir de l'équation suivante :

$$P_o = \frac{T_{\text{ouvert}}}{T_{\text{total}}} \quad (9)$$

Avec : T_{ouvert} , la durée totale des états ouverts et T_{total} , la durée totale de l'enregistrement (toutes deux exprimées en secondes).

La connaissance de la probabilité d'ouverture du canal ne donne cependant aucune indication quant à la cinétique de fonctionnement de ce canal. Il convient donc de déterminer des grandeurs caractérisant son mode de fonctionnement. Le courant enregistré à un potentiel donné est échantillonné, à partir des détections de transitions précédemment décrites, en séquences élémentaires correspondant à la durée de chacun des états ouverts et fermés. Ces séquences sont stockées, puis classées selon leur durée. Ceci conduit à la construction d'histogrammes de distribution des temps d'ouverture et de fermeture. Quels que soient l'enregistrement et la configuration expérimentale utilisée, les distributions obtenues sont toutes de type exponentielle décroissante. Ces distributions peuvent être ajustées par une ou par plusieurs fonctions de densité de probabilité de type exponentielle, où la probabilité $P_{(t)}$ du temps de résidence du canal dans son état (ouvert ou fermé) t est donnée par :

$$P_{(t)} = \sum_{i=1}^n a_i \cdot e^{-\left(\frac{t}{\tau_i}\right)} \quad (10), \text{ où :}$$

n : est le nombre de sous-états du canal à l'état ouvert ou fermé ;
 a_i : la fraction du nombre total d'événements dans l'état i ;
 τ_i : est le temps moyen de résidence pour cet état i .

Le meilleur ajustement est recherché par la méthode du maximum de vraisemblance. Ces distributions permettent donc de déterminer les constantes de temps d'ouverture (τ_o) ou de fermeture (τ_c), qui sont les durées moyennes de résidence du canal à l'état ouvert ou fermé.

Enfin, la caractérisation d'un canal nécessite de connaître la nature des ions qui le traversent et la facilité avec laquelle s'effectue ce passage. L'équation de Nernst (équation 4) permet de déterminer le potentiel d'équilibre d'un ion en fonction de ses concentrations de part et d'autre de la membrane. Tout écart du potentiel d'inversion par rapport au potentiel d'équilibre d'un ion signale une perméabilité non négligeable du canal pour un autre ion. En simplifiant l'équation de GHK (équation 6), en la ramenant à deux espèces chimiques (anions et cations), il est possible de déterminer la sélectivité relative d'un canal aux anions ou aux cations. Ainsi, l'équation de GHK devient :

$$E_r = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{\text{cation}} [\text{cation}]_{\text{ext}} + P_{\text{anion}} [\text{anion}]_{\text{int}}}{P_{\text{cation}} [\text{cation}]_{\text{int}} + P_{\text{anion}} [\text{anion}]_{\text{ext}}} \right) \quad (11)$$

Ceci permet alors de calculer le rapport de sélectivité $P_{\text{cation}}/P_{\text{anion}}$ en utilisant l'équation suivante :

$$\frac{P_{\text{cation}}}{P_{\text{anion}}} = \frac{[\text{anion}]_{\text{int}} - \left[e^{\frac{E_r}{p}} [\text{anion}]_{\text{ext}} \right]}{\left[e^{\frac{E_r}{p}} [\text{cation}]_{\text{int}} - [\text{cation}]_{\text{ext}} \right]} \quad \text{avec } p = \frac{RT}{F}, \quad (12)$$

Si un canal est plus perméant aux anions qu'aux cations ou inversement, il convient d'établir sa séquence de sélectivité, ceci afin de déterminer quels ions sont les plus susceptibles de traverser ce canal. Ainsi, à partir de l'équation de GHK simplifiée aux seuls anions, c'est-à-dire en considérant la perméabilité cationique à travers le canal comme nulle, il est possible de déterminer une perméabilité relative pour l'ion X par rapport au chlore ($P_{\text{Cl}}/P_{\text{x}}$), dans le cas d'un canal anionique grâce à l'équation :

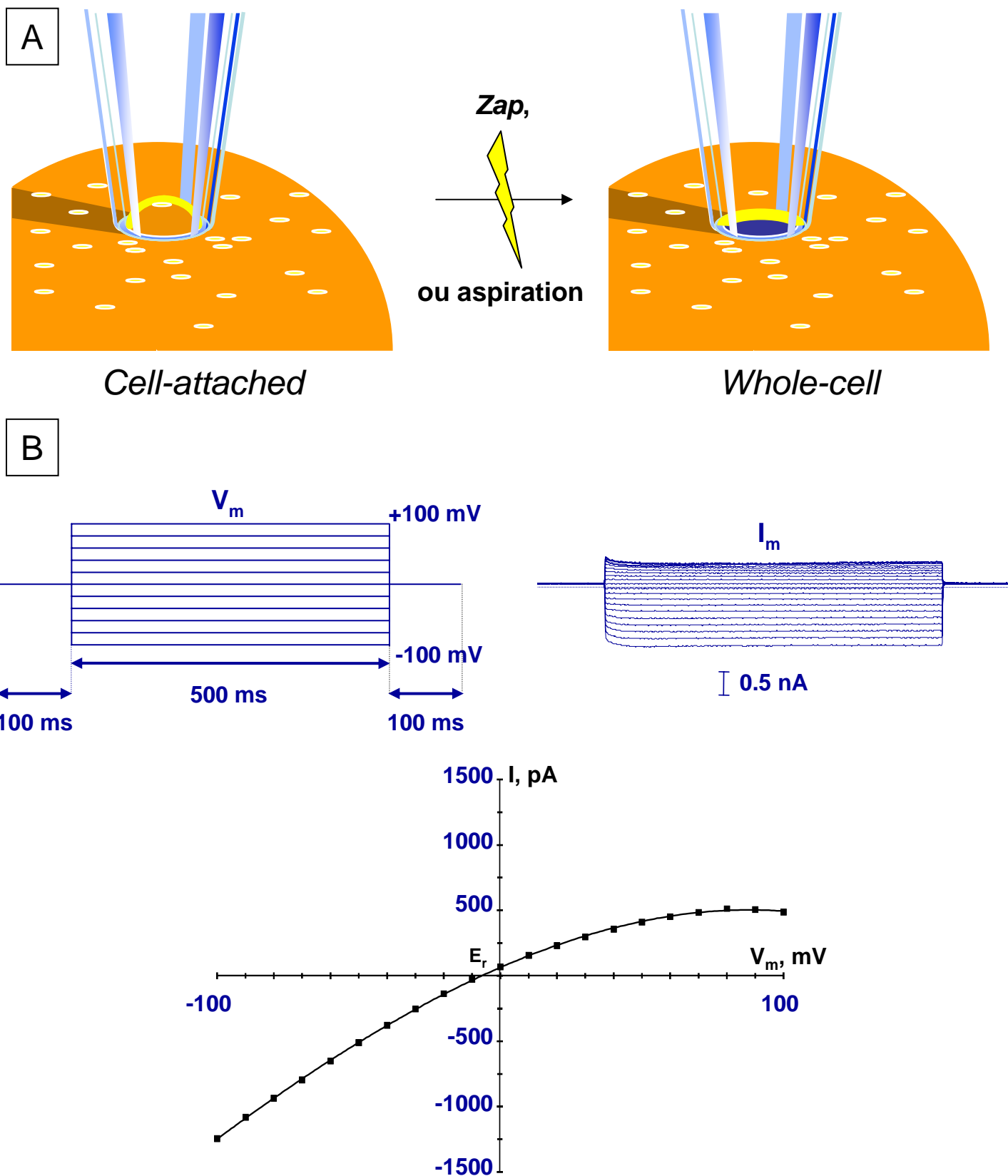


Figure 19. : Enregistrement de l'activité globale des canaux ioniques actifs présents au niveau de la membrane cytoplasmique des globules rouges humains :

A : L'application d'une forte aspiration à l'intérieur de la pipette de *patch* ou d'une brève impulsion électrique entraîne la rupture du fragment membranaire situé sous l'électrode, permettant ainsi le passage de la configuration *cell-attached* à la configuration *whole-cell*.

B : Les détails du protocole expérimental utilisé pour l'enregistrement de l'activité globale des canaux ioniques sont présentés à gauche. Les courants (I_m) qui en résultent sont reportés à droite, ainsi pour chaque voltage imposé correspond un courant mesuré. La relation qui lie ces 2 paramètres peut être représentée graphiquement sous la forme d'une courbe courant-tension telle que celle présentée ci-dessus (E_r est le potentiel d'inversion, c'est-à-dire la valeur du potentiel de membrane pour laquelle aucun courant n'est mesurable et où le courant change de sens).

$$\frac{P_{Cl}}{P_X} = z_X \frac{e^{\frac{E_r}{p}} \cdot [X]_{int} - [X]_{ext}}{[Cl^-]_{int} - e^{\frac{E_r}{p}} \cdot [Cl^-]_{ext}} \quad (13)$$

Où, z_X est la valence de l'ion X et p est égal à : $p = \frac{RT}{F}$.

La détermination du courant unitaire ainsi que les analyses cinétiques sont effectuées sur des enregistrements filtrés à 300 Hz, d'une durée supérieure à 60 secondes. De plus, sauf lorsque cela est précisé, cette analyse est effectuée sur des enregistrements ne contenant qu'un seul canal actif. En effet les constantes de temps ne peuvent être calculées lorsque plusieurs exemplaires d'un canal sont présents sous la pipette de *patch*.

4.6. Analyse des caractéristiques électriques de la membrane en configuration *whole-cell* :

L'enregistrement des courants globaux en configuration *whole-cell* est réalisée après obtention d'un *gigaseal* et perforation du fragment de membrane présent sous la pipette de patch (par application d'une forte dépression ou d'une impulsion électrique, **Fig. 19 A**). Le passage en *whole-cell* est évalué par l'augmentation de la capacitance membranaire et la réduction de la résistance d'accès. Les pipettes sont remplies d'une solution de ringer NMDG dont la teneur en calcium est ajustée à une concentration proche de celle du cytoplasme d'un érythrocyte (Ringer NMDG pCa 7, **Tab. 3**). Il est alors possible d'enregistrer l'activité des canaux ioniques présents dans la membrane érythrocytaire. Le logiciel WCP permet de construire de nombreux protocoles expérimentaux. Ainsi des rampes de voltage sont imposées, pendant une période de 500 ms, de 10 mV en 10 mV, en partant d'un potentiel de +100 mV pour s'arrêter à -100 mV (**Fig. 19 B**). Entre chaque rampe de voltage, une période de 200 ms est respectée, au cours de laquelle aucun voltage n'est imposé. Cette période se divise en 2 intervalles de 100 ms situés en amont et en aval de chaque

NOM	PROPRIETES	SOLVANT	FOURNISSEUR
9-AC	inhibiteur des canaux chlorure	DMSO	SIGMA
Acide flufénamique	inhibiteur de certains canaux chlorure	DMSO	SIGMA
Acide niflumique	inhibiteur de la bande 3 et du cotransport K-Cl, de canaux chlorure	DMSO	SIGMA
Gibco Albumax II	sérum riche en albumine et lipides d'origine bovine	Ringer	Invitrogen
ATP (Na ou Tris salts)	source d'énergie pour la cellule, donneur de phosphates dans les mécanismes de phosphorylation	Ringer	SIGMA
DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2'2'-disulfonic acid)	inhibiteur des canaux chlorure, de la bande 3, et du cotransport K-Cl	DMSO	SIGMA
DPC (diphenylamine-2-carboxylic acid)	inhibiteur des canaux chlorure épithéliaux	DMSO	SIGMA
Forskoline	augmente l'AMPc intracellulaire par stimulation de l'adénylate cyclase	DMSO	SIGMA
furosémide	inhibiteur du NPP et de canaux chlorure, cotransport KCl et de la bande 3	DMSO	SIGMA
Glibenclamide	inhibiteur des canaux chlorure de la famille des CFTR et des K-ATP	DMSO	SIGMA
IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine)	inhibiteur de la phosphodiesterase	DMSO	SIGMA
NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate)	inhibiteur des canaux chlorure	DMSO	RBI
Phosphatase alcaline	catalyse l'hydrolyse de groupements 5'-phosphate de nombreux substrats	Ringer	Promega
PKI	inhibiteur spécifique et naturel de la sous-unité catalytique de la PKA	Ringer	SIGMA
Sous-unité catalytique de la PKA (origine bovine)	catalyse la phosphorylation d'un substrat	Ringer	SIGMA
Tamoxifène	inhibiteur de protéine kinase C et de certains canaux chlorure	DMSO	SIGMA
Théophylline	inhibiteur de la phosphodiesterase	Ringer	SIGMA

Tableau 4. : Liste de différents produits testés au cours des différentes expériences de *patch-clamp*.

potentiel imposé. Dès le lancement d'une rampe complète (de +100 à -100 mV), il est possible de visualiser les courants (I_m) mesurés (**Fig. 19 B**). Pour chaque voltage appliqué à la membrane, les courants mesurés sont moyennés sur l'ensemble des 500 ms de la rampe de voltage, et sont utilisés pour établir la courbe I/V (**Fig. 19 B**) correspondant aux conditions expérimentales mises en œuvre (composition des solutions de bain et de pipette, présence d'inhibiteurs ou d'activateurs dans chacun des compartiments intra- et extracellulaire).

5. Présentation des données et analyse statistique des résultats :

Les données sont présentées sous la forme de moyennes accompagnées de la valeur de l'erreur standard à la moyenne (moy. \pm SEM). La comparaison des moyennes est effectuée par un test t de Student après analyse de la variance par un test F de Fischer. Le seuil de significativité des tests, ainsi que le nombre d'expériences faisant l'objet du test sont précisés le cas échéant.

6. Produits chimiques utilisés au cours des différentes expériences :

Les différents produits utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le **tableau 4**. Ce tableau précise leur provenance, leur solvant ainsi que leur mode d'action. Lorsque l'emploi d'un solvant organique (DMSO ou éthanol) est nécessaire à la préparation d'un produit, la concentration finale en solvant n'excède jamais 0.025% vol/vol.

Résultats

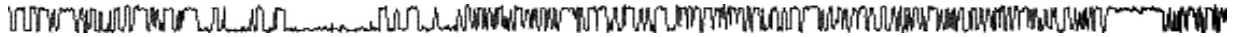


Liste des Publications

1. **Decherf, G.**, Egee, S., Staines, H., Ellory, C., and Thomas, S. (2004). Anionic channels in malaria-infected human red blood cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *in press*.

2. Staines, H.M., Powell, T., Ellory, J.C., Egee, S., Lapaix, F., **Decherf, G.**, Thomas, S.L., Duranton, C., Lang, F., and Huber, S.M. (2003). Modulation of whole-cell currents in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by holding potential and serum. *J Physiol* 552, 177-183.

3. Egee, S., Lapaix, F., **Decherf, G.**, Staines, H.M., Ellory, J.C., Doerig, C., and Thomas, S.L. (2002). A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Physiol* 542, 795-801. **ANNEXE I**



Résultats

Les résultats présentés dans cette partie seront divisés en 3 chapitres distincts :

- Chapitre I : Caractérisation des canaux CFTR-*like* dans la membrane des érythrocytes humains : rôle physiologique et implication dans la nouvelle voie de perméabilité induite au cours de l'infection par *Plasmodium falciparum* ;
- Chapitre II : Malaria, érythrocytes, canaux ioniques et kinases ;
- Chapitre III : Effets du potentiel imposé et du sérum sur les conductances activées par *Plasmodium falciparum*.

Chapitre I:

Caractérisation des canaux CFTR-*like* dans la membrane des érythrocytes humains : rôle physiologique et implication dans la nouvelle voie de perméabilité induite au cours de l'infection par *Plasmodium falciparum*

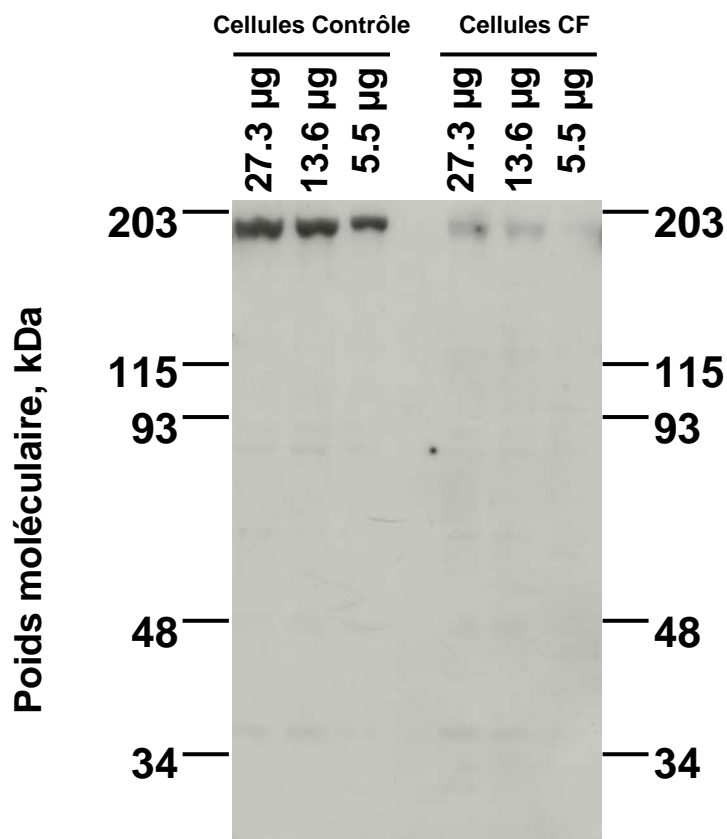
Chapitre I :
Caractérisation des canaux CFTR-like dans la membrane des
érythrocytes humains : rôle physiologique et implication dans la
nouvelle voie de perméabilité induite au cours de l'infection par
Plasmodium falciparum :

Introduction

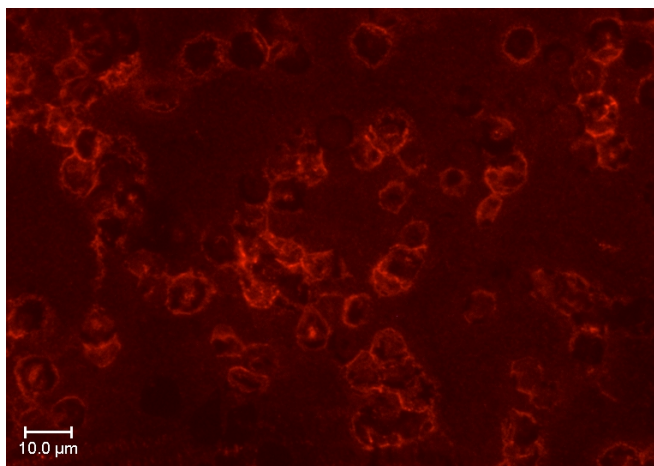
Comme nous l'avons souligné dans l'introduction générale, deux types de canaux chlorure sont présents dans la membrane des hématies. Toutefois, leur identité moléculaire ainsi que leurs fonctions physiologiques dans le globule rouge non infecté restent encore indéterminées. Ici, nous nous intéresserons plus particulièrement au canal de faible conductance unitaire car il possède de fortes similitudes avec celui observé dans la membrane de cellules infectées par *Plasmodium falciparum*. Les principales caractéristiques de ce canal sont : une conductance linéaire de 12 pS et une activité PKA dépendante. Ces caractéristiques ne sont pas sans rappeler celles des canaux de type CFTR qui partagent le même modulateur ainsi qu'un profil pharmacologique très proche ; seule la séquence de sélectivité de ces canaux est différente de celle que nous avons rapportée précédemment. En effet, ces canaux présentent une conductance linéaire d'environ 10 pS, leur activité est étroitement régulée par des mécanismes de phosphorylation AMP_c dépendants et ils présentent un profil pharmacologique très proche de celui que nous observons, seule la séquence de sélectivité semble les séparer.

Afin d'identifier la nature du canal chlorure de 12 pS de conductance, nous avons comparé les réponses de cellules contrôle (issues de donneurs en bonne santé) et de cellules CF (provenant de patients volontaires, souffrants de mucoviscidose, porteurs de la mutation $\Delta F508$). Au cours des différentes expériences de *patch-clamp*, les enregistrements ont été réalisés en utilisant du Ringer NMDG afin de s'affranchir de tous courants cationiques. Dans le cas contraire, la composition des solutions utilisées sera précisée.

A



B



C

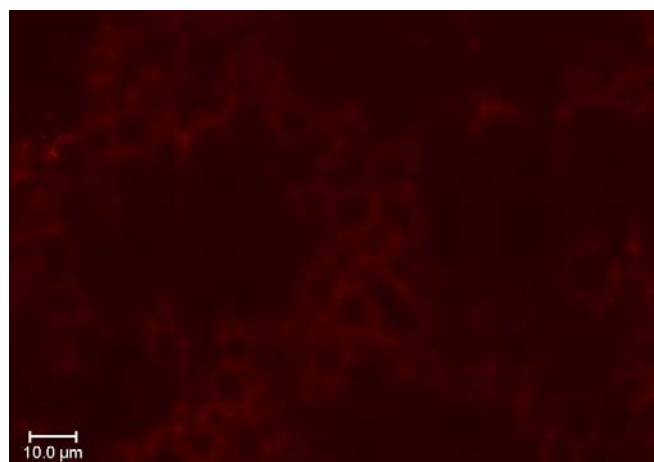


Figure 20. : Localisation de canaux CFTR dans la membrane du globule rouge humain :

A : Western-blot réalisé à partir des extraits protéiques membranaires d'érythrocytes contrôle et CF. (L'anticorps primaire utilisé est dirigé contre la première boucle extracellulaire de la protéine canal, les quantités de protéines chargées sont indiquées en haut).

B-C : Immunolocalisation de canaux CFTR présents à la surface de globules rouges contrôle. La figure **B** présente un marquage positif grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire dirigé contre un segment de la première boucle extracellulaire de la protéine et d'un anticorps secondaire couplé à une sonde TRITC. La figure **C** est un contrôle négatif où l'anticorps primaire n'a pas été utilisé.



Résultats

1. Mise en évidence de protéines de type CFTR dans la membrane des érythrocytes humains :

Avant de pousser plus loin les études électrophysiologiques, il est fondamental de vérifier si des protéines de type CFTR sont présentes dans la membrane des globules rouges. Afin de vérifier cette hypothèse, une approche biochimique a été envisagée. Un anticorps monoclonal dirigé contre la première boucle extracellulaire du canal CFTR a été utilisé sur des extraits de protéines membranaires provenant des deux types cellulaires étudiés afin de réaliser des *western-blots* (**Fig. 20 A**). Une bande unique d'environ 200 kDa apparaît, toutefois l'intensité de cette bande varie selon le type de cellules considéré. En effet, pour une même quantité de protéines utilisée la bande est plus intense pour les extraits provenant de cellules contrôle que de cellules CF. Ceci indique que l'anticorps reconnaît l'épitope [(103)GRIIASYDPDNKEER(117)], qui après vérification par *blast* n'est retrouvé que dans la protéine de type CFTR. Ces protéines sont donc présentes dans la membrane des érythrocytes, néanmoins, la quantité détectée chez les cellules CF est inférieure à celle des contrôles. L'existence de ces protéines dans la membrane des cellules contrôle est également confirmée grâce à une méthode d'immunolocalisation utilisant ce même anticorps (**Fig. 20 B & C**).

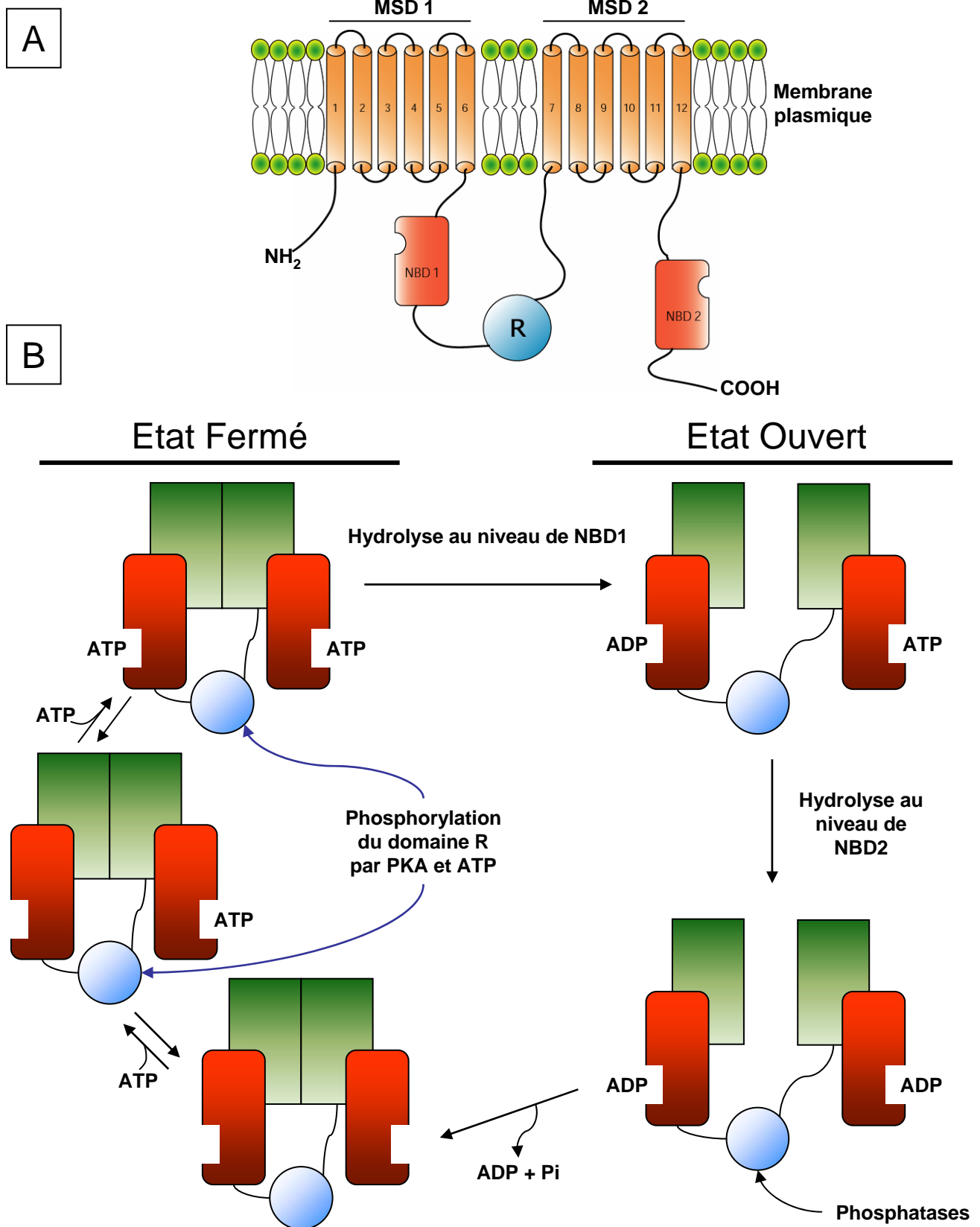


Figure 21. : Schémas représentatifs de la structure et des mécanismes d'activation présumés d'un canal CFTR (d'après Sheppard et *al.*, 1999) :

A : Modèle structural du canal CFTR : il possède 2 domaines transmembranaires (MSD 1 et 2, *Membrane-Spanning Domain*) chacun constitué de 6 segments (numérotés de 1 à 12), de 2 domaines de fixation de l'ATP (NBD 1 et 2, *Nucleotide-Binding Domain*), et d'un domaine régulateur R phosphorylable par la PKA.

B : Schéma d'activation du canal CFTR : la fixation conjointe de 2 molécules d'ATP au niveau des 2 NBDs, ainsi que la phosphorylation du domaine R sous l'action d'une protéine kinase A permettent le passage de l'état fermé à l'état ouvert. Dès lors, l'hydrolyse de l'ATP fixé par les NBDs, et/ou la déphosphorylation du domaine R, sous l'action de phosphatases, entraîne(nt) la fermeture du canal.

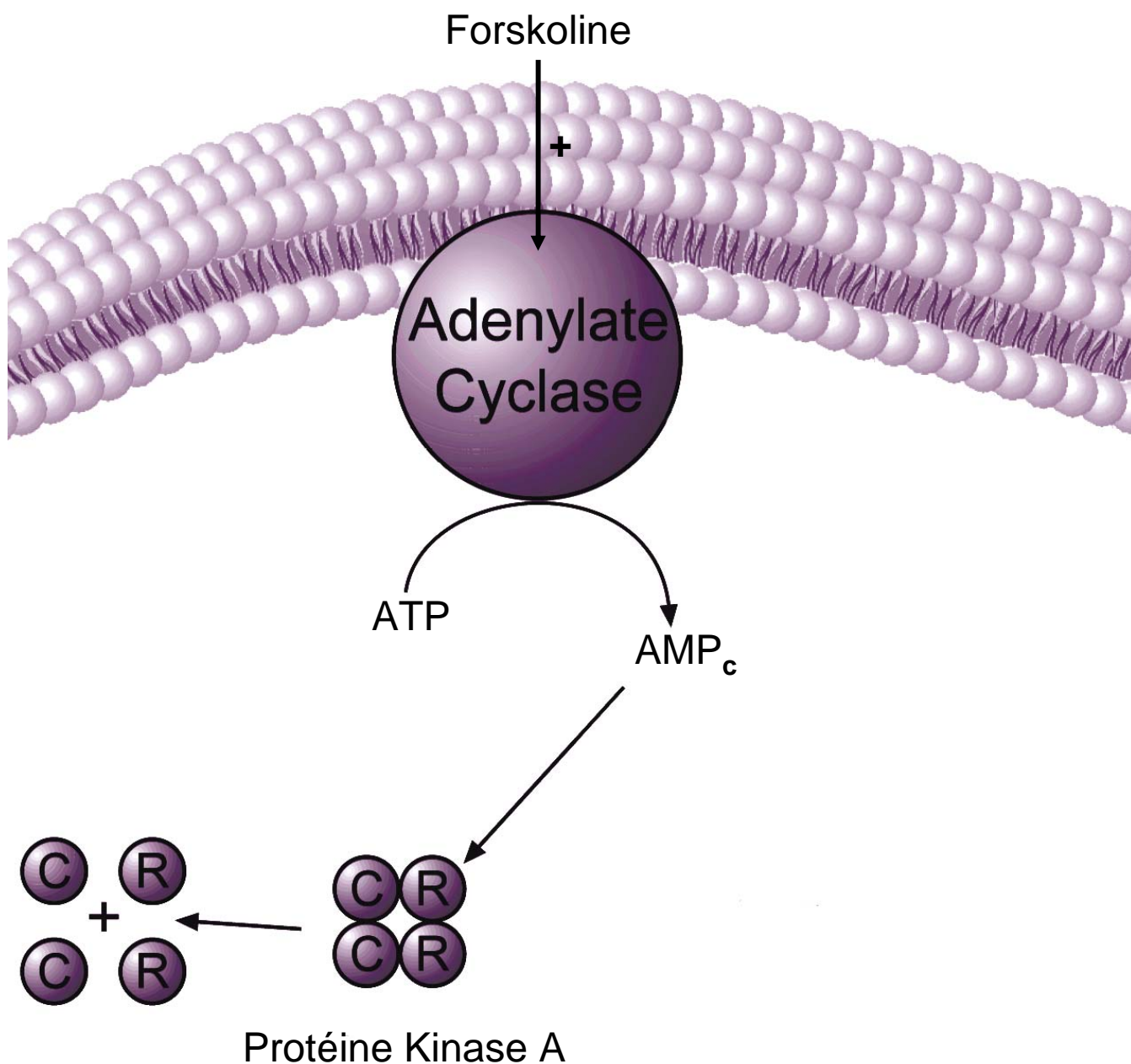


Figure 22. : Schéma d'activation de la Protéine Kinase A :

L'augmentation d'AMP_c intracellulaire provenant de l'ATP hydrolysé par l'adenylate cyclase activé par la forskoline permet la dissociation du complexe constitué par les 2 sous-unités régulatrices (R) et les 2 sous-unités catalytiques (C) de la PKA. Les sous-unités catalytiques peuvent alors remplir leur rôle : phosphoryler le domaine régulateur du canal CFTR.

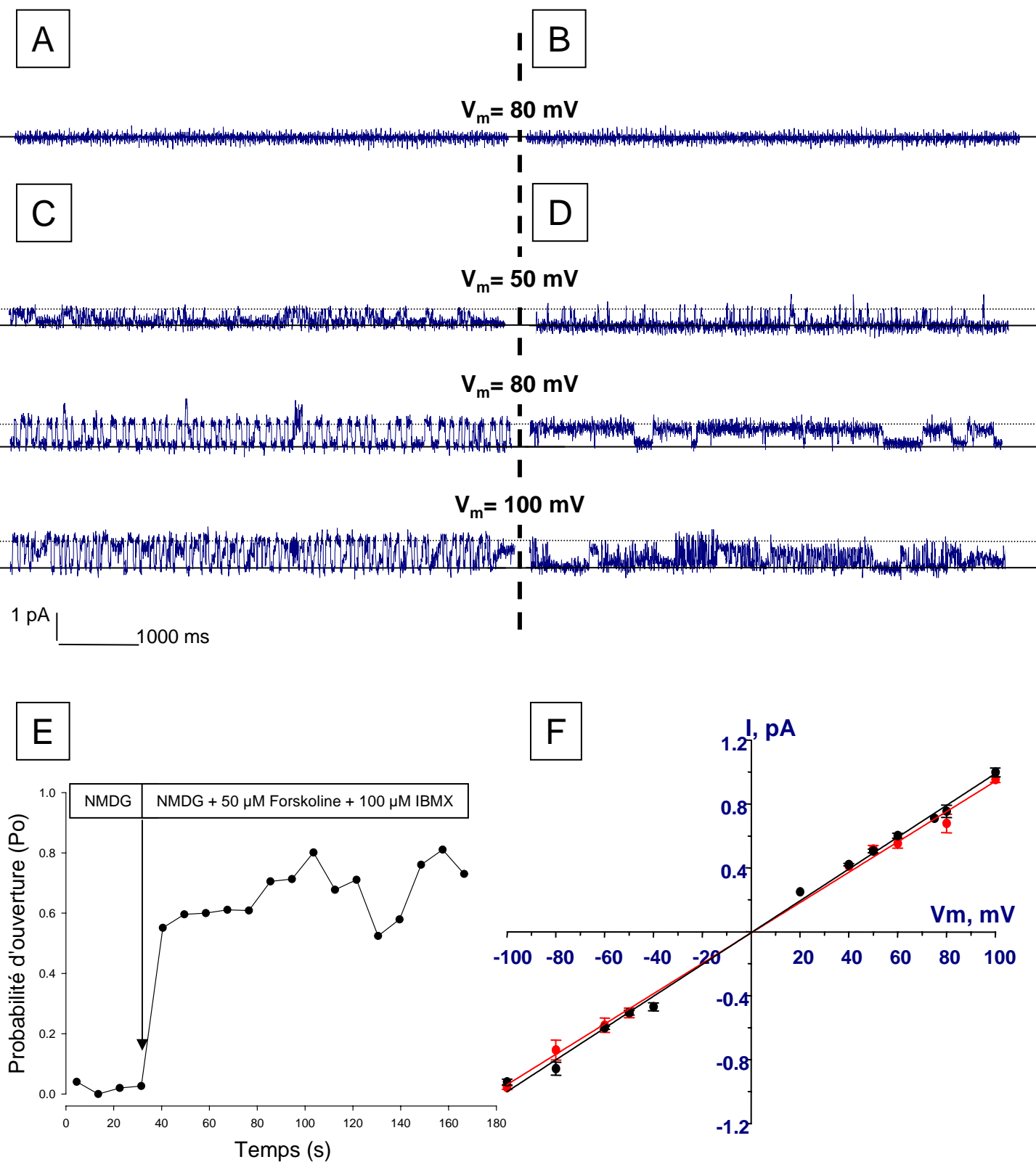


Figure 23. : Activation, en configuration *cell-attached*, du canal CFTR-like présent dans la membrane de globules rouges contrôle et CF, par augmentation du taux d'AMP_c intracellulaire (en présence de 50 μM de forskoline et de 100 μM d'IBMX) :

A-B : Absence d'activité spontanée lorsque le ringer NMDG est utilisé comme solution de bain et de pipette, pour les 2 types cellulaires : contrôle (**A**) et CF (**B**).

C-D : Activation d'une conductance chlorure AMP_c dépendante, dans la membrane des cellules contrôle (**C**) et CF (**D**) lorsque de la forskoline est ajoutée dans la solution de bain.

E : Effet de la forskoline sur la probabilité d'ouverture d'un canal issu d'une cellule CF.

F : Relation courant-voltage correspondante. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) de 74 et 32 mesures réalisées, respectivement pour les cellules contrôle et CF.



2. Mise en évidence de canaux CFTR(-like) dans la membrane des érythrocytes humains :

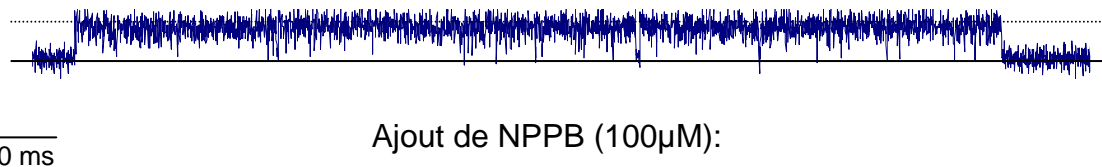
2.1. Activation d'une conductance chlorure en présence de forskoline en configuration cell-attached :

Deux conditions doivent être remplies pour permettre l'activation de canaux CFTR. Tout d'abord, de l'ATP doit être fixé au niveau des deux domaines NBDs (*Nucleotide-Binding Domains*) pour y être hydrolysé en ADP (Szellas et Nagel, 2003). Puis, intervient une étape de phosphorylation, où l'action d'une PKA permet le transfert d'un groupement phosphate (provenant d'une molécule d'ATP) sur le domaine régulateur R du canal (Sheppard et Welsh, 1999; Cheng, 1991; Seibert, 1999, **Fig. 21 A**). La PKA n'est pas spontanément active dans le cytoplasme des mammifères, elle existe sous la forme d'un hétérotétramère composé de deux sous-unités catalytiques et de deux sous-unités régulatrices. Une augmentation du taux d'AMP_c intracellulaire permet la dissociation de ce complexe (par fixation de ce dernier sur les deux sous-unités régulatrices), libérant les sous-unités catalytiques capables alors de phosphoryler différents substrats (**Fig. 22**). Le canal se referme sous l'action combinée de phosphatases au niveau du domaine régulateur (Fischer *et al.*, 1998; Zhou, 2002) et de l'hydrolyse de l'ATP au niveau des deux domaines NBDs (**Fig. 21 B**).

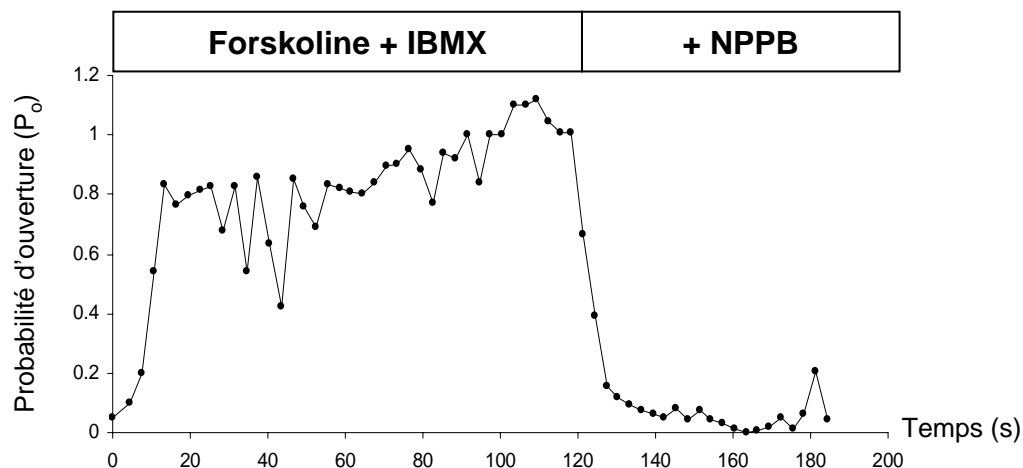
La perfusion extracellulaire lors des expériences de *patch-clamp*, de forskoline (50 µM) et d'IBMX (100 µM), permet d'activer ces mécanismes. La forskoline est un activateur de l'adénylate cyclase qui permet d'augmenter le taux d'AMP_c en hydrolysant de l'ATP (**Fig. 22**, Bajnath *et al.*, 1993). L'IBMX est un inhibiteur de la phosphodiesterase prévenant ainsi la dégradation de l'AMP_c produit par l'adénylate cyclase.

En configuration *cell-attached*, en absence de toute stimulation aucune activité spontanée n'est enregistrable (**Fig. 23 A & B**). En revanche, des ouvertures apparaissent dès l'ajout de forskoline dans la solution de bain conformément à ce que Berger *et al.*, (1991) ont observé,

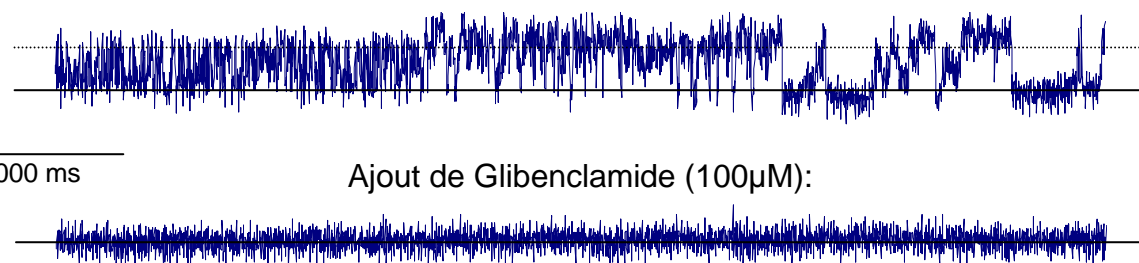
A



B



C



D

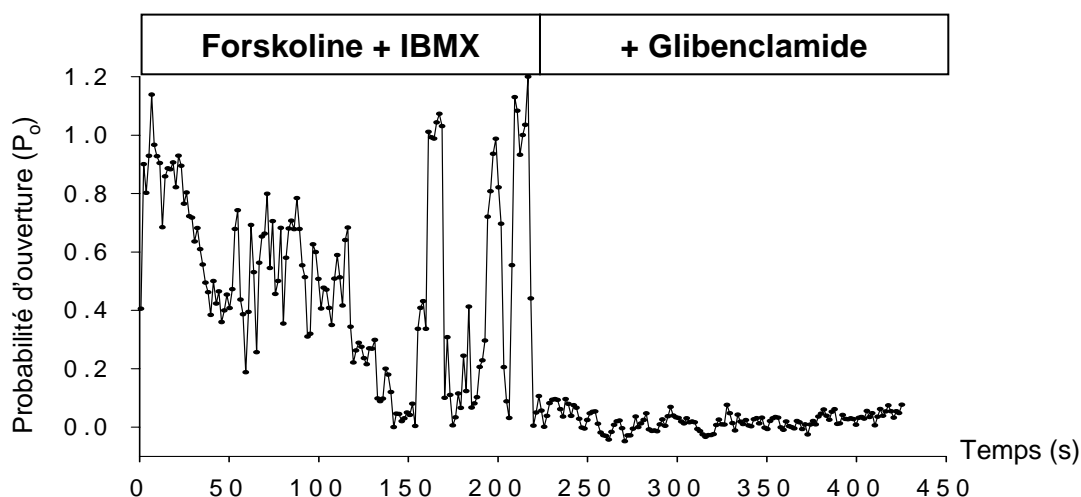


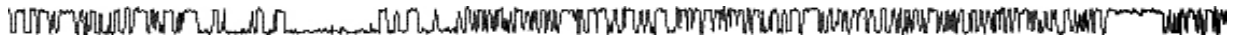
Figure 24. : Inhibition en configuration *cell-attached* de l'activité de canaux CFTR-like présents dans la membrane de cellules CF, préalablement activés par augmentation de la concentration intracellulaire en AMP_c (forskoline et IBMX) :

A : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal, pour un potentiel membranaire de 80mV avant et après ajout de NPPB (100 μ M) dans la solution de bain (Ringer NMDG comme solution de pipette et de bain. La ligne continue indique l'état fermé du canal).

B : Evolution de l'activité du canal (P_o) avant et après ajout de NPPB (100 μ M).

C : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal, pour un potentiel membranaire ($-V_p$) de 80mV avant et après ajout de glibenclamide (100 μ M) dans la solution de bain. (Ringer NMDG comme solution de pipette et de bain. La ligne continue indique l'état fermé du canal).

D : Evolution de l'activité du canal (P_o) avant et après ajout de glibenclamide (100 μ M).



(**Fig. 23 E**), comme le montre les enregistrements caractéristiques obtenus avec les deux types cellulaires, représentés ici à différents potentiels imposés à la membrane ($-V_p$) (**Fig. 23 C & D**). La relation courant-voltage établie à partir des courants unitaires mesurés aux différents potentiels testés est identique pour les cellules contrôle et CF qui présentent respectivement une conductance linéaire de 10.6 pS et 9.6 pS, et un potentiel d'inversion proche de 0 mV (**Fig. 23 F**). Ces résultats indiquent que l'activation du canal est de type AMP_c dépendante. De plus, ces courants peuvent être inhibés par le NPPB (100 μ M) et la glibenclamide (100 μ M) ajoutés à la solution de bain (**Fig. 24 A & B**), tout comme l'observent Taddei *et al.*, (2004).

L'analyse de la cinétique de ces canaux a été menée sur des enregistrements de plusieurs minutes, réalisés à un potentiel imposé à la membrane ($-V_p$) de +50 mV et ne présentant qu'une seule copie du canal, afin de déterminer si ces derniers présentent un comportement différent en fonction de l'origine des cellules. La **figure 25** présente des histogrammes caractéristiques de temps de résidence des canaux dans chaque état (ouvert et fermé). Ces histogrammes permettent de déterminer la valeur des constantes de temps d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_c) d'un canal¹⁶. En comparant les valeurs moyennes de ces constantes de temps, on constate que les cellules contrôle et CF présentent des constantes de temps d'ouverture et de fermeture similaires ($P=0.2$, **Fig. 25 C & D**). En revanche les canaux des cellules CF ($\tau_c = 19.9 \pm 2$ ms, $n = 3$) restent significativement plus longtemps fermés que ceux des cellules contrôle ($\tau_c = 10.1 \pm 0.6$ ms, $n = 3$; test t : $P < 0.01$).

¹⁶ Le comportement d'un canal ionique bien que stochastique, peut être modélisé sous la forme d'une somme d'exponentielles décroissantes.

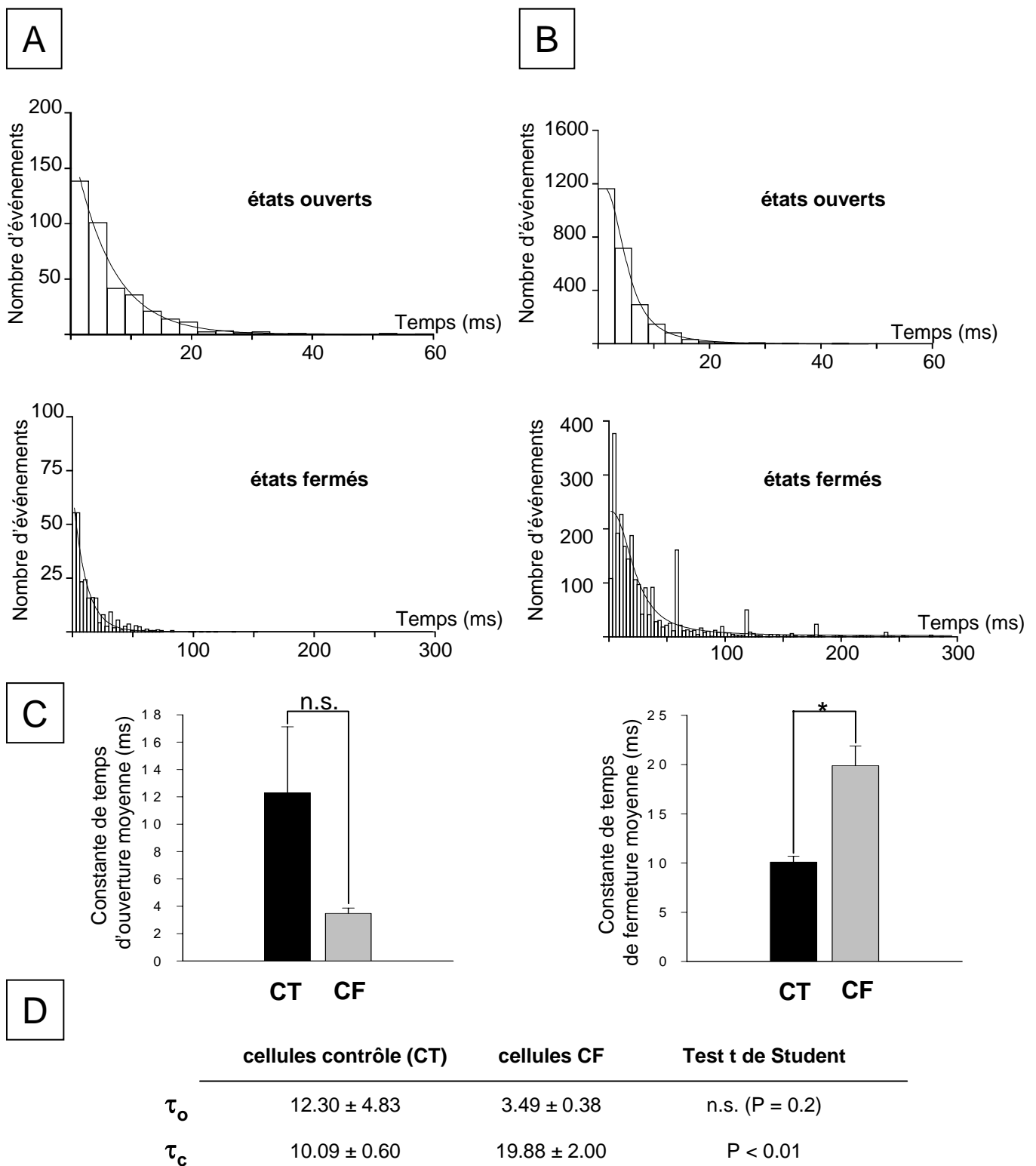
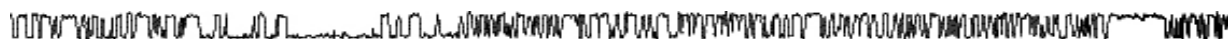


Figure 25. : Caractérisation en configuration *cell-attached* de la cinétique des canaux CFTR-like de la membrane des érythrocytes contrôle et CF, activés par augmentation du taux d'AMP_c intracellulaire (forskoline et IBMX) :

A - B : Histogrammes caractéristiques des temps de résidence des canaux présents dans la membrane de cellules contrôle (**A**) et CF (**B**), dans chaque état (ouvert ou fermé) pour un potentiel membranaire de 50 mV. (les solutions de bain et de pipette sont constituées de Ringer NMDG).

C : Histogrammes de comparaison des constantes de temps d'ouverture et de fermeture moyennes des canaux en fonction du type cellulaire étudié, (contrôle : n= 3; CF : n=3).

D : Tableau récapitulatif des constantes de temps d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_c). Les valeurs indiquées sont la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) des valeurs obtenues à partir de 3 enregistrements de cellules contrôle et 3 à partir de cellules CF.



2.2. Activation d'une conductance chlorure par la sous unité catalytique de la Protéine Kinase A (PKA) :

Précédemment, nous avons vu que la PKA et l'ATP permettaient d'activer une conductance chlorure dans la membrane des globules rouges contrôle. Cependant, est-il également possible d'activer cette conductance dans la membrane des globules rouges CF ?

2.2.1. Activation d'une conductance chlorure en présence de PKA en configuration inside-out :

L'application de la sous-unité catalytique de la PKA (100 nM) et d'ATP (1 mM) au niveau de la face cytosolique de la membrane permet l'enregistrement d'une activité canalaire dans les deux types d'érythrocytes. Toutefois, en configuration excisée *inside-out*, comme nous avons pu le décrire précédemment, en absence de toute stimulation aucune activité spontanée n'a pu être observée quelque soit le type cellulaire étudié (contrôle ou CF). La **figure 26 (A & B)**, présente les enregistrements caractéristiques obtenus pour différentes valeurs de potentiel membranaire (V_m). Les relations courant-voltage obtenues à partir des enregistrements effectués sur des cellules contrôle et CF sont identiques avec une conductance linéaire respective de 9.4 pS et 10.7 pS, et un potentiel d'inversion voisin de 0 mV dans ces conditions ioniques symétriques en chlore (**Fig. 26 C**). Ces courants sont inhibés par le NPPB (100 μ M) et la glibenclamide (100 μ M) lorsque ceux-ci sont perfusés dans la solution de bain contenant de la PKA et de l'ATP (**Fig. 27 A & B**).

Une étude cinétique de l'activité des canaux a été réalisée, tout comme au préalable en *cell-attached*, sur des enregistrements de plusieurs minutes, réalisés à +50 mV et ne présentant qu'une seule copie du canal. La **figure 28** présente des histogrammes caractéristiques de temps de résidence des canaux dans chaque état (ouvert et fermé). En

A

B

 $-V_p = 80 \text{ mV}$ $-V_p = 60 \text{ mV}$ $-V_p = 40 \text{ mV}$ $-V_p = 0 \text{ mV}$ $-V_p = -40 \text{ mV}$

1 pA

1000 ms

C

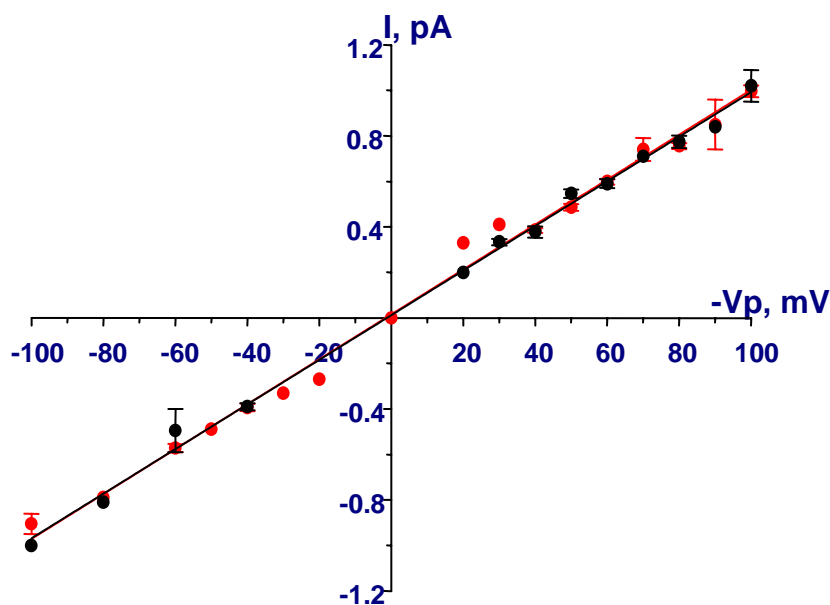


Figure 26. : Activation, en configuration *inside-out*, du canal CFTR-like présent dans la membrane de globules rouges contrôle et CF, en présence de la sous unité catalytique de la Protéine Kinase A (100 nM) et d'ATP (1mM) au niveau cytosolique :

A-B : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal pour différents potentiels de membrane ($-V_p$) dans la membrane de cellules contrôle (**A**) et CF (**B**). (La ligne continue indique l'état fermé du canal).

C : Relation courant-voltage correspondante. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) de 31 et 83 mesures réalisées, respectivement à partir de cellules contrôle et CF.

Résultats

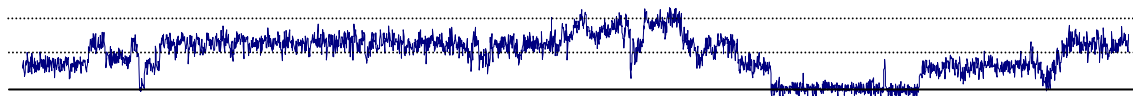
comparant les valeurs moyennes de ces constantes de temps, on constate que les canaux des cellules contrôle sont plus longtemps ouverts ($\tau_o = 3.7 \pm 0.1$ ms, $n=2$) que ceux des cellules CF ($\tau_o = 1.6 \pm 0.4$ ms, $n=2$; test t : $P < 0.05$). Les constantes de temps de fermeture de ces canaux ne sont pas statistiquement différentes (pour les cellules contrôle : $\tau_c = 23.35 \pm 0.56$ ms, $n=2$, contre $\tau_c = 47.05 \pm 11.39$ ms, $n=2$, pour les cellules CF, $P=0.2$). L'absence de différence significative entre ces constantes de temps de fermeture est due au petit nombre d'enregistrements répondants aux critères nécessaires pour réaliser une analyse cinétique. Toutefois, ces résultats bien que différents de ceux obtenus en *cell-attached* en présence de forskoline, indiquent une tendance des canaux des cellules CF à être moins longtemps ouverts que ceux des cellules contrôle. Ceci peut être une conséquence de la mutation $\Delta F508$ qui peut modifier le comportement du canal et/ou sa sensibilité à certains modulateurs.

2.2.2. Activation d'une conductance chlorure en présence de PKA et d'ATP en configuration *whole-cell* :

La configuration *whole-cell* permet d'appréhender la réponse à un stimulus donné, de l'ensemble d'une population de canaux présents dans la membrane d'une cellule. La PKA et l'ATP permettent l'activation, au niveau unitaire, d'un canal chlore d'environ 10 pS, identique dans les deux types de globules rouges considérés. L'étude de cette conductance au niveau global devrait permettre de déterminer si les érythrocytes contrôle et CF réagissent de la même façon à cette stimulation.

Ainsi, des enregistrements, en configuration *whole-cell*, ont été réalisés. La solution de pipette contient lors de ces expériences 100 nM de PKA, 10 mM d'ATP et 100 μ M de théophylline (un inhibiteur de phosphodiésterases). Le moment où le scellement est rompu (passage en *whole-cell*) sera considéré pour toutes les expériences suivantes comme le

A

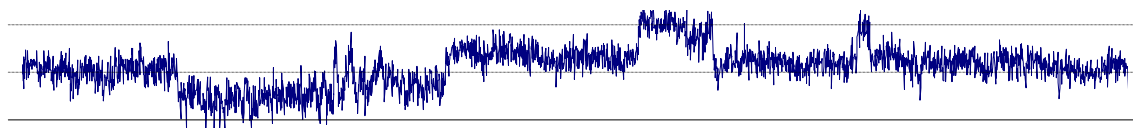


Ajout de NPPB (100 μ M):



1 pA
1000 ms

B



Ajout de glibenclamide (100 μ M):



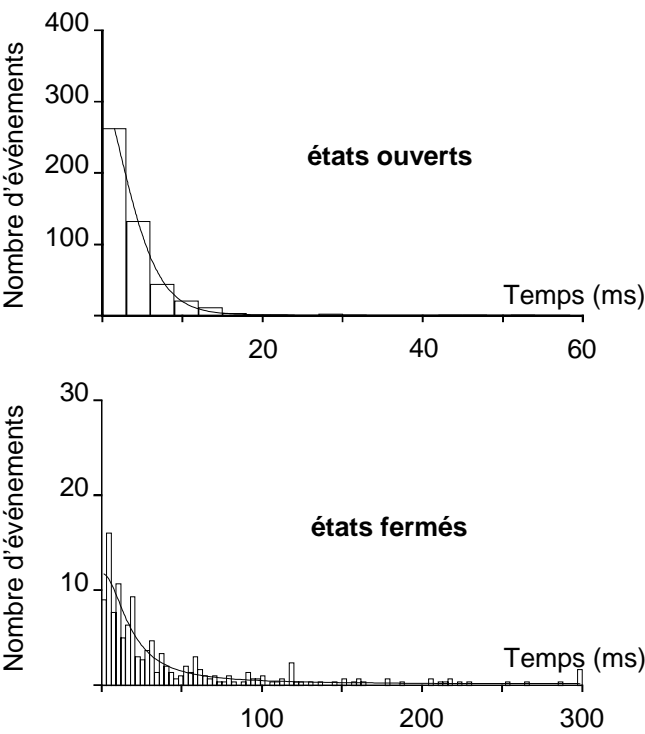
1 pA
1000 ms

Figure 27. : Inhibition, en configuration *inside-out*, de canaux CFTR-like présents dans la membrane de globules rouges CF, préalablement activés par phosphorylation (PKA, ATP et Théophylline) :

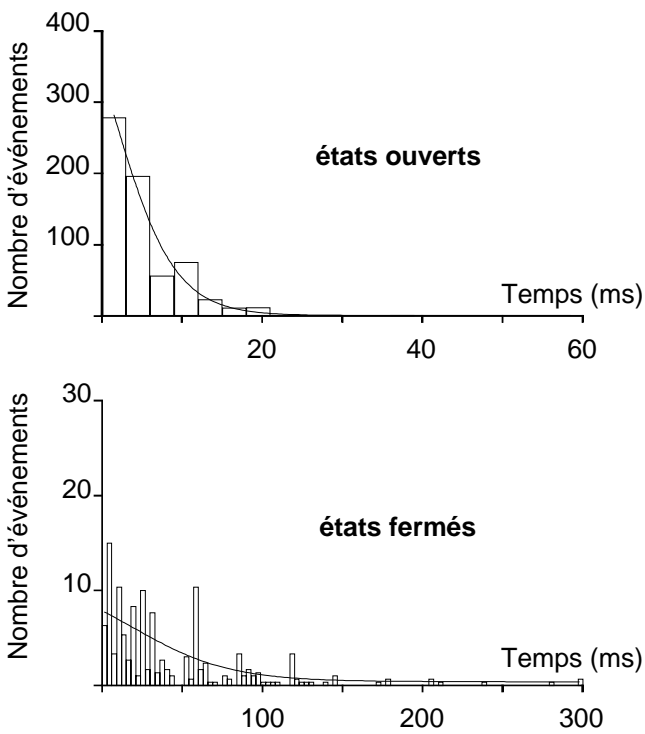
A : Enregistrements caractéristiques pour un potentiel membranaire (V_m) de 80 mV avant et après ajout de NPPB (100 μ M) dans la solution de bain (Ringer NMDG comme solution de pipette et de bain. La ligne continue indique l'état fermé du canal).

B : Enregistrements caractéristiques pour un potentiel membranaire (V_m) de 80 mV avant et après ajout de glibenclamide (100 μ M) dans la solution de bain (Ringer NMDG comme solution de pipette et de bain. La ligne continue indique l'état fermé du canal).

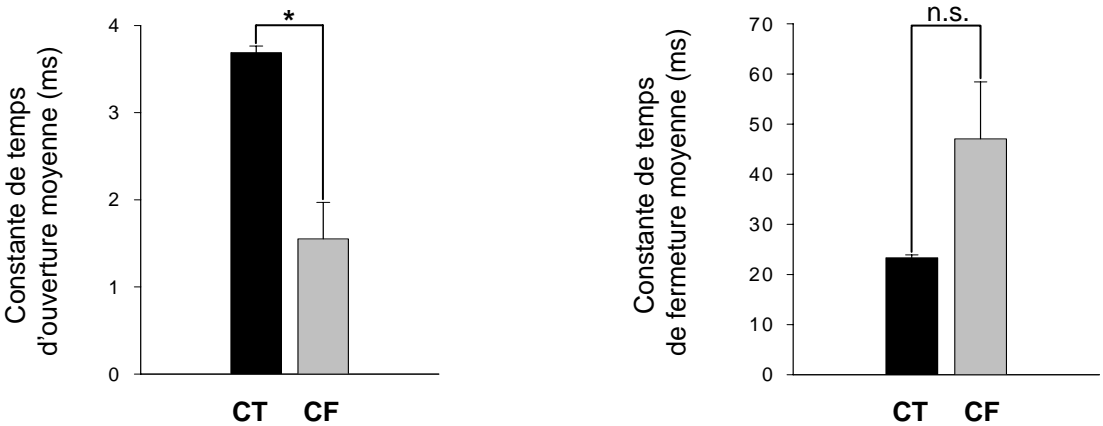
A



B



C



D

	cellules contrôle (CT)	cellules CF	Test t de Student
τ_o	3.69 ± 0.075	1.55 ± 0.42	$P < 0.05$
τ_c	23.35 ± 0.56	47.05 ± 11.39	n.s. ($P = 0.2$)

Figure 28. : Caractérisation en configuration *inside-out*, de la cinétique des canaux CFTR-like présents dans la membrane des érythrocytes contrôle et CF, activés par application de PKA et ATP au niveau de sa face cytosolique :
A-B : Histogrammes caractéristiques des temps de résidence des canaux présents dans la membrane de cellules contrôle (**A**) et CF (**B**), dans chaque état (ouvert ou fermé) pour un potentiel membranaire de 50 mV. (les solutions de bain et de pipette sont constituées de Ringer NMDG).
C : Histogrammes de comparaison des constantes de temps d'ouverture et de fermeture moyennes des canaux en fonction du type cellulaire étudié, (contrôle : n= 2; CF : n=2).
D : Tableau récapitulatif des constantes de temps d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_c). Les valeurs indiquées sont la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) des valeurs obtenues à partir de 2 enregistrements de cellules contrôle et 2 à partir de cellules CF.

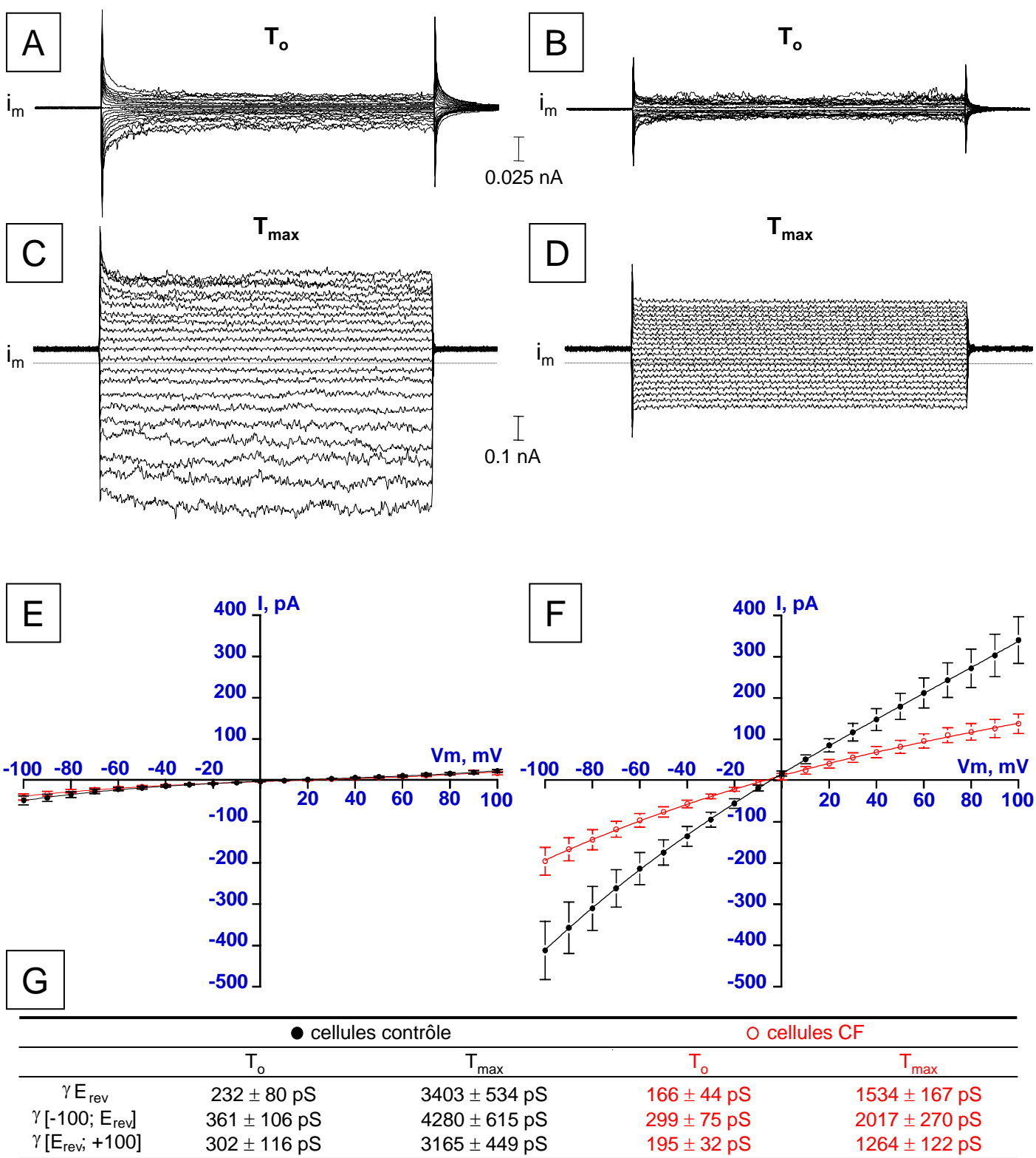


Figure 29. : Activation et évolution au cours du temps, en configuration *whole-cell*, d'une conductance anionique dans la membrane de globules rouges contrôle et CF, en présence de la sous unité catalytique de la PKA (100 nM), d'ATP (10 mM) et de Théophylline (100 μ M) dans la solution de pipette :

A-B : Enregistrements caractéristiques, au début des expériences (T_0), de courants membranaires globaux obtenus à partir de cellules contrôle (**A**) et CF (**B**).

C-D : Enregistrements caractéristiques, à la fin des expériences (T_{max}), de courants membranaires globaux obtenus à partir de cellules contrôle (**C**) et CF (**D**).

E-F : Relations courant-voltage calculées à partir des données obtenues au début (**E**) et à la fin (**F**) des expériences. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) de 10 et 13 (**E**), 9 et 8 (**F**) mesures réalisées, respectivement pour les cellules contrôle et CF au début et à la fin des différentes expériences.

G : Tableau récapitulatif des conductances moyennes calculées à T_0 et T_{max} pour les 2 types cellulaires.

temps initial T_0 . A cet instant, les deux types de globules rouges présentent des courants identiques de très faible amplitude comme le montre les enregistrements caractéristiques de la **figure 29 (A & B)**. La relation courant-voltage résultante présente une légère rectification entrante (**Fig. 29 E**), les cellules contrôle et CF présentent respectivement une conductance aux potentiels négatifs (courants entrants) de 361 ± 106 pS ($n=10$) et 299 ± 75 pS ($n=13$; test t : non significatif), contre 301 ± 116 pS ($n=10$) et 195 ± 32 pS ($n=13$; test t : non significatif) aux potentiels positifs (courants sortants). Au cours du temps, une activation c'est-à-dire une augmentation des courants membranaires globaux est enregistrée. Ces courants se stabilisent ensuite à un maximum, au bout d'un laps de temps variable selon les cellules, compris entre 10 et 20 minutes, nous les appellerons : les valeurs obtenues à T_{max} . Les cellules contrôle présentent des courants de plus grande amplitude que ceux obtenus à partir de cellules CF, comme l'attestent les exemples donnés par les **figures 29 C et D**. Les courbes I/V moyennes (**Fig. 29 F**) correspondantes confirment les rectifications entrantes observées à T_0 , et mettent en évidence que les cellules CF présentent une conductance globale deux fois moindre que celle des cellules contrôle (**Fig. 29 G**), avec respectivement 1534 ± 167 pS ($n=8$) et 3403 ± 534 pS ($n=9$; test t : $P < 0.02$). Ces valeurs de conductances, calculées à T_{max} , divisées par la valeur de la conductance unitaire déterminée au préalable permettent d'estimer le nombre approximatif de canaux actifs présents dans la membrane des érythrocytes. On peut donc estimer que les courants mesurés en *whole-cell* résultent de l'activité de 300 à 350 canaux dans la membrane des cellules contrôle contre environ 150 copies pour les cellules CF.



2.3. Conclusions :

Les érythrocytes humains possèdent dans leur membrane des canaux (silencieux en absence de toute stimulation) présentant une conductance chlorure d'environ 10 pS. Cette conductance est mesurable lors de l'application de forskoline ce qui dénote une activation AMP_c dépendante, certainement liée à des étapes de phosphorylation comme le montre les expériences réalisées aussi bien au niveau unitaire que global en présence de la sous-unité catalytique de la PKA.

Les globules rouges CF présentent une cinétique différente de celle des cellules contrôle, malgré une conductance unitaire identique. Cette différence est probablement une des conséquences de la mutation $\Delta F508$. De même, en *whole-cell*, les cellules CF présentent moins de courants que les témoins ce qui est probablement dû à un nombre réduit de canaux dans leur membrane, comme le confirment les *western-blot*s.

Si la mutation $\Delta F508$ n'affecte que peu le mode d'activation des canaux chlorure présents dans la membrane des érythrocytes de patients souffrants de mucoviscidose, elle entraîne de légères altérations de leur comportement et diminue leur expression au niveau de la membrane plasmique. L'ensemble de ces données tend en faveur d'un canal de type CFTR. Le rôle de ces canaux est d'assurer le bon fonctionnement des fonctions sécrétoires au niveau épithélial, néanmoins leur fonction physiologique au sein de la membrane des hématies reste encore indéterminée.

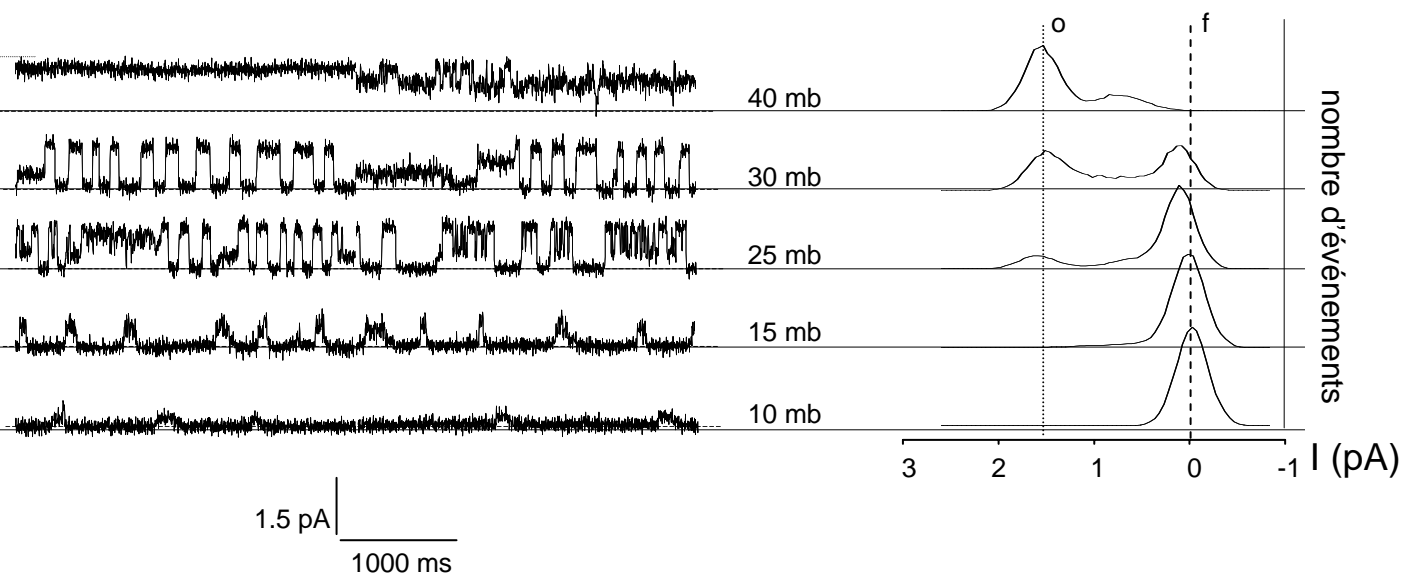
3. Propriétés et rôles physiologiques des canaux CFTR-like dans la membrane des érythrocytes humains :

Les canaux anioniques enregistrés en *patch-clamp* ne sont jamais spontanément actifs, seule une augmentation du taux intracellulaire d'AMP_c ou l'utilisation de PKA permettent de les activer, ils sont présents à l'état quiescents dans la membrane des érythrocytes.

Quelle peut-être la fonction de ces canaux : sont-ils activés au cours des différentes étapes de différenciation cellulaire (Nilius *et al.*, 2000; Valenzuela *et al.*, 2000; Clapham *et al.*, 2001) permettant le passage de l'état de cellules souches du tissu hématopoïétique à celui d'érythrocyte mature ? Interviennent-ils, comme les canaux cationiques (NSC ou Gárdos) dans la sénescence des globules rouges (Romero et Romero, 1999; Lang *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2003) ? Ou, ont-ils une fonction propre à ce dernier stade de différenciation ?

Les globules rouges sont des cellules circulantes, permettant une bonne distribution des gaz respiratoires dans tout l'organisme. Pour remplir à bien cette mission, ils doivent se déformer pour résister aux importantes contraintes mécaniques qui leur sont imposées lors de leur passage dans les capillaires sanguins dont le diamètre interne est inférieur au leur (8 µm). Lorsque des érythrocytes sont soumis à un stress mécanique *in vitro* ils libèrent de l'ATP dans le milieu extracellulaire (Sprague *et al.*, 1998). Toutefois, un tel phénomène est inexistant quand des globules rouges de patients CF sont utilisés (Sprague *et al.*, 1998). De plus, cette libération d'ATP est accrue en présence d'AMP_c ou d'activateurs de l'adenylate cyclase (Sprague *et al.*, 2001). Sprague conclut que ce transport d'ATP nécessite la présence de canaux CFTR. Néanmoins, ces résultats ne permettent pas de savoir si les canaux CFTR transportent directement l'ATP, ou si au contraire ils régulent l'activité d'autres transporteurs membranaires ?

A



B

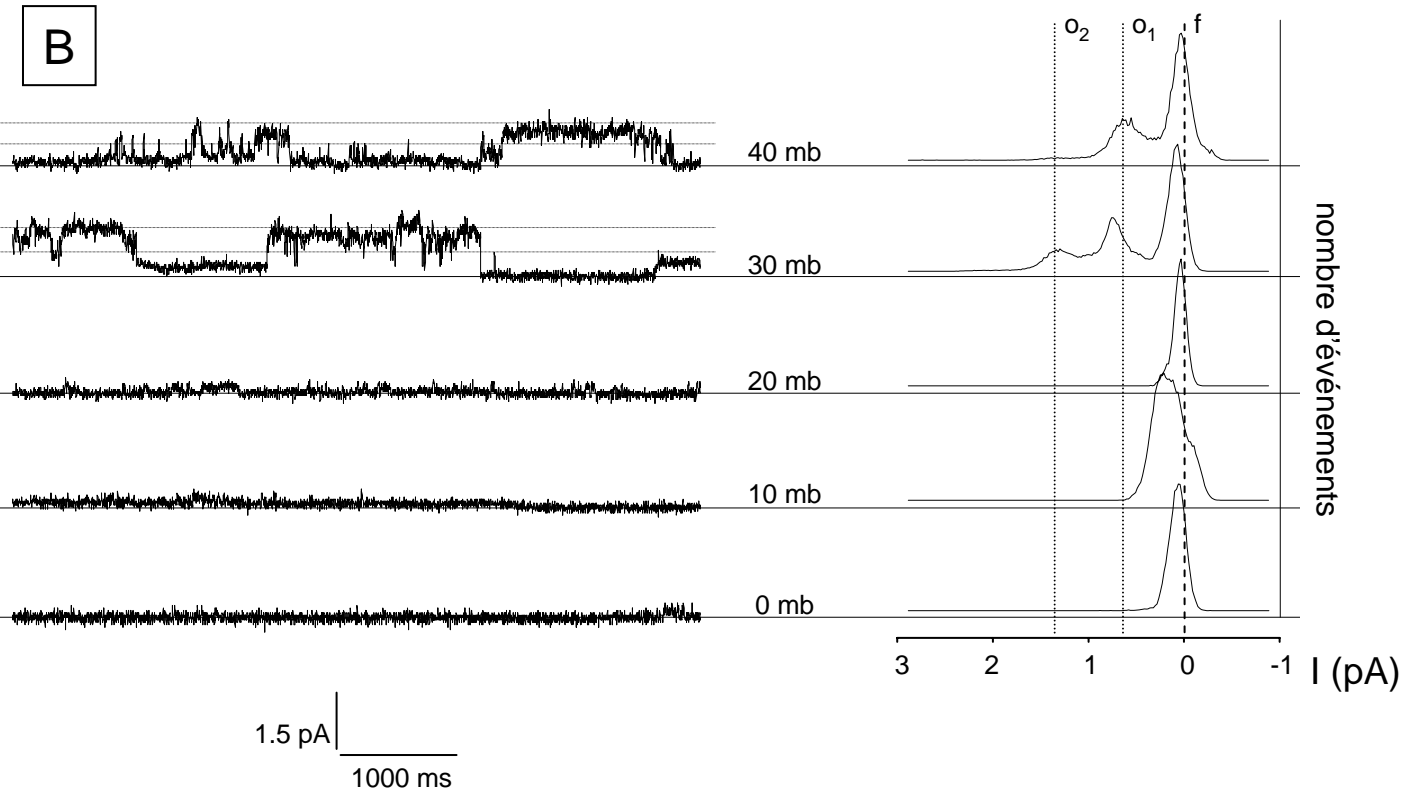


Figure 30. Caractérisation de la mécano-sensibilité en configuration *inside-out* du canal CFTR-like présent dans la membrane d'érythrocytes humains contrôle et CF :

A : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal anionique en fonction des différentes dépressions appliquées lorsque celui-ci est présent à la surface d'une cellule contrôle. Le graphique de droite représente la distribution de l'amplitude des courants pour chaque dépression testée, avec le nombre d'événements détectés en fonction du courant mesuré (I , pA), (o : état ouvert et f : état fermé ; $V_m = 80$ mV).

B : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal en fonction des différentes dépressions appliquées lorsque celui-ci est présent à la surface d'une cellule CF. Le graphique de droite représente la distribution de l'amplitude des courants pour chaque dépression, avec le nombre d'événements détectés en fonction du courant mesuré (I , pA), (o : état ouvert et f : état fermé ; $V_m = 80$ mV).



3.1. La mécano-sensibilité des canaux CFTR-like :

En préambule nous avons expliqué qu'il était possible d'activer ce canal, dans la membrane de cellules contrôle, en appliquant des dépressions calibrées à l'intérieur de la pipette de *patch*. Afin de mieux caractériser la dépendance de l'activation des canaux chlorure, à la déformation membranaire, un protocole de dépression calibrée (de 0 à -40 mbar) dans la pipette de *patch* a été suivi afin de comparer le comportement des canaux des cellules contrôle et CF. Pour chaque dépression testée, un enregistrement ainsi qu'un histogramme de distribution de l'amplitude des courants ont été réalisés. L'effet de la *stretch-activation* a été testé sur différentes cellules, en *inside-out*, à un potentiel de membrane de +80 mV. Bien que les canaux des cellules de patients CF soient capables de réagir à une déformation membranaire, la sensibilité de ces derniers reste moindre (**Fig. 30 A & B**). En effet, pour des dépressions comprises entre 10 et 25 mbar, les globules rouges contrôle présentent de brèves ouvertures (faible P_o) entrecoupées de périodes de fermeture plus longues, constituées par des sous-états d'ouverture du canal. Par contre, lorsque des dépressions supérieures à 25 mbar sont appliquées, les courants atteignent leur maximum d'amplitude et la cinétique du canal change radicalement, en passant de plus en plus de temps à l'état ouvert (à -40 mbar, le canal est ouvert la plupart du temps, $P_o > 0.9$) comme l'atteste la répartition des évènements sur les histogrammes correspondants (**Fig. 30 A**). En revanche, les cellules CF présentent une mécano-sensibilité différente. Pour des dépressions inférieures ou égales à 20 mbar de rares évènements constitués de sous-états sont observés. Ce n'est qu'au-delà de 20 mbar que les ouvertures atteignent leur amplitude complète. Toutefois, la probabilité d'ouverture reste inférieure à celle observée avec les cellules contrôles. Ainsi, pour des dépressions de 30 à 40 mbar, la probabilité d'ouverture ne dépasse jamais 0.25 comme le prouve la répartition des évènements sur l'histogramme correspondant (**Fig. 30 B**).

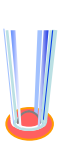
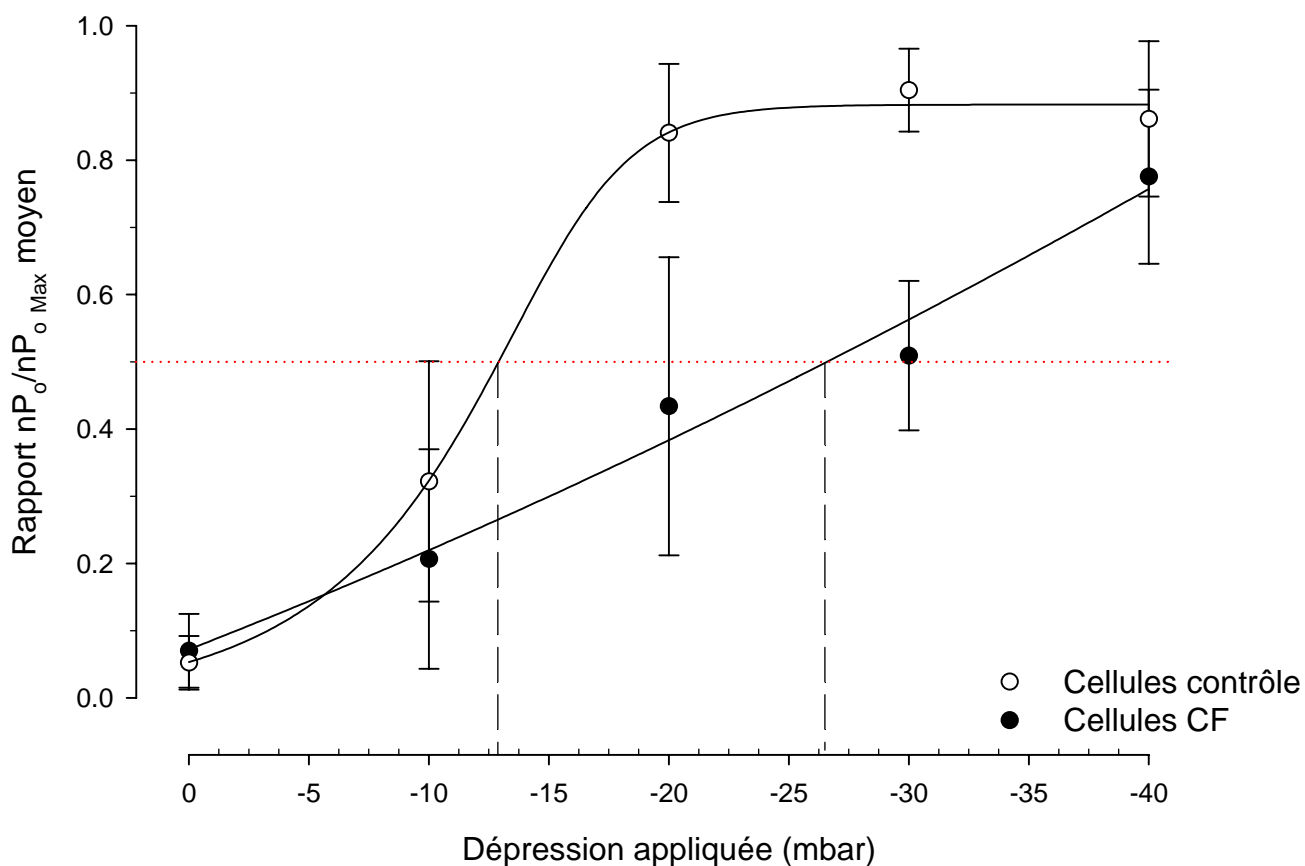


Figure 31. : Comparaison, en configuration excisée, de la mécano-sensibilité du canal CFTR-*like* présent dans la membrane de globules rouges contrôle et CF :

L'effet de la dépression sur la probabilité d'ouverture (P_o) du canal est déterminé par l'évolution du rapport ($NP_o/NP_{o\ Max}$) moyenné à partir de 27 mesures pour les cellules contrôle et 26 pour les cellules CF (le potentiel membranaire est fixé à 80 mV, ajustement sigmoïdal).

Afin de confronter ces observations, la probabilité d'ouverture (NP_o)¹⁷ de chaque enregistrement a été calculée à partir des histogrammes d'amplitude des courants obtenus par détection de transitions, pour les différentes pressions testées. Ces données sont ensuite normalisées en calculant les rapports NP_o/NP_{o_Max} ¹⁸ en fonction de la pression imposée. Ces rapports sont ensuite moyennés sur l'ensemble des cellules testées, avant d'être reportés graphiquement (ajustement sigmoïdal) en fonction de la pression exercée dans la pipette de *patch* (**Fig. 31**). Les courbes obtenues présentent des profils différents. Si l'ajustement obtenu à partir des cellules contrôle présente une forme sigmoïdale, ce n'est pas le cas de celui obtenu avec les données des cellules CF : ce dernier ressemble davantage à une relation linéaire. De plus, on notera que la valeur de P_{50} (valeur de la pression pour laquelle on obtient 50% de l'activité maximal) diffère en fonction du type cellulaire, avec : 13 mbar pour les globules rouges contrôle contre 26.5 mbar pour les érythrocytes CF. Ceci confirme donc le fait que ces deux types de cellules présentent des canaux mécano-sensibles mais à des degrés différents : les cellules contrôle sont deux fois plus sensibles à la déformation que les cellules CF.

3.2. Le transport d'ATP :

Les canaux CFTR sont au cœur d'une polémique, en effet depuis plusieurs années certains auteurs supposent qu'ils sont capables de transporter de l'ATP, tandis que d'autres réfutent cette hypothèse et considèrent que les CFTR n'interviennent dans ce transport uniquement en tant que régulateurs de l'activité d'autres transporteurs membranaires (Devidas et Guggino, 1997). Sprague a récemment montré que les érythrocytes de patients

¹⁷ On utilise le terme NP_o quand plusieurs copies d'un canal sont présentes simultanément sous la pipette de *patch*.

¹⁸ NP_{o_Max} étant la plus forte probabilité d'ouverture obtenue pour les différentes pressions testées de 0 à -40 mbar.

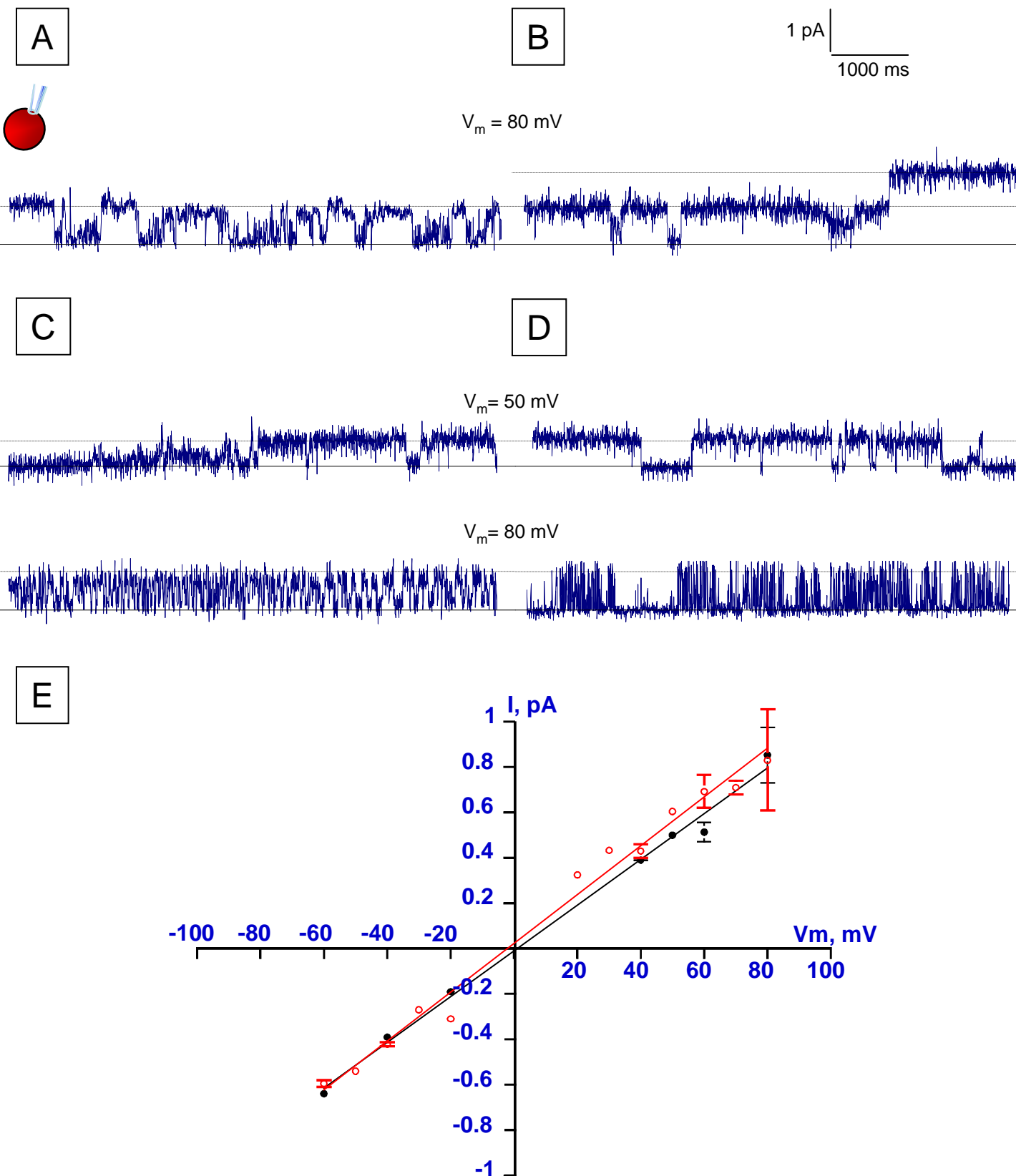


Figure 32. : Rôle physiologique du canal : le transport d'ATP :

A-B : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal, obtenus en configuration *cell-attached*, pour un potentiel membranaire ($-V_p$) de 80mV à partir de cellules contrôle (**A**) et CF (**B**). (La ligne continue indique l'état fermé du canal ; ATP tris 100 mM dans la pipette et Ringer NaCl dans le bain).

C-D : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal, obtenus en configuration *inside-out*, pour différents potentiels de membrane ($-V_p$) à partir de cellules contrôle (**C**) et CF (**D**). (La ligne continue indique l'état fermé du canal ; ATP tris 100 mM dans la solution de pipette et dans le bain).

E : Relation courant-voltage correspondante aux figures **C** et **D**. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) de 18 et 19 mesures réalisées respectivement à partir de cellules contrôle et CF.

CF ne peuvent pas, sous certaines conditions, libérer d'ATP (Sprague *et al.*, 1998), ce qui indique que ce processus nécessite la présence de canaux CFTR.

Afin d'établir si le canal que nous observons est capable de transporter de l'ATP, les cellules ont été incubées entre 15 et 30 minutes en présence de 50 μ M de forskoline. La configuration *cell-attached* a été utilisée dans un premier temps, pour un potentiel de membrane de +80 mV, en présence d'ATP (100 mM) dans la pipette et de Ringer NaCl dans le bain. Spontanément, dans la plupart des cas, un canal actif était présent sous la pipette de *patch*, il était possible d'enregistrer son activité et ce quelque soit le type cellulaire considéré (**Fig. 32 A & B**). Cependant, cette configuration expérimentale ne permet pas de déterminer si le canal est à même de transporter de l'ATP. Seule l'utilisation de solutions de bain et de pipette identiques en *inside-out* permet d'éprouver cette hypothèse. En configuration excisée, en condition symétrique d'ATP (100 mM), une activité en tout point similaire à celle obtenue en *cell-attached* a pu être mesurée pour les cellules contrôle mais aussi pour les cellules CF, et ce quelque soit le voltage imposé (**Fig. 32 C & D**). Dans les deux cas, une relation courant-voltage linéaire présentant une conductance d'environ 10 pS (respectivement 8.9 pS et 12.4 pS pour les hématies contrôle et CF) a pu être tracée (**Fig. 32 E**) pour des voltages compris entre -60 mV et +80 mV (les *seals* ne résistent pas au-delà de ces valeurs). Etant donné que le seul ion présent de part et d'autre du canal est l'ATP, les courants générés ne peuvent résulter que de son passage à l'intérieur du canal.

3.3. Conclusions :

La mécano-sensibilité des canaux vient s'ajouter aux voies d'activation précédemment décrites. Cette propriété du canal permet à la cellule lorsqu'elle subit des contraintes physiques entraînant une déformation de sa membrane, comme lors de son passage au travers de capillaires sanguins, de libérer de l'ATP dans le plasma. Deux théories expliquent l'intérêt de ce transport d'ATP. Selon la première, développée par

Sprague (Sprague *et al.*, 1998), une fois libéré l'ATP peut se fixer aux récepteurs purinergiques des cellules endothéliales bordant la face interne des capillaires, entraînant ainsi la synthèse et la libération de facteurs vasodilatateurs dans la circulation sanguine dans le but de maintenir une bonne résistance vasculaire (*i.e.* de contrôler la bonne « dilatation » du système veineux). Le concept développé par Abraham (Abraham *et al.*, 2001), diffère quelque peu de celui de Sprague. En effet, il considère l'érythrocyte comme un véhicule permettant de fournir de l'adénosine aux différentes cellules épithéliales de l'organisme. Il suppose qu'une fois l'ATP présent dans la circulation, il est hydrolysé sous forme d'ADP puis d'AMP sous l'action d'apyrases. Ensuite, interviennent les nucléotidases pour transformer l'AMP en adénosine. Dès lors, cette dernière peut être absorbée au niveau de la face basolatérale de cellules épithéliales dotées d'un transporteur à adénosine. Abraham suppose que les globules rouges participent ainsi au maintien des purines à des concentrations adéquates au niveau épithélial.

Dans le cas de la malaria, les travaux de Kirk (1994) et de Desai (2000), mettent en évidence comme nous l'avons vu en introduction, que l'accroissement de perméabilité membranaire observé dans les cellules infectées par *Plasmodium falciparum* résulte de l'activité d'un transporteur présentant les caractéristiques fonctionnelles d'un canal anionique. Si ce canal est endogène, c'est-à-dire qu'il est propre à l'érythrocyte, peut-être correspond-il à l'un des deux types de canaux chlorure que nous avons identifié.

4. Canaux CFTR-like et nouvelles voies de perméabilité dans la membrane de globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum* :

Afin de vérifier si le canal dont nous mesurons l'activité est bien un canal de type CFTR et/ou s'il participe à l'apport de substrats dans le cas d'une infection plasmodiale, des érythrocytes CF ont été maintenus en culture *in vitro* en présence de parasites. De façon surprenante, le taux de croissance de ces derniers est comparable à celui obtenus lorsqu'ils

A

 $V_m = +100 \text{ mV}$

- 20 mV

+ 80 mV

- 40 mV

+ 40 mV

- 80 mV

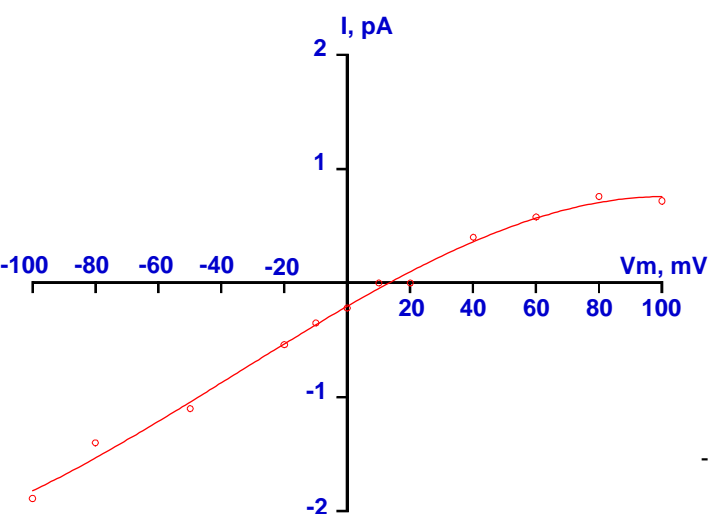
+ 20 mV

- 100 mV

2 pA
1000 ms

0 mV

B



C

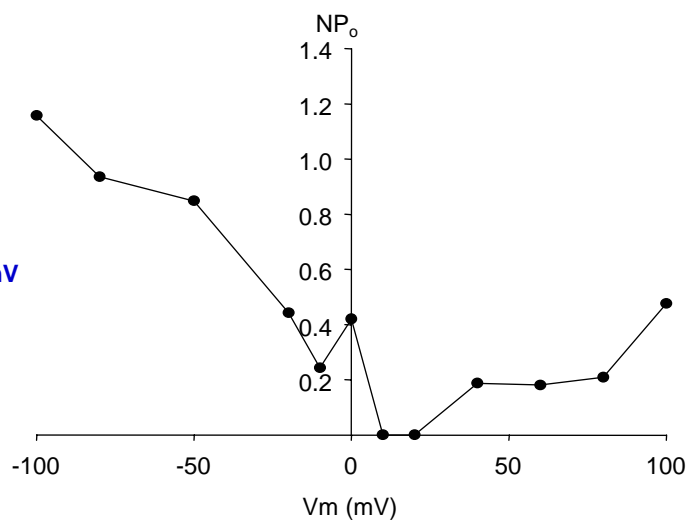


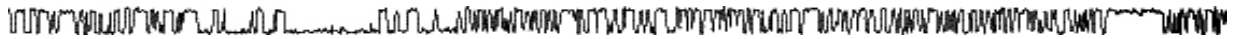
Figure 33. : Caractérisation des courants anioniques spontanément enregistrés en configuration *cell-attached* dans la membrane d'une cellule CF infectée par *Plasmodium falciparum* :

A : Enregistrements caractéristiques de l'activité de 2 canaux pour différents potentiels membranaires (V_m). (La ligne continue indique l'état fermé du canal ; Ringer NaCl dans le bain et Ringer NMDG dans la pipette).

B : Relation courant-voltage correspondante aux enregistrements présentés en A.

C : Evolution de la probabilité d'ouverture (NP_o) pour chaque valeur du potentiel de membrane testée.

Résultats



sont cultivés en présence de globules rouges contrôle. Ces cellules ont été utilisées en *patch-clamp* lorsque le stade trophozoïte était atteint.

4.1. Recherche d'une nouvelle voie de perméabilité dans la membrane des érythrocytes CF infectés par *Plasmodium falciparum* :

En configuration *cell-attached*, contrairement aux cellules non infectées (contrôle ou CF), les cellules parasitées présentent une activité canalaire spontanée en présence de Ringer NaCl dans le bain et de NMDG dans la pipette¹⁹ pour l'ensemble des voltages imposés de -100 à +100 mV, comme le montre la **figure 33 A**, où deux copies du même canal sont actives. Ces canaux présentent un potentiel d'inversion égal à 14 mV (E_{rev}), ainsi qu'une légère rectification entrante, la conductance calculée entre -100 mV et E_{rev} atteint 16.4 pS contre 9.3 pS entre E_{rev} et +100 mV (**Fig. 33 B**). Enfin, la probabilité d'ouverture semble être dépendante du voltage (*gating* voltage-dépendant), elle est plus importante aux valeurs de potentiel de membrane négatif (**Fig. 33 C**).

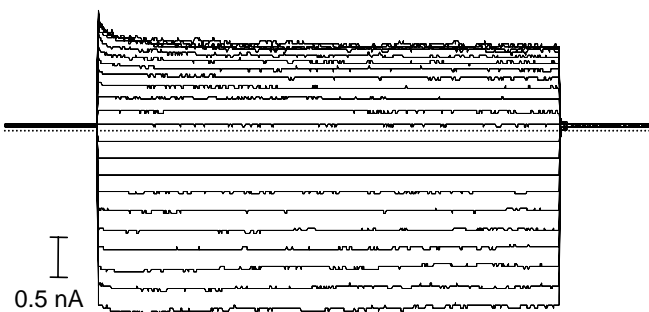
Ces caractéristiques électrophysiologiques sont très semblables à celles observées précédemment sur les cellules contrôle infectées. Pourtant, en est-il de même au niveau global ?

4.2. Comparaison des conductances membranaires globales de cellules contrôle et CF infectées en configuration *whole-cell* :

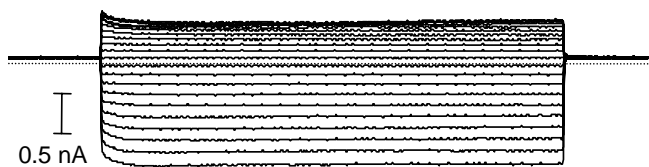
Spontanément, les cellules CF infectées présentent tout comme les cellules contrôle, une conductance membranaire importante comparée à celle des cellules non infectées (**Fig. 34 A & B**). Cependant, les courants membranaires enregistrés sur les cellules CF

¹⁹ L'utilisation de Ringer NaCl ou de Ringer NMDG à la fois dans le bain et la pipette ne change en rien ces observations.

A



B



C

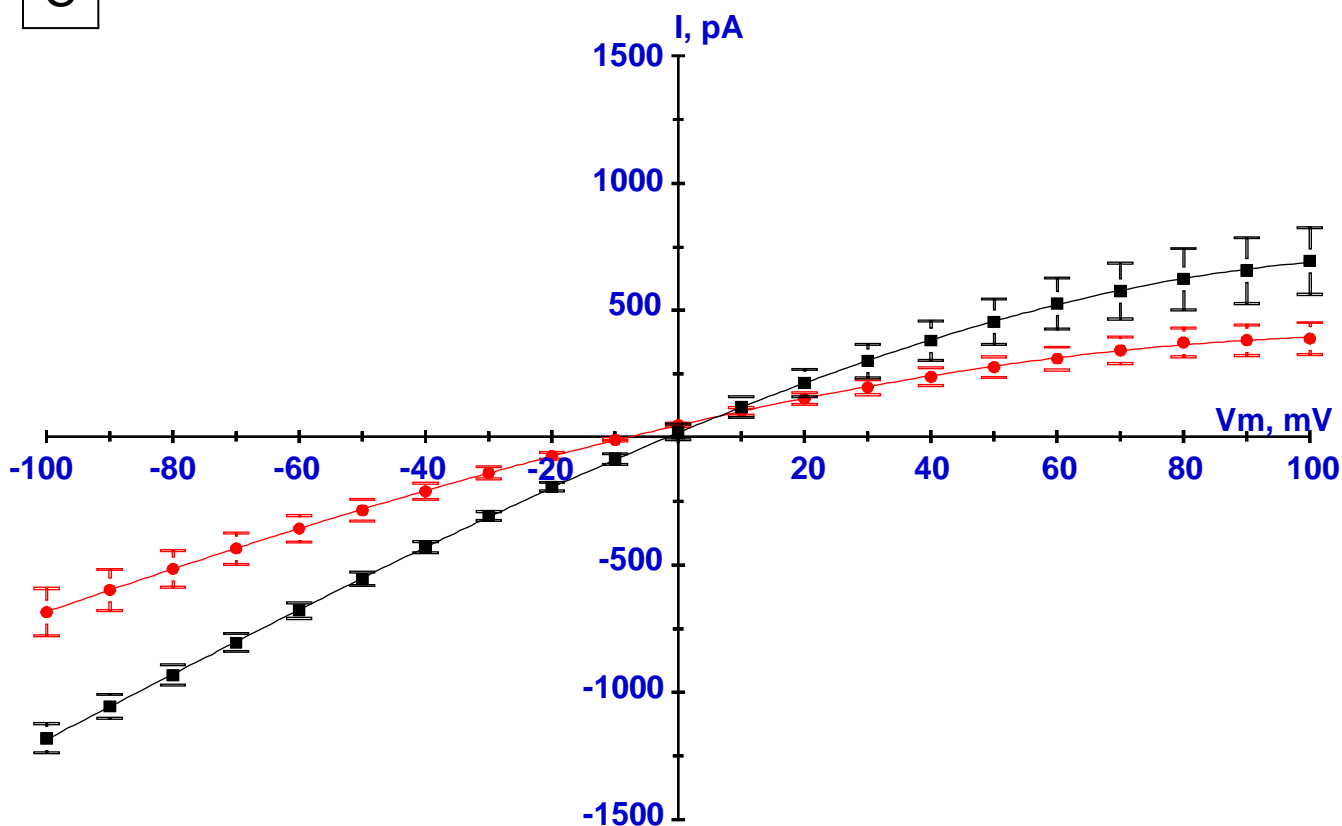


Figure 34. : Caractérisation, en configuration *whole-cell*, des courants membranaires anioniques de globules rouges contrôle et CF infectés par *Plasmodium falciparum* :

A : Enregistrement caractéristique d'une conductance membranaire rectifiée entrante obtenue à partir d'une cellule contrôle infectée par *Plasmodium falciparum* (Ringer NMDG et Ringer NaCl, respectivement, comme solution de pipette et de bain).

B : Enregistrement caractéristique d'une conductance membranaire rectifiée entrante obtenue à partir d'une cellule CF infectée par *Plasmodium falciparum* (Ringer NMDG et Ringer NaCl, respectivement, comme solution de pipette et de bain).

C : Relation courant-voltage correspondante. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) de 12 et 31 mesures réalisées, respectivement pour les cellules contrôle et CF infectées.

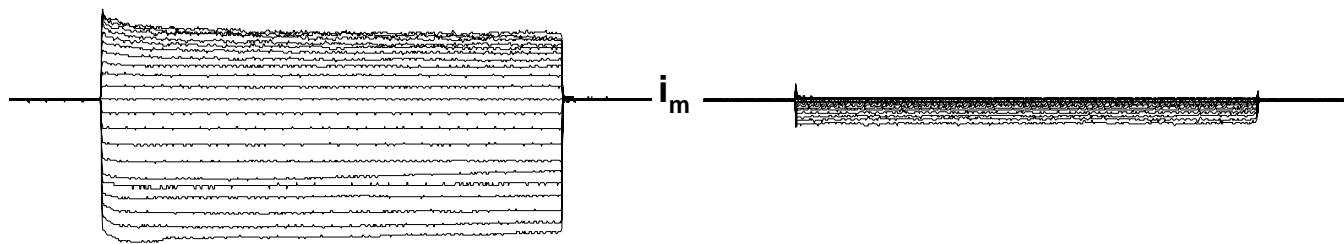
Résultats

infectées sont moins importants que ceux mesurés sur des cellules contrôle infectées, comme le prouvent les courbes I/V moyennes au profil rectifié entrant qui en résultent (**Fig. 34 C**). Ainsi, les valeurs de conductance sont de 12115 ± 608 pS ($n=12$) et 6905 ± 1240 pS ($n=31$; test t: $P<0.001$) aux potentiels membranaires négatifs contre 6434 ± 1088 pS ($n=12$) et 2978 ± 533 pS ($n=31$; test t: $P<0.005$) aux potentiels positifs, respectivement pour les érythrocytes contrôle et CF. La conductance membranaire globale moyenne calculée pour les cellules CF ($\gamma E_{rev} = 5600$ pS) équivaut à 55% de celle des cellules contrôle ($\gamma E_{rev} = 10300$ pS) et est 3.6 fois plus grande que celle enregistrée sur les cellules CF non infectées lorsque l'activation par PKA et ATP atteint son maximum (à $T_{max} : \gamma E_{rev} \approx 1550$ pS). Le NPPB (100 μ M), la glibenclamide (100 μ M) et l'acide flufénamique (100 μ M), trois inhibiteurs connus de canaux chlore et du NPP, ont été testés sur les cellules CF infectées (**Fig. 35 B, C & D**). Ils se sont révélés particulièrement efficaces, agissant la plupart du temps immédiatement dès leur ajout à la solution de bain. A l'opposé, le furosémide (200 μ M), un bon inhibiteur du NPP (Kirk *et al.*, 1994), qui bien qu'étant tout aussi efficace (**Fig. 35 A**), nécessite une durée d'application supérieure à 10 minutes. Ce profil pharmacologique correspond à celui observé au préalable sur les cellules contrôle infectées.

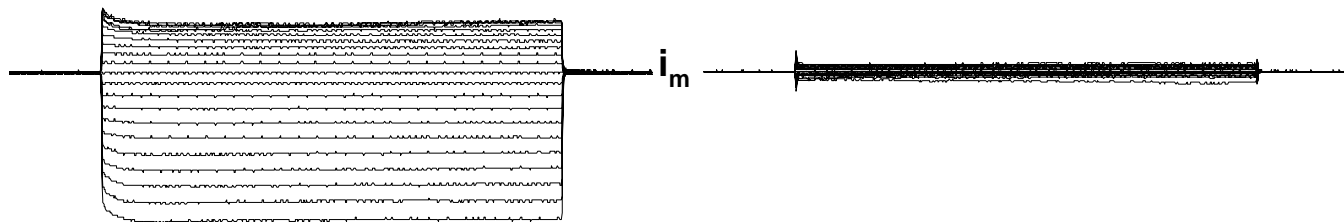
4.3. Conclusions :

Il semble que le nombre réduit de canaux présents dans la membrane des globules rouges de patients atteints de mucoviscidose ne soit pas un facteur limitant la croissance de *Plasmodium falciparum*. De plus, l'étude unitaire de ces cellules lorsqu'elles sont infectées révèle une activité canalaire similaire à celle des cellules contrôle parasitées. Cependant, les courants membranaires globaux enregistrés sur les deux types cellulaires présentent une différence de 50%. Ce même schéma a été observé en présence de PKA et d'ATP dans la

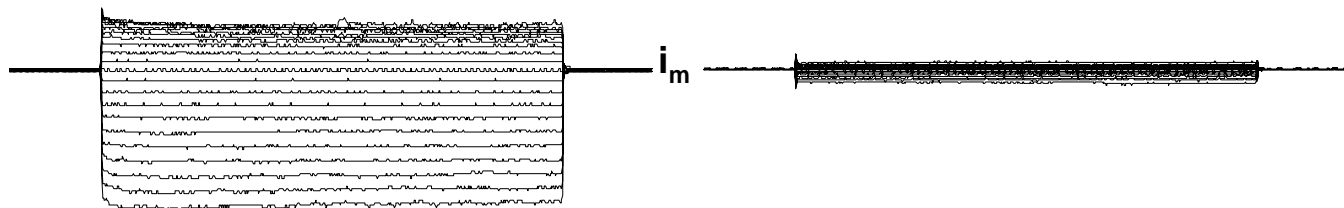
A

+ glibenclamide (100 μ M)

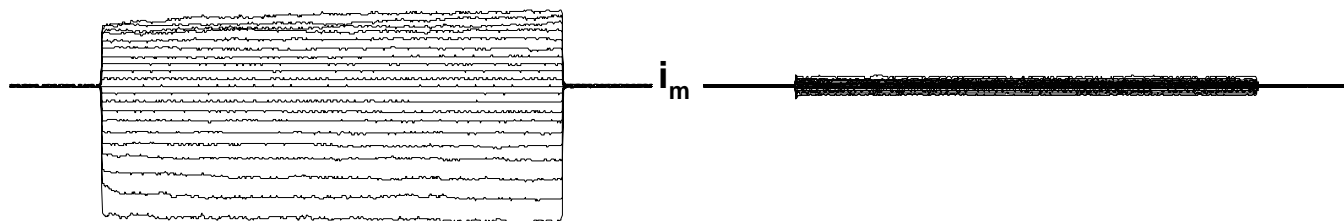
B

+ NPPB (100 μ M)

C

+ acide flufénamique (100 μ M)

D

+ furosémide (200 μ M)

0.5 nA

Figure 35. : Inhibition de la conductance membranaire globale de cellules CF infectées par *Plasmodium falciparum* :

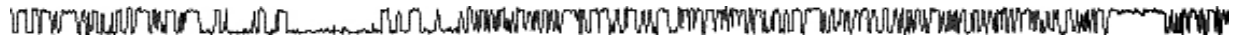
A-B-C-D : Enregistrements caractéristiques des courants membranaires anioniques avant (à gauche) et après perfusion (à droite) de substances inhibitrices : glibenclamide (100 μ M), NPPB (100 μ M), acide flufénamique (100 μ M) et furosémide (200 μ M), correspondant respectivement à **A**, **B**, **C** et **D** (Ringer NMDG dans la pipette et Ringer NaCl comme milieu extracellulaire).

Résultats

pipette, sur des cellules exemptes de tout parasite. *Plasmodium falciparum* utilise donc ce même canal endogène activé par des protéines kinases afin d'en potentialiser l'activité, le convertissant ainsi en une nouvelle voie de perméabilité indispensable à son bon développement.

Chapitre II:

Malaria, érythrocytes, canaux ioniques et kinases



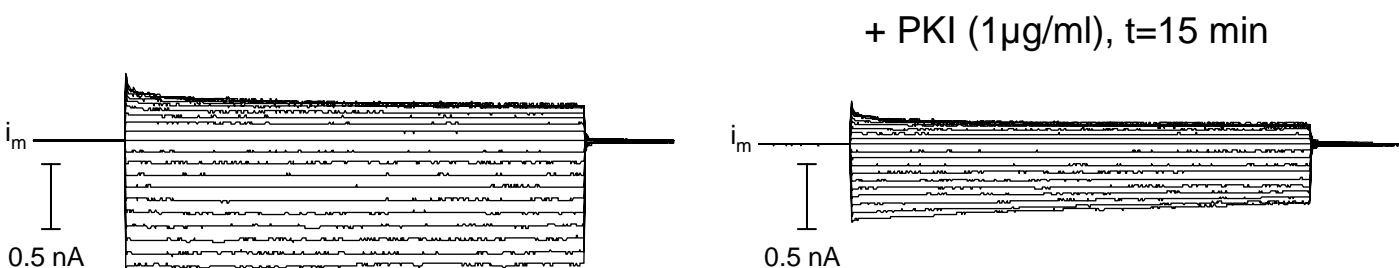
Chapitre II :
Malaria, érythrocytes, canaux ioniques et kinases :

Article I : « Anionic channels in malaria-infected human red blood cells »

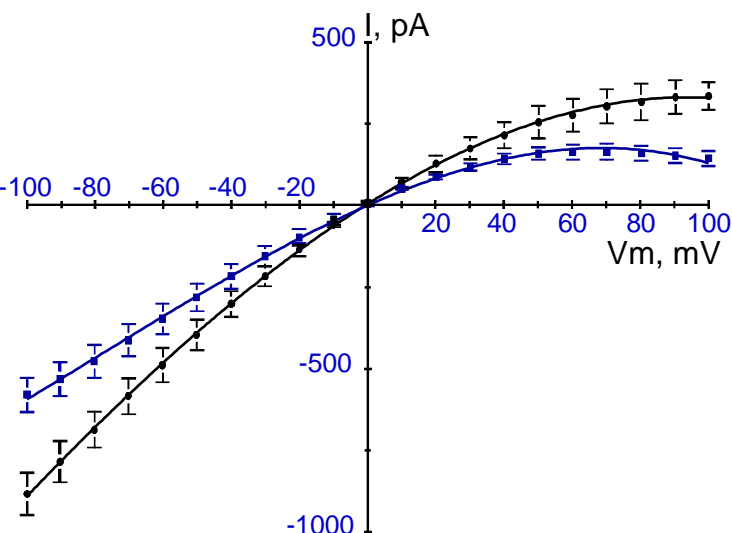
Plasmodium falciparum utilise les globules rouges pour échapper au système immunitaire de son hôte mais également afin de se développer, croître et se multiplier. Au cours des 48 heures de son développement intraérythrocytaire il développe une forte activité métabolique principalement liée à la synthèse d'ADN et de nouvelles protéines ainsi qu'à la mise en place de différentes structures membranaires. Cependant, comme bon nombre d'Apicomplexes, *Plasmodium falciparum* est incapable de synthétiser certains composés indispensables à sa croissance, il les acquiert donc soit par digestion de l'hémoglobine présente dans le cytoplasme de la cellule hôte, soit en les absorbant depuis le milieu extérieur. Si la forte demande métabolique de *Plasmodium*, en particulier au stade trophozoïte, implique d'importants flux de nutriments, elle induit également la production en grande quantité de déchets tels que le lactate et le pyruvate. Face à une telle sollicitation, certains transporteurs membranaires de la cellule hôte se révèlent trop lents pour subvenir aux besoins du parasite. Ainsi, une nouvelle voie de perméabilité membranaire, induite par le parasite, apparaît, lui permettant ainsi de suppléer aux limitations des transporteurs membranaires du globule rouge.

Cette nouvelle voie de perméabilité a été identifiée pour la première fois par des méthodes de flux isotopiques et de lyse isosmotique (Cabantchik, 1990; Kirk, 2001). Ces études ont permis de montrer que le NPP est à la fois perméable aux anions, mais aussi aux cations et à certains solutés électroneutres (**Fig. 8**, Kirk *et al.*, 1994), et qu'il présente de fortes homologues avec les canaux ioniques (Kirk *et al.*, 1992b; Kirk *et al.*, 1993; Kirk *et al.*,

A



B



C

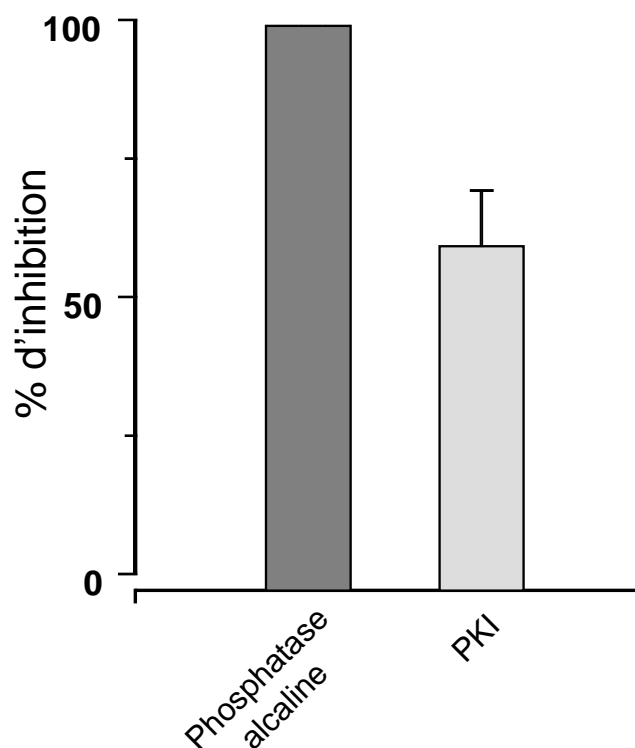


Figure 36. : Effet des inhibiteurs des processus de phosphorylation testés en configuration *whole-cell* sur les courants membranaires induits par *Plasmodium falciparum*, sur des cellules contrôle :

A : Enregistrements caractéristiques des courants membranaires anioniques d'une cellule contrôle infectée par *Plasmodium falciparum*, lorsqu'un inhibiteur spécifique de la PKA est présent dans la solution de pipette : PKI (1 $\mu\text{g/ml}$; Ringer NMDG et Ringer NaCl comme solution de pipette et de bain).

B : Relations courant-voltage correspondantes. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) de 6 mesures réalisées avant (en noir) et après (en bleu) que l'inhibiteur ait agit.

C : Histogramme de comparaison de l'efficacité de deux inhibiteurs des processus de phosphorylation sur la conductance membranaire globale de cellules contrôle infectées : la phosphatase alcaline (0.1 unité/ml ; $n=6$), et le PKI (1 $\mu\text{g/ml}$; $n=6$), un inhibiteur spécifique de la PKA.

1994; Kirk, 2000). Cette hypothèse s'est vue confirmée par plusieurs études électrophysiologiques (Desai *et al.*, 2000; Egee *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2002c).

Dans l'introduction ainsi que dans le chapitre précédent nous avons établi qu'il existe deux canaux anioniques quiescents présents dans la membrane des érythrocytes. Le premier, rarement observé, s'apparente à un canal ORCC. Bien que ce canal n'ait jamais été observé lors de nos expériences sur des cellules infectées (quelque soit la configuration utilisée), nous ne pouvons toutefois pas écarter l'hypothèse que ce canal serait responsable de la conductance rectifiée sortante observée par Huber *et al.*, (2002). Cependant, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, il semble plus probable que cette conductance soit un « artefact » lié aux conditions expérimentales que le groupe de Tübingen utilise en *whole-cell*. Le second canal, présente une conductance unitaire linéaire de 12 pS en présence de PKA_c et d'ATP, ainsi que de fortes analogies avec celui spontanément actif dans la membrane des cellules infectées. Ici, nous apportons de nouvelles informations concernant son mode de fonctionnement et plus particulièrement sur les mécanismes de contrôle mis en oeuvre par le parasite.

Nous avons vu que l'application de PKA_c et d'ATP au niveau de la face cytosolique de la membrane d'un érythrocyte non infecté entraîne l'activation d'une conductance chlore. Il semble donc que des étapes de phosphorylation soient indispensables à la régulation de son activité. Cette conductance globale (*whole-cell*) bien que similaire à celle observée sur une cellule parasitée est de moindre amplitude. Or, *Plasmodium falciparum* est capable de produire sa propre Protéine Kinase A (*PfPKA*), constituée comme celle de mammifère d'un hétéromultimère de la sous-unité catalytique (*access number AAG01351*) et de la sous-unité régulatrice (*access number CAD29699*). Cette protéine est exprimée au cours du développement intraérythrocytaire du parasite (Syin *et al.*, 2001), au même titre que d'autres kinases, (Kappes *et al.*, 1999). La plupart sont indispensables à son développement, ainsi certaines seront exportées vers le cytoplasme et la membrane plasmique de la cellule hôte (Chishti *et al.*, 1994; Kappes *et al.*, 1999; Droucheau *et al.*, 2004).

Afin de vérifier si l'augmentation de conductance membranaire est liée à des processus de phosphorylation, nous avons testé, en configuration *whole-cell*, l'effet de deux antagonistes de ces processus : la phosphatase alcaline qui permet une déphosphorylation massive et aspécifique de tous les substrats intracellulaires et, l'inhibiteur naturel de la protéine kinase A de mammifère appelé PKI (*Protein Kinase Inhibitor*, SIGMA). Ainsi, l'utilisation de la phosphatase (0.1 unité par ml) dans la pipette de *patch*, entraîne une abolition complète des courants membranaires (**Fig. 36 C**). En effet, dans ce cas, ils sont similaires à ceux mesurés sur une cellule non infectée en absence de stimulation. Si la première substance testée s'est révélée particulièrement efficace (l'inhibition des courants est totale), en revanche le PKI induit une inhibition moins prononcée (60%) et dépendante du temps (**Fig. 36 A, B & C**). Ainsi, l'effet maximum est observé après une durée d'incubation de l'ordre de quinze minutes. Toutefois, il convient de remarquer que les courants restants (40%) sont probablement dus au fait que le PKI n'interagit pas avec les kinases d'origine plasmodiale (ou modifiées par le parasite)²⁰, ou encore que des éléments (phosphorylés car inhibés par la phosphatase) autres que la PKA_c interviennent en tant que modulateurs du canal.

Il apparaît donc que des étapes de phosphorylation sont indispensables au fonctionnement du canal chlorure quiescent dans la membrane des globules rouges, et ce sont ces mécanismes qui sont utilisés par le parasite pour en sur-activer ou en déréguler le fonctionnement à son avantage. Cependant, ces mécanismes sont complexes et l'implication de kinases plasmodiales, telle que la *Pf*PKA_c, doit encore être identifiée.

²⁰ En effet, il semblerait que le PKI ne soit pas en mesure d'inhiber la *Pf*PKA_c *in vitro* ou du moins uniquement dans des proportions assez faibles, (Anaïs Merckx et Christian Doerig, communication personnelle).

Available online at www.sciencedirect.com

Blood Cells, Molecules, and Diseases xx (2004) xxx–xxx

BLOOD CELLS,
MOLECULES,
&
DISEASESwww.elsevier.com/locate/ybcm

Anionic channels in malaria-infected human red blood cells

Gaëtan Decherf,^a Stéphane Egée,^a Henry M. Staines,^b J. Clive Ellory,^b and Serge L. Thomas^{a,*}^aCNRS, FRE 2775, Station Biologique de Roscoff, Roscoff Cédex FR-29682, France^bUniversity Laboratory of Physiology, Oxford OX1 3PT, United Kingdom

Submitted 22 January 2004

(Communicated by J. Hoffman, Ph.D., 22 January 2004)

Abstract

As the intraerythrocytic stage of the human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, matures, the plasma membrane of the host red blood cell (RBC) becomes increasingly permeable to a variety of physiologically relevant solutes via the induction of new permeation pathways (NPPs) (H. Ginsburg, *Novartis Foundation Symposium* 226, 99–108, 1999; K. Kirk, *Physiol. Rev.* 81, 495–537, 2001). Although permeable to cationic and electroneutral solutes, transport studies have shown that the NPPs exhibit the general properties of anion channels and recent electrophysiological studies, using the patch-clamp technique, have demonstrated that anion channels are activated in the plasma membrane of the RBC following infection (S.A. Desai et al., *Nature* 406, 1001–1005, 2000; S.M. Huber et al., *EMBO J.* 21, 22–30, 2002; S. Egée et al., *J. Physiol.* 542, 795–801, 2002). In this paper, we review the features of the anionic channels that we have observed in both uninfected and malaria-infected human RBCs, the data that suggest that the NPPs are endogenous to the RBC membrane, and present new evidence, which suggests that the mechanism of induction of the NPPs, used by the parasite, involves phosphorylation steps.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Erythrocyte; Malaria; *Plasmodium falciparum*; New permeation pathways; Ionic channels

Introduction

The electrophysiological study of red blood cells (RBCs), using the patch-clamp technique, has been going through a renaissance with the recent discovery of novel channel activity in the host plasma membrane of *Plasmodium falciparum*-infected human RBCs [1–3]. This arose from the finding that malaria-infected RBCs have altered permeability characteristics due to the induction of new permeation pathways (NPPs) (reviewed by Kirk [4]), which are defined, using non-electrophysiological techniques, as having the general characteristics of anion channels (i.e., high anion permeability, linear concentration-dependence, inability to distinguish between stereo-isomers of permeant solutes), while still able to transport a range of other solutes at reduced rates [5].

The first electrophysiological evidence that the NPPs are formed by anion-selective channels was obtained by Desai et al. [1], using the patch-clamp technique. They demonstrated that the membrane conductance of *P. falciparum*-infected human RBCs is 150 times larger than that measured in uninfected RBCs and that this increased conductance results from the activation of small anion channels showing functional and pharmacological properties in keeping with those reported previously for the NPP. However, the question of whether these channels are up-regulated and/or modified endogenous RBC proteins or are parasite-derived was not addressed.

Previous electrophysiological studies on non-infected RBCs have identified three different cation channels, an intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, known as the Gárdos channel [6], a voltage-dependent non-selective cation channel [7], and an anion-dependent cation channel [8]. However, until recently, there have been few reports, which detail anionic channels in human RBCs. An early study by Schwartz et al. [9] reported small electrophysiological events, which are almost certainly due to anion transport and several studies reported biochemical

* Corresponding author. UMR 7127, CNRS, FRE 2775 Mer & Santé, Unité de Recherche en Physiologie Cellulaire, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, BP 74, Roscoff Cédex FR-29682, France. Fax: +33-298-292310.

E-mail address: thomas@sb-roscoff.fr (S.L. Thomas).

evidence that anion channels are probably present in the red cell membrane [10–13].

In this review, we detail our studies on anion channel activity in uninfected and *P. falciparum*-infected human RBCs, using the patch-clamp technique. We present evidence for the existence of two endogenous anion channels, that one of these channel types is up-regulated by the parasite in *P. falciparum*-infected RBCs, and for a mechanism of action that could be used by the parasite to up-regulate endogenous channels. Our data are also compared to other recent publications in the same field.

The intraerythrocytic stage of the parasite life cycle

The life cycle of *P. falciparum* (Fig. 1) can be separated into four phases (three asexual and one sexual). One of the asexual stages takes place in the human RBC, where one cycle takes approximately 48 h and results in the production of up to 30 new parasites. The strategy of invading the RBC has the advantage that the parasite can evade the host immune system. However, in doing so, the parasite enters an environment where the nutrient supply and waste removal routes are largely insufficient. Consequently, the parasite must establish transport pathways across the plasma membrane of the host RBC for these tasks.

Single channel recording of anion channels in the plasma membrane of uninfected RBCs

Using the excised inside-out configuration of the patch-clamp technique to identify the different channel types present in the plasma membranes of uninfected RBCs, we found two types of anion channel [3]. The first type has

linear conductance and is visible in more than 80% of membrane patches under appropriate conditions (see below). The second channel type displays outward rectification and is present in less than 5% of uninfected cell patches.

The linear conductance anion channel is not spontaneously active but can be activated by exposure of the cytosolic side of the membrane to the catalytic subunit of PKA (100 nM) in the presence of ATP (1 mM). The unit conductance is 12–15 pS. A progressive run-down of channel activity is observed within the 5-min period after activation, which is probably due to endogenous protein-phosphatase activity. ATP alone cannot induce this channel activity.

Similar channel activity can also be observed, in the absence of PKA, by the application of suction to the pipette of quiescent patches. Under this condition, the open probability (P_o) values measured at a given membrane potential, are related to the degree of depression imposed on the membrane patch. There is no run-down of the activity during this procedure and its effect is reversible. The unit conductance (12–15 pS) is identical to the value calculated by PKA-induced activation.

The linear conductance anion channel (activated by either method) exhibits 2 characteristic sub-states in most membrane patches, corresponding to 1/3 and 2/3 of the full amplitude, has a halide selectivity of $I^- > Br^- > Cl^-$, and is inhibited by 100 μ M NPPB, 100 μ M niflumic acid, 1 mM DPC and 10 μ M tamoxifen. DIDS, at a concentration of 100 μ M, induces a variable partial block.

The second rare anion channel shows strong outward rectification. The channel slope conductance is 10–15 pS between –100 mV and 0 mV, and is 75–85 pS at positive membrane potentials. Addition of the chloride channel blockers NPPB, DIDS and 9-AC on the cytosolic face of excised patches (100 μ M) leads to 90–100% inhibition of

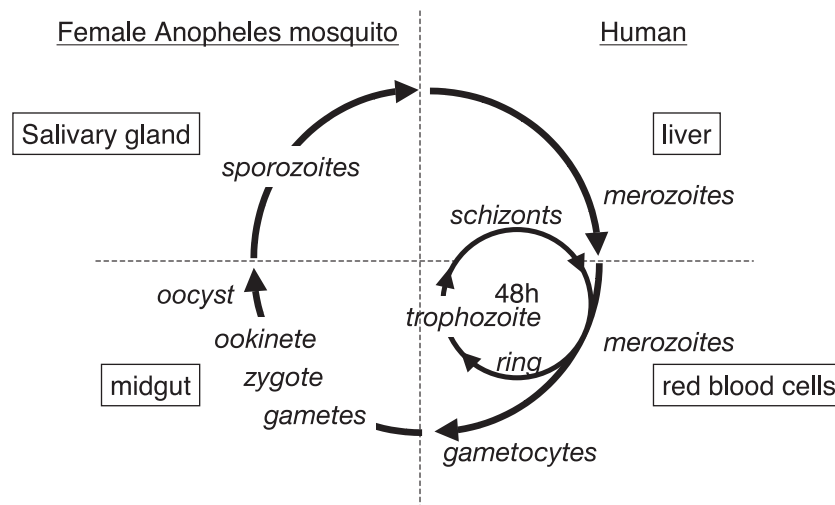


Fig. 1. The parasite life cycle. Schematic representation of the four phase of the life cycle of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. The midgut stage is sexual, the three others are asexual. The 48-h intraerythrocytic phase consists of the “ring” (0 to 16 h post-invasion), “trophozoite” (16 h to 36 h) and “schizont” (36–48 h) stages. The patch-clamp experiments were carried out on infected RBCs at the trophozoite stage.

channel activity. The presence of PKA and ATP is never observed to induce activity of this channel type.

Single channel recording of anion channels in the host plasma membrane of *P. falciparum*-infected RBCs

P. falciparum-infected RBCs show a very different pattern of channel activity from uninfected cells. Spontaneous channel activity is observed in infected RBCs, as bursts of channel openings separated by short closures (Fig. 2). These channels exhibit voltage-dependent gating, with low P_o between +50 and +100 mV, and increasing P_o between +50 and –100 mV. In addition, for a given membrane patch, the number of simultaneously active channels is directly proportional to the membrane potential (V_m), with the maximum number activated at negative potentials. The mean unit conductance is in the range 14–16 pS. The channel displays the same halide selectivity ($I^- > Br^- > Cl^-$) and the same pharmacology as the most abundant channel type recorded in non-infected cells.

Interestingly, while the majority of comparable data are consistent with the observations of Desai et al. [1], the mean unit conductance of the anion channel measured in malaria-infected RBCs during our studies is several times higher than theirs (approximately 15 pS versus approximately 3 pS). The reason for this difference is, as yet, unknown.

Whole-cell patch-clamp recording in uninfected and *P. falciparum*-infected RBCs

Using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique, uninfected RBCs display negligible conductance.

The membrane conductance (G_m) is in the range 40–50 pS. However, the addition of the catalytic subunit of PKA (100 nM) and ATP (10 mM) to the pipette solution, in the presence of theophylline (100 μ M), produces an inwardly rectifying membrane current 40 times larger than in unstimulated RBCs. In this case, the G_m between –100 and 0 mV is approximately 1700 pS and the halide selectivity sequence is $I^- > Br^- \geq Cl^- > F^-$. The increased conductance does not occur in the presence of the anion channel blockers NPPB (100 μ M), glibenclamide (100 μ M) and DPC (1 mM; pre-incubated for at least 5 min) in the bath solution.

P. falciparum-infected RBCs have a membrane current 100- to 150-fold larger than in unstimulated uninfected cells with the corresponding I – V curves showing inward rectification. G_m , calculated between –100 and 0 mV is around 5000 pS. The anion selectivity sequence is $I^- > NO_3^- > Br^- \geq Cl^- > F^- > \text{gluconate}$. NPPB, niflumic acid and glibenclamide, added in the bathing solution, reduce the membrane conductance of infected cells immediately with IC₅₀ values of 0.8, 2.5 and 35 μ M, respectively. Furosemide (200 μ M), a potent blocker of malaria-induced solute transport only reduces the membrane conductance by 45% and 100 μ M DIDS produces no significant inhibition. With the exception of the weak effect of furosemide, these data are in good agreement with the work of Desai et al. [1].

A third study by Huber et al. [2] confirmed an inwardly rectifying anion conductance in *P. falciparum*-infected RBCs but, in addition, reported an outwardly rectifying anion conductance. With additional inhibitor studies, they concluded that at least two anion-selective channel types must be induced by the parasite, although this was not confirmed with measurements at the single channel level. Interestingly, the pharmacological data presented by Huber

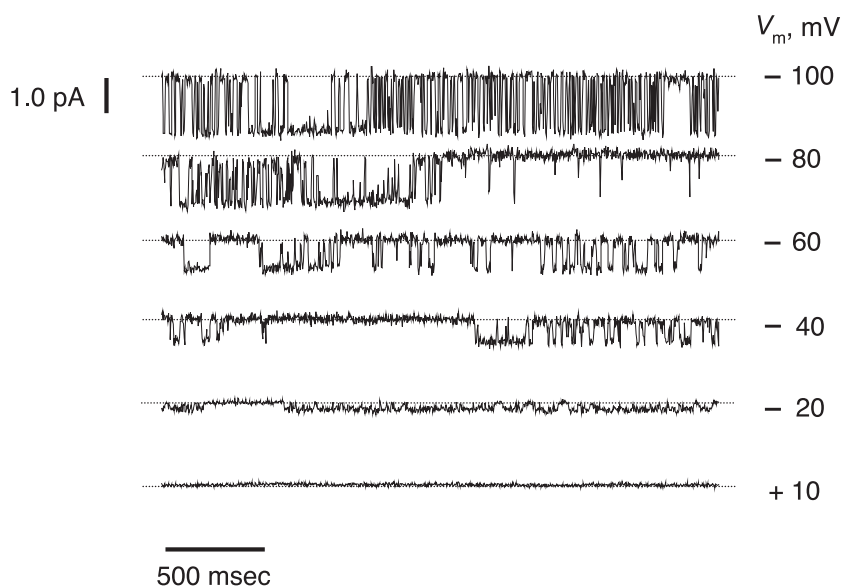


Fig. 2. Cell-attached single channel recordings of infected RBCs. Typical current recordings obtained at different potentials in infected RBCs bathed in NMDG-Cl solution. The dotted lines correspond to the channel closed-state.

et al. (for the two conductance phenotypes) does not match either our data or those of Desai et al. [1–3]. It is not yet known why pharmacological discrepancies have arisen between groups. However, the reason why Huber et al. also observed outwardly rectifying currents has been discovered recently [14]. A combination of the use of a negative holding potential (we use 0 mV) and the presence of a factor contained in serum (used during parasite culture) alters the conductance phenotype from inwardly to outwardly rectifying.

While our findings, using the cell-attached and excised inside-out configuration of the patch-clamp technique, demonstrate the presence of a second endogenous anion channel in the host RBC membrane, we have never observed its activation in infected RBCs (raising the interesting possibility that this channel is inactivated or modified by the parasite). However, we cannot exclude the possibility that the channels, which produce outward whole-cell currents, are too small to be seen in single channel recordings. Of course, another possibility is that the inward- or outward-rectifying behaviour in whole-cell configurations may represent alternative kinetic modalities of the same channels dependent on conditions.

The NPP are endogenous channels

The unitary conductance, substrate selectivity and pharmacology of the observed parasite-induced channel are identical to those of the endogenous linear conductance anion channel measured in uninfected RBCs. It is therefore reasonable to conclude that the membrane conductance of *P. falciparum*-infected RBCs results from the up-regulation of endogenous, normally quiescent channels.

Huber et al. [2] also came to the same conclusion. In their study, they presented evidence that inwardly and outwardly rectifying anionic conductances, with essentially identical characteristics to those that they observed in *P. falciparum*-infected RBCs, could be induced in uninfected RBCs by oxidation. In addition, a previous study by our group on induced channel activity in *Plasmodium gallinaceum*-infected chicken RBCs, using the patch-clamp technique, supported the hypothesis of endogenous ion channel up-regulation [15]. Although the channels induced by malaria in chicken RBCs were mostly non-selective cationic channels, they were clearly identified as up-regulated endogenous channels.

Molecular nature of the endogenous anion channels

The molecular natures of the two anion channels observed in the plasma membrane of human RBCs are, as yet, unknown. However, they may well be related to known anion channels, which are ubiquitous to many cell types: the ATP binding cassette (ABC) family of chloride channels

(including the cystic fibrosis transmembrane regulator protein, CFTR), the volume-regulated anion channels (VRAC) and the chloride channel family (ClC).

The linear small conductance Cl[−] channel that we have identified in uninfected and malaria-infected human RBCs displays some of the functional characteristics (conductance, the pharmacology and mode of activation) of CFTR channels. These features support their putative identity as CFTR-like channels, even though mechanosensitivity has never been observed for CFTR channels previously. It may also be possible that CFTR is acting as a regulator of this channel type.

The existence of CFTR in the plasma membrane of human RBCs is supported by the biochemical observations of Abraham et al. [13] showing the presence of different ABC proteins (CFTR, MRP1 and MDR) in the RBC membrane. The mechanosensitivity of these CFTR-like channels supports a model [12] in which mechanical deformation of RBCs in the vasculature would result in their activation. These channels would then provide a pathway for ATP release and, thereby, play an important role in regulation of vascular resistance in vivo (by the activation of purinergic receptors and synthesis of nitric oxide) [16].

The mechanism of activation of the NPP involves phosphorylation steps

The present observation that the addition of PKA and ATP to uninfected RBCs induced a whole-cell current, which mimics the membrane current observed in infected cells, suggests that the mechanism of up-regulation used by the parasite may involve phosphorylation. This hypothesis is supported by the data presented in Fig. 3, which shows that the membrane conductance of malaria-infected RBCs, measured in the whole-cell configuration, is totally and immediately abolished in the presence of alkaline phosphatase (0.1 U/ml) in the pipette solution (pH 7.4). Interestingly, it is also known that the malaria parasite produces many kinases [17] and that parasite-dependent kinase activities have been detected at the plasma membrane of the host RBC [18]. Furthermore, the endogenous PKA (the parasite is also known to produce its own PKA molecule) appears to be modified following infection with *P. falciparum* [19].

It is also worth noting that Huber et al. [2] have presented evidence that oxidation of the RBC plasma membrane can activate the NPPs. However, the possibility that this mechanism of induction is physiologically relevant has recently been brought into question [20,21].

A note on methodology

The electrophysiological results discussed throughout this review were obtained with the patch-clamp technique.

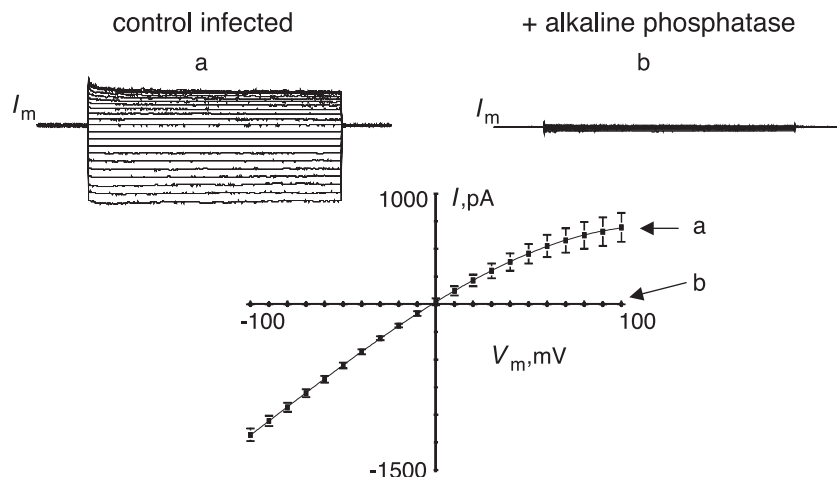


Fig. 3. Whole-cell recordings of infected RBCs. Current traces in infected RBCs bathed in NMDG-Cl solution (voltage pulses between -100 and $+100$ mV, 20 mV increment, 700 ms) and corresponding $I-V$ plots (mean \pm SEM) in control (a, $n = 6$) or after addition of alkaline phosphatase (0.1 U/ml) in the pipette solution (b, $n = 6$).

While all experimental protocols are described in detail in the references referred to in the text, an overview of the configurations of the patch-clamp technique and the composition of pipette and bathing solutions used during our studies may be useful. A brief review therefore follows.

The patch-clamp technique has been used in three distinct configurations during our (and other's) studies: (1) cell-attached: for measuring the current through the approximately $1 \mu\text{m}^2$ of membrane within the tip of the pipette. This configuration maintains the integrity of the cell and is therefore the most physiological; it does not, however, provide access to the cytosolic side of the membrane. (2) Excised inside-out: this configuration allows full control of the ionic composition of the cytosolic side of the membrane for selectivity and substitution experiments and for pharmacological assays. Both configurations enable measurements of unitary currents at the single channel level, thus allowing a biophysical characterisation of all channel types present in the membrane under study. In these configurations, the success rate of experiments depends largely on the surface density of channels. Considering the small fraction of membrane under the patch, it takes hundreds of observations to build up a reliable and comprehensive picture of the density and variety of channels present in the membrane. (3) Whole-cell configuration, obtained from the cell-attached configuration when the patch of membrane within the tip is ruptured by suction or by application of brief electric shocks, and the currents measured are those flowing through all the ionic channels present and active in the cell. In this configuration, the cell content changes dramatically as the cell cytosol equilibrates with the fluid within the patch pipette.

Pipette and bath solutions contained (in mM) 155 NMDG-Cl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES and 5 glucose (pH 7.4).

The calcium concentration used in the bath and pipette solutions was adjusted to pCa 3 in the cell-attached configuration, while it was adjusted to pCa 7 in the pipette and bathing solutions in the excised inside-out and whole-cell configurations.

Summary

It appears from recent electrophysiological studies that unstimulated uninfected human RBCs have little or no anionic channel activity, although the membrane is not devoid of anionic channels. A small anionic channel with linear conductance, and an outwardly rectifying anion channel are present in the plasma membrane of human RBCs. They are usually quiescent and their mechanism of regulation, as well as their physiological role, remains to be defined. The small conductance anionic channel is possibly a member of the ABC family of anionic channels (with some characteristic features of CFTR channels). The possible existence of such channels in human RBCs could open a new area of research in the determination of their physiological importance in healthy or in cystic fibrosis patients.

The linear small conductance anion channel can be activated in normal RBCs by intracellular application of the catalytic subunit of PKA, in the presence of ATP, or by membrane deformation. Furthermore, we have presented evidence that the malaria parasite *P. falciparum* up-regulates this endogenous pathway (possibly via phosphorylation steps). These findings give a new insight into the way in which the parasite modifies the host membrane to survive intracellularly. A better understanding of whether and, if so, how *P. falciparum* kinases activate these endogenous channels could be important in developing strategies for future antimalarial chemotherapies.

Acknowledgments

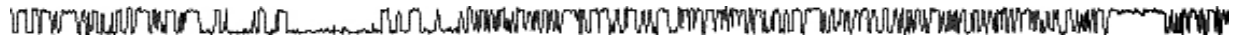
The French Ministry of Research (PAL + and PRFMMIP programmes), the French Ministry of Defence (DGA), The Wellcome Trust, The Royal Society, and The Sir Halley Stewart Trust have supported work in our laboratories on this subject. This paper is based on a presentation at the Red Cell Club Meeting held at Yale University School of Medicine on October 24, 2003.

References

- [1] S.A. Desai, S.M. Bezrukov, J. Zimmerberg, A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite, *Nature* 406 (2000) 1001–1005.
- [2] S.M. Huber, A.C. Uhlemann, N.L. Gamper, C. Duranton, P.G. Kremsner, F. Lang, *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl⁻ channels of human erythrocytes by membrane oxidation, *EMBO J.* 21 (2002) 22–30.
- [3] S. Egée, F. Lapaix, G. Decherf, H.M. Staines, J.C. Ellory, C. Doerig, S.L. Thomas, A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *J. Physiol.* 542 (2002) 795–801.
- [4] K. Kirk, Membrane transport in malaria-infected erythrocytes, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 495–537.
- [5] K. Kirk, H.A. Horner, B.C. Elford, J.C. Ellory, C.I. Newbold, Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3339–3347.
- [6] O.P. Hamill, Potassium channel currents in human red blood cells, *J. Physiol.* 319 (1998) 97–98.
- [7] P. Christophersen, P. Bennekou, Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 1065 (1991) 103–106.
- [8] C. Duranton, S.M. Huber, F. Lang, Oxidation induces a Cl⁻-dependent cation conductance in human red blood cells, *J. Physiol.* 539 (2002) 847–855.
- [9] W. Schwartz, R. Gryorczyk, D. Hof, Recording single-channel currents from human red cells, *Methods Enzymol.* 173 (1989) 112–121.
- [10] J.C. Freedman, T.S. Novac, J.D. Bisognano, P.R. Pratap, Voltage dependence of DIDS-insensitive chloride conductance in human red blood cells treated with valinomycin or gramicidin, *J. Gen. Physiol.* 104 (1994) 961–983.
- [11] R.S. Schwartz, A. Rybicki, R.L. Nagel, Molecular cloning and expression of a chloride channel-associated protein p_{l_{Cl}} in human young red blood cells: association with actin, *Biochem. J.* 327 (1997) 609–616.
- [12] R.S. Sprague, M.L. Ellsworth, A.H. Stephenson, M.E. Kleinhenz, A.J. Lonigro, Deformation-induced ATP release from red blood cell requires CFTR activity, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) H1726–H1732.
- [13] E.H. Abraham, K.M. Sterling, R.J. Kim, A.Y. Salikhova, H.B. Huffman, M.A. Crockett, N. Johnston, H.W. Parker, W.E. Boyle, A. Hartov, E. Demidenko, J. Efrid, J. Kahn, S.A. Grubman, D.M. Jefferson, S.C. Robson, J.H. Thakar, A. Lorico, G. Rappa, A.C. Sartorelli, P. Okunieff, Erythrocyte membrane ATP binding cassette (ABC) proteins: MRP1 and CFTR as well as CD39 (ecto-apyrase) involved in RBC ATP transport and elevated blood plasma ATP of cystic fibrosis, *Blood Cells* 27 (2001) 165–180.
- [14] H.M. Staines, T. Powell, J.C. Ellory, S. Egée, F. Lapaix, G. Decherf, S.L.Y. Thomas, C. Duranton, F. Lang, S.M. Huber, Modulation of whole-cell currents in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by holding potential and serum, *J. Physiol.* 552 (2003) 177–183.
- [15] S.L.Y. Thomas, S. Egée, F. Lapaix, L. Kaestner, H.M. Staines, J.C. Ellory, Malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* up-regulates host red blood cell channels, *FEBS Lett.* 500 (2001) 45–51.
- [16] R. Busse, A. Ogilvie, U. Pohl, Vasomotor activity of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate in isolated arteries, *Am. J. Phys.* 254 (1988) H823–H828.
- [17] B. Kappes, C.D. Doerig, R. Graeser, An overview of *Plasmodium* protein kinases, *Parasitol. Today* 15 (1999) 449–454.
- [18] A.H. Chishti, G.J. Maalouf, S. Marfatia, J. Palek, W. Wang, D. Fisher, S. Liu, Phosphorylation of Protein 4.1 in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells, *Blood* 83 (1994) 3339–3345.
- [19] C. Syin, D. Parzy, F. Traincard, I. Boccaccio, M.B. Joshi, D.T. Lin, X.M. Yang, K. Assemet, C. Doerig, G. Langsley, The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 4842–4849.
- [20] H. Ginsburg, Oxidative permeabilization? *Trends Parasitol.* 18 (2002) 346.
- [21] S.M. Huber, A. Uhlemann, N. Gamper, C. Duranton, F. Lang, P. Kremsner, Oxidative permeabilization? Response, *Trends Parasitol.* 18 (2002) 346–347.

Chapitre III:

Effets du potentiel de maintien et du sérum sur les conductances activées
par *Plasmodium falciparum*



Chapitre III :
Effets du potentiel de maintien et du sérum sur les conductances
activées par *Plasmodium falciparum* :

Article II : « Modulation of whole-cell currents in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by holding potential and serum »

Trois récentes études électrophysiologiques ont permis de révéler l'activité d'un canal ionique présent dans la membrane plasmique des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*. Dans la première, (Desai *et al.*, 2000), deux configurations de la technique du *patch-clamp* sont utilisées : le *whole-cell* et le *cell-attached*. La conductance mesurée sur les cellules infectées est 150 fois plus importante que celle mesurée sur des globules rouges non infectés, rectifiée entrante, et présente la séquence de sélectivité suivante : $I^- > Br^- > Cl^-$ ainsi que le même profil pharmacologique que celui décrit en flux (Kirk *et al.*, 1993; Kirk *et al.*, 1994). Au niveau unitaire (*cell-attached*), seules les cellules infectées présentaient un canal anionique de faible conductance (~3 pS) spontanément actifs. A partir de ces données, Desai conclut que ce canal fait partie de la nouvelle voie de perméabilité membranaire (NPP) induite par le parasite au cours de son développement érythrocytaire. Néanmoins, il ne parvient pas à déterminer l'origine de ce canal.

Nous avons obtenu des résultats similaires (cf. les chapitres précédents) à ceux de l'équipe de Sanjay Desai, cependant la conductance que nous mesurons est plus grande (12 pS) et semble être endogène à l'hôte. La troisième étude menée par le groupe de Stephan Huber (2002b), basée uniquement sur une approche globale (*whole-cell*), confirme l'existence d'une conductance anionique rectifiée entrante dans la membrane des cellules infectées. Toutefois, ils décrivent également l'existence d'une conductance anionique rectifiée sortante, dont la pharmacologie diffère de la première conductance observée, ils supposent que le parasite est capable d'activer deux conductances anioniques distinctes.

Tout comme dans nos travaux, ils ont également réussi à activer ces conductances dans la membrane de cellules non infectées, grâce à des mécanismes oxydatifs. Ceci conforte donc l'idée que le ou les NPP(s) induit(s) par le parasite serai(en)t des canaux endogènes quiescents dans la membrane des érythrocytes. En avril 2003, lors du 14^{ième} congrès de l'EARCR (*European Association for Red Cell Research*) organisé à Roscoff, ces divergences ont fait l'objet de nombreuses discussions (Thomas et Lew, 2004), de nouvelles expériences ont pu être réalisées en collaboration avec Stephan Huber et Christophe Duranton, de Tübingen, afin de tenter de mieux les appréhender.

Deux facteurs sont à l'origine des différences observées. Le premier est le « *holding potential* », c'est-à-dire le potentiel de membrane imposé à la cellule entre chaque rampe de voltage en *whole-cell*. En effet, le groupe de Tübingen maintient systématiquement les cellules à un potentiel de membrane compris entre -20 mV et -40 mV. Or, d'un point de vue physiologique, le potentiel de membrane d'un globule rouge infecté est proche de 0 mV, du fait de l'inversion et de l'annulation des gradients de Na⁺ et K⁺ (présents avant l'infection, **Fig. 1 B** et **Fig. 7 E**). L'utilisation de telles valeurs de voltage imposé ne correspond donc à aucune réalité physiologique. De plus, l'application d'un tel potentiel hyperpolarisant à la membrane entraîne rapidement (<200 ms) une désactivation croissante des conductances entrantes au cours du temps (ce qui ne s'observe pas quand le potentiel imposé est nul), de ce fait, les relations courant-voltage obtenues présentent un profil de rectification sortante.

Le second paramètre influant sur les courants membranaires globaux mis en évidence lors de cette série d'expériences est la quantité de sérum présente dans la solution de bain. L'ajout de sérum humain (ou de tout autre composé riche en protéines et lipides tels que le plasma ou l'albumax II utilisé dans le milieu de culture), toujours en *whole-cell*, multiplie par 4 les courants sortants (mesurés aux potentiels positifs) et d'environ 2 fois les courants entrants. Cependant, le même protocole appliqué à des enregistrements unitaires, en *cell-attached* et en *inside-out*, n'induit pas l'apparition de nouveaux types de courants. Du fait de la grande fragilité des *seals* en présence de sérum, il n'a pas été possible d'aller plus

Résultats

loin dans la caractérisation unitaire de l'effet de cette substance sur les canaux anioniques activés par *Plasmodium falciparum*. Si l'effet du potentiel imposé sur les conductances anioniques globales a pu être identifié de façon distincte, l'effet du sérum, semble plus complexe étant donné qu'il ne présente qu'un effet très limité au niveau unitaire. La substance responsable de l'augmentation de la conductance globale n'a pu être identifiée mais semble être présente à la fois dans le sérum et l'albumax II.

Ces deux paramètres semblent être la clé des différences expérimentales observées entre les différentes équipes, toutefois, étant donné la complexité des résultats obtenus il convient de rester prudent et de poursuivre les recherches afin d'en déterminer les mécanismes physiologiques sous-jacents.

Rapid Report

Modulation of whole-cell currents in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by holding potential and serum

Henry M. Staines, Trevor Powell, J. Clive Ellory, Stéphane Egée*, Franck Lapaix*, Gaëtan Decherf*, Serge L. Y. Thomas*, Christophe Duranton†, Florian Lang† and Stephan M. Huber†

University Laboratory of Physiology, Parks Road, Oxford OX1 3PT, UK, * CNRS, UMR 7127, Station Biologique, Place G. Teissier, BP 74, 29682 Roscoff cedex, France and † Department of Physiology, University of Tuebingen, Gmelinstrasse 5, D 72076, Tuebingen, Germany

Recent electrophysiological studies have identified novel ion channel activity in the host plasma membrane of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells (RBCs). However, conflicting data have been published with regard to the characteristics of induced channel activity measured in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. In an effort to establish the reasons for these discrepancies, we demonstrate here two factors that have been found to modulate whole-cell recordings in malaria-infected RBCs. Firstly, negative holding potentials reduced inward currents (i.e. at negative potentials), although this result was highly complex. Secondly, the addition of human serum increased outward currents (i.e. at positive potentials) by approximately 4-fold and inward currents by approximately 2-fold. These two effects may help to resolve the conflicting data in the literature, although further investigation is required to understand the underlying mechanisms and their physiological relevance in detail.

(Received 11 July 2003; accepted after revision 18 August 2003; first published online 22 August 2003)

Corresponding author H. M. Staines: University Laboratory of Physiology, Parks Road, Oxford OX1 3PT, UK.
Email: henry.staines@physiol.ox.ac.uk

The malaria parasite *Plasmodium falciparum* induces new permeation pathways (NPP) for a variety of structurally unrelated solutes in the host plasma membrane of infected red blood cells (RBCs) 10–15 h after invasion. The NPP have been characterised previously (using radio-tracer and haemolysis techniques) as anion-selective channels of a single type, which are also permeable to electroneutral and cationic solutes, albeit to a lesser degree (Kirk *et al.* 1994). They have also been implicated in nutrient uptake, ‘waste’ removal, volume regulation and ion balance and are generally accepted as excellent chemotherapeutic targets and specific traffic routes for antimalarial agents against the intra-erythrocytic parasite (Kirk, 2001).

The presence of malaria-induced anion channels in the host plasma membrane of mature *P. falciparum*-infected human RBCs was supported further by the data reported by Desai *et al.* (2000), using the patch-clamp technique in both the whole-cell and cell-attached patch configurations. They reported a whole-cell conductance in infected cells, which is 150-fold higher than that measured in uninfected cells, rectifies inwardly, has an anion selectivity of $I^- > Br^- > Cl^-$ and a pharmacological profile similar to that reported previously for the NPP (Kutner *et al.* 1987; Kirk *et al.* 1993, 1994). At the single channel level,

they identified a small conductance (~ 3 pS) anion-selective channel that is not observed in uninfected RBCs under the same experimental conditions. From these data, Desai *et al.* concluded that this channel type forms the NPP. Egée *et al.* (2002), using whole-cell, cell-attached and excised patch configurations, reported broadly similar results, except that they observed a slightly larger conductance (~ 12 pS) anion channel.

A third study by Huber *et al.* (2002), using the whole-cell recording configuration, confirmed an inwardly rectifying anion conductance in parasitised RBCs. However, they described also an outwardly rectifying anion conductance and, with additional pharmacological data, concluded that at least two anion-selective channel types must be induced by the parasite (although single channel measurements were not performed). Interestingly, both of the latter two groups performed additional experiments on uninfected cells and reported that several different stimuli (oxidation, phosphorylation and membrane stretch) were able to induce channel activity with properties similar to those observed in infected RBCs, from which they concluded that the intra-erythrocytic parasite activates quiescent, endogenous channels (rather than incorporating parasite-derived channels).

The aim of this study was to investigate possible reasons why discrepancies in whole-cell experimental data have arisen. We have measured whole-cell currents in *P. falciparum*-infected RBCs, using standard electrophysiological techniques, and show that variations in the preparation of infected RBCs prior to experimentation and the various voltage-clamp protocols used can go some way to clarifying disparities in the reported electrophysiological characteristics.

METHODS

Preparation of cells

Human RBCs (type O), infected with the A4 line of *P. falciparum* (Roberts *et al.* 1992), were cultured under 1% O₂–3% CO₂–96% N₂ in RPMI-1640 culture medium, supplemented with (mM): 10 D-glucose, 2 L-glutamine, 40 Hepes, gentamicin sulphate (25 mg l⁻¹), and human serum (8.5% v/v, pooled from different blood donors). Patch-clamp experiments were carried out using trophozoite-infected RBCs (36–42 h post-invasion), synchronised by a combination of sorbitol haemolysis (Lambros & Vanderberg, 1979) and gelatin flotation (Pasvol *et al.* 1978). RBCs were drawn directly from the culture (5–20% parasitaemia) or harvested from the culture by centrifugation on Percoll (yielding suspensions of 80–96% parasitaemia), as described elsewhere (Kirk *et al.* 1996). The use of Percoll separation had no obvious effect on whole-cell currents in infected RBCs compared with cells taken directly from culture (data not shown). Prior to experimentation RBCs were washed 3 times in serum-free culture medium followed by 3 washes in bath solution. Single parasitised or uninfected RBCs for patch-clamp experiments were identified by microscopic examination.

Current recordings

Patch pipettes (tip resistances 6–18 MΩ) were prepared from borosilicate glass capillaries pulled and polished on a Werner Zeitz DMZ programmable puller (Augsburg, Germany). The bath solution contained (mM): 155 NaCl, 1.4 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 Hepes, 10 glucose, pH 7.4, 320 ± 5 mosmol (kg H₂O)⁻¹. The pipette solution was of the same composition, with the one exception that 1.4 mM CaCl₂ was replaced with 0.5 mM EGTA.

The ruptured patch whole-cell voltage-clamp configuration was used to record membrane currents (as detailed previously; see for example Sasaki *et al.* 1999). RBC membrane seals (2–10 GΩ) were obtained by the application of suction to the pipette (1–2 kPa) followed by the imposition of a negative pipette potential (–5 to –30 mV). Cell rupture was attained by a short burst of strong suction and the configuration assessed by a decrease in access resistance and the development of a small capacitance transient. Whole-cell currents were recorded using an Axopatch 200A amplifier, with voltage command protocols generated and the currents analysed using the pCLAMP software suite (Version 8, Axon Instruments Inc., USA). Whole-cell *I*–*V* curves were obtained by evoking a series of test potentials (*V*_T) from –100 to +100 mV in 10 mV steps for 300 or 500 ms from a holding potential (*V*_H) of 0 or –30 mV. Data for the construction of *I*–*V* curves were measured at 10 ms for each *V*_T for the analysis of ‘early’ currents and over the last 50 ms of the current records (i.e. 250–300 or 450–500 ms) for the analysis of ‘late’ currents. All experiments were performed at room temperature. Averaged data are shown as the mean ± S.E.M. In all cases, *n* denotes the number of cells tested. Significance was assessed using Student’s *t* test.

RESULTS

Effect of holding potential on the whole-cell conductance of malaria-infected RBCs

One clear difference between the studies of Egee *et al.* (2002) and Huber *et al.* (2002) is that the former held the cells at 0 mV between test pulses, whereas the latter used predominantly a *V*_H of –30 mV (occasionally –10 mV). Figure 1 illustrates typical whole-cell current recordings, which we have observed in malaria-infected RBCs, and their *I*–*V* relationships (analysing late current data) at these two values of *V*_H. Within the first 30 s of obtaining the whole-cell configuration, at either *V*_H, the current recordings were similar (Fig. 1A and B show examples), although, occasionally, a small degree of time-dependent current inactivation was observed at negative *V*_T values (e.g. Fig. 1C). However, as recording continued, there developed in 20% (3 out of 16) of cells held at 0 mV a striking time-dependent inactivation of inward currents evoked at negative *V*_T values. The change occurred with greater frequency in cells held at –30 mV, where over 60% (14 out of 23) of cells displayed the effect (representative example shown in Fig. 1C and D). To test if these changes could be reversed, the *V*_H of six cells initially held at –30 mV was changed to 0 mV. Of these six cells, the current change reversed completely in one, while reversing partially in the other five (data not shown).

The *I*–*V* curves constructed from the averaged data of all initial whole-cell current recordings (*n* = 51), using late current data, in malaria-infected RBCs held at either 0 or –30 mV showed inward rectification and reversal potentials close to 0 mV. The membrane slope conductances (calculated between –100 and –30 mV) were calculated to be 9.2 ± 0.7 and 10.3 ± 0.8 nS for malaria-infected RBCs held at 0 and –30 mV, respectively (Fig. 1E). No statistically significant difference was found between these conductances (*P* = 0.4, two-tailed, unpaired Student’s *t* test). However, for those cells where time-dependent current inactivation proceeded to completion (i.e. reaching a steady-state) during the length of the test pulse, the *I*–*V* curves for late currents changed from inwardly rectifying to sigmoidal in appearance, whilst retaining their reversal potentials (Fig. 1F).

Effect of serum on the whole-cell conductance of malaria-infected RBCs

The groups also used different protocols for their treatment of the RBCs prior to the electrophysiological investigations. The RBCs used here and also those studied by Egee *et al.* (2002) were washed at least 3 times in serum-free media. However, Huber *et al.* (2002) used RBCs taken directly from culture (containing 0.5% w/v of the lipid-rich bovine serum albumin Albumax II), which were then placed into Petri dishes and perfused (rather than washing). To assess whether these differing preparative protocols modulated significantly the recorded electro-

physiological phenotype, we investigated the effects of adding human serum to the bath solution of washed malaria-infected RBCs maintained under whole-cell voltage-clamp.

Figure 2 shows a representative experiment. A malaria-infected RBC (held at 0 mV) showed no alteration in membrane conductance (i.e. time-dependent inward current inactivation was not observed) over the first 6 min of recording (typical inwardly rectifying currents were observed, Fig. 2A and F). At this time, 0.4% (v/v) human serum was added to the bath solution. This evoked rapid changes in the observed current recordings, which (in this particular cell) were completed after a further 6 min

(Fig. 2B). Serum induced an increase in the whole-cell conductance at both positive and negative potentials, with a slight time-dependent inactivation of currents at negative V_T values (producing a curvilinear $I-V$ relationship from late current data (Fig. 2F), although steady-state currents at negative V_T values were not reached). Changing V_H from 0 to -30 mV resulted in the development of a strong time-dependent current inactivation at negative test potentials (including a reduction in the early current amplitudes (i.e. in the first 10 ms) observed at negative V_T values), which reached a steady state after ~ 150 ms. The conductance, when measured from late current data, rectified outwardly and

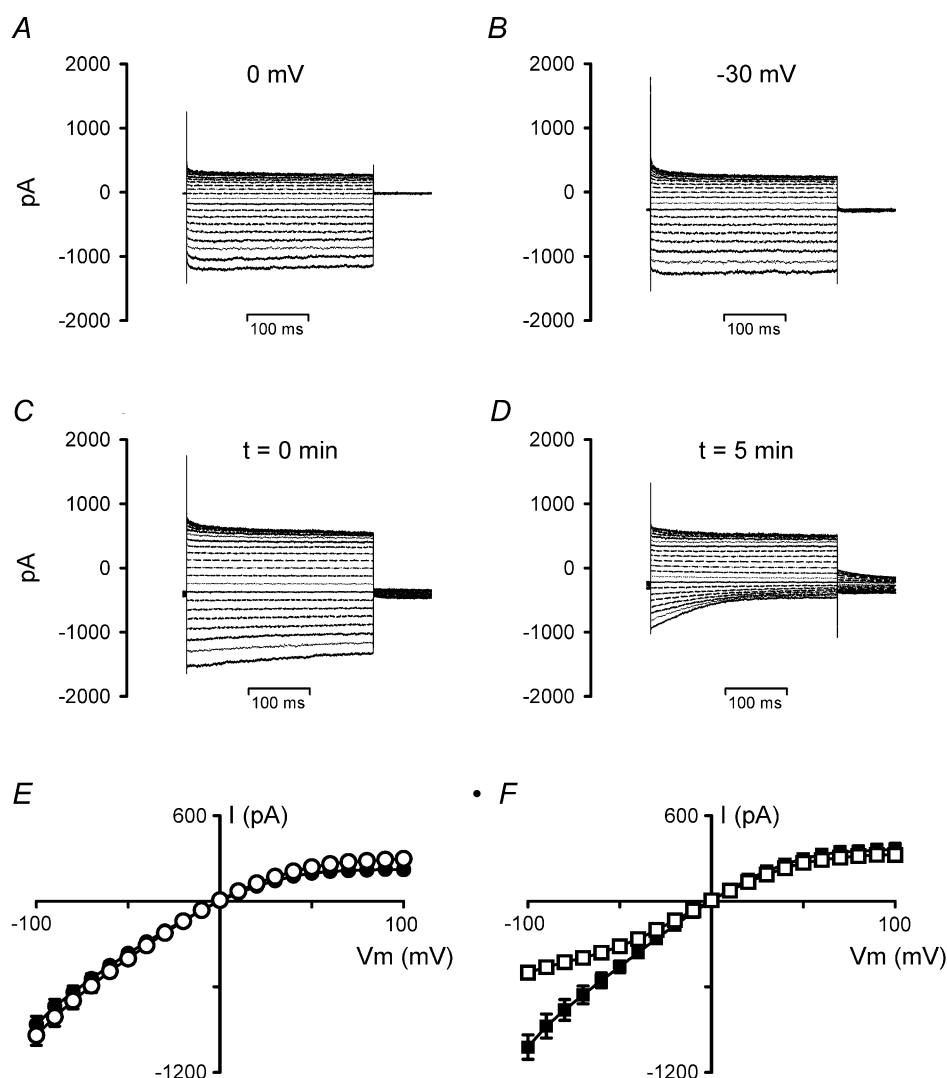


Figure 1. Whole-cell current recordings in malaria-infected RBCs

A, a representative current recording of an infected RBC directly after attaining the whole-cell configuration, $V_H = 0$ mV. B, as for A except $V_H = -30$ mV. C and D, a representative example of the development of time-dependent current inactivation at negative V_T values in an infected RBC, using the whole-cell configuration (in this particular case $V_H = -30$ mV). Note: times shown in the figure represent the times after whole-cell rupture. E, $I-V$ curves for averaged late current data from initial recordings of infected RBCs held at 0 (●; $n = 25$) and -30 mV (○; $n = 26$). F, $I-V$ curves for averaged late current data before (■) and after (□) the development of time-dependent current inactivation ($n = 13$). Late current data are shown as the mean \pm S.E.M. and where not shown error bars lie within the symbols.

the recording also showed large, decaying tail currents on returning to the V_H (Fig. 2C and F). In this case, returning V_H to 0 mV completely reversed the effect (Fig. 2D and F) and the further addition of 0.1 mM of the NPP inhibitor 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB; Kirk & Horner, 1995) to the bath solution reduced the conductance by over 90 % (Fig. 2E and F).

Although addition of serum to the bath modulated both current amplitude and kinetics to some extent in every cell, these effects were variable and were always affected by V_H . While some cells in the presence of serum and held at 0 mV showed slight time-dependent inward current inactivation (Fig. 2B), others showed a far higher degree (Fig. 3A). Even

so, the latter were still affected by changing V_H to -30 mV (Fig. 3B). Other variations included the time required to observe the full effect of changing V_H from 0 to -30 mV. Out of 17 cells, this occurred within 60 s for two cells, 2–4 min for 13 cells and between 8 and 9 min for two cells. On returning V_H back to 0 mV, the response time was comparable or even faster and the degree of reversibility variable, as complete reversal was observed in only 4 out of 13 cells (compare Fig. 2B with Fig. 2D). It was also noted that the first V_T (-100 mV) often accelerated subsequent current inactivation (Fig. 3C).

From a detailed analysis of all whole-cell experimental data from malaria-infected RBCs in the absence ($n = 51$) and

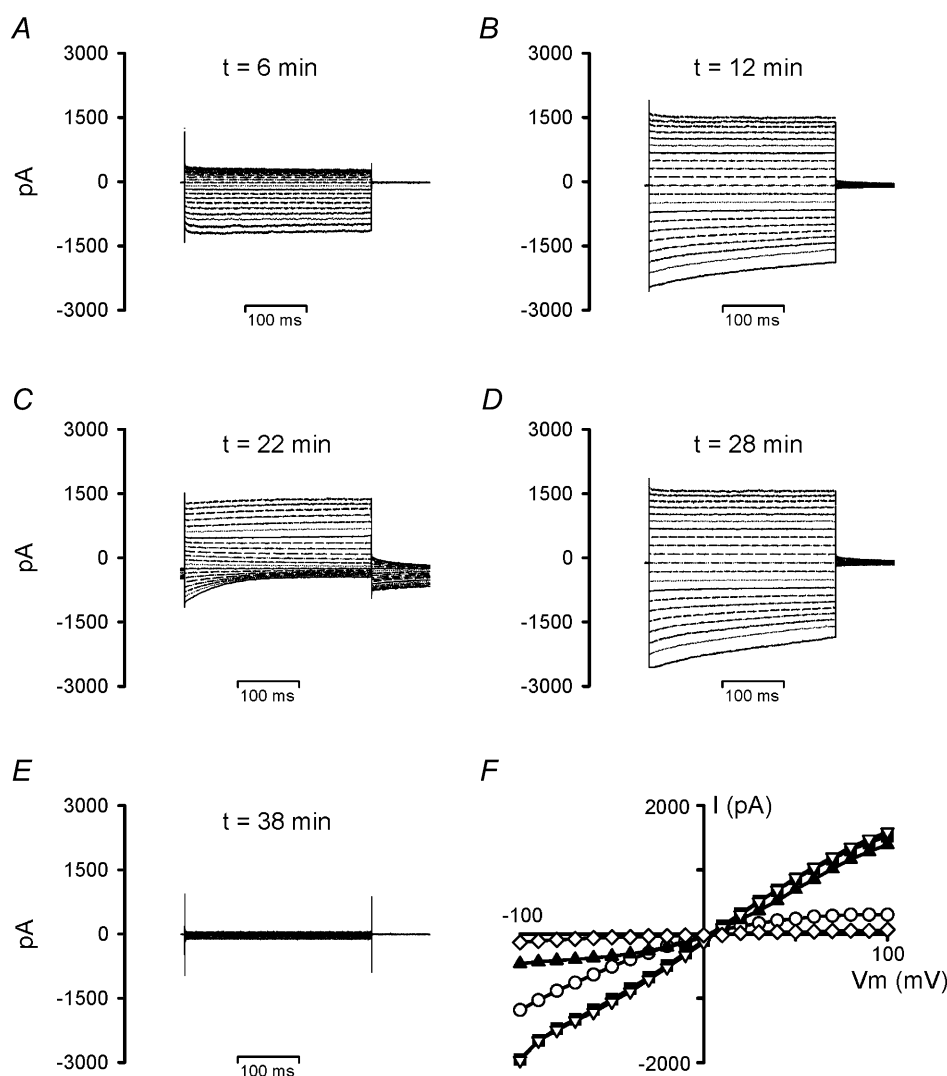


Figure 2. The effect of serum and holding potential on whole-cell current recordings in a malaria-infected RBC

A, current recording of an infected RBC immediately before the addition of serum, $V_H = 0$ mV. B, current recording 6 min after addition of human serum (0.4 % v/v). C, current recording 9 min after changing V_H from 0 to -30 mV. D, current recording 3 min after changing V_H from -30 to 0 mV. E, current recording after addition of 0.1 mM NPPB, $V_H = 0$ mV. F, corresponding I - V curves of late currents under each of the conditions described above (A, \circ ; B, \blacksquare ; C, \blacktriangle ; D, ∇ ; E, \diamond). Note: times shown on the figure represent the times after whole-cell rupture and the I - V curves (shown in F) produced from the data in panels B and D overlaid each other.

presence ($n = 23$) of serum, it is clear that serum increased late outward current amplitudes by approximately 4-fold, independently of the V_H (Fig. 3D). At negative test potentials, the effect of serum was shown to nearly double the early inward current amplitudes (i.e. in the first 10 ms) when cells were held at 0 mV, although this effect was not seen at a V_H of -30 mV (Fig. 3E). Ultimately, the complex effects observed in currents recorded at negative test

potentials made quantitative analysis of the effect of serum on steady-state whole-cell inward currents in malaria-infected RBCs held at 0 mV very difficult. However, it is clear that serum had no effect on late (i.e. steady-state) inward currents, in cells held at -30 mV (Fig. 3F).

In addition to human serum, human plasma (0.4 % v/v), Albumax II (0.025 % w/v) and essentially lipid-free bovine

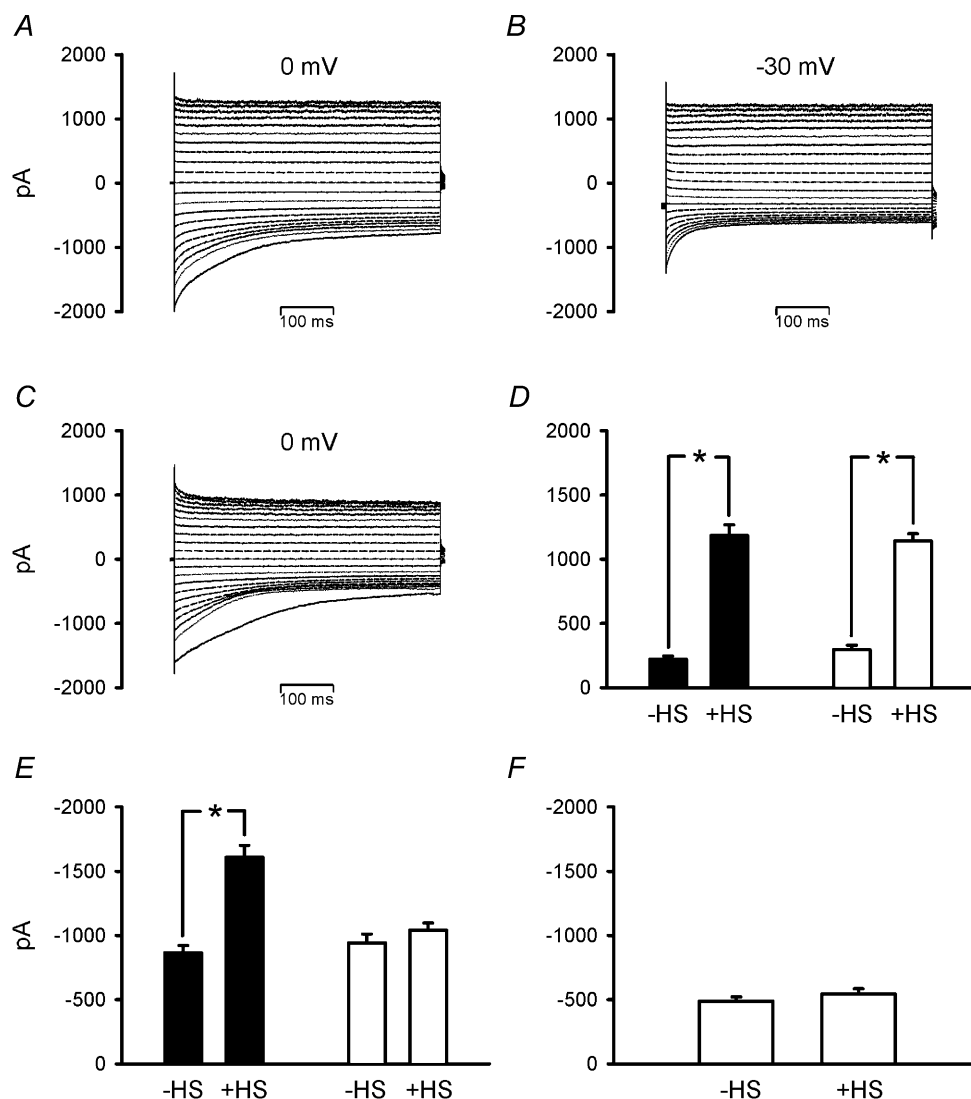


Figure 3. The complex nature of whole-cell current recordings in malaria-infected RBCs in the presence of serum

A and B, a second example of the effect of serum and holding potential on whole-cell current recordings in an infected RBC. A, current recording after addition of human serum (0.4 % v/v), $V_H = 0$ mV. B, current recording after changing V_H from 0 to -30 mV. C, an example of the effect of the initial V_T (-100 mV for 500 ms) on a whole-cell current recording in the presence of serum in an infected RBC, $V_H = 0$ mV. D, averaged late outward current (calculated at $V_T = +100$ mV) for cells held at 0 mV (■) in the absence (-HS; $n = 25$) and presence (+HS; $n = 23$) of 0.4 % (v/v) human serum and for cells held at -30 mV (□) in the absence ($n = 26$) and presence ($n = 23$) of 0.4 % (v/v) human serum. E, averaged early inward current (calculated at $V_T = -100$ mV) for cells held at 0 mV (■) in the absence ($n = 25$) and presence ($n = 23$) of 0.4 % (v/v) human serum and for cells held at -30 mV (□) in the absence ($n = 26$) or presence ($n = 23$) of 0.4 % (v/v) human serum. F, averaged late inward current values (calculated at $V_T = -100$ mV) for cells held at -30 mV in the absence ($n = 12$) or presence ($n = 23$) of 0.4 % (v/v) human serum, where time-dependent current inactivation proceeded to completion during the test pulse. For C, D and E, data are shown as the means \pm S.E.M. (* $P < 0.000001$, two-tailed, unpaired Student's t test).

serum albumin (0.025 % w/v) produced similar current changes in malaria-infected RBCs (Fig. 4 shows a representative example of the effect of Albumax II on whole-cell current recordings in malaria-infected RBCs, which can be compared to Fig. 2), while heat-inactivated human serum (10 min at $\sim 100^\circ\text{C}$) and serum-free culture medium (used as the bath solution) had no effect (data not shown). Furthermore, all these additions had no effect on the whole-cell currents recorded from uninfected RBCs (data not shown).

DISCUSSION

The focus of this study was to clarify some of the possible reasons why groups investigating malaria-infected RBCs with the whole-cell patch-clamp technique have reported contrasting results. In particular, the different experimental conditions used by the groups of Huber *et al.* and Egee *et al.* were studied.

Conductance changes in malaria-infected RBC whole-cell patches

Using infected RBCs washed at least three times in serum-free media, initial whole-cell recordings rectified inwardly, as reported by both Desai *et al.* (2000) and Egee *et al.* (2002). However, with time, developing inactivation of inward currents was observed in some whole-cell

recordings, which was more frequent and more marked on changing to a V_H of -30 mV. This sequence of events has not been described previously, neither has the sigmoidal appearance of the steady-state I - V curve for the late current component. It seems likely that this conductance change, once observed, is voltage dependent due to the semi-reversible nature of the change. The fact that full reversal was not observed on every occasion is probably due to the effect of the initial V_T of each recording (300 or 500 ms at -100 mV), which on occasion acted in the same way as a -30 mV V_H (Fig. 3B shows a similar effect that was recorded in the presence of serum).

The fact that the late current, sigmoidal conductance phenotype develops over time after the whole-cell configuration has been attained suggests that it may be due to the loss of cytosolic components, which are heavily diluted by the pipette solution after cell rupture. However, it is also possible that in attaining the whole-cell configuration there is an instantaneous change to the RBC, which produces the inwardly rectifying recordings (i.e. without time-dependent inward current inactivation) and which takes time to reverse. Therefore, further detailed experiments are required to determine the most physiologically relevant conductance phenotype in these conditions.

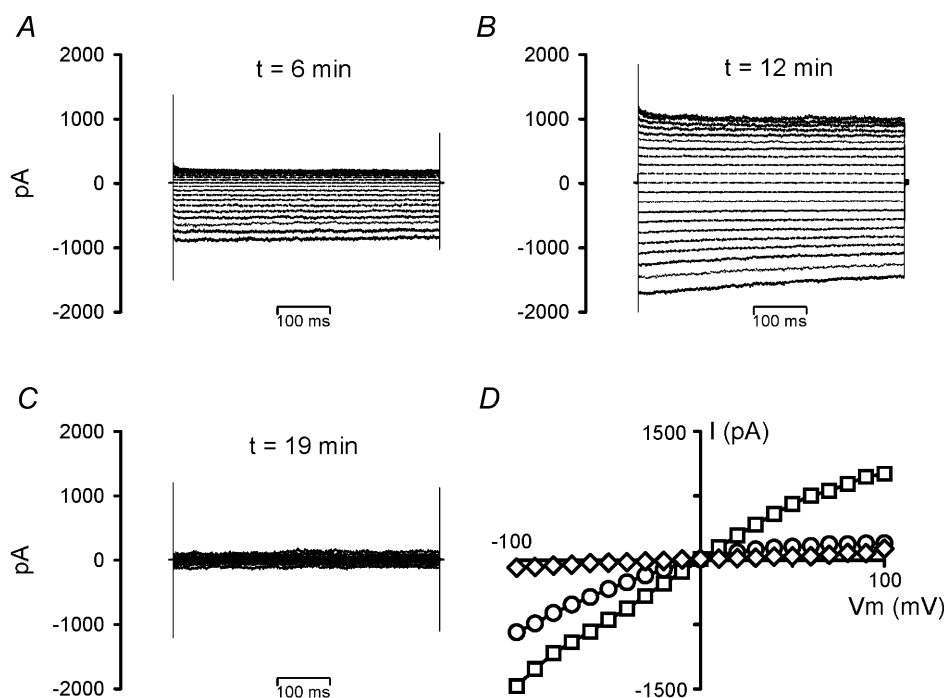


Figure 4. The effect of Albumax II on whole-cell current recordings in a malaria-infected RBC

A, current recording of an infected RBC immediately before the addition of Albumax II, $V_H = 0$ mV. B, current recording 6 min after addition of Albumax II (0.025 % w/v). C, current recording after addition of 0.1 mM NPPB. D, corresponding I - V curves of late currents under each of the conditions described above (A, \circ ; B, \square ; C, \diamond). Note: times shown on the figure represent the times after whole-cell rupture.

Can the effects of V_H and serum explain reported differences?

As well as the apparent voltage-dependent changes in membrane conductance discussed above, the addition of human serum (an essential requirement for parasite growth *in vitro*; Trager & Jensen, 1978) increased both inward and outward whole-cell currents significantly in cells held at 0 mV. There was, however, a complex interplay between the effects of membrane potential and serum, which makes a detailed analysis of the serum effect on inward currents very difficult. It will therefore be important to clarify the mechanisms underlying the changes we have seen. Notwithstanding this, given that the effect of serum was inhibited by NPPB, yet was not observed in uninfected RBCs, it must reflect a modulation of the malaria-induced NPP.

In addition to human serum and human plasma, Albumax II (lipid-rich bovine serum albumin, which also supports parasite growth *in vitro* (Cranmer *et al.* 1999) and which is used by the group of Huber *et al.* (2002)) induced similar effects on whole-cell currents in malaria-infected cells. Therefore the effects of both V_H and residual serum components binding to the malaria-infected RBC could explain the outwardly rectifying conductance phenotype reported by Huber *et al.* (2002).

The physiological importance of these effects

It is clearly possible that the effects of both membrane potential and serum underlie physiological processes that are important to the malaria parasite. Our study shows that quite small changes in holding potential can affect significantly the amplitude and kinetics of the whole-cell conductance of malaria-infected RBCs. The recently reported model for the malaria-infected RBC by Lew *et al.* (2003) predicts that as the parasite matures the RBC membrane potential drops from approximately -12 mV to -14 mV before increasing again to -2 mV (V. L. Lew, personal communication). With this in mind, variations in the membrane potential of the host plasma membrane in infected RBCs may modulate NPP activity. Furthermore, as stated above, the presence of serum components are a prerequisite for parasite growth. Therefore, one possible role for serum *in vivo* and *in vitro* is the proper maintenance of the NPP.

Conclusions

Here we have reported that both changing the holding potential and the addition of serum to the bathing solution can drastically affect the whole-cell conductance of malaria-infected RBCs recorded under voltage clamp. These observations may well help to explain why different conductance phenotypes have been described recently by a number of groups. However, at present the mechanisms underlying these phenotype changes are not understood, neither is their physiological relevance.

REFERENCES

- Cranmer SL, Magowan C, Liang J, Coppel RL & Cooke BM (1997). An alternative to serum for cultivation of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**, 363–365.
- Desai SA, Bezrukov SM & Zimmerberg J (2000). A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* **406**, 1001–1005.
- Egee S, Lapaix F, Decherf G, Staines HM, Ellory JC, Doerig C & Thomas SL (2002). A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Physiol* **542**, 795–801.
- Huber SM, Uhlemann AC, Gamper NL, Duranton C, Kremsner PG & Lang F (2002). *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl^- channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J* **21**, 22–30.
- Kirk K (2001). Membrane transport in malaria-infected erythrocytes. *Physiol Rev* **81**, 495–537.
- Kirk K & Horner HA (1995). In search of a selective inhibitor of the induced transport of small solutes in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: effects of arylaminobenzoates. *Biochem J* **311**, 761–768.
- Kirk K, Horner HA, Elford BC, Ellory JC & Newbold CI (1994). Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J Biol Chem* **269**, 3339–3347.
- Kirk K, Horner HA & Kirk J (1996). Glucose uptake in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is an equilibrative not an active process. *Mol Biochem Parasitol* **82**, 195–205.
- Kirk K, Horner HA, Spillett DJ & Elford BC (1993). Glibenclamide and meglitinide block the transport of low molecular weight solutes into malaria-infected erythrocytes. *FEBS Lett* **323**, 123–128.
- Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H & Cabantchik ZI (1987). On the mode of action of phlorizin as an antimalarial agent in in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* **36**, 123–129.
- Lambros C & Vanderberg JP (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* **65**, 418–420.
- Lew VL, Tiffert T & Ginsburg H (2003). Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* **101**, 4189–4194.
- Pasvol G, Wilson RJ, Smalley ME & Brown J (1978). Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann Trop Med Parasitol* **72**, 87–88.
- Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches R, Nash G, Marsh K & Newbold CI (1992). Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* **357**, 689–692.
- Sasaki N, Mitsuiye T, Noma A & Powell T (1999). Sarcomere length and contraction in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch* **437**, 804–811.
- Trager W & Jensen JB (1978). Cultivation of malarial parasites. *Nature* **273**, 621–622.

Acknowledgements

This work was supported by the Wellcome Trust (Grant Nos. 066067 and 071662), the French Ministry of Research (PAL+ and PRFMIP programmes), the French Ministry of Defence (DGA), the WHO/UNDP/World Bank TDR programme, the Foundation Langlois and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (La 315/11-1).

Conclusions et Perspectives



CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Le présent chapitre s'articule autour de deux points :

- Dans le premier, nous étudierons les éléments de réponse qui nous permettent de supposer que les canaux Cl^- de faible conductance de la membrane des globules rouges humains s'apparentent aux canaux CFTR.

- Dans la seconde partie, nous chercherons à définir la relation qui lie ces canaux à l'augmentation de la perméabilité membranaire induite lors du développement de *Plasmodium falciparum* dans une cellule hôte.

Enfin, nous conclurons cette étude par quelques perspectives dans le but d'approfondir notre compréhension de ces canaux anioniques et leurs implications possibles dans des pathologies telles que la mucoviscidose et le paludisme.

	CFTR-like	PESAC Desai <i>et al.</i>	Conductance rectifiée entrante Huber <i>et al.</i>	Conductance rectifiée sortante Huber <i>et al.</i>
Conductance Globale	~ 10 000 pS	~ 10 000 pS	$\gamma_{entrante}$: 7000 pS $\gamma_{moyenne}$: 10 000 pS	$\gamma_{sortante}$: 18 000 pS
Relation I/V en <i>whole-cell</i>	rectifiée entrante	rectifiée entrante	rectifiée entrante	rectifiée sortante
Fréquence d'observation	100 %	100 %	13.7 %	86.7 %
Conductance unitaire	12-15 pS (<i>inside-out</i>) 18 pS (<i>cell-attached</i>)	< 10 pS	non mesurée	non mesurée
Relation I/V	linéaire	linéaire	non mesurée	non mesurée
Perméabilité	I ⁻ >NO ₃ ⁻ >Br ⁻ ≥ Cl ⁻ > F ⁻ >gluconate	SCN ⁻ >I ⁻ >Br ⁻ >Cl ⁻ > acétate>lactate> glutamate	I ⁻ >SCN ⁻ ~ Br ⁻ ≥ Cl ⁻ > lactate>gluconate	I ⁻ >SCN ⁻ ~ Br ⁻ ≥ Cl ⁻ >lactate>gluconate
Inhibiteurs	NPPB, acide niflumique, glibenclamide, furosémide, DPC, tamoxifène, DIDS *, PKI, phosphatase alcaline	furosémide, glibenclamide, acide niflumique, NPPB, DIDS*, phloridzine	IC ₅₀ : > 1 µM NPPB > 100 µM DIDS > 1mM glibenclamide > 10 µM furosémide	IC ₅₀ : NPPB 100 nM DIDS 1-10 µM glibenclamide 1-10 µM furosémide 1-10 µM
Modulateurs	PfPKA _C ?	parasite-encoded	oxydation	oxydation

Tableau 6. : Comparaison des caractéristiques électrophysiologiques des différents canaux observés dans la membrane de globules rouges infectés par le parasite *Plasmodium falciparum*.
(PESAC : *Plasmodial Erythrocyte Surface Anion Channel* ; * : très faible effet du DIDS testé à une concentration de 100 µM).



1. Le canal anionique de faible conductance linéaire est-il un canal CFTR ?

Les canaux ioniques de par leur diversité, les nombreux rôles physiologiques qu'ils remplissent et la grande variété des mécanismes qui les contrôlent (en adéquation avec leurs fonctions), sont des éléments fondamentaux dans le fonctionnement cellulaire (Ashcroft, 2000). Les canaux chlorure ne dérogent pas à cette règle (Jentsch *et al.*, 1999; Nilius et Droogmans, 2003), aussi, peut-on se demander quel est leur rôle au sein de cellules, telles que les globules rouges, qui présentent une très forte perméabilité anionique ($25 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$, Bennekou, 1984;1999), et une conductance chlore théorique de 43 pS (Bennekou, 1999) valeur similaire à celle que l'on a pu décrire pour des globules rouges en condition d'équilibre (44 ± 1 pS).

Le **tableau 5**, regroupe les caractéristiques globales du canal anionique que nous avons étudié, ainsi que celles des principaux autres canaux chlorure connus et présents dans de très nombreux types cellulaires. Seuls, les canaux de type CFTR, certains CIC, calcium-dépendants (CaCl) et *ligand-gated* présentent une conductance proche de celle que nous avons mesuré (en *cell-attached* ou en *inside-out*). Parmi ces 4 candidats potentiels, seuls les canaux CFTR présentent une relation courant-voltage systématiquement linéaire de l'ordre de 10 pS (Berger *et al.*, 1991; Dawson *et al.*, 1999; Sheppard et Welsh, 1999), notons toutefois que la plupart des canaux CIC n'ont jamais été observés en *single channel recording*. Du point de vue pharmacologique, le canal que nous avons observé est sensible aux mêmes inhibiteurs que d'autres canaux chlorure, cependant, comme le rappellent Taddei *et al.*, (2004) le NPPB, le DPC, l'acide niflumique et la glibenclamide, bien qu'étant des inhibiteurs connus du CFTR (Sheppard et Robinson, 1997, Schultz, 1999, Gupta et Linsdell, 2002; Hwang et Sheppard, 1999; Sheppard et Welsh, 1999), agissent également sur d'autres canaux comme le prouve le **tableau 5**. Néanmoins, la glibenclamide est considérée comme un inhibiteur sélectif des canaux CFTR (Hwang et Sheppard, 1999;

Conclusions et Perspectives

Sheppard et Welsh, 1999, Schultz, 1999) du fait de la faible IC_{50} obtenue avec ce composé par rapport à celle mesurée sur d'autres types de canaux anioniques. Le canal Cl^- de faible conductance est également sensible à cette substance, ce canal présente donc de fortes similitudes avec le profil pharmacologique d'un canal CFTR.

De la même manière, tous deux nécessitent la mise en place d'une cascade d'activation AMP_c dépendante mettant en jeu la sous-unité catalytique de la PKA qui nécessite la présence d'ATP pour fonctionner (Berger *et al.*, 1991; Sheppard et Welsh, 1999; Gadsby et Nairn, 1999). Néanmoins, il convient de noter que certains auteurs ont également observés une telle activité anionique dépendante de la protéine kinase A qu'ils ont attribué à l'activité d'un canal CIC-2 (Kajita *et al.*, 2000). La conductance décrite dans ces travaux possède les mêmes caractéristiques de rectification entrante et de sélectivité anionique que celles que nous avons observé lors de l'analyse de la conductance membranaire anionique des érythrocytes. Toutefois, il convient de noter que la pharmacologie de la conductance décrite dans le plexus choroïde²¹ de porc est caractéristique des canaux CIC-2 car elle est faiblement sensible aux inhibiteurs de canaux chlorure tels que le DIDS, le NPPB ou la glibenclamide (Jentsch *et al.*, 2002), ce qui n'est pas le cas dans notre étude. En revanche, cette conductance est inhibée par les cations divalents comme le Zn^{2+} , qui sont considérés comme des inhibiteurs du CIC-2. Dans la présente étude ce cation métallique s'est révélé sans effet sur les courants activés par la PKA (données non présentées). De plus, on notera que Jentsch (2002) remet en question l'appartenance de ce canal à la famille des CIC-2, en effet, l'activation de canaux CIC par la PKA_c rapportée par Kajita *et al.*, (2000), constitue un cas exceptionnel dans la littérature. Par ailleurs, les canaux CIC ont la particularité de posséder deux pores de conduction par canal (*double-barreled structure*, Teulon et Vandewalle, 2002), or, nous n'avons jamais observé un tel mode de fonctionnement. De plus, les *western-blots* réalisés avec un anticorps polyclonal dirigé contre la partie C-

²¹ L'épithélium du plexus choroïde forme une barrière sélective entre le système nerveux et le sang, il sécrète le liquide cébrospinal baignant les ventricules cérébraux.

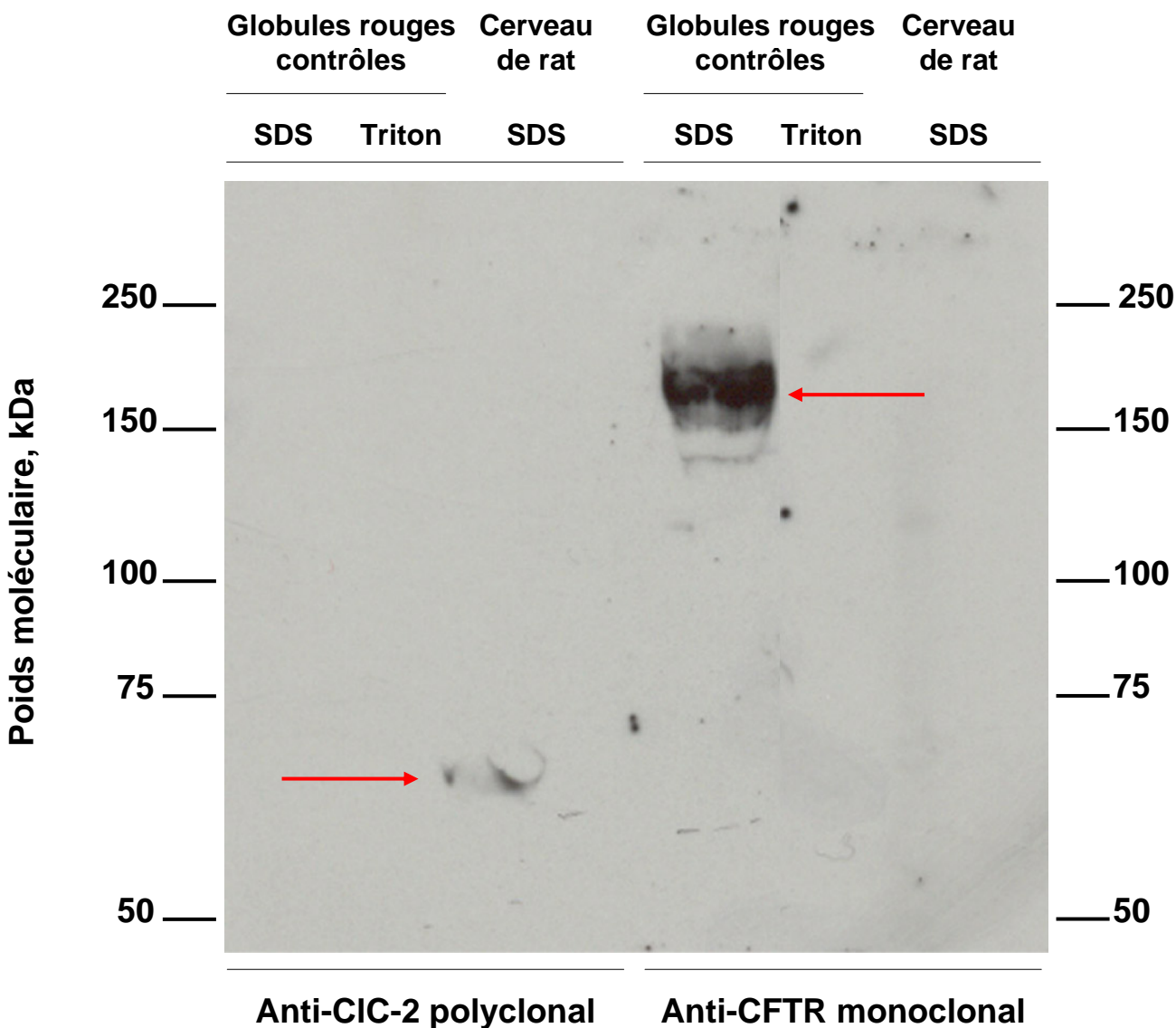


Figure 37. : Détection de protéines CIC-2 et CFTR dans des extraits membranaires de globules rouges contrôle et de cerveau de rat. Ces extraits protéiques sont obtenus à la fois par des traitements en conditions dénaturantes (SDS) mais aussi en conditions non dénaturantes (Triton). Deux types d'anticorps sont utilisés à une dilution de 1/400^{ième} : un anticorps monoclonal anti-CFTR et un anticorps polyclonal anti-CIC-2. Les flèches indiquent les protéines détectées (temps d'exposition de 2 minutes, gel à 7.5%).

Conclusions et Perspectives

terminale du canal CIC-2, ne nous ont pas permis de déceler la présence de ce type de canal dans les extraits membranaires de globules rouges contrôle, alors qu'il était possible de détecter une protéine de 80 kDa dans des extraits de cerveau de rat, tissu naturellement riche en CIC-2 (**Fig. 37**). Il est donc peu probable que le canal que nous avons étudié appartienne à la famille des canaux CIC.

La séquence de sélectivité d'un canal CFTR ($\text{Br}^+ > \text{Cl}^- > \text{I}^-$) (Sheppard et Welsh, 1999; Anderson, 1991) diffère de celle que nous avons déterminé ($\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$). Néanmoins, les protéines CFTR sauvages (ou *Wild-type*, WT) exprimées dans des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) transfectées, présentent, en conditions bi-ioniques, une séquence de sélectivité altérée ($\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$) (Tabcharani *et al.*, 1997), identique à celle que nous observons. Ainsi, dans certaines conditions ioniques, la perméabilité des CFTR peut être modifiée. Selon Reddy et Quinton (2003), la sélectivité ionique, les modes d'activation du CFTR, observés dans les tissus natifs peuvent différer de ceux constatés en culture *in vitro*. La plupart des études concernant les canaux CFTR sont réalisées sur des cellules épithéliales maintenues en culture (ex : T84, Calu-3, HT-29...) et sur des lignées cellulaires transfectées (ex : CHO, BHK, EX4N, ...), ces cellules doivent subir des traitements plus ou moins drastiques afin d'être individualisées en vue d'être utilisées en *patch-clamp*. Ces traitements peuvent éventuellement avoir un effet sur les différents paramètres électrophysiologiques enregistrés. A l'opposé, les globules rouges, bien que faisant partie intégrante du tissu sanguin, ne s'organisent pas en épithélium et ne sont pas adhérents, aussi de tels traitements sont inutiles. Ces caractéristiques font des érythrocytes un excellent modèle expérimental car même maintenus *in vitro*, leur intégrité cellulaire est préservée et leurs capacités de transport membranaire demeurent intactes.

Les différences observées entre les cellules contrôle et les cellules CF constituent également un argument en faveur de la présence de CFTR dans la membrane des érythrocytes humains. Tout d'abord, l'application de forskoline (en *cell-attached*) dans le milieu extracellulaire ou de PKA_c et d'ATP au niveau de la face cytosolique du *patch* (en

Conclusions et Perspectives

inside-out), permet l'enregistrement de courants anioniques identiques dans les deux types cellulaires (conductance linéaire d'environ 10 pS pour toutes les conditions expérimentales testées). Cependant, la cinétique de ces canaux varie selon les cellules considérées. Ainsi, les canaux des cellules CF, activés par la forskoline, présentent un temps de fermeture plus long que ceux des cellules contrôle. Les travaux de Dalemans (1991), réalisés sur des cellules VERO²², transfectées avec le gène codant pour les formes sauvage (WT) et $\Delta F508$ de la protéine CFTR, partagent de nombreuses similitudes avec nos résultats. Ainsi, l'utilisation d'AMP_c leur a permis d'activer les deux formes de canaux (WT et muté). Ces derniers présentent le même courant unitaire caractérisé par une faible conductance linéaire. Néanmoins, la probabilité d'ouverture des canaux « $\Delta F508$ » est plus faible que celle des canaux WT. Cette différence résulte de la constante de temps de fermeture des canaux CFTR $\Delta F508$, qui est 5 fois plus grande que celle des CFTR WT (Dalemans *et al.*, 1991). Ces auteurs ont également étudié ces cellules en configuration *whole-cell*, en utilisant le même protocole d'activation, ils ont pu enregistrer une augmentation des courants membranaires globaux de 10 et de 2 à 3 fois dans des cellules exprimant respectivement le gène sauvage et muté de la protéine. Au cours de notre étude, dans la même configuration, en présence de PKA_c et d'ATP, nous avons également pu constater que les érythrocytes de patients $\Delta F508$ présentent une conductance globale deux fois moindre que celle des cellules contrôle.

Dans le cadre des expériences que nous avons réalisées tour à tour avec des globules rouges contrôle et CF, il nous a été possible d'enregistrer l'activité de courants chlorure activés par une voie AMP_c dépendante. La mutation $\Delta F508$ entraîne la délétion de la phénylalanine en position 508 (codée par l'exon 10) située dans le domaine NBD1. Cette mutation ne modifie pas le cadre de lecture et n'affecte en rien la liaison de l'ATP. Pourtant, cette mutation perturbe le repliement du domaine NBD1 et empêche la maturation complète

²² Lignée cellulaire de fibroblastes rénaux issus de singes verts africains.

Conclusions et Perspectives

de la protéine. Ainsi, les protéines CFTR $\Delta F508$ sont dégradées très tôt au cours de leur biosynthèse par le protéasome du réticulum endoplasmique, (Pasyk et Foskett, 1995; Lukacs, 1994; Scanlin et Glick, 1999), et seul un nombre infime de ces mutants est correctement adressé à la membrane plasmique, comme le confirment les *western-blots* que nous avons réalisés. En effet, à charge égale la quantité de protéines détectée dans les extraits issus de patients atteints de mucoviscidose est inférieure à celle retrouvée dans les extraits provenant de patients contrôle. Cependant nous ne savons pas pourquoi le poids moléculaire des protéines détectées est plus élevé (environ 190-200 kDa) que celui rencontré dans des cellules épithéliales (compris entre 170 et 180 kDa, Lukacs *et al.*, 1994; Frizzell, 1995). Ceci est peut-être lié à la nature même des globules rouges ou comme nous le verrons plus loin à une modification structurale de la protéine « CFTR épithéliale classique » pour lui permettre d'interagir avec le cytosquelette de la cellule ou encore cela peut résulter d'une glycosylation particulière dépendante de la structure spécifique de la membrane érythrocytaire. Toutefois, les quelques rares canaux $\Delta F508$ correctement adressés à la membrane fonctionnent comme les autres canaux chlorure activés par l'AMP cyclique (Drumm *et al.*, 1991; Bear *et al.*, 1992; Riordan, 1993; Frizzell, 1995). L'ensemble de ces données confirme nos observations (expériences en *whole-cell*, ainsi que les *western-blots*), la membrane des érythrocytes de patients CF présente une activité CFTR réduite. Ainsi, la mutation $\Delta F508$, entraîne une diminution du nombre de canaux CFTR correctement adressés à la membrane plasmique mais n'affecte en rien leur fonctionnement. Néanmoins, les éléments de réponse apportés par ces travaux résultent d'expériences réalisées dans des systèmes cellulaires où il existe un *turn-over* important des canaux CFTR, ce qui n'est pas le cas des globules rouges qui ne peuvent plus synthétiser de nouvelles protéines et ne possèdent plus de mécanismes de dégradation comme les lysosomes. Il est donc probable que le stock définitif de protéines CFTR soit entièrement constitué avant d'atteindre le dernier stade de différenciation (*i.e.* érythrocyte). La

Conclusions et Perspectives

constitution d'un tel stock expliquerait l'activité de canaux CFTR enregistrée dans la membrane des érythrocytes CF, comme c'est le cas des œufs de xénope exprimant la mutation $\Delta F508$ (Drumm *et al.*, 1991) où la production protéique est plus importante que, par exemple dans les cellules épithéliales respiratoires, où la synthèse de nouvelles protéines, bien que continue, ne permet pas de compenser l'importante lyse de ces dernières au niveau du réticulum endoplasmique (Hwang *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1989).

Enfin, l'activité ou la présence de canaux CFTR ont pu être détectées dans des types cellulaires plus proches des cellules que nous étudions. Ainsi, les cellules K562, une lignée de cellules leucémiques, capables de se différencier en érythroïdes (Assef *et al.*, 2003) présentent une activité CFTR. De même, Verloo et collaborateurs (Verloo *et al.*, 2004) détectent par RT-PCR, de faibles niveaux d'ARN_m de CFTR dans les érythroblastes²³ isolés par ponction de moelle osseuse de donneurs CFTR (+/+). Néanmoins, ces auteurs présentent des résultats obtenus en *whole-cell* sur des hématies humaines contrôle et CF, en totale contradiction avec nos résultats. Selon ces derniers, les globules rouges WT, sont les seuls à présenter une activité CFTR mesurable en présence de 110 mM CsCl de part et d'autre de la membrane et de 2 mM d'ATP dans la solution de pipette. Or, comme le rappellent Sheppard et Welsh (1999), l'application d'ATP seul au niveau de la face cytosolique du canal est sans effet, sauf si la protéine a été phosphorylée au préalable par la PKA_c, ce qui n'est pas le cas dans les expériences menées par Verloo et collaborateurs, ceci lié à l'absence d'enregistrements unitaires ne nous permet pas de conclure que Verloo *et al.*, mesurent l'activité de canaux CFTR.

De plus, les canaux anioniques présents dans la membrane des érythrocytes CF et contrôle présentent une mécano-sensibilité. En effet, il est possible de les activer en absence de stimulation AMP_c dépendante, en induisant une déformation membranaire par le

²³ Cellules nucléées précurseurs des érythrocytes.

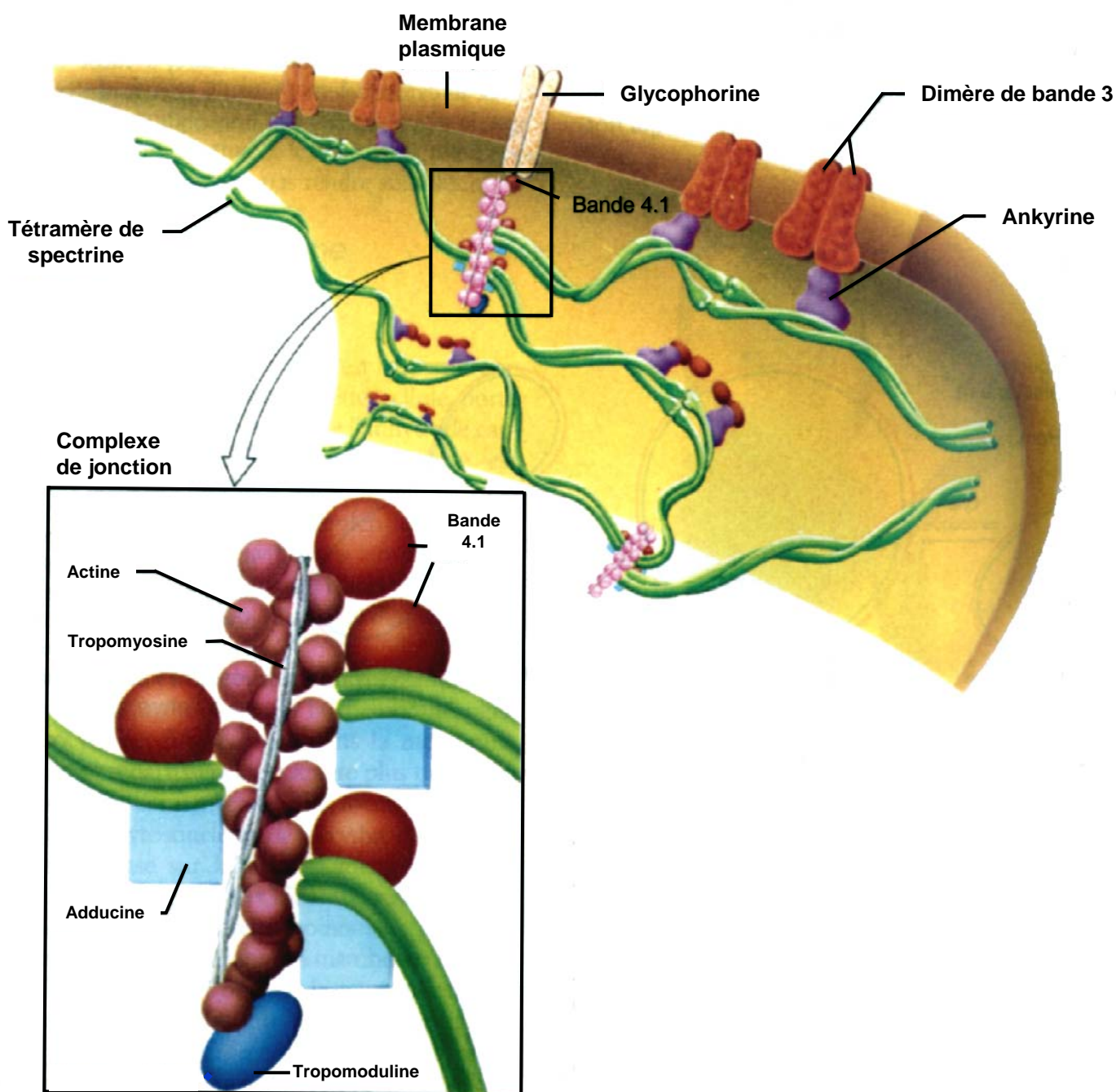


Figure 38. Représentation schématique de l'organisation présumée des principales protéines du cytosquelette érythrocytaire ainsi que de leurs interactions avec la protéine de la bande 3 et la glycophorine. Tiré de Lodish *et al.*, (1997), d'après Luna et Hitt, (1992).

biais d'une dépression calibrée appliquée à l'intérieur de la pipette de *patch*. Bien qu'il existe d'autres canaux anioniques mécano-sensibles, cette caractéristique n'a jamais été observée à propos de canaux CFTR présents dans la membrane de cellules épithéliales ou transfectées. Cette propriété « exclusive » aux globules rouges, semble être directement liée à la très grande déformabilité de ces cellules sanguines, indispensable à leur circulation dans l'intégralité du système vasculaire. Les travaux menés au sein du groupe dirigé par Cantiello (Prat *et al.*, 1999; Cantiello, 2001b; Chasan *et al.*, 2002) mettent cependant en évidence l'existence d'une relation directe entre le CFTR et les filaments d'actine qui constituent le cytosquelette. Ainsi, des cellules issues d'une lignée humaine de mélanomes génétiquement dépourvus de la protéine ABP-280²⁴ et exprimant la protéine CFTR WT (ABP (-) / CFTR (+)), utilisées en *patch-clamp*, ne présentent pas d'activité canalaire. L'ajout de 30 nM de filamine au niveau de la face cytosolique du canal (en *inside-out*), permet de stimuler l'activité de canaux Cl⁻, de la même façon qu'en présence de PKA et d'ATP. Les observations réalisées en AFM (*Atomic Force Microscopy*), par ces mêmes auteurs, montrent que la filamine vient s'agréger au niveau de la face cytosolique des canaux CFTR pour y former un réseau. De plus, le cytosquelette est en étroite relation avec la membrane plasmique des globules rouges, aussi est-il garant du maintien des propriétés rhéologiques de ces derniers, mais également du fonctionnement de certaines protéines comme la bande 3 à laquelle il est attaché par l'intermédiaire de l'ankyrine et de la spectrine (**Fig. 38**, Lux, 1979; Luna *et al.*, 1992). Ces informations confirment la possibilité selon laquelle le canal est sensible à la déformation membranaire, du fait de l'étroite relation qui le lie au cytosquelette par l'intermédiaire des filaments d'actine.

Sprague et ses collaborateurs (Sprague *et al.*, 1998; Sprague *et al.*, 2001; Olearczyk, 2001; Sprung, 2002; Sprague *et al.*, 2002) ont tenté d'établir une corrélation entre la déformabilité des globules rouges face à des stress mécaniques, comme ceux qu'ils subissent lors de leur passage dans les capillaires sanguins, et le rôle physiologique de canaux CFTR. Dans un

²⁴ Cette protéine appartient à la famille des filamines, ce sont des homologues de l'actine.

Conclusions et Perspectives

premier temps, ils ont fait passer des érythrocytes contrôle et CF à travers des filtres dont les pores étaient de diamètre calibré. Seules les cellules contrôle répondent à cette déformation en libérant de l'ATP dans le milieu extracellulaire. Cette libération d'ATP est potentialisée lors de l'utilisation de forskoline, ce qui implique une voie d'activation AMP_c dépendante. Cette dernière est liée à l'activité de protéines G_i , dont certaines sous-unités peuvent activer les adénylates cyclases de type II et IV. Des résultats similaires, obtenus sur des cellules T84²⁵, rapportés par Grygorczyk et Hanrahan (1997), corroborent les observations de Sprague et de ses collaborateurs. Cependant, ces travaux ne permettent pas de savoir si l'ATP est directement transporté par les CFTR ou si ces derniers régulent l'activité d'autres canaux en charge de ce transport. Si certains auteurs considèrent que les canaux CFTR sont aptes à transporter cette molécule (Reisin *et al.*, 1994; Cantiello, 2001a), d'autres considèrent que c'est impossible (Li *et al.*, 1996; Braunstein *et al.*, 2001). Aussi, à l'heure actuelle, l'hypothèse selon laquelle les protéines CFTR seraient directement impliquées dans le flux sortant d'ATP demeure controversée (Devidas et Guggino, 1997, Abraham, 1997). Aussi, avons-nous utilisé la technique du *patch-clamp* pour tenter de répondre à cette question. Afin de s'assurer de la présence de canaux actifs sous la pipette de *patch* contenant une solution de 100 mM d'ATP, les cellules CF et contrôle furent incubées au préalable en présence de forskoline (50 μ M). Dans un premier temps, il a été possible d'enregistrer l'activité de canaux présents dans les deux types cellulaires, en configuration *cell-attached*. La même activité persiste, après excision, en conditions symétriques d'ATP. La conductance ainsi calculée, pour les deux types cellulaires, est linéaire et atteint approximativement 10 pS. Ces observations indiquent qu'un seul canal est impliqué dans le transport de l'ATP, il est activé par la forskoline et présente une conductance similaire à celles obtenues avec d'autres protocoles expérimentaux. Cependant, comment expliquer que Sprague *et al.*, n'observent pas de diffusion d'ATP dans le milieu extracellulaire lorsqu'ils utilisent des cellules CF ? Deux arguments peuvent permettre de répondre à cette question.

²⁵ Ces cellules expriment de grandes quantités de CFTR.

Conclusions et Perspectives

Tout d'abord nous avons incubé les érythrocytes en présence de forskoline avant de les utiliser, cette étape de préphosphorylation permet d'activer les canaux au préalable. Ensuite, l'ajout d'ATP au niveau de la face cytosolique (en configuration excisée) permet de maintenir cette activité (Szellas et Nagel, 2003). De plus, pour réaliser nos enregistrements nous sommes amenés à tester différentes valeurs du potentiel membranaire, en modulant de la sorte ce paramètre, nous agissons sur le gradient électrochimique d'ATP et créons des conditions optimales à son passage à travers le canal. Ainsi, comme le prouve la relation courant-voltage de la **figure 32 E**, au potentiel spontané de membrane aucune activité n'est enregistrable.

L'ATP est une molécule présente à une concentration comprise entre 1 et 3 mM dans le cytoplasme des globules rouges humains (Sprague *et al.*, 1998; Sprague *et al.*, 2001). Cette molécule est vitale pour la survie des érythrocytes qui en font une grande consommation afin de préserver l'intégrité de leurs fonctions cellulaires, aussi l'export d'une telle substance peut représenter un coût énergétique conséquent pour la cellule. Cependant, les quantités exportées restent infimes. En effet, les concentrations d'ATP plasmatique sont respectivement d'environ 1 μM et 1.70 μM pour un individu en bonne santé et pour un individu porteur de la mutation ΔF508^{26} (Lader *et al.*, 2000). Ainsi, le gradient de concentrations est tellement important entre le cytoplasme et le plasma, qu'une infime quantité d'ATP libérée se révèle suffisante pour activer l'ensemble des récepteurs purinergiques présents dans l'environnement de la cellule (Schwiebert et Zsembergy, 2003). Dans ce cas, l'ATP peut être considéré comme une hormone (car il est transporté dans tout l'organisme par les globules rouges) autocrine puisqu'il peut stimuler les récepteurs purinergiques ou les transporteurs à nucléosides (comme NT1) de la cellule dont il est issu (Devidas et Guggino, 1997; Abraham, 2001), ou paracrine (Abraham *et al.*, 2001). L'ATP peut jouer le rôle de médiateur dans les mécanismes de réponses inflammatoires, ainsi le

²⁶ Abraham *et al.*, (2001) considère que ces taux d'ATP plasmatiques plus élevés que la normale, résulte de l'expression réduite d'ecto-apyrase (CD39) qui normalement hydrolysent l'ATP présent dans le milieu extracellulaire.

Conclusions et Perspectives

teneur élevée en ATP plasmatique de personnes atteintes de mucoviscidose expliquerait en partie l'inflammation des voies respiratoires dont ces personnes souffrent (Lader *et al.*, 2000). De plus, l'ATP est un puissant vasodilatateur qui se fixe à certains récepteurs purinergiques présents à la surface des cellules endothéliales qui tapissent l'intérieur des capillaires sanguins. En réponse, ces cellules libèrent un facteur appelé EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*, Furchgott et Zawadzki, 1980). Ainsi la libération d'ATP par les érythrocytes, lorsqu'ils passent à l'intérieur de capillaires de faible diamètre, contrôle le tonus vasculaire. Enfin, Abraham (2001) considère que les érythrocytes, en libérant ainsi de l'ATP dans leur environnement, participent au transport de purines entre le foie et les différentes structures épithéliales qui bordent les tissus des différents organes.

Lorsque nous avons entrepris cette étude, peu d'informations étaient disponibles sur les canaux chlorure présents dans la membrane des érythrocytes humains. Seuls quelques rares travaux faisaient états de leur existence, sans en apporter de preuves électrophysiologiques. En utilisant cette approche, nous avons pu caractériser deux canaux anioniques dans la membrane des globules rouges. Le premier décrit est un canal de type ORCC. La fonction de ce canal n'a pu être étudiée du fait de sa rareté et aucun activateur testé jusqu'à présent n'a permis d'augmenter sa fréquence d'observation. Le second canal, beaucoup plus fréquent, doit être phosphorylé par une kinase AMP_c dépendante pour être actif. Les données que nous avons accumulées au cours de nos recherches, tant par des méthodes électrophysiologiques que biochimiques, forment un faisceau de présomption en faveur d'un canal de type CFTR. Cependant, la *stretch-activation* semble être une propriété exclusive de ces canaux, directement liée à la grande déformabilité des érythrocytes. Du fait de cette propriété, nous utiliserons le terme de CFTR-like pour désigner ces canaux.

Enfin, nous mettons également en évidence que ces canaux offrent une nouvelle fonction aux globules rouges, qui vient s'ajouter à celle du transport de l'oxygène : le transport d'ATP.

2. Existe t'il une relation entre les canaux CFTR-like de la membrane des globules rouges humains et la nouvelle voie de perméabilité induite par *Plasmodium falciparum* ?

Après avoir envahi un globule rouge, *Plasmodium falciparum* remodèle sa cellule hôte afin d'achever son cycle de développement érythrocytaire en 48 heures. Une croissance aussi rapide implique d'importants besoins métaboliques ainsi qu'une forte production de catabolites. Pour faire face à ses besoins croissants, le parasite est capable de sur-activer certains des transporteurs présents dans la membrane plasmique de son hôte. Malgré cela, ces transporteurs se révèlent insuffisants ou ne sont pas aptes à transporter certains éléments indispensables au parasite dont les transporteurs spécifiques sont par ailleurs, pour certains, absents de la membrane du globule rouge (pour revue, Kirk, 2001). Ainsi, une nouvelle voie de perméabilité (NPP) membranaire apparaît dans la membrane des cellules infectées quelques heures après l'infection. Cette dernière est perméable à une large gamme de solutés organiques et inorganiques et semble indispensable à la croissance du parasite. La caractérisation de ce NPP par les techniques de flux isotopiques permet d'en définir le taux de transfert et la sélectivité pour différents solutés ainsi qu'un profil pharmacologique. Ces résultats conjointement associés aux observations basées sur la méthode de lyse isosmotique en présence de sorbitol, permettent d'établir que cette voie de transport présente les caractéristiques d'un canal anionique (Kirk *et al.*, 1993; Kirk *et al.*, 1994). Grâce à l'utilisation de la technique du *patch-clamp*, nous mettons clairement en évidence que les globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum* possèdent une conductance membranaire globale supérieure à celle des cellules non infectées. Nous attribuons cette augmentation de la conductance membranaire à l'activation d'un canal Cl^- , de 12 pS de conductance unitaire et dont la probabilité d'ouverture augmente avec l'hyperpolarisation de la membrane. Cette activité accrue aux potentiels de membrane négatifs explique la rectification entrante des courbes I/V construites à partir des

Conclusions et Perspectives

enregistrements réalisés en *whole-cell* (**Tab. 6**). Ce canal, spontanément actif dans la membrane des érythrocytes infectés, est le seul que nous ayons pu observer au cours de cette étude, aussi peut-on le considérer comme un bon candidat pour prétendre au titre de NPP. Néanmoins, d'autres travaux, utilisant la même approche électrophysiologique, ne nous permettent ni d'affirmer que ce canal est le seul à être activé au cours de l'infection (Huber *et al.*, 2002b), ni de préjuger de manière catégorique que ce canal est une protéine propre à la cellule hôte, dont l'activité est dérégulée par le parasite (Desai *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2003). En effet, l'analyse de la conductance membranaire globale réalisée, en *whole-cell* sur des cellules infectées, au sein du groupe de Stephan Huber, met en évidence l'existence de deux conductances dont les profils de rectification et la pharmacologie diffèrent (**Tab. 6**). La première, rectifiée entrante, est en tous points comparable à celle que nous décrivons dans la présente étude. Ainsi, la pharmacologie et la séquence de sélectivité de cette conductance sont identiques à celles que nous observons. En revanche, dans 84% des cellules testées par ce groupe, les enregistrements sont dominés par une conductance rectifiée sortante présentant une sensibilité accrue au NPPB (Huber *et al.*, 2002b). Ce groupe attribue ces deux conductances aux forts stress oxydatifs qui surviennent lors de l'infection d'un globule rouge par *Plasmodium falciparum*. Par ailleurs, ce groupe considère la conductance rectifiée sortante comme un excellent prétendant pour représenter le NPP (Huber *et al.*, 2002b), car elle est perméable aux anions organiques et vraisemblablement aux osmolytes non chargés comme le sorbitol (Huber *et al.*, 2002a). Toutefois, il convient de noter que ces travaux sont les seuls dans la littérature à mettre en évidence une telle voie de conductance. Au cours de nos recherches nous avons démontré que cette dernière résulte très probablement des paramètres expérimentaux utilisés par ce groupe. Effectivement, un profil de rectification sortante peut être observé lorsque des potentiels de maintien négatifs (< -20 mV) sont imposés. Ces potentiels désactivent de manière *time-dependent* (< 200 ms) la conductance entrante et élicitent la conductance sortante. Ce phénomène peut également être observé en présence de sérum ou de tout autre composé riche en protéines et lipides

(provenant du milieu de culture comme l'albumax II ou le plasma) dans l'environnement extracellulaire de la cellule (voir chapitre 3). De plus, aucun autre type de canal n'a pu être observé au niveau unitaire (en *cell-attached* ou *inside-out*) lors du maintien prolongé de potentiels hyperpolarisants, et ce même en présence de sérum dans la solution de bain. Par ailleurs, l'usage de potentiels de maintien négatifs, en configuration *whole-cell*, comme cela est généralement pratiqué pour d'autres types cellulaires, est une condition totalement aphysiologique dans le cas des globules rouges infectés, car au cours du développement du parasite, les gradients transmembranaires pour le Na^+ et le K^+ s'annulent, réduisant ainsi le potentiel de membrane à une valeur nulle (0 mV ; Staines *et al.*, 2001 ; Lew *et al.*, 2003b).

En revanche, tout comme nous, le groupe de Stephan Huber, attribue la forte conductance décelée dans la membrane des cellules parasitées à la dérégulation de canaux présents dans la bicouche phospholipidique de globules rouges intacts. Cependant, le groupe de Sanjay Desai soutient une thèse contraire. Bien que ce dernier décrive, chez les érythrocytes infectés, une conductance globale (*whole-cell*) dont la relation courant-voltage rectifiée entrante est similaire à celle que nous décrivons, il attribue cette conductance à un seul type de canal dont la cinétique est, tout comme nous avons pu le constater, dépendante du voltage ($P_o=f(V)$, **Tab. 6**). Néanmoins, ce canal se distingue de celui que nous décrivons par sa conductance très inférieure à celle que nous avons mesuré (3 pS contre 12 pS, **Tab. 6**). Aucune explication ne nous permet à l'heure actuelle d'expliquer ces différences, si ce n'est d'évoquer la composition des solutions ioniques hautement aphysiologiques (1.15 M NaCl) utilisées par le groupe de Desai. Pourtant, en utilisant différentes concentrations de chlore, ils établissent une corrélation positive linéaire entre la conductance mesurée et la concentration en ions chlorure testée, ce qui indique que le canal répond bien à la loi d'Ohm. La seule hypothèse plausible est que le canal se comporte étrangement face à des concentrations extrêmement élevées en chlore. Enfin, ce groupe considère ce canal comme une xénoprotéine, c'est-à-dire une protéine synthétisée par la parasite et exportée à la membrane de la cellule hôte (Desai *et al.*, 2000; Cohn *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003).

Conclusions et Perspectives

L'identité moléculaire ainsi que l'origine de ce canal (s'agit-il d'une xénoprotéine dérivée du parasite ou d'une perméase endogène de l'hôte) restent encore controversées (Kirk, 2001; 2004). Selon, le modèle développé par Wagner *et al.*, (2003), le NPP résulterait de l'association de protéines membranaires plasmodiales avec la membrane de la cellule hôte. Ainsi, Wagner et collaborateurs, proposent l'appellation PESAC, *Plasmodial Erythrocyte Surface Anion Channel*, au lieu de NPP. Pourtant, il existe peu de preuves actuellement en faveur de ces modèles. Ainsi, l'analyse récente du génome de *Plasmodium falciparum*, bien que révélant la présence de séquences codantes pour des transporteurs membranaires, ne présente pas de signatures de canaux anioniques connus (Gardner *et al.*, 2002).

Huber *et al.*, (2002), démontrent que l'oxydation de cellules non infectées induit une hémolyse et des conductances similaires à celles observées dans les cellules parasitées. De la même manière, nous mettons en évidence qu'une telle conductance peut être activée, en *whole-cell*, dans la membrane des globules rouges en présence de PKA_c. Ces arguments favorisent l'hypothèse selon laquelle le NPP résulte de la prise de contrôle, par le parasite, de transporteurs endogènes propres à l'hôte. Aussi peut-on se demander si les canaux CFTR-*like* décrits dans la membrane des érythrocytes non infectés participent à la formation de la nouvelle voie de perméabilité induite par *Plasmodium* ?

De façon étonnante, nous avons constaté que *Plasmodium falciparum* croît, *in vitro*, au même rythme dans les cellules CF qu'à l'intérieur des cellules contrôle, malgré le nombre réduit de canaux qu'elles possèdent. Les mesures d'incorporation d'hypoxanthine radiomarquée réalisées par Verloo *et al.*, (2004) confirment nos observations : le parasite a le même taux de croissance dans les deux types de cellules. De plus, tout comme les cellules contrôle infectées, les cellules CF présentent, en *cell-attached*, une activité canalaire spontanée très similaire. Aussi peut-on se demander si le nombre de canaux CFTR présents

A

	CFTR-like ?	CFTR	CIC(1-7)	VRAC	Ca ²⁺ dépendant	Ligand-gated
Conductance	10-12 pS	6-12 pS	1-9 pS	1-70 pS	1-70 pS	10-90 pS
Relation I/V	linéaire	linéaire	sous-type dépendante	rectifiée sortante	rectifiée sortante ou linéaire selon [Ca ²⁺]	dépendant du ligand
Perméabilité	I ⁻ >Br ⁻ >Cl ⁻	Br ⁻ >Cl ⁻ >I ⁻	dépendante du sous-type	I ⁻ >Br ⁻ >Cl ⁻	I ⁻ >Br ⁻ >Cl ⁻	I ⁻ >Br ⁻ >Cl ⁻
Inhibiteurs	NPPB, ac. niflumique, glibenclamide, DPC	NPPB, 9-AC, glibenclamide, DIDS*, DPC, suramine	dépendant du sous-type, incluant: DIDS, 9-AC	NPPB, DIDS, tamoxifène, ac. niflumique, 1,9-didéoxy- forskoline	NPPB, DIDS, ac. niflumique	dépendant du ligand, incluant: picrotoxine, cyanotriphenyl- borate
Modulateurs	forskoline, PKA _c , stretch- activation	forskoline, PKA _c , AMP _c , actine, phosphatases	dépendant du sous-type: gonflement cellulaire, pH, dépolarisation, hyperpolarisation, [Ca ²⁺] _{intracellulaire}	gonflement cellulaire	[Ca ²⁺] _{intracellulaire}	dépendant du ligand (ex: GABA, glycine,...)

B

	CIC-2
Conductance	2-3 pS
Relation I/V	rectifiée entrante**
Perméabilité	I ⁻ > Br ⁻ >Cl ⁻
Inhibiteurs	DIDS, 9-AC,NPPB, glibenclamide, Cd ²⁺ *, Ba ²⁺ *
Modulateurs	gonflement cellulaire, hyperpolarisation, pH _{extracellulaire} , PKA _c , Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)

Tableau 5. : Synthèse des principales caractéristiques électrophysiologiques du canal anionique de faible conductance présent dans la membrane des globules rouges humains :

A : Tableau comparatif des propriétés de canal par rapport à celle des autres types canaux anioniques les plus répandus. (On notera toutefois que les conductances de la plupart des canaux CIC et CaCl sont déterminées par transformées de Fourier à partir d'enregistrements en *whole-cell*, et ne résultent pas d'observations réalisées au niveau unitaire).

B : Carte d'identité du canal CIC-2 présent dans les cellules épithéliales issues du plexus choroïde de porc, décrit par Kajita *et al.*, (2000).

(*: application intracellulaire, **: en *whole-cell* ; CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*, VRAC: *Volume-Regulated Anion Channel*).

est suffisant pour permettre le développement de *Plasmodium falciparum* ou si ce dernier utilise d'autres canaux comme NPP ?

Tout comme dans le cas des cellules non infectées stimulées par la PKA_c, les conductances membranaires globales des cellules CF infectées sont de moitié inférieures à celles des cellules contrôle parasitées. Ces différences indiquent donc que non seulement *Plasmodium falciparum* utilise les canaux CFTR-like pour augmenter le flux des échanges à travers la membrane érythrocytaire, mais qu'il parvient à les activer plus efficacement que la sous-unité catalytique de la PKA d'origine bovine dont nous avons fait usage. En effet, les conductances des cellules infectées sont respectivement 3.6 et 3 fois plus importantes que celles obtenues lors de l'activation par la PKA_c sur des cellules non infectées CF et contrôle respectivement. De plus, ces conductances sont sensibles aux mêmes inhibiteurs que le NPP (Kirk *et al.*, 1993; Kirk et Horner, 1995a, **Tab. 2 A, Fig. 10 et 35**). Cependant, si elles partagent la même sensibilité au NPPB que ce dernier (IC₅₀ = 0.8 µM), elles sont moins sensibles à la glibenclamide (IC₅₀ de 35 µM contre 11 µM) et plus sensibles à l'acide niflumique (IC₅₀ de 2.5 µM contre 20 µM) que le NPP. Néanmoins de telles dissemblances peuvent être expliquées par certaines différences expérimentales. Tout d'abord, les souches utilisées ne présentent pas toutes la même sensibilité à ces substances. De plus, les IC₅₀ obtenues par les résultats obtenus par mesures de flux ou de lyse isosmotique sont réalisées dans des solutions dont la composition ionique est aphysiologique, or, les travaux de Tabcharani *et al.*, (1997) montrent que sous certaines conditions ioniques la perméabilité des canaux CFTR peut être modifiée, ainsi la sensibilité à certains inhibiteurs peut être altérée.

D'autre part, les canaux CFTR sont, tout comme le NPP, perméables à un certain nombre d'anions polyatomiques (NO₃⁻, HCO₃⁻, formate et acétate, Linsdell *et al.*, 1997), et surtout, ils peuvent transporter de nombreux solutés organiques de grande taille présents dans le milieu intracellulaire (Linsdell et Hanrahan, 1998a), c'est par exemple le cas du pyruvate qui est produit en grande quantité dans une cellule infectée. Le glutathion sous

Conclusions et Perspectives

forme réduite ou oxydée peut également traverser la membrane plasmique par l'intermédiaire de canaux CFTR (Linsdell et Hanrahan, 1998b). Or, *Plasmodium falciparum* génère 100 fois plus rapidement de ce tripeptide anionique que sa propre cellule hôte (Ginsburg et Kirk, 1998). Selon Kirk *et al.*, (1994), le NPP est d'avantage impliqué dans les flux sortants de catabolites que dans l'acquisition de nutriments. Aussi cette perméabilité asymétrique des canaux CFTR pourrait être utilisée par le parasite pour compenser les limitations de transporteurs endogènes tels que MCAT²⁷ et GSTP²⁸ dans l'export de ces solutés afin de bénéficier d'un environnement de croissance optimal, atoxique et osmotiquement stable.

Comme nous l'avons vu tout au long de cette étude, l'activation des canaux CFTR-*like* passe par des étapes de phosphorylations (le domaine R des canaux CFTR possède 9 sites de phosphorylation, (Riordan, 1993). Or, *Plasmodium falciparum* produit sa propre Protéine Kinase A (*Pf*PKA). Cette protéine est exprimée au cours de son développement (Syin *et al.*, 2001), au même titre que d'autres kinases, (Kappes *et al.*, 1999), dont certaines sont exportées vers la membrane plasmique de la cellule hôte (Chishti *et al.*, 1994; Kappes *et al.*, 1999; Droucheau *et al.*, 2004). Ainsi supposons-nous que *Plasmodium* utilise ses propres kinases afin de sur-activer les canaux chlorure de son hôte. Afin de vérifier cette hypothèse, deux substances ont été testées en *whole-cell* sur des globules rouges infectés. La phosphatase alcaline s'est révélée la plus efficace car elle inhibe complètement les courants membranaires, tandis que le PKI n'inhibe que 60% des courants enregistrés. Le PKI est l'inhibiteur naturel et spécifique de la PKA (de mammifère), ainsi les courants restants (40%) sont probablement dus au fait que le PKI n'interagit pas correctement avec son substrat d'origine plasmodiale. En effet, Anaïs Merckx et Christian Doerig (communication personnelle), ont pu constater au cours d'expériences de *pool down* que le

²⁷ Transporteur de monocarboxylate.

²⁸ Transporteur de glutathion.

Conclusions et Perspectives

PKI de mammifère n'inhibe que peu voire pas la sous-unité catalytique de la *Pf*PKA. Une autre hypothèse est que la PKA érythrocytaire est modifiée par le parasite (Syn *et al.*, 2001), ce qui altérerait son interaction avec le PKI, ce qui déplacerait l'équilibre PKAc-PKI dans le sens d'une suractivité de la PKA, rendant ainsi le canal constamment actif. Par contre la phosphatase alcaline qui agit de façon aspécifique, abolit complètement tout courant, ce qui permet de supposer que d'autres protéines plasmodiales, insensibles au PKI, pourraient également réguler son activité. Une hypothèse alternative peut également être proposée. En effet, précédemment, nous avons démontré que les canaux CFTR des globules rouges sont sensibles à la déformation membranaire, probablement du fait de l'étroite relation qui existe entre leurs domaines cytoplasmiques et les filaments d'actine qui forment le cytosquelette. Ce dernier, pour rester fonctionnel doit être phosphorylé (Lux, 1979). Chishti *et al.*, (1994), prouvent que certaines kinases du parasite interagissent avec la protéine 4.1, or, cette protéine fait partie intégrante du cytosquelette de la cellule hôte. Aussi peut-on supposer que l'activité canalaire spontanée des cellules infectées, résulte de la synergie d'au moins deux stimuli distincts. Le premier résulte des modifications apportées par certaines kinases du parasite, insensibles à la PKI, au niveau de la membrane plasmique et du cytosquelette sous-jacent de la cellule hôte. Ce premier stimulus combiné à la voie d'activation « classique » des canaux, conduite par la phosphorylation du domaine R par des kinases telles que la *Pf*PKA_c et/ou la PKA érythrocytaire (dont l'activité *in vitro* ne peut être régulée par *Pf*PKA_r, Anaïs Merckx et Christian Doerig, communication personnelle), explique la constante activité de ces canaux, et l'absence de *run-down* observée même en configuration excisée.

Les résultats que nous apportons ici viennent se ranger derrière l'hypothèse d'une origine endogène du NPP. Ainsi, les canaux CFTR-*like* permettent-ils d'expliquer une partie de l'augmentation de perméabilité aux solutés, notamment anioniques, à travers la membrane des érythrocytes humains envahis par *Plasmodium falciparum*. A la lumière de

nos dernières observations et du fait de la longue co-évolution entre l'espèce humaine et *Plasmodium* (rappelons que le paludisme touche l'espèce humaine depuis plus de 5000 ans et qu'en tant que tel est considéré comme l'une des principales pressions sélectives qu'ait subi son génome), l'hypothèse selon laquelle ce dernier utiliserait ses propres kinases pour contrôler l'activité des canaux chlorure AMP_c dépendants de son hôte semble vraisemblable. Néanmoins, la sur-activation qui en résulte reste encore, pour l'heure inexpliquée et constitue un nouveau champ d'investigation pour nos recherches futures.

3. Perspectives :

Longtemps, les globules rouges ont été considérés comme l'un des meilleurs modèles d'étude des échanges transmembranaires du fait de la grande diversité de transporteurs qu'ils possèdent. Néanmoins, avant cette étude, les connaissances disponibles sur l'existence de canaux anioniques présents dans la membrane de ces derniers constituaient un champ de recherche presque vierge.

Aussi, au cours de nos recherches avons nous pu mettre en évidence l'existence de deux types de canaux normalement présents dans la membrane apicale de cellules épithéliales. Si dans les épithélia, l'activité des premiers, les canaux ORCC, est régulée par celle des seconds : les canaux CFTR (Devidas et Guggino, 1997; Hryciw *et al.*, 2000), nous n'avons pas été en mesure de vérifier ce mode de fonctionnement dans la membrane des érythrocytes humains. Plus particulièrement, nous décrivons un sous-type de CFTR, que nous appelons CFTR-*like* du fait de sa séquence de sélectivité différente de celle d'un CFTR épithélial, de sa perméabilité à l'ATP et de sa mécano-sensibilité. Selon Sprague, ces deux dernières propriétés sont intimement liées. Ainsi, les hématies interviendraient, en plus du transport d'oxygène, dans des processus aussi variés que la régulation du tonus vasculaire, dans certaines manifestations inflammatoires ou encore dans le transport d'adénosine. La

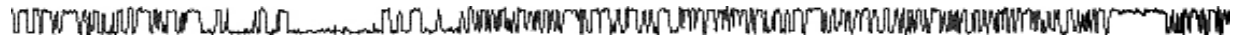
Conclusions et Perspectives

découverte d'une telle activité dans la membrane des globules rouges de patients CF est une première en électrophysiologie. De plus, l'implication de ces canaux dans la mise en place d'une nouvelle voie de perméabilité dans la membrane de cellules infectées par *Plasmodium falciparum*, font des canaux CFTR-like et des globules rouges un nouveau modèle expérimental pour l'étude de ces deux pathologies que sont le paludisme et la mucoviscidose.

Dans le cas de la malaria, la régulation de ces canaux par des protéines kinases dérivées du parasite ouvre de nouvelles voies de recherche. Tout d'abord, en tant que nouvelles cibles thérapeutiques, en effet, le blocage du NPP entraîne la mort du parasite, réduisant ainsi à néant sa prolifération sanguine. D'autre part, si la sur-activation des canaux CFTR-like procède de l'activité de kinases telle que la sous-unité catalytique de *PfPKA*, cette enzyme peut jouer un rôle déterminant dans l'étude de la mucoviscidose. Si cette kinase parvient réellement à potentialiser l'activité des canaux CFTR, dans ce cas elle pourrait éventuellement permettre de compenser le nombre réduit de ces canaux (du fait de la mutation $\Delta F508$), en les rendant plus actifs, ce qui permettrait de rétablir les fonctions sécrétoires des épithélia touchés par cette fibrose kystique.

Enfin, des travaux récents mettent en évidence que des canaux cationiques sont impliqués dans la sénescence des globules rouges humains (Lang *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2003), aussi serait-il intéressant d'étudier la relation qui lie les canaux ioniques, et plus particulièrement les canaux anioniques que nous avons étudiés dans le cadre de cette étude, au cycle cellulaire. Si dans les autres types cellulaires, l'ensemble des protéines et des transporteurs membranaires font l'objet d'un renouvellement continu, à des rythmes spécifiques, ce n'est pas le cas à l'intérieur des érythrocytes où toute synthèse protéique est impossible après le stade réticulocyte. La durée de résidence d'un canal CFTR épithélial au

Conclusions et Perspectives



niveau membranaire est inférieure aux 120 jours qui correspondent à la durée de vie moyenne d'un érythrocyte dans la circulation sanguine, aussi peut-on se demander de quelle manière le stock de canaux CFTR-*like* se met en place dans la membrane de ces derniers et quels sont les mécanismes mis en œuvre pour les garder fonctionnels tout au long de ce laps de temps ?

Références Bibliographiques



Références Bibliographiques

- Abraham, E. H., P. Okunieff, S. Scala, P. Vos, M. J. Oosterveld, A. Y. Chen and B. Shrivastav (1997). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and adenosine triphosphate." Science **275**(5304): 1324-6.
- Abraham, E. H., K. M. Sterling, R. J. Kim, A. Y. Salikhova, H. B. Huffman, M. A. Crockett, N. Johnston, H. W. Parker, W. E. Boyle, Jr., A. Hartov, *et al.* (2001). "Erythrocyte membrane ATP binding cassette (ABC) proteins: MRP1 and CFTR as well as CD39 (ecto-apyrase) involved in RBC ATP transport and elevated blood plasma ATP of cystic fibrosis." Blood Cells Mol Dis **27**(1): 165-80.
- Anderson, M. P., R. J. Gregory, S. Thompson, D. W. Souza, S. Paul, R. C. Mulligan, A. E. Smith and M. J. Welsh (1991). "Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity." Science **253**(5016): 202-5.
- Apovo, M., Y. Beuzard, F. Galacteros, D. Bachir and F. Giraud (1994). "The involvement of the Ca-dependent K channel and of the KCl co- transport in sickle cell dehydration during cyclic deoxygenation." Biochim Biophys Acta **1225**(3): 255-8.
- Ashcroft, F. M. (2000). Ion Channels and Disease, Academic Press, San Diego California, USA.
- Assef, Y. A., A. E. Damiano, E. Zotta, C. Ibarra and B. A. Kotsias (2003). "CFTR in K562 human leukemic cells." Am J Physiol Cell Physiol **285**(2): C480-8.
- Bahl, A., B. Brunk, R. L. Coppel, J. Crabtree, S. J. Diskin, M. J. Fraunholz, G. R. Grant, D. Gupta, R. L. Huestis, J. C. Kissinger, *et al.* (2002). "PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. An integrated database providing tools for accessing, analyzing and mapping expression and sequence data (both finished and unfinished)." Nucleic Acids Res **30**(1): 87-90.
- Bajnath, R. B., J. A. Groot, H. R. De Jonge, M. Kansen and J. Bijman (1993). "Synergistic activation of non-rectifying small-conductance chloride channels by forskolin and phorbol esters in cell-attached patches of the human colon carcinoma cell line HT-29cl.19A." Pflugers Arch **425**(1-2): 100-8.

Bibliographie

- Bannister, L. H. (2001). "Looking for the exit: How do malaria parasites escape from red blood cells?" Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 383-4.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna and G. H. Mitchell (2000). "A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages." Parasitol Today **16**(10): 427-33.
- Bear, C. E., C. H. Li, N. Kartner, R. J. Bridges, T. J. Jensen, M. Ramjeeasingh and J. R. Riordan (1992). "Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)." Cell **68**(4): 809-18.
- Bennekou, P. (1984). "K⁺-valinomycin and chloride conductance of the human red cell membrane. Influence of the membrane protonophore carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone." Biochim Biophys Acta **776**(1): 1-9.
- Bennekou, P. (1993). "The voltage-gated non-selective cation channel from human red cells is sensitive to acetylcholine." Biochim Biophys Acta **1147**(1): 165-7.
- Bennekou, P. (1999). "The feasibility of pharmacological volume control of sickle cells is dependent on the quantization of the transport pathways. A model study." J Theor Biol **196**(1): 129-37.
- Bennekou, P., L. de Franceschi, O. Pedersen, L. Lian, T. Asakura, G. Evans, C. Brugnara and P. Christophersen (2001). "Treatment with NS3623, a novel Cl-conductance blocker, ameliorates erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice: a possible new therapeutic approach for sickle cell disease." Blood **97**(5): 1451-7.
- Bennekou, P., O. Pedersen, A. Moller and P. Christophersen (2000). "Volume control in sickle cells is facilitated by the novel anion conductance inhibitor NS1652." Blood **95**(5): 1842-8.

Bibliographie

- Berger, H. A., M. P. Anderson, R. J. Gregory, S. Thompson, P. W. Howard, R. A. Maurer, R. Mulligan, A. E. Smith and M. J. Welsh (1991). "Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel." J Clin Invest **88**(4): 1422-31.
- Bookchin, R. M., O. E. Ortiz and V. L. Lew (1987). "Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells." Prog Clin Biol Res **240**: 193-200.
- Braunstein, G. M., R. M. Roman, J. P. Clancy, B. A. Kudlow, A. L. Taylor, V. G. Shylonsky, B. Jovov, K. Peter, T. Jilling, Ismailov, II, *et al.* (2001). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation." J Biol Chem **276**(9): 6621-30.
- Brugnara, C. (1997). "Erythrocyte membrane transport physiology." Curr Opin Hematol **4**(2): 122-7.
- Brugnara, C. (2001). "Therapeutic strategies for prevention of sickle cell dehydration." Blood Cells Mol Dis **27**(1): 71-80.
- Brugnara, C., H. F. Bunn and D. C. Tosteson (1986). "Regulation of erythrocyte cation and water content in sickle cell anemia." Science **232**(4748): 388-90.
- Brugnara, C., L. De Franceschi and Y. Beuzard (2001). "Erythrocyte-active agents and treatment of sickle cell disease." Semin Hematol **38**(4): 324-32.
- Cabantchik, Z. I. (1990). "Properties of permeation pathways induced in the human red cell membrane by malaria parasites." Blood Cells **16**(2-3): 421-32.
- Cabantchik, Z. I. (1999). "Erythrocyte membrane transport." Novartis Found Symp **226**: 6-16.
- Cantiello, H. F. (2001a). "Electrodiffusional ATP movement through CFTR and other ABC transporters." Pflugers Arch **443 suppl1**: S22-S27.

Bibliographie

- Cantiello, H. F. (2001b). "Role of actin filament organization in CFTR activation." Pflugers Arch **443**(Suppl 1): S75-80.
- Chang, D., P. S. Hsieh and D. C. Dawson (1988). "Calcium: a program in BASIC for calculating the composition of solutions with specified free concentrations of calcium, magnesium and other divalent cations." Comput Biol Med **18**(5): 351-66.
- Chasan, B., N. A. Geisse, K. Pedatella, D. G. Wooster, M. Teintze, M. D. Carattino, W. H. Goldmann and H. F. Cantiello (2002). "Evidence for direct interaction between actin and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Eur Biophys J **30**(8): 617-24.
- Cheng, S. H., D. P. Rich, J. Marshall, R. J. Gregory, M. J. Welsh and A. E. Smith (1991). "Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel." Cell **66**(5): 1027-36.
- Chishti, A. H., G. J. Maalouf, S. Marfatia, J. Palek, W. Wang, F. D. and S. Liu (1994). "Phosphorylation of Protein 4.1 in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells." Blood **83**: 3339-3345.
- Chitnis, C. E. and M. J. Blackman (2000). "Host cell invasion by malaria parasites." Parasitol Today **16**(10): 411-5.
- Christophersen, P. and P. Bennekou (1991). "Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane." Biochim Biophys Acta **1065**(1): 103-6.
- Clapham, D. E., L. W. Runnels and C. Strubing (2001). "The TRP ion channel family." Nat Rev Neurosci **2**(6): 387-96.
- Clark, I. A., K. A. Rockett and D. Burgner (2003). "Genes, nitric oxide and malaria in African children." Trends Parasitol **19**(8): 335-7.

Bibliographie

- Cohn, J. V., A. Alkhalil, M. A. Wagner, T. Rajapandi and S. A. Desai (2003). "Extracellular lysines on the plasmodial surface anion channel involved in Na⁺ exclusion." Mol Biochem Parasitol **132**(1): 27-34.
- Culliford, S., C. Ellory, H. J. Lang, H. Englert, H. Staines and R. Wilkins (2003). "Specificity of classical and putative Cl(-) transport inhibitors on membrane transport pathways in human erythrocytes." Cell Physiol Biochem **13**(4): 181-8.
- Dalemans, W., P. Barbry, G. Champigny, S. Jallat, K. Dott, D. Dreyer, R. G. Crystal, A. Pavirani, J. P. Lecocq and M. Lazdunski (1991). "Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation." Nature **354**(6354): 526-8.
- Dawson, D. C., S. S. Smith and M. K. Mansoura (1999). "CFTR: mechanism of anion conduction." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S47-75.
- Deitsch, K. W. and T. E. Wellems (1996). "Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum*." Mol Biochem Parasitol **76**(1-2): 1-10.
- Dempster, J. (1993). Computer analysis of electrophysiological signals, Biological Techniques Series, Academic Press, San Diego California.
- Desai, S. A. (1999). "A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite." Novartis Found Symp **226**: 89-95; discussion 95-8.
- Desai, S. A., S. M. Bezrukov and J. Zimmerberg (2000). "A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite." Nature **406**(6799): 1001-5.
- Desai, S. A., D. J. Krogstad and E. W. McCleskey (1993). "A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite." Nature **362**(6421): 643-6.
- Desai, S. A. and R. L. Rosenberg (1997). "Pore size of the malaria parasite's nutrient channel." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 2045-9.

Bibliographie

- Deuticke, B. (1999). "Chemical and physical in vitro alterations of the erythrocyte membrane: a model for its pathophysiological states?" Novartis Found Symp **226**: 20-34; discussion 34-6.
- Devidas, S. and W. B. Guggino (1997). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and ATP." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 547-52.
- Doerig, C., D. Chakrabarti, B. Kappes and K. Matthews (2000). "The cell cycle in protozoan parasites." Prog Cell Cycle Res **4**: 163-83.
- Drew, C., F. Lapaix, S. Egee, S. Thomas, J. Ellory and H. Staines (2002). "Age-dependent changes in cation transport in the chicken erythrocyte." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **133**(1): 169.
- Droucheau, E., A. Primot, V. Thomas, D. Mattei, M. Knockaert, C. Richardson, P. Sallicandro, P. Alano, A. Jafarshad, B. Baratte, *et al.* (2004). "*Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors." Biochemica et Biophysica Acta **in press**.
- Drumm, M. L., D. J. Wilkinson, L. S. Smit, R. T. Worrell, T. V. Strong, R. A. Frizzell, D. C. Dawson and F. S. Collins (1991). "Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes." Science **254**(5039): 1797-9.
- Dunn, P. M. (1998). "The action of blocking agents applied to the inner face of Ca²⁺-activated K⁺ channels from human erythrocytes." J Membr Biol **165**(2): 133-43.
- Durantou, C., S. M. Huber and F. Lang (2002). "Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells." J Physiol **539**(Pt 3): 847-55.
- Egee, S., F. Lapaix, G. Decherf, H. M. Staines, J. C. Ellory, C. Doerig and S. L. Thomas (2002). "A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." J Physiol **542**(Pt 3): 795-801.

Bibliographie

- Elford, B. C., G. M. Cowan and D. J. Ferguson (1995). "Parasite-regulated membrane transport processes and metabolic control in malaria-infected erythrocytes." Biochem J **308**(Pt 2): 361-74.
- Falke, J. J. and S. I. Chan (1986). "Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers." Biochemistry **25**(24): 7895-8.
- Fischer, H., B. Illek and T. E. Machen (1998). "Regulation of CFTR by protein phosphatase 2B and protein kinase C." Pflugers Arch **436**(2): 175-81.
- Freedman, J. C., T. S. Novak, J. D. Bisognano and P. R. Pratap (1994). "Voltage dependence of DIDS-insensitive chloride conductance in human red blood cells treated with valinomycin or gramicidin." J Gen Physiol **104**(5): 961-83.
- Frizzell, R. A. (1995). "Functions of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein." Am J Respir Crit Care Med **151**(3 Pt 2): S54-8.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
- Galtieri, A., E. Tellone, L. Romano, F. Misiti, E. Bellocco, S. Ficarra, A. Russo, D. Di Rosa, M. Castagnola, B. Giardina, *et al.* (2002). "Band-3 protein function in human erythrocytes: effect of oxygenation-deoxygenation." Biochim Biophys Acta **1564**(1): 214-8.
- Gadsby, D. C. and A. C. Nairn (1999). "Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S77-S107.
- Gardner, M. J., N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, *et al.* (2002). "Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Nature **419**(6906): 498-511.
- Gardos, G. (1956). "The permeability of human erythrocytes to potassium." Acta Physiologica **4**: 185-189.

Bibliographie

- Gershon, H. (2001). "Erythrocytes." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Gibson, J. S. and J. C. Ellory (2002). "Membrane transport in sickle cell disease." Blood Cells Mol Dis **28**(3): 303-14.
- Ginsburg, H. (1994). "Transport pathways in the malaria-infected erythrocyte. Their characterization and their use as potential targets for chemotherapy." Biochem Pharmacol **48**(10): 1847-56.
- Ginsburg, H. (1999). "The permeability properties of the parasite cell membrane." Novartis Found Symp **226**: 99-108; discussion 108-13.
- Ginsburg, H. and K. Kirk (1998). Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *in* Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. I. W. Sherman. Eds. Washington D.C., ASM Press: 219-232.
- Grygorczyk, R. and W. Schwarz (1983). "Properties of the Ca^{2+} -activated K^+ conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique." Cell Calcium **4**(5-6): 499-510.
- Grygorczyk, R. and J. W. Hanrahan (1997). "CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli." Am J Physiol **272**(3 Pt 1): C1058-66.
- Gupta, J. and P. Linsdell (2002). "Point mutations in the pore region directly or indirectly affect glibenclamide block of the CFTR chloride channel." Pflugers Arch **443**(5-6): 739-47.
- Halder, K. (1998). "Intracellular trafficking in Plasmodium-infected erythrocytes." Curr Opin Microbiol **1**(4): 466-71.
- Halder, K., B. U. Samuel, N. Mohandas, T. Harrison and N. L. Hiller (2001). "Transport mechanisms in Plasmodium-infected erythrocytes: lipid rafts and a tubovesicular network." Int J Parasitol **31**(12): 1393-401.

Bibliographie

- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.
- Harper, T. E. and R. A. Harris (2001). "Glycolytic Pathway." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Haynes, J. D., C. L. Diggs, F. A. Hines and R. E. Desjardins (1976). "Culture of human malaria parasites *Plasmodium falciparum*." Nature **263**(5580): 767-9.
- Heinemann, S. H. (2001). "Sodium, Calcium and Potassium Channels." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Hempelmann, E., C. Motta, R. Hughes, S. A. Ward and P. G. Bray (2003). "*Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals?" Trends Parasitol **19**(1): 23-6.
- Hjelmeland, L. M. (1990). "Solubilization of native membrane proteins." Methods Enzymol **182**: 253-64.
- Ho, C. and Lukin (2001). "Haemoglobin: Cooperativity in Protein-Ligand Interactions." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Hoffman, J. F., W. Joiner, K. Nehrke, O. Potapova, K. Foye and A. Wickrema (2003). "The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7366-71.
- Holt, R. A., G. M. Subramanian, A. Halpern, G. G. Sutton, R. Charlab, D. R. Nusskern, P. Wincker, A. G. Clark, J. M. Ribeiro, R. Wides, *et al.* (2002). "The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*." Science **298**(5591): 129-49.
- Hryciw, D. H. and W. B. Guggino (2000). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the outwardly rectifying chloride channel: a relationship between two chloride channels expressed in epithelial cells." Clin Exp Pharmacol Physiol **27**(11): 892-5.

Bibliographie

- Huber, S. M., C. Duranton, A.-C. Uhlemann, P. G. Kremsner and F. Lang (2002a). "Anion and organic osmolyte channels of human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*." Pflügers Archiv European Journal of Physiology **443**, Supp. 2.S164
- Huber, S. M., N. Gamper and F. Lang (2001). "Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts." Pflugers Arch **441**(4): 551-8.
- Huber, S. M., A. C. Uhlemann, N. L. Gamper, C. Duranton, P. G. Kremsner and F. Lang (2002c). "*Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation." Embo J **21**(1-2): 22-30.
- Hviid, L. and T. Staalsoe (2004). "Malaria immunity in infants: a special case of a general phenomenon?" Trends in Parasitology **20**(2): 66-72.
- Hwang, T. C., L. Lu, P. L. Zeitlin, D. C. Gruenert, R. Haganir and W. B. Guggino (1989). "Cl-channels in CF: lack of activation by protein kinase C and cAMP- dependent protein kinase." Science **244**(4910): 1351-3.
- Hwang, T. C. and D. N. Sheppard (1999). "Molecular pharmacology of the CFTR Cl-channel." Trends Pharmacol Sci **20**(11): 448-53.
- Jay, D. and L. Cantley (1986). "Structural aspects of the red cell anion exchange protein." Annu Rev Biochem **55**: 511-38.
- Jentsch, T. J., T. Friedrich, A. Schriever and H. Yamada (1999). "The CLC chloride channel family." Pflugers Arch **437**(6): 783-95.
- Jentsch, T. J., V. Stein, F. Weinreich and A. A. Zdebik (2002). "Molecular structure and physiological function of chloride channels." Physiol Rev **82**(2): 503-68.
- Joiner, C. H. (1993). "Cation transport and volume regulation in sickle red blood cells." Am J Physiol **264**(2 Pt 1): C251-70.

Bibliographie

- Kaestner, L. and I. Bernhardt (2002). "Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance." Bioelectrochemistry **55**(1-2): 71-4.
- Kaestner, L., P. Christophersen, I. Bernhardt and P. Bennekou (2000). "The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterisation." Bioelectrochemistry **52**(2): 117-25.
- Kajita, H., K. Omori and H. Matsuda (2000). "The chloride channel ClC-2 contributes to the inwardly rectifying Cl⁻ conductance in cultured porcine choroid plexus epithelial cells." J Physiol **523 Pt 2**: 313-24.
- Kanaani, J. and H. Ginsburg (1991). "Transport of lactate in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes." J Cell Physiol **149**(3): 469-76.
- Kanzok, S. M. and L. Zheng (2003). "The mosquito genome--a turning point?" Trends Parasitol **19**(8): 329-31.
- Kappes, B., C. D. Doerig and R. Graeser (1999). "An overview of Plasmodium protein kinases." Parasitol Today **15**(11): 449-54.
- King, L. S. and P. Agre (2001). "Water Channels." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Kirk, K. (2000). "Malaria. Channelling nutrients." Nature **406**(6799): 949, 951.
- Kirk, K. (2001). "Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte." Physiol Rev **81**(2): 495-537.
- Kirk, K. (2004). "Channels and transporters as drug targets in the Plasmodium-infected erythrocyte." Acta Trop **89**(3): 285-98.

Bibliographie

- Kirk, K., K. J. Ashworth, B. C. Elford, R. A. Pinches and J. C. Ellory (1991a). "Characteristics of 86Rb^+ transport in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*." Biochim Biophys Acta **1061**(2): 305-8.
- Kirk, K., B. C. Elford and J. C. Ellory (1992a). "The increased K^+ leak of malaria-infected erythrocytes is not via a Ca^{2+} -activated K^+ channel." Biochim Biophys Acta **1135**(1): 8-12.
- Kirk, K., J. C. Ellory and J. D. Young (1992b). "Transport of organic substrates via a volume-activated channel." J Biol Chem **267**(33): 23475-8.
- Kirk, K. and H. A. Horner (1995a). "In search of a selective inhibitor of the induced transport of small solutes in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: effects of arylaminobenzoates." Biochem J **311**(Pt 3): 761-8.
- Kirk, K. and H. A. Horner (1995b). "Novel anion dependence of induced cation transport in malaria-infected erythrocytes." J Biol Chem **270**(41): 24270-5.
- Kirk, K., H. A. Horner, B. C. Elford, J. C. Ellory and C. I. Newbold (1994). "Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel." J Biol Chem **269**(5): 3339-47.
- Kirk, K., H. A. Horner and J. Kirk (1996). "Glucose uptake in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is an equilibrative not an active process." Mol Biochem Parasitol **82**(2): 195-205.
- Kirk, K., H. A. Horner, D. J. Spillett and B. C. Elford (1993). "Glibenclamide and meglitinide block the transport of low molecular weight solutes into malaria-infected erythrocytes." FEBS Lett **323**(1-2): 123-8.
- Kirk, K., C. E. Poli de Figueiredo, B. C. Elford and J. C. Ellory (1992c). "Effect of cell age on erythrocyte choline transport: implications for the increased choline permeability of malaria-infected erythrocytes." Biochem J **283**(Pt 2): 617-9.

Bibliographie

- Kirk, K., H. M. Staines, R. E. Martin and K. J. Saliba (1999). "Transport properties of the host cell membrane." Novartis Found Symp **226**: 55-66; discussion 66-73.
- Kirk, K., H. Y. Wong, B. C. Elford, C. I. Newbold and J. C. Ellory (1991b). "Enhanced choline and Rb⁺ transport in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Biochem J **278**(Pt 2): 521-5.
- Klinken, S. P. (2002). "Red blood cells." Int J Biochem Cell Biol **34**: 1513–1518.
- Kopito, R. R. (1999). "Biosynthesis and degradation of CFTR." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S167-73.
- Krishna, S., C. J. Woodrow, R. J. Burchmore, K. J. Saliba and K. Kirk (2000). "Hexose transport in asexual stages of *Plasmodium falciparum* and kinetoplastidae." Parasitol Today **16**(12): 516-21.
- Lader, A. S., A. G. Prat, G. R. Jackson, Jr., K. L. Chervinsky, A. Lapey, T. B. Kinane and H. F. Cantiello (2000). "Increased circulating levels of plasma ATP in cystic fibrosis patients." Clin Physiol **20**(5): 348-53.
- Lane, J. N. (2001). "Cell Structure." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Lang, F., M. Ritter, N. Gamper, S. Huber, S. Fillon, V. Tanneur, A. Lepple-Wienhues, I. Szabo and E. Gulbins (2000). "Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death." Cell Physiol Biochem **10**(5-6): 417-28.
- Lang, K. S., C. Duranton, H. Poehlmann, S. Myssina, C. Bauer, F. Lang, T. Wieder and S. M. Huber (2002). "Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes." Cell Death Differ **10**(2): 249-56.
- Lang, K. S., S. Myssina, V. Tanneur, T. Wieder, S. M. Huber, F. Lang and C. Duranton (2003). "Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride." Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol **367**(4): 391-6.

Bibliographie

- Lauer, S. A., P. K. Rathod, N. Ghori and K. Haldar (1997). "A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite." Science **276**(5315): 1122-5.
- Lew, V. L. and R. M. Bookchin (1986). "Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model." J Membr Biol **92**(1): 57-74.
- Lew, V. L., N. Daw, D. Perdomo, Z. Etzion, R. M. Bookchin and T. Tiffert (2003a). "Distribution of plasma membrane Ca^{2+} pump activity in normal human red blood cells." Blood **102**(12): 4206-13.
- Lew, V. L., T. Tiffert and H. Ginsburg (2003b). "Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells." Blood **101**(10): 4189-94.
- Li, C., M. Ramjeesingh and C. E. Bear (1996). "Purified cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) does not function as an ATP channel." J Biol Chem **271**(20): 11623-6.
- Li, M., J. D. McCann, M. P. Anderson, J. P. Clancy, C. M. Liedtke, A. C. Nairn, P. Greengard and M. J. Welsch (1989). "Regulation of chloride channels by protein kinase C in normal and cystic fibrosis airway epithelia." Science **244**(4910): 1353-6.
- Linsdell, P. and J. W. Hanrahan (1998a). "Adenosine triphosphate-dependent asymmetry of anion permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel." J Gen Physiol **111**(4): 601-14.
- Linsdell, P. and J. W. Hanrahan (1998b). "Glutathione permeability of CFTR." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): C323-6.
- Linsdell, P., J. A. Tabcharani, J. M. Rommens, Y. X. Hou, X. B. Chang, L. C. Tsui, J. R. Riordan and J. W. Hanrahan (1997). "Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions." J Gen Physiol **110**(4): 355-64.

Bibliographie

- Lipscombe, D. (2001). "Ion Channels." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira and J. Darnell (1997). Biologie Moléculaire de la Cellule, De Boeck editions, Brussels.
- Lukacs, G. L., A. Mohamed, N. Kartner, X. B. Chang, J. R. Riordan and S. Grinstein (1994). "Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP." Embo J **13**(24): 6076-86.
- Luna, E. J. and A. L. Hitt (1992). "Cytoskeleton--plasma membrane interactions." Science **258**(5084): 955-64.
- Lux, S. E. (1979). "Dissecting the red cell membrane skeleton." Nature **281**(5731): 426-9.
- Maher, A. D. and P. W. Kuchel (2003). "The Gardos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes." Int J Biochem Cell Biol **35**(8): 1182-97.
- Miller, C. (2001). "See potassium run." Nature **414**(6859): 23-4.
- Mongin, E., C. Louis, R. A. Holt, E. Birney and F. H. Collins (2004). "The Anopheles gambiae genome: an update." Trends in Parasitology **20**(2): 49-52.
- Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.
- Neildez-Nguyen, T. M., H. Wajcman, M. C. Marden, M. Bensidhoum, V. Moncollin, M. C. Giarratana, L. Kobari, D. Thierry and L. Douay (2002). "Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo." Nat Biotechnol **20**(5): 467-72.
- Neugebauer, J. M. (1990). "Detergents: an overview." Methods Enzymol **182**: 239-53.
- Nikinmaa, M. (1990). Vertebrate Red Blood Cells - Adaptations of Function to Respiratory Requirements. Zoophysiology Series(vol. 28), Springer Verlag, Berlin, Germany.

Bibliographie

- Nilius, B. and G. Droogmans (2003). "Amazing chloride channels: an overview." Acta Physiol Scand **177**(2): 119-47.
- Nilius, B., J. Eggermont and G. Droogmans (2000). "The endothelial volume-regulated anion channel, VRAC." Cell Physiol Biochem **10**(5-6): 313-20.
- Ohlendieck, K. (1996). "Purification of membrane proteins." Methods Mol Biol **59**: 313-22.
- Olearczyk, J. J., A. H. Stephenson, A. J. Lonigro and R. S. Sprague (2001). "Receptor-mediated activation of the heterotrimeric G-protein Gs results in ATP release from erythrocytes." Med Sci Monit **7**(4): 669-74.
- Orkin, S. H. (1995). "Hematopoiesis: how does it happen?" Curr Opin Cell Biol **7**(6): 870-7.
- Pasyk, E. A. and J. K. Foskett (1995). "Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells." J Biol Chem **270**(21): 12347-50.
- Pilewski, J. M. and R. A. Frizzell (1999). "Role of CFTR in airway disease." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S215-55.
- Prat, A. G., C. C. Cunningham, G. R. Jackson, Jr., S. C. Borkan, Y. Wang, D. A. Ausiello and H. F. Cantiello (1999). "Actin filament organization is required for proper cAMP-dependent activation of CFTR." Am J Physiol **277**(6 Pt 1): C1160-9.
- Quinton, P. M. (1999). "Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S3-S22.
- Reddy, M. M. and P. M. Quinton (2003). "Control of dynamic CFTR selectivity by glutamate and ATP in epithelial cells." Nature **423**(6941): 756-60.
- Reisin, I. L., A. G. Prat, E. H. Abraham, J. F. Amara, R. J. Gregory, D. A. Ausiello and H. F. Cantiello (1994). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel." J Biol Chem **269**(32): 20584-91.

Bibliographie

- Reithmeier, R. A. (2001). "Membrane Proteins." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Riordan, J. R. (1993). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Annu Rev Physiol **55**: 609-30.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, *et al.* (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**(4922): 1066-73.
- Romero, P. J. and E. A. Romero (1999). "Effect of cell ageing on Ca^{2+} influx into human red cells." Cell Calcium **26**(3-4): 131-7.
- Saliba, K. J. and K. Kirk (2001). " H^{+} -coupled pantothenate transport in the intracellular malaria parasite." J Biol Chem **276**(21): 18115-21.
- Sardini, A., J. S. Amey, K. H. Weylandt, M. Nobles, M. A. Valverde and C. F. Higgins (2003). "Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels." Biochim Biophys Acta **1618**(2): 153-62.
- Scanlin, T. F. and M. C. Glick (1999). "Terminal glycosylation in cystic fibrosis." Biochim Biophys Acta **1455**(2-3): 241-53.
- Schultz, B. D., A. K. Singh, D. C. Devor and R. J. Bridges (1999). "Pharmacology of CFTR chloride channel activity." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S109-44.
- Schwarz, W., R. Grygorczyk and D. Hof (1989). "Recording single-channel currents from human red cells." Methods Enzymol **173**: 112-21.
- Schwiebert, E. M. and A. Zsembery (2003). "Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells." Biochim Biophys Acta **1615**(1-2): 7-32.

Bibliographie

- Seibert, F. S., X. B. Chang, A. A. Aleksandrov, D. M. Clarke, J. W. Hanrahan and J. R. Riordan (1999). "Influence of phosphorylation by protein kinase A on CFTR at the cell surface and endoplasmic reticulum." Biochim Biophys Acta **1461**(2): 275-83.
- Sheppard, D. N. and K. A. Robinson (1997). "Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a murine cell line." J Physiol **503**(Pt 2): 333-46.
- Sheppard, D. N. and M. J. Welsh (1999). "Structure and function of the CFTR chloride channel." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S23-45.
- Sherman, I. W. (2001). "Malaria." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Sherman, I. W. and E. Winograd (1990). A modified band 3 protein, expressed on the surface of erythrocytes infected with a knobby line of *Plasmodium falciparum* (human malaria), is involved in cytoadherence. Cellular and molecular biology of normal and abnormal erythroid membranes. C. M. Cohen and J. Palek. NewYork, Wiley-Liss. **118**: 283-299.
- Sprague, R. S., E. A. Bowles, J. J. Olearczyk, A. H. Stephenson and A. J. Lonigro (2002). "The role of G protein beta subunits in the release of ATP from human erythrocytes." J Physiol Pharmacol **53**(4 Pt 1): 667-74.
- Sprague, R. S., M. L. Ellsworth, A. H. Stephenson, M. E. Kleinhenz and A. J. Lonigro (1998). "Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity." Am J Physiol **275**(5 Pt 2): H1726-32.
- Sprague, R. S., M. L. Ellsworth, A. H. Stephenson and A. J. Lonigro (2001). "Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release." Am J Physiol Cell Physiol **281**(4): C1158-64.
- Sprung, R., R. Sprague and D. Spence (2002). "Determination of ATP release from erythrocytes using microbore tubing as a model of resistance vessels in vivo." Anal Chem **74**(10): 2274-8.

Bibliographie

- Staines, H. M., J. C. Ellory and K. Kirk (2001). "Perturbation of the pump-leak balance for Na^+ and K^+ in malaria- infected erythrocytes." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1576-87.
- Syin, C., D. Parzy, F. Traincard, I. Boccaccio, M. B. Joshi, D. T. Lin, X. M. Yang, K. Assemet, C. Doerig and G. Langsley (2001). "The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes." Eur J Biochem **268**(18): 4842-9.
- Szellas, T. and G. Nagel (2003). "Apparent affinity of CFTR for ATP is increased by continuous kinase activity." FEBS Lett **535**(1-3): 141-6.
- Tabcharani, J. A., P. Linsdell and J. W. Hanrahan (1997). "Halide permeation in wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels." J Gen Physiol **110**(4): 341-54.
- Taddei, A., C. Folli, O. Zegarra-Moran, P. Fanen, A. S. Verkman and L. J. Galletta (2004). "Altered channel gating mechanism for CFTR inhibition by a high-affinity thiazolidinone blocker." FEBS Lett **558**(1-3): 52-6.
- Taraschi, T. F. (1999). "Macromolecular transport in malaria-infected erythrocytes." Novartis Found Symp **226**: 114-20; discussion 121-5.
- ter Kuile, F., N. J. White, P. Holloway, G. Pasvol and S. Krishna (1993). "*Plasmodium falciparum*: in vitro studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria." Exp Parasitol **76**(1): 85-95.
- Teulon, J. and A. Vandewalle (2002). "Fonctions physiologiques des canaux chlorure de la famille CIC." MEDECINE/SCIENCES **18**: 595-604.
- Thomas, S. and V. L. Lew (2004). "*Plasmodium falciparum* and the permeation pathway of the host red blood cell." Trends in Parasitology **in press**.

Bibliographie

- Thomas, S. L., S. Egee, F. Lapaix, L. Kaestner, H. M. Staines and J. C. Ellory (2001). "Malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* up-regulates host red blood cell channels." FEBS Lett **500**(1-2): 45-51.
- Tosteson, D. C. and J. F. Hoffman (1960). "Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells." J Gen Physiol **44**: 169-94.
- Trager, W. and J. B. Jensen (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." Science **193**(4254): 673-5.
- Trigg, P. I. and A. V. Kondrachine (1998). The current global malaria situation. in Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. I. W. Sherman. Eds. Washington D.C., ASM Press :11-24.
- Ursos, L. M. and P. D. Roepe (2002). "Chloroquine resistance in the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*." Med Res Rev **22**(5): 465-91.
- Van Dooren, G. G., R. F. Waller, K. A. Joiner, D. S. Roos and G. I. McFadden (2000). "Traffic jams: protein transport in *Plasmodium falciparum*." Parasitol Today **16**(10): 421-7.
- Valenzuela, S. M., M. Mazzanti, R. Tonini, M. R. Qiu, K. Warton, E. A. Musgrove, T. J. Campbell and S. N. Breit (2000). "The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle." J Physiol **529 Pt 3**: 541-52.
- Verloo, P., C. H. Kocken, A. Van Der Wel, B. C. Tilly, B. M. Hogema, M. Sinaasappel, A. W. Thomas and H. R. De Jonge (2004). "*Plasmodium falciparum*-activated chloride channels are defective in erythrocytes from cystic fibrosis patients." J Biol Chem **279**(11) : 10316-22.
- Vichinsky, E. (2002). "New therapies in sickle cell disease." Lancet **360**(9333): 629-31.
- Wagner, M. A., B. Andemariam and S. A. Desai (2003). "A Two-Compartment Model of Osmotic Lysis in *Plasmodium falciparum* - Infected Erythrocytes." Biophys J **84**(1): 116-23.

Bibliographie

- Weber, J.-M. (2001). "Energy Cycle in Vertebrates." Encyclopedia of life science / Nature Publishing Group.
- Wiser, M. F., H. N. Lanners and R. A. Bafford (1999). "Export of *Plasmodium* proteins via a novel secretory pathway." Parasitol Today **15**(5): 194-8.
- Wright, E. M. and J. M. Diamond (1977). "Anion selectivity in biological systems." Physiol Rev **57**(1): 109-56.
- Zhang, D., A. Kiyatkin, J. T. Bolin and P. S. Low (2000). "Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3." Blood **96**(9): 2925-33.
- Zhao, Y., R. M. Franklin and B. Kappes (1994). "*Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase phosphorylates proteins of the host erythrocytic membrane." Mol Biochem Parasitol **66**(2): 329-43.
- Zhou, S. S., A. Takai and Y. Okada (2002). "Regulation of cardiac CFTR Cl(-) channel activity by a Mg²⁺-dependent protein phosphatase." Pflugers Arch **444**(3): 327-34.

Annexe

Annexe I :

Article III :

A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite Plasmodium falciparum

Rapid Report

A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*

Stéphane Egée, Franck Lapaix, Gaëtan Decherf, Henry M. Staines*, J. Clive Ellory*, Christian Doerig† and Serge L. Y. Thomas

Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 9042, Station Biologique, Place G. Teissier, B. P. 74, 29682 Roscoff cedex, France, * University Laboratory of Physiology, Parks Road, Oxford OX1 3PT, UK and † INSERM U511, CHU Pitié-Salpêtrière, 91 Bd. de l'Hôpital, 75634 Paris cedex 13, France

A recent study on malaria-infected human red blood cells (RBCs) has shown induced ion channel activity in the host cell membrane, but the questions of whether they are host- or parasite-derived and their molecular nature have not been resolved. Here we report a comparison of a malaria-induced anion channel with an endogenous anion channel in *Plasmodium falciparum*-infected human RBCs. Ion channel activity was measured using the whole-cell, cell-attached and excised inside-out configurations of the patch-clamp method. Parasitised RBCs were cultured *in vitro*, using co-cultured uninfected RBCs as controls. Unstimulated uninfected RBCs possessed negligible numbers of active anion channels. However, anion channels could be activated in the presence of protein kinase A (PKA) and ATP in the pipette solution or by membrane deformation. These channels displayed linear conductance (~15 pS), were blocked by known anion channel inhibitors and showed the permeability sequence $I^- > Br^- > Cl^-$. In addition, in less than 5 % of excised patches, an outwardly rectifying anion channel (~80 pS, outward conductance) was spontaneously active. The host membrane of malaria-infected RBCs possessed spontaneously active anion channel activity, with identical conductances, pharmacology and selectivity to the linear conductance channel measured in stimulated uninfected RBCs. Furthermore, the channels measured in malaria-infected RBCs were shown to have a low open-state probability (P_o) at positive potentials, which explains the inward rectification of membrane conductance observed when using the whole-cell configuration. The data are consistent with the presence of two endogenous anion channels in human RBCs, of which one (the linear conductance channel) is up-regulated by the malaria parasite *P. falciparum*.

(Resubmitted 22 April 2002; accepted after revision 11 June 2002)

Corresponding author S. L. Y. Thomas: Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 9042, Station Biologique, Place G. Teissier, B. P. 74, 29682 Roscoff cedex, France. Email: thomas@sb-roscoff.fr

Until recently, electrophysiological studies on human RBCs have been difficult, and little is known of the anionic conductive pathways present in the RBC membrane. Anion permeability is particularly relevant in the context of malaria where a wealth of transport studies have demonstrated the importance of parasite-induced transport pathways for anions and other solutes in infected RBCs (Ginsburg, 1999; Kirk, 2001).

Recently, it has been reported that human RBCs infected by *Plasmodium falciparum* exhibit novel parasite-induced voltage-dependent anion channels (Desai *et al.* 2000) but the questions of whether they are host- or parasite-derived and their molecular nature were not resolved. Using the patch-clamp method on avian RBCs infected by

P. gallinaceum, we were unable to identify novel parasite-induced pathways in infected chicken RBCs (Thomas *et al.* 2001), rather the avian malaria parasite up-regulates existing pathways in the host RBC membrane. This observation raises the possibility that the small conductance anion channels identified in infected human RBCs (Desai *et al.* 2000) are also endogenous components of the RBC membrane, and there are some indications in the literature (Freedman *et al.* 1994; Schwartz *et al.* 1997) that this may be so.

In the light of this evidence, we used various configurations of the patch-clamp technique and conditions that are known to activate quiescent channels to produce the first electrophysiological evidence at the single channel level for two anionic channels in human RBCs. In addition, we

have demonstrated that the membrane current measured in human RBCs, infected by *P. falciparum*, could be accounted for by up-regulation of one of these anion channel types.

METHODS

Preparation of cells

RBCs were obtained from healthy volunteers, who gave informed, written consent, in accordance with the Declaration of Helsinki. The RBCs were washed three times in a saline solution containing (mM): 150 NaCl, 5 KCl, 1.4 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 Hepes, 10 glucose, pH 7.4, 320 ± 5 mosmol (kg H₂O)⁻¹. *P. falciparum*-infected human RBCs, using clone 3D7, were cultured as described previously (Doerig *et al.* 1995) and washed into the same saline as uninfected RBCs prior to experimentation.

Current recordings

Patch pipettes (tip resistance 10–20 MΩ) were prepared from borosilicate glass capillaries pulled and polished on a Werner Zeitz DMZ programmable puller (Augsburg, Germany). Pipette and bath solutions contained (mM): 155 NMDG-Cl, 1 MgCl₂, 10 Hepes, 10 glucose, pH 7.4, 320 ± 5 mosmol (kg H₂O)⁻¹. The Ca²⁺ concentrations were adjusted to different pCa (–log[Ca²⁺]) in the pipette and bathing solutions (pCa 7 on the cytosolic side and pCa 3 on the extracellular side).

Single channel current and voltage recordings were made as described previously (Egée *et al.* 2000), using cell-attached and excised inside-out configurations. The ruptured patch whole-cell configuration was used to record whole-cell currents. All experiments were performed at 37 °C. Whole-cell current–voltage (*I*–*V*) relationships were run and analysed using WCP V3.2 software (Strathclyde, UK). Seal resistances were 4–20 GΩ. Data are given as mean values ± S.E.M. Significance was assessed using the Fisher *F* test and Student's *t* test.

Materials

ATP (as Mg²⁺ or Na⁺ salts), 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS), furosemide (frusemide), niflumic acid, glibenclamide, *N*-methyl-D-glucamine chloride (NMDG), the catalytic subunit of protein kinase A (PKA) and anthracene-9-carboxylic acid (9-AC) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate (NPPB) and diphenylamine-2-carboxylic acid (DPC) were obtained from Research Biochemicals International (Saint Quentin Fallavier, France). Tamoxifen was obtained from Calbiochem (Fontenay-sous-Bois, France).

RESULTS

Whole-cell patch clamp of uninfected and malaria-infected RBCs

Using the whole-cell patch-clamp method, with the impermeable monovalent cation NMDG in all pipette and bathing solutions (to prevent cationic currents), uninfected RBCs displayed negligible conductance with linear *I*–*V* relationships and reversal potentials (*E*_r) close to 0 mV (Fig. 1A and D). The membrane conductance (*G*_m) was measured to be only 44 ± 1 pS (*n* = 32).

It is known that phosphorylation of a consensus site by PKA in the presence of ATP can activate ion channels

(e.g. cAMP-regulated CFTR channels; Tabcharani *et al.* 1991). We therefore investigated whether the addition of the catalytic subunit of PKA (100 nM) and ATP (10 mM) to the pipette solution, in the presence of theophylline (100 μM), could enhance membrane conductance. Under these conditions, the membrane current was 40 times larger than in unstimulated RBCs (Fig. 1B and D) and showed inward rectification. ATP or theophylline alone did not induce channel activity. The conductance between –100 mV and *E*_r was 1700 ± 40 pS (*n* = 58). *P*_x/*P*_{Cl} permeability ratios estimated from the shift in *E*_r after replacement of Cl[–] ions in the bath solution for anions were calculated to be I[–] (2.8 ± 0.3; *n* = 3) > Br[–] (1.2 ± 0.5; *n* = 3) ≥ Cl[–] (1) > F[–] (0.4 ± 0.2; *n* = 3). In addition, the increased conductance did not occur in the presence of the anion channel blockers NPPB (100 μM), glibenclamide (100 μM) and DPC (1 mM; pre-incubated for at least 5 min) in the bath solution.

Whole-cell experiments on malaria-infected cells showed a membrane current 100- to 150-fold larger than in unstimulated uninfected cells (Fig. 1C and D) with the corresponding *I*–*V* curves showing inward rectification. Addition of PKA and ATP to the patch pipettes had no additive effect. The membrane current reversed polarity at –9 ± 1 mV and the *G*_m, calculated between –100 mV and *E*_r, was 5300 ± 140 pS (*n* = 24). No significant change in the *I*–*V* relationship was observed when NMDG was replaced by Na⁺ (Fig. 1D), which indicates further an anionic conductance. *P*_x/*P*_{Cl} ratios for anions were calculated to be I[–] (3.4 ± 0.4, *n* = 4) > NO₃[–] (1.6 ± 0.2, *n* = 4) > Br[–] (1.3 ± 0.3, *n* = 5) ≥ Cl[–] (1.00) > F[–] (0.4 ± 0.2, *n* = 5) > gluconate (0.2 ± 0.1, *n* = 3). NPPB, niflumic acid and glibenclamide, added in the bathing solution, reduced immediately the membrane conductance of infected cells in a dose-related manner. The IC₅₀ values (i.e. the concentration at which the inward current is reduced by half) were 0.8 ± 0.3 μM (*n* = 4), 2.5 ± 0.3 μM (*n* = 4), 35.0 ± 8.7 μM (*n* = 3), respectively. Furosemide (200 μM), known as a potent blocker of malaria-induced solute transport via the infected RBC membrane (Kirk *et al.* 1994), reduced the membrane conductance by 45 ± 1 % (*n* = 3). By contrast, 100 μM DIDS produced no significant inhibition.

Cell-attached patch clamp of uninfected and malaria-infected RBCs

To elucidate the exact nature of the channels responsible for the whole-cell membrane conductance of intact normal and infected RBCs, we recorded single channel activity in the cell-attached configuration. As implied by the whole-cell data, negligible channel activity was detected in uninfected cells.

In contrast to uninfected RBCs, spontaneous channel activity was observed in infected RBCs, as bursts of channel openings separated by short closures (Fig. 1E). All successful patches contained one or more spontaneously

active channels. These channels showed slight inward rectification at negative potentials (cubic polynomial regression, $P < 0.005$), with an average conductance of 18.0 ± 1.1 pS (82 data points from 25 experiments) between -100 and -20 mV. In the majority of cases, the estimated E_r was twelve millivolts more positive than the resting membrane potential (Fig. 1F), which indicates that intracellular chloride was slightly above electrochemical equilibrium at the spontaneous membrane potential.

These channels exhibited voltage-dependent gating, with low P_o between $+50$ and $+100$ mV, and increasing P_o between $+50$ and -100 mV. In addition, for a given membrane patch, the number of simultaneously active channels was directly proportional to the membrane potential (V_m), with the maximum number (3) activated at negative potentials.

A dwell time analysis was performed on patches containing only one channel, and the kinetics analysis, made at holding potentials ($-V_p$) of $+80$ and -80 mV, showed that within bursts the open-time and closed-time durations

were fitted best by single exponential distributions. The kinetic constants, τ_o and τ_c , were 19.4 ± 2.4 ms and 9.9 ± 2.3 ms ($n = 5$), respectively, at -80 mV and 9.4 ± 2.9 ms and 7.9 ± 1.6 ms ($n = 6$), respectively, at $+80$ mV. Using the data presented above, it was possible to calculate that approximately 250–300 copies of the 18 pS channel could be responsible for the measured whole-cell currents in infected RBCs (if we assume that the whole-cell current can be accounted for totally by this channel type).

Excised inside-out patch clamp of uninfected and malaria-infected RBCs

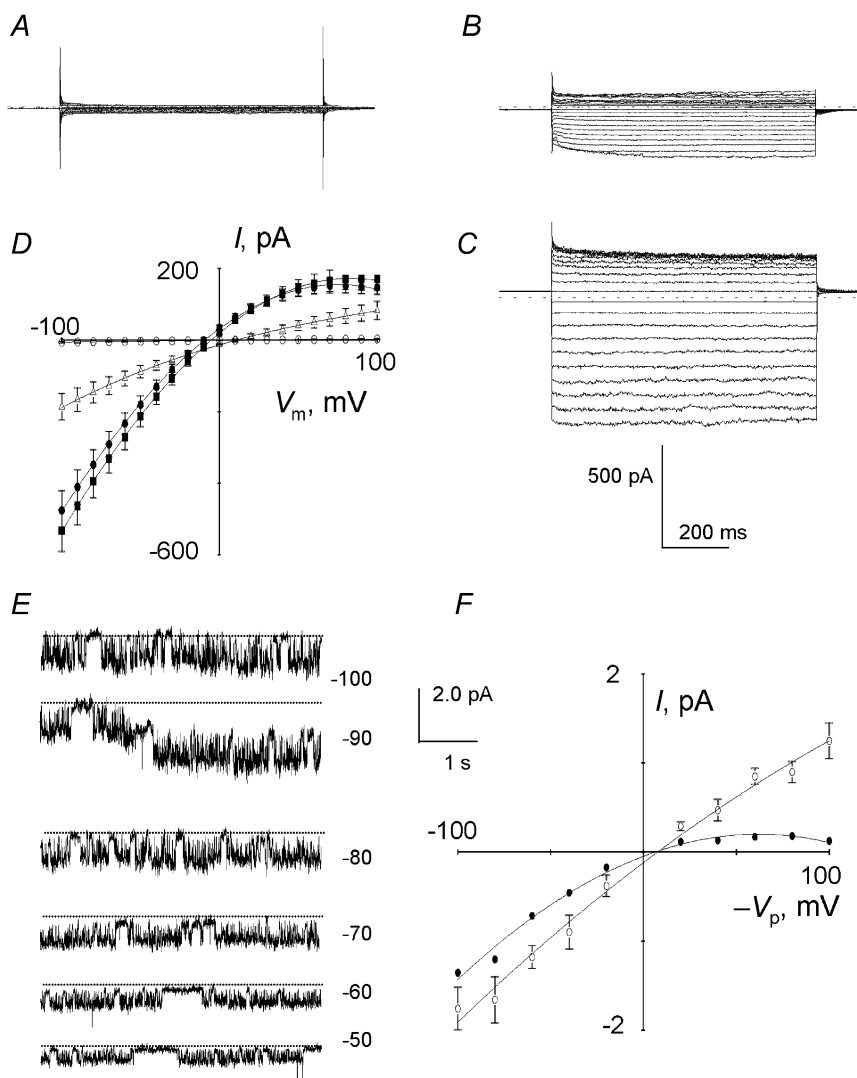
Finally, we used the excised inside-out configuration to identify further the different channel types present in the plasma membranes of uninfected and malaria-infected RBCs. After excision, one type of channel, showing linear conductance (12–15 pS), was observed in more than 80 % of membrane patches from both uninfected and malaria-infected RBCs. In addition, another channel type, which displayed outward rectification, was present in less than 5 % of uninfected cell patches but was never observed in infected cell patches.

Figure 1. Whole-cell and cell-attached single channel recordings of uninfected and infected RBCs

Current traces in uninfected RBCs in control (A) or after addition of PKA catalytic subunit (100 nM) to the pipette solution (B). Current traces in infected RBCs (C) bathing in NMDG-Cl solution (voltage pulses between -100 and $+100$ mV, 10 mV increments, 700 ms).

D, corresponding I - V plots (mean \pm S.E.M.) in control (O, $n = 32$), after addition of PKA (Δ , $n = 58$), in infected cells with NMDG-Cl (\bullet , $n = 24$) or NaCl (\blacksquare , $n = 12$) in the bath. E, typical current recordings at different potentials ($-V_p$) from infected RBCs. F, corresponding I - V plot (mean \pm S.E.M., O, $n = 25$).

\bullet , I - V plot obtained after multiplication of the I value by the corresponding mean P_o .



In uninfected membrane patches, the linear conductance channel was not spontaneously active but could be activated by exposure of the cytosolic side of the membrane to the catalytic subunit of PKA (100 nM) in the presence of ATP (1 mM), after a lag period of 1–3 min (Fig. 2A). The mean I – V relationship was linear ($P < 0.001$) and the unit conductance was 12.3 ± 0.5 pS (62 data points from 8 experiments) (Fig. 2D). In the majority of cases, a progressive run-down of channel activity was observed within the 5 min period after activation, which was probably due to endogenous protein phosphatase activity. ATP alone could not induce channel activity.

Similar channel activity could also be observed, in the absence of PKA, by the application of suction to the pipette of quiescent patches. Under this condition, the P_o values estimated for the activated channels, measured at a given membrane potential, were related to the degree of depression imposed on the membrane patch (Fig. 2B). There was no run-down of the activity during this procedure and its effect was reversible. Using this mode of activation, the I – V curves were linear and the average conductance (13.4 ± 0.5 pS, 55 data points from 10 experiments) was not statistically different ($P < 0.001$) from the value calculated by PKA activation (Fig. 2D).

The linear conductance channel exhibited two characteristic substates in most membrane patches, corresponding to 1/3 and 2/3 of the full amplitude. These substates were more visible after stretch activation than after PKA-activation (Fig. 2B). After stretch activation, the distribution of relative amplitudes was clearly related to the degree of depression imposed on the membrane patches (i.e. longer periods of full opening increased with pressure). In the case of activation by PKA, full channel openings were obtained at high voltages (< -60 mV and $> +60$ mV) for brief durations and were usually preceded by channel openings at the 1/3 substate. At low voltages (-60 to $+60$ mV), amplitude distributions oscillated in a non-discrete manner between the two substates (1/3 and 2/3) with few full channel openings.

In infected cells, a single channel type was always spontaneously active after excision (Fig. 2C) and displayed linear conductance, with a mean unit conductance of 15.7 ± 0.8 pS (60 data points from 7 experiments) (Fig. 2D). The channel exhibited voltage-dependent gating, with a low P_o between $+50$ and $+100$ mV and an increasing P_o between $+50$ and -100 mV (consistent with the observations in the cell-attached configuration). Run-down of channel activity was never observed after excision.

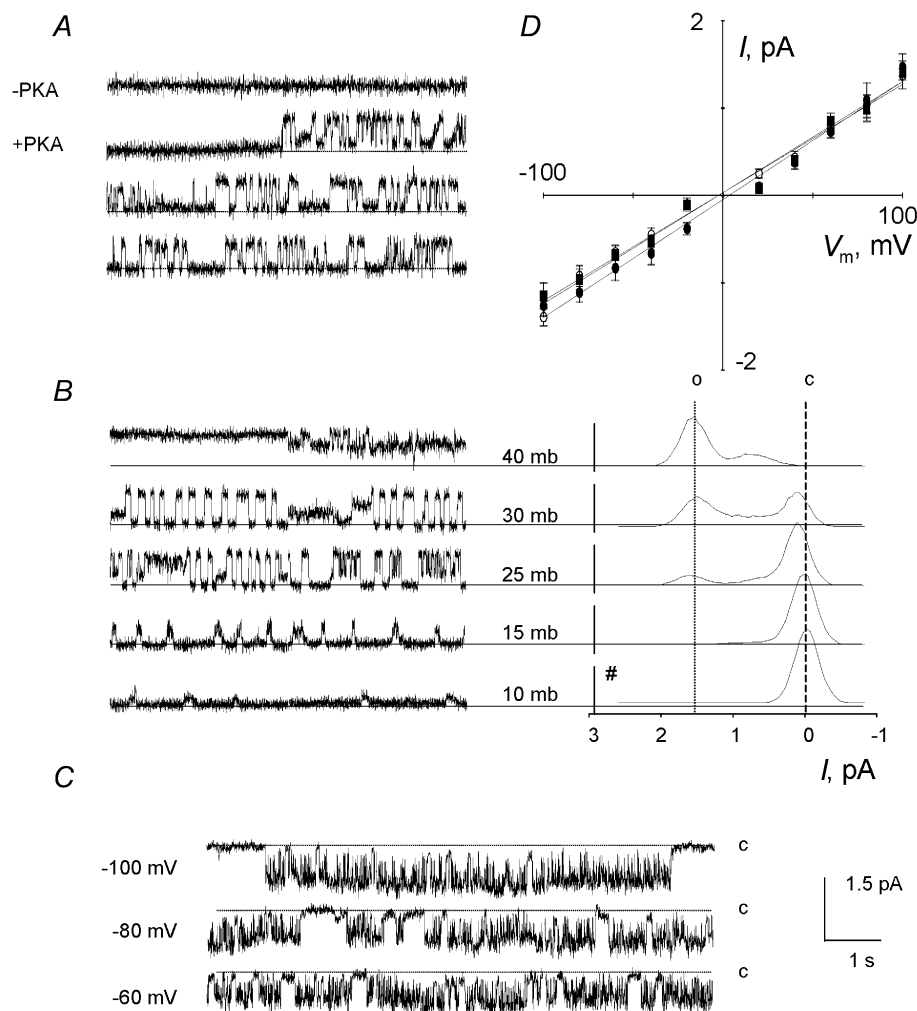


Figure 2. Excised inside-out single channel recordings of linear conductance anion channels in uninfected and infected RBCs

A, activation of an anion channel by exposure of the cytosolic side of the membrane to PKA (100 nM) and ATP (1 mM), after a 1–3 min lag period, at V_m of $+100$ mV. B, activation of the same channel by membrane deformation upon application of calibrated depression in the pipette (V_m of $+100$ mV). Substates corresponding to 1/3 and 2/3 of full amplitude are clearly visible. The right panel shows the distribution of current amplitude from 3 min recordings (#, number of events; o, open state; c, closed state; mb, millibars). C, examples of current recordings from infected RBCs showing fast gating at negative potentials. D, mean I – V plots (\pm S.E.M.) corresponding to A (\circ , $n = 8$), B (\blacksquare , $n = 10$) and C (\bullet , $n = 7$).

The linear conductance channels present in both uninfected (produced via both modes of activation) and infected membrane patches displayed the same halide selectivity ($I^- > Br^- > Cl^-$). Furthermore, they also shared the same pharmacology. Total inhibition of channel activity was obtained by treatment with 100 μM NPPB, 100 μM niflumic acid, 1 mM DPC and 10 μM tamoxifen. DIDS, at a concentration of 100 μM , induced a variable partial block in all cases.

In addition to the linear conductance channel, after excision into the inside-out configuration, an outwardly rectifying channel was identified in only 10 of 243 membrane patches. As shown in Fig. 3, the current–voltage relationship showed strong outward rectification. The channel slope conductance was 11.5 ± 1.3 pS ($n = 10$) between -100 and 0 mV, and it was 79.9 ± 4.1 pS ($n = 10$) for positive membrane potentials. Addition of the chloride channel blockers NPPB ($n = 4$), DIDS ($n = 4$) and 9-AC ($n = 3$) on the cytosolic face of excised patches (100 μM) led, within seconds, to 90–100 % inhibition of channel activity. The presence of PKA and ATP never induced activity of this channel type.

DISCUSSION

Endogenous anion channels in uninfected RBCs

The data presented in this report show that unstimulated, uninfected human RBCs have an almost total absence of anionic channel activity. However, the uninfected RBC membrane is not devoid of anionic channels. In the present study, we have identified a small (~ 15 pS), linear conductance, stretch-activated Cl^- channel in uninfected RBCs. This channel can be induced via two modes of activation (PKA/ATP and membrane deformation). The two modes of activation produce slightly different channel gating activity but the activated channels have the same number of subunits, pharmacology, conductance and selectivity, which indicate that they are the same channel

type. Furthermore, we have also identified an outward rectifying anion channel in uninfected RBCs. However, due to the infrequent observation of this channel in single channel recordings and the absence of outward rectification in the whole-cell configuration, we have been unable to characterise this channel type in detail.

The molecular nature of these two anion channels is as yet unknown and might represent novel classes of anion channels. However, they may also be related to several highly characterised anion channels, which are found in a variety of cell types, including the cystic fibrosis transmembrane regulator protein (CFTR), the volume-regulated anion channel (VRAC) and the ClC chloride channel family (see Table 1 for comparisons).

The mechanosensitivity of the linear conductance channel type is very interesting and may relate to the ATP transport pathway reported by Sprague and co-workers (1998) in human RBCs, which is activated by mechanical deformation and reduced in RBCs from patients with cystic fibrosis. This would support a model in which mechanical deformation of RBCs in the vasculature would result in the activation of anionic channels. These channels would then provide a pathway for ATP release and, thereby, play an important role in regulation of vascular resistance *in vivo* (by the activation of purinergic receptors and synthesis of nitric oxide; Busse *et al.* 1988).

Malaria-induced anion channels in infected RBCs

The data show that the dramatic increase in the membrane conductance of malaria-infected human RBCs results from the activation of anionic channels of a single type. Their general pharmacology, selectivity and electrophysiological characteristics are in good agreement with the previous electrophysiological report, in malaria-infected human RBCs, of small conductance anion channels (Desai *et al.* 2000). However, the channel conductance measured by Desai and co-workers, using the cell-attached configuration with 1150 mM Cl^- in the bath and pipette

Figure 3. Excised inside-out single channel recordings of outwardly rectifying anion channels in uninfected RBCs

A, example of current traces from uninfected RBCs showing outward rectification. *B*, mean I – V plots (\pm S.E.M.) corresponding to 10 recordings.

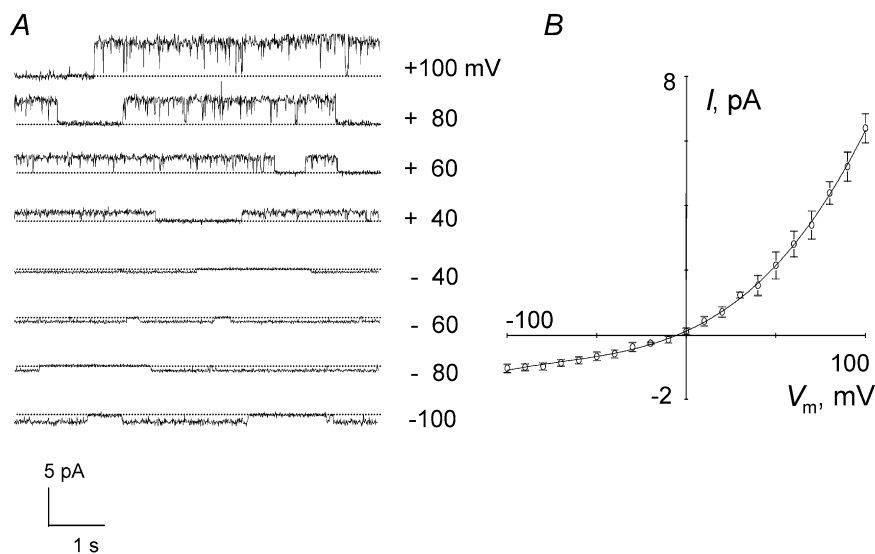


Table 1. An electrophysiological comparison of a malaria-induced small, linear conductance anion channel with several known chloride channel types (compiled from the review by Jentsch *et al.* 2002)

	Channel type						
	Malaria-induced	CFTR	ClC (1–7)	VRAC	Ca ²⁺ -activated	Ligand-gated	Maxi
Conductance	12–18 pS	5–9 pS	1–9 pS	40–50 pS (+V _m)	1–10 pS	10–90 pS	200–400 pS
I–V	Linear	Linear	Subtype dependent	Outward rectification	[Ca ²⁺] dependent	Ligand-type dependent	Linear
Permeation	I [−] > Br [−] > Cl [−]	Br [−] > Cl [−] > I [−]	Cl [−] > Br [−] > I [−]	I [−] > Br [−] > Cl [−]	I [−] > Br [−] > Cl [−]	I [−] > Br [−] > Cl [−]	Cl [−] > acetate
Inhibitors	NPPB, niflumate, glibenclamide, tamoxifen, DPC	NPPB, 9-AC, glibenclamide, DPC, DIDS*, suramin*	Subtype dependent but including: DPC, 9-AC	NPPB, DIDS, tamoxifen, niflumate, 1,9-dideoxy-forskolin	NPPB, DIDS, niflumate	Ligand-type dependent but including: picrotoxin, cyanotriphenylborate	Phalloidin, DIDS, NPPB, pertussis toxin
Modulators	Unknown	Phosphorylation by PKA	Subtype dependent but including: cell swelling, hyperpolarisation, internal pH, internal [Ca ²⁺], depolarisation	Cell swelling	Internal [Ca ²⁺]	Specific ligands (e.g. GABA, glycine)	Cell swelling, phorbol esters, PKC
CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator protein; VRAC, volume-regulated anion channel. * Intracellular application							

solutions, was only 20 pS. This approximates to a channel conductance of only 3 pS (under the conditions used during this study (i.e. 155 mM Cl[−])) compared to a conductance of 12–18 pS presented here. The reason for the higher conductance observed in the present work compared to that of Desai and co-workers is not known, but may be related to the different experimental conditions used. The present study was carried out at 37°C with glucose in the bath, conditions that may affect (directly or indirectly) the particular anion channel or conductance substate observed in malaria-infected RBCs. Desai and co-workers also reported a greater effect of furosemide on the malaria-induced anion channel than reported here (for which we are unable to provide an explanation).

Extending this work, we have shown here that the single channel conductance of the malaria-induced channel is linear with a low P_o at positive potentials. Together with the voltage-dependent open-time duration and number of active channels, it provides an explanation for the inward rectification of the whole-cell *I–V* curves (see Fig. 1*D*) observed in malaria-infected RBCs.

Furthermore, the conductance, substrate selectivity and pharmacology of the observed malaria-induced channel, using the excised inside-out configuration of the patch-clamp method, are identical to the endogenous linear conductance anion channel measured in uninfected RBCs.

The finding that *P. falciparum* activates an endogenous ion channel is similar to the action of *P. gallinaceum* in infected chicken RBCs (Thomas *et al.* 2001) and is consistent with the hypothesis that *P. falciparum* up-regulates native anion channels in the host plasma membrane.

If this is the case, the observed differences in gating and P_o between the anion channel and the malaria-induced channel may well be due to the mode of action by which the parasite up-regulates the channels. This hypothesis is reinforced by the differences in the gating of the anion channel measured, using two different modes of activation (PKA/ATP and deformation). The present observation that it is possible to induce, in uninfected RBCs, a whole-cell current by the addition of PKA and ATP, which mimics, albeit to a lower extent, the membrane current observed in infected cells suggests that the mechanism of up-regulation used by the parasite may involve phosphorylation steps. It is known that the malaria parasite produces many kinases (Kappes *et al.* 1999) and parasite-dependent kinase activities have been detected at the membrane of the host RBC (Chishti *et al.* 1994). Furthermore, the host PKA present in the erythrocyte appears to be modified following infection with *P. falciparum*, which produces its own PKA molecule (Syin *et al.* 2001). A better understanding of a possible role for these kinases in activating anion channels could be important in developing strategies for future malarial chemotherapies.

Recently, in a similar study to our present work, Huber and co-workers (2002) have also reported that native anion channels are up-regulated in malaria-infected human RBCs. However, they found that two endogenous channel types are activated by the parasite. One channel produces inward rectification of membrane conductance while the other produces outward rectification and, although sharing functional and pharmacological characteristics, neither is identical to the channels reported here and by Desai and co-workers (2000). Paradoxically, Huber and co-workers reported that the whole-cell conductance in infected RBCs, which has the closest pharmacological profile to the inwardly rectifying malaria-induced conductance reported here and by Desai and co-workers, is the outwardly rectifying conductance and that it is this conductance that mediates malaria-induced transport predominantly.

While our findings, like Huber and co-workers, demonstrate the presence of a second endogenous anion channel in the host RBC membrane, we have never observed its activation in infected RBCs. Furthermore, Huber and co-workers show evidence that these channels are activated by oxidation of the host membrane. It is impossible to rule out this mechanism of activation from the data presented here but it is important to note that neither Huber and co-workers (2002) nor Desai and co-workers (2000) used glucose in their solutions. This will have a major impact on the ATP levels present in the infected RBC and the consequent important physiological changes that low ATP levels produce (e.g. depletion of ATP by the removal of glucose from the medium in malaria-infected RBCs induces a novel Ca^{2+} permeation route; Staines *et al.* 1999).

In conclusion, using the patch-clamp technique, we have identified two quiescent anion channels in uninfected human RBCs (a small conductance, stretch-activated channel and an outwardly rectifying channel). The data are consistent with the hypothesis that the linear conductance anion channel is activated by the malaria parasite *P. falciparum* during its intraerythrocytic phase.

REFERENCES

- BUSSE, R., OGILVIE, A. & POHL, U. (1988). Vasomotor activity of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate in isolated arteries. *American Journal of Physiology* **254**, H823–H828.
- CHISHTI, A. H., MAALOUF, G. J., MARFATIA, S., PALEK, J., WANG, W., FISHER, D. & LIU, S. (1994). Phosphorylation of Protein 4.1 in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells. *Blood* **83**, 3339–3345.
- DESAI, S. A., BEZRUKOV, S. M. & ZIMMERBERG, J. (2000). A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* **406**, 1001–1005.
- DOERIG, C. D., DOERIG, C. M., HORROCKS, P., CARLTON, J., SULTAN, A., ARNOT, D. & CARTER, R. (1995). Pfcrk-1, a developmentally regulated cdc2-related protein kinase of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **70**, 167–174.
- EGÉE, S., LAPAIX, F., COSSINS, A. R. & THOMAS, S. L. Y. (2000). The role of anion and cation channels in volume regulatory responses in trout red blood cells. *Bioelectrochemistry* **52**, 133–149.
- FREEDMAN, J. C., NOVAC, T. S., BISOGNANO, J. D. & PRATAP, P. R. (1994). Voltage dependence of DIDS-insensitive chloride conductance in human red blood cells treated with valinomycin or gramicidin. *Journal of General Physiology* **104**, 961–983.
- GINSBURG, H. (1999). The permeability properties of the parasite cell membrane. *Novartis Foundation Symposium* **226**, 99–108.
- HUBER, S. M., UHLEMANN, A. C., GAMPER, N. L., DURANTON, C., KREMSNER, P. G. & LANG, F. (2002). *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl^- channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO Journal* **21**, 22–30.
- JENTSCH, T. J., STEIN, V., WEINREICH, F. & ZDEBIK, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews* **82**, 503–568.
- KAPPES, B., DOERIG, C. D. & GRAESER, R. (1999). An overview of *Plasmodium* protein kinases. *Parasitology Today* **15**, 449–454.
- KIRK, K. (2001). Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiological Reviews* **81**, 495–537.
- KIRK, K., HORNER, H. A., ELORD, B. C., ELLORY, J. C. & NEWBOLD, C. I. (1994). Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 3339–3347.
- SCHWARTZ, R. S., RYBICKI, A. & NAGEL, R. L. (1997). Molecular cloning and expression of a chloride channel-associated protein p1Cln in human young red blood cells: association with actin. *Biochemical Journal* **327**, 609–616.
- SPRAGUE, R. S., ELLSWORTH, M. L., STEPHENSON, A. H., KLEINHENZ, M. E. & LONIGRO, A. J. (1998). Deformation-induced ATP release from red blood cell requires CFTR activity. *American Journal of Physiology* **275**, H1726–H1732.
- STAINES, H. M., CHANG, W., ELLORY, J. C., TIFFERT, T., KIRK, K. & LEW, V. L. (1999). Passive Ca^{2+} transport and Ca^{2+} -dependent K^+ transport in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. *Journal of Membrane Biology* **172**, 13–24.
- SYIN, C., PARZY, D., TRAINCARD, F., BOCCACCIO, I., JOSHI, M. B., LIN, D. T., YANG, X. M., ASSEMAT, K., DOERIG, C. & LANGSLEY, G. (2001). The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes. *European Journal of Biochemistry* **268**, 4842–4849.
- TABCHARANI, J. A., CHANG, X. B., RIORDAN, J. R. & HANRAHAN, J. W. (1991). Phosphorylation-regulated Cl^- channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* **352**, 628–631.
- THOMAS, S. L. Y., EGÉE, S., LAPAIX, F., KAESTNER, L., STAINES, H. M. & ELLORY, J. C. (2001). Malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* up-regulates host red blood cell channels. *FEBS Letters* **500**, 45–51.

Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Research (PAL+ and PRFMIP programmes), the French Ministry of Defence (DGA), the WHO/UNDP/World Bank TDR programme, the Wellcome Trust (Grant No. 058230 and 066067) and the Fondation Langlois.

Identification and characterisation of CFTR-like channels in human red blood cells membrane : physiological function and implication in the Plasmodium falciparum-induced new permeability pathways

Abstract

During the course of its complex life cycle, *Plasmodium falciparum* invades the red blood cells of its vertebrate host. The strategy of living inside the cells of its host, helps the parasite evade the host's immune system. The fast growth of the invading parasite (48 hours) implies that it must have mechanisms for obtaining nutrients and for eliminating metabolic wastes. Consequently, appears a new permeability pathway (NPP) ensuring an increase of the flow of essential solutes for its development across the host cell membrane. Radioisotope fluxes and isosmotic hemolysis experiments demonstrate that this pathway has the functional characteristics of an anionic channel.

A Recent study from our laboratory point out that malaria-infected cells present spontaneously active channels, in contrast, no spontaneous activity can be recorded in the membrane of non-infected erythrocytes. However, a similar activity (to infected cells) can be activated in the membrane of those cells by applying PKA_c on the intracellular side.

The aim of this report is double. The first objective is to identify and to characterize the chloride channels of uninfected red blood cells. The second one is to determine if those channels are involved in the NPP. In order to answer to those questions two kinds of erythrocytes were used: control cells from healthy donors and CF cells from $\Delta F508$ cystic fibrosis patients. The patch-clamp technique allows observing a CFTR-like activity in both kinds of cells. Nevertheless, CF cells display a reduced CFTR conductance. This result must be linked to the immunodetection of CFTR proteins in both kinds of cells. Actually, western-blotting reveals that CF cells have fewer quantities of this membrane protein than control cells.

Surprisingly, the reduced quantity of CFTR in the membrane of CF erythrocytes has no gross effect on *in vitro* parasite growth. Moreover, spontaneously activate chloride channels can be observed in malaria-infected CF cells. However, their membrane global conductance is lower than malaria-infected control cells' one. This result, correlatively to our observations realized on uninfected cells, indicates that this difference is mainly due to the small amount of CFTR channels in the membrane of CF cells. Such differences suggest that *P. falciparum* is able to use CFTR-like channels in order to increase the flow of solutes across the host membrane. Preliminary results obtained with alkaline phosphatase and PKI, allows to suppose that the parasite produces its own kinases and/or that he is able to potentiate the activity of endogenous ionic channels of host red blood cell.

Keywords : Erythrocytes, ionic channels, new permeability pathways (NPP), *Plasmodium falciparum*, CFTR, Patch-clamp.

Identification et caractérisation de canaux CFTR-like dans la membrane des érythrocytes humains : rôle physiologique et implication dans la nouvelle voie de perméabilité induite au cours de l'infection par Plasmodium falciparum

Résumé

Plasmodium falciparum, le parasite responsable de la malaria, est capable d'envahir les globules rouges de son hôte afin de croître et de se diviser à l'abri de son système immunitaire. Cette croissance rapide (48 heures) implique d'importants besoins métaboliques accompagnés d'une production extensive de catabolites. Dès lors, apparaît une nouvelle voie de perméabilité (NPP) pour faire face à l'accroissement du flux de solutés nécessaire pour son développement. Les mesures de flux isotopiques ou de lyse isosmotique réalisées sur des cellules infectées révèlent que le NPP présente les caractéristiques fonctionnelles d'un canal anionique.

Des travaux récents, menés au sein de notre équipe, mettent en évidence l'existence de canaux spontanément actifs dans la membrane de hématies infectées, ce qui n'est pas le cas des cellules non infectées. Toutefois une activité canalaire identique peut être activée par phosphorylation par la PKA_c.

Ce travail de thèse a un double objectif, d'une part caractériser et identifier les canaux Cl⁻ des globules rouges non infectés et, d'autre part, déterminer si ces canaux sont impliqués dans le NPP. Pour répondre à ces questions deux types d'érythrocytes ont été utilisés : des cellules contrôle de volontaires en bonne santé et des cellules CF de patients atteints de mucoviscidose porteurs de la mutation $\Delta F508$. L'utilisation de la technique du *patch-clamp* permet de mesurer une activité de type CFTR-like dans les deux types de cellules utilisés. Toutefois, les cellules CF présentent une conductance membranaire globale due au CFTR réduite par rapport à celle des contrôles. L'immunodétection de ces protéines par la méthode du *western-blot* montre que le CFTR est présent dans la membrane des deux types cellulaires mais en quantité moindre dans les cellules CF.

Cette quantité réduite n'affecte en rien la croissance *in vitro* de *P. falciparum*. Ces cellules présentent des canaux spontanément actifs. Toutefois, les courants membranaires globaux enregistrés sont inférieurs à ceux des cellules contrôle infectées. Ce résultat, corrélativement, aux observations réalisées sur des cellules non infectées, permet de supposer que cette différence de conductance résulte essentiellement du nombre réduit de canaux dans la membrane de ces cellules. Ces différences indiquent donc que *P. falciparum* utilise les canaux CFTR-like pour augmenter l'intensité des échanges à travers la membrane érythrocytaire. Les résultats préliminaires obtenus avec la phosphatase alcaline et le PKI, nous permettent de supposer que le parasite produit ses propres kinases et/ou qu'il modifie celles de son hôte afin de potentialiser l'activité des canaux ioniques de son hôte.

Mots clés : Erythrocytes, canaux ioniques, nouvelle voie de perméabilité (NPP), *Plasmodium falciparum*, CFTR, *Patch-clamp*.

(English version of this abstract on the inside back cover)