

### 1.4.3 Le transport protéique chez *P. falciparum*

Le globule rouge dans lequel se développe le parasite est un environnement plutôt inhospitalier. En effet, l'érythrocyte est une cellule anucléée, dépourvue d'organite et d'un système de production protéique. Afin d'y survivre, *Plasmodium* se doit d'implanter son propre système de production et de transport protéique. Ce système complexe doit assurer d'une part le transport de protéines aux différents organites du parasite et d'une autre part l'export de matériels au-delà de la MPP, dans la VP ou à l'intérieur de la cellule hôte. De ce fait, le système de sécrétion de *Plasmodium* est essentiel et se doit d'être hautement organisé et dynamique.

#### 1.4.3.1 Le système de sécrétion eucaryote vs *P. falciparum*

Les bases du système de sécrétion de *Plasmodium* sont similaires à celles décrites chez les eucaryotes et inclus le transport des protéines via le RE et l'appareil de Golgi, suivi de leur transport à l'intérieur de vésicules vers leur destination finale (Figure 15). Ce système de sécrétion est emprunté par les protéines des différents organites, mais aussi par les protéines sécrétées dans la VP ou exportées vers le globule rouge. Cependant, certaines protéines de la VP et de l'apicoplaste sont transportées directement à partir du RE sans passer par l'appareil de Golgi<sup>185</sup>.

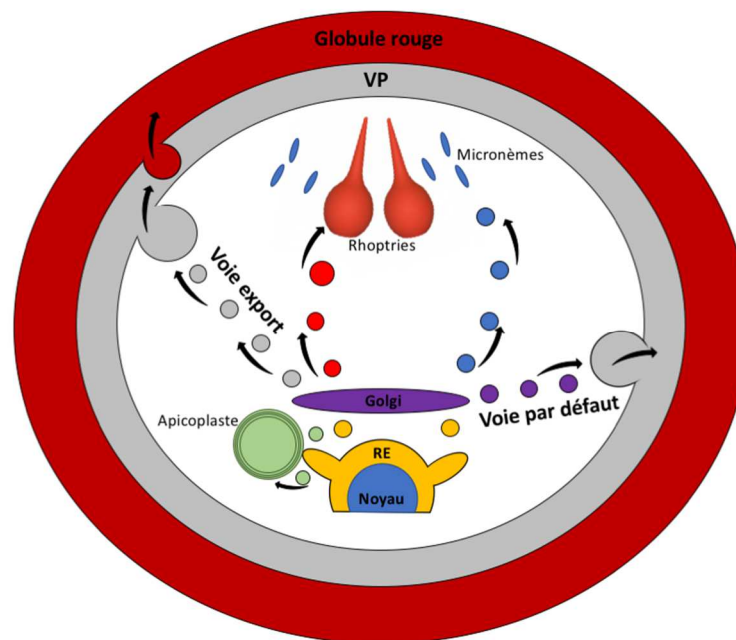


Figure 15 : Le système de sécrétion de *P. falciparum*

Il a été démontré que *Plasmodium* opère un système de sécrétion similaire à celui décrit chez les eucaryotes. Selon ce système, les protéines triées et sécrétées à l'appareil de Golgi voyagent à l'intérieur de vésicules similaires aux endosomes. De plus, des protéines homologues aux

composantes du rétomère eucaryote ont été identifiées et étudiées (VPS26/29/35), mettant en évidence la présence d'un système de recyclage de molécules sécrétées au TGN<sup>186</sup>. De plus, des homologues aux protéines du manteau ont aussi été trouvés pour le complexe COPI<sup>187</sup> et COPII (SEC23/24, SAR1, SEC13/31)<sup>188-190</sup>.

De la même façon que chez les eucaryotes, la famille de protéines Rab GTPases joue un rôle clé dans la régulation du transport vésiculaire et dans l'identité des différents compartiments. Jusqu'à maintenant, 11 membres de la famille Rab ont été identifiés chez *P. falciparum* avec des fonctions et des localisations diverses (Tableau 3)<sup>191,192</sup>. Certaines de ces protéines Rab assurent des fonctions similaires à leur homologue eucaryote tandis que certaines autres ont acquis des fonctions spécifiques au parasite. Par exemple les protéines Rab5A et B sont impliquées dans le transport de l'hémoglobine vers la VD<sup>193,194</sup>.

**Tableau 3 : La famille de protéines Rab chez *P. falciparum*** <sup>191</sup>

Protéines Rab	Rôle potentiel/Localisation
<b>Rab1A</b>	Transport de protéines vers les rhoptries ; Localisée aux rhoptries <sup>195</sup>
<b>Rab1B</b>	Transport ER=> Golgi <sup>191</sup>
<b>Rab2</b>	Rôle dans la taille de la vésicule ; localisation indéterminée <sup>191</sup>
<b>Rab5A</b>	Transport de vésicules contenant l'hémoglobine vers la VD <sup>193</sup>
<b>Rab5B</b>	Transport de protéines à la MPP et à la VD <sup>194</sup>
<b>Rab5C</b>	Inconnu
<b>Rab6</b>	Transport intra-Golgi vers le TGN ; Localisée au TGN <sup>196</sup>
<b>Rab7</b>	Transport endocyttaire à partir TGN et transport rétrograde vers TGN <sup>186</sup>
<b>Rab11A</b>	Transport de protéines à la MPP et à l'IMC lors de la division cellulaire <sup>197</sup>
<b>Rab11B</b>	Transport de protéines à l'IMC lors de la division cellulaire <sup>198</sup>
<b>Rab18</b>	Non caractérisée

En vérité, le rôle fonctionnel des différents effecteurs du système de sécrétion chez *P. falciparum* a très peu été étudié et démontré. La majorité des connaissances sont basées sur des études de localisation chez le parasite et sur des travaux réalisés chez *Toxoplasma*. De ce fait, les rôles potentiels avancés pour ces effecteurs reposent sur l'assomption que ces protéines possèdent un rôle conservé chez les apicomplexés et de façon plus générale chez l'ensemble des eucaryotes. Or, on dénote plusieurs différences importantes entre le système de sécrétion classique et celui présent chez *Plasmodium*. Première différence, l'organisation de l'appareil de Golgi. Malgré une fonction similaire, le Golgi de *P. falciparum* est composé d'une seule citerne comparativement aux eucaryotes supérieurs et à *Toxoplasma*, qui possèdent un empilement de citernes<sup>199,200</sup>. Cependant, ce Golgi plutôt primitif de *Plasmodium*, est composé de différents compartiments (région cis et trans) accomplissant des fonctions différentes (section 1.4.3.2).

Deuxième différence, la variété et la singularité des organites de *Plasmodium*. Le parasite possède plusieurs compartiments uniques et sans homologue chez les eucaryotes : les rhoptries, les micronèmes, l'apicoplaste ou encore une structure similaire au lysosome, la VD. Le parasite doit donc développer des outils afin de correctement adresser les protéines vers chacun de ces organites, en plus de gérer l'export de protéines.

Troisième différence, l'adressage des protéines destinées au système de sécrétion au moment de la translocation au RE. En effet, la voie classique retrouvée chez les eucaryotes prévoit que les protéines destinées au système de sécrétion possèdent un PS à l'extrémité N-terminale ou un domaine transmembranaire. Cependant, chez *P. falciparum*, il a été observé que certaines protéines exportées ne possédaient pas de PS classique. Contrairement au PS classique situé directement au début de la séquence protéique, certaines protéines solubles exportées possèdent une extension en N-terminale, en amont de la séquence hydrophobe associée au PS. Cette séquence encastrée en début de protéine est de longueur variable, et peut aller jusqu'à cinquante acides aminés<sup>201,202</sup>. Cette extension ne semble cependant pas impliquée dans l'adressage à la voie de sécrétion, mais son rôle est encore mal compris<sup>203</sup>. De plus, plusieurs de ces protéines exportées possédant un PS atypique ou encore possédant un domaine transmembranaire sans PS, sont transloquées au RE de façon post-traductionnel. Cette voie alternative est indépendante du complexe SRP, mais nécessite l'assistance de protéines chaperonnes cytosoliques suivie d'une translocation post-traductionnelle au RE via le translocon<sup>204</sup>.

En résumé, les différentes protéines qui entrent dans le système de sécrétion au RE possèdent un ou plusieurs signaux stipulant la voie à emprunter : PS et/ou signal d'adressage à un organite particulier. Les protéines sont ensuite transportées dans les vésicules vers un lieu temporaire (VP) ou encore à leur destination finale. En l'absence d'un signal particulier, la voie par défaut du parasite est celle menant à la VP dans le cas de protéines solubles et à la MPP pour les protéines transmembranaires, contrairement aux eucaryotes où la sécrétion extracellulaire ou la membrane plasmique est la destination privilégiée<sup>205,206</sup>.

#### *1.4.3.2 L'organisation de l'appareil de Golgi*

La structure de l'appareil de Golgi de *Plasmodium* fut l'objet de quelques études afin de déterminer s'il était formé ou non d'un empilement de citernes. Les observations en microscopie à fluorescence, mais surtout en microscopie électronique n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de plusieurs sacs membranaires typique d'un Golgi classique<sup>30,207</sup>. Cependant, d'autres études ont montré que différents marqueurs pour cet organite sont localisés à des endroits différents<sup>190,199</sup>. Il fut

donc conclu que l'appareil de Golgi de *P. falciparum* est dispersé, mais composé d'une seule citerne organisée en plusieurs compartiments<sup>208</sup>.

Ces études sur l'organisation du Golgi ont aussi permis de mettre évidence des marqueurs pour les différents compartiments. Par exemple, la protéine Rab6 est retrouvée dans la région correspondant au trans Golgi. De plus, la protéine ERD2 (« ER lumen protein retaining receptor »), un récepteur KDEL, responsable du transport rétrograde de protéines résidentes du RE à partir du Golgi, est un excellent marqueur pour la région cis<sup>209</sup>. Finalement, les protéines GRASP et Bet3 peuvent aussi être utilisées comme marqueur pour le cis Golgi<sup>189,208</sup>.

La caractérisation de ces protéines du Golgi a aussi permis de décortiquer le processus division du Golgi lors de la cytokinèse. Tout d'abord, lors du stade précoce (anneau) le parasite ne possède qu'un seul Golgi. Par la suite, au cours des instants précédant la première division nucléaire, un second appareil est formé. La multiplication du Golgi s'effectue donc au fil de la division nucléaire. Finalement, au terme de la division nucléaire et cellulaire, chaque mérozoïte possède son propre appareil de Golgi<sup>208</sup>.

À titre de rappel, notons que la région du trans Golgi de *Plasmodium* est aussi associée à un rôle de plateforme de triage pour les protéines des différents organites et celles exportées. De nombreux homologues aux protéines de la machinerie de transport eucaryote ont été identifiés chez *P. falciparum* : clathrines, protéine adaptatrices, SNARE, Rab GTPase<sup>185</sup>. À ce jour, peu de recherches ont été entreprises afin d'investiguer la présence et le rôle des récepteurs de cargo chez le parasite. Par contre, il semble que tout comme chez la levure, *Plasmodium* ne possède pas d'homologue au M6PR eucaryote. Cependant, un homologue à la protéine sortiline a été identifié et localisé à l'appareil de Golgi<sup>186</sup>.

Finalement, le rôle précis des protéines de la machinerie de transport dans la sélection protéique ainsi que la spécificité du transport sont peu connus et mal compris. Des modèles ont cependant été établis pour différentes voie de transport dont la voie de transport des protéines apicales (section 1.4.3.3), celle vers l'apicoplaste (section 1.4.3.4) et celle permettant l'export de protéines (section 1.4.3.5).

#### **1.4.3.3 Le transport des protéines apicales**

Malgré leur caractère essentiel et leur rôle au moment de l'invasion, les connaissances quant aux mécanismes menant à la formation et au transport spécifique des protéines apicales restent insuffisantes. L'intérêt croissant pour la caractérisation de cette voie de transport a cependant permis d'identifier certaines pièces du casse-tête. Tout d'abord, lors de la schizogonie, les organites du complexe apical sont synthétisés *de novo*, nécessitant un transport d'une importante quantité et variété

de protéines apicales lors des stades tardifs. Des observations en microscopie électronique ont permis de visualiser et de déterminer que les protéines apicales sont transportées à l'intérieur de vésicules bourgeonnant de l'appareil de Golgi<sup>30,91</sup>. De plus, la majorité des protéines apicales possèdent un PS ou encore un domaine transmembranaire confirmant que les protéines apicales sont prises en charge par le système de sécrétion. Mais contrairement aux protéines exportées ou encore aux protéines de l'apicoplaste, les protéines apicales ne semblent pas posséder de motifs singuliers ou de séquences d'adressages particulières dictant leur destination. Cette particularité implique la présence d'un mécanisme de sélection spécifique afin que la machinerie de transport soit en mesure de transporter de façon différentielle les protéines destinées aux différents organites apicaux. Des études réalisées chez *Toxoplasma* ont identifié la sortiline comme étant le déterminant vers la voie apicale (voir section 1.4.4.2). Cependant, aucun rôle n'a encore été attribué à la sortiline de *P. falciparum*.

Parmi les autres composantes de la machinerie de transport potentiellement impliquées dans le trafic apical, l'on retrouve la protéine AP-1. Cette protéine adaptatrice, homologue à celle retrouvée chez les eucaryotes est localisée au Golgi au stade trophozoite, mais aux rhoptries lors du stade schizont. Cette évolution dans la localisation en fonction du développement du parasite indique un rôle potentiel de la protéine AP-1 dans le transport de protéines aux rhoptries<sup>210</sup>. Un des rôles des protéines AP est de reconnaître et de lier un motif spécifique contenant un résidu tyrosine ou un motif dileucine dans le domaine cytoplasmique des protéines transmembranaires<sup>211,212</sup>. Cependant, plusieurs des protéines apicales ne possèdent pas de domaine transmembranaire et donc de queue cytoplasmique<sup>185</sup>. De plus, il a été montré que le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique de certaines protéines de micronèmes n'est pas nécessaire à leur localisation<sup>213,214</sup>. Il s'agit d'une autre démonstration de la présence d'un mécanisme alternatif et encore inconnu pour le triage et la sélection de protéines au TGN.

Un des mécanismes identifiés afin de transporter des protéines apicales solubles est l'interaction des protéines de rhoptries RAMA-RAP1. En effet, il a été démontré que la protéine RAMA, exprimée précocement à l'appareil de Golgi, est impliquée dans le transport des complexes de protéines RAP, mais aussi RhopH aux rhoptries<sup>107</sup>. Ceci a été montré en microscopie où l'absence d'interaction entre RAMA et RAP1 entraîne une localisation à la PV, la destination par défaut, des protéines RAP1 et RAP2. Ancrée à la membrane par un groupe GPI, RAMA agirait donc comme escorte pour ces protéines de rhoptries. Les études suggèrent qu'une fois à destination, l'interaction RAMA-RAP1 serait brisée par clivage protéolytique de la protéine RAP1 par SUB1 et que le complexe RAP serait libéré dans le lumen de la rhoptrie<sup>106</sup>. L'étude du complexe RAMA-RAP1/2 a aussi permis localiser ce dernier à l'intérieur de régions de la membrane du Golgi résistantes aux détergents. La présence

de protéines de rhoptries, mais pas de micronèmes à l'intérieur de ces régions de type radeau lipidique a permis d'établir un modèle pour le transport de protéines apicales (Figure 16). Selon le modèle établi par les auteurs, il y aurait dans la membrane de l'appareil de Golgi des microdomaines lipidiques ayant une composition protéique distincte permettant l'oligomérisation de protéines en complexe afin de rassembler les protéines destinées à un organe spécifique<sup>106</sup>. Ce type de plateforme lipidique et protéique est présent et caractérisé chez les cellules épithéliales dans le cas du transport des protéines destinées à la membrane apicale<sup>215</sup>.

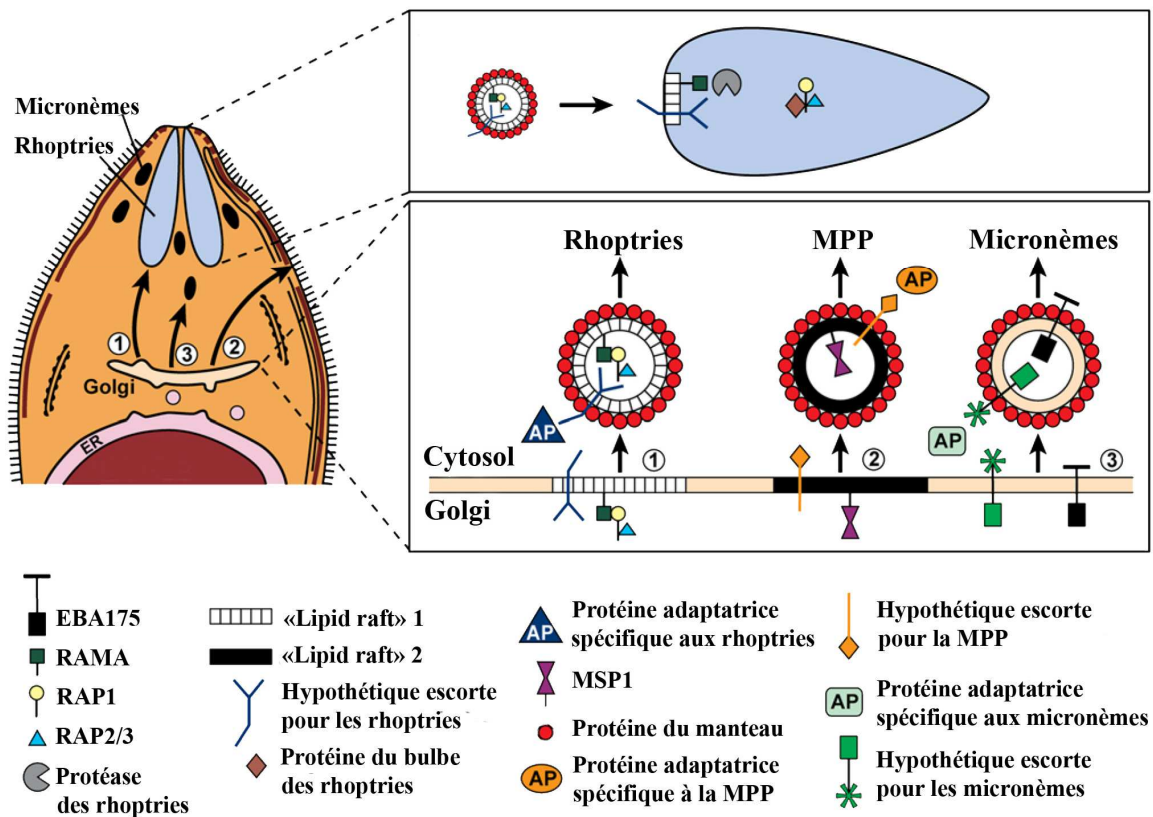


Figure 16 : Modèle de la sélection des protéines apicales au TGN (Adaptée de <sup>106</sup>)

#### 1.4.3.4 Le transport des protéines à l'apicoplaste

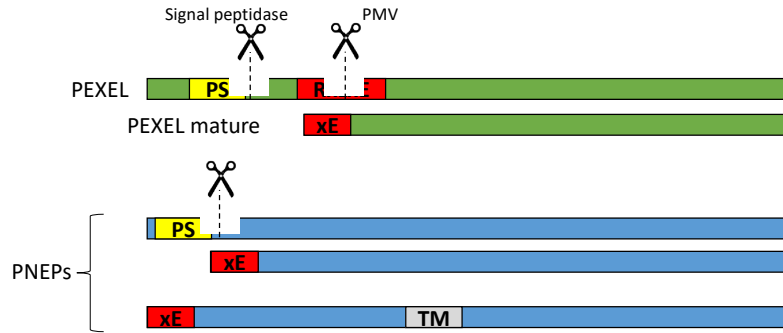
L'apicoplaste de *Plasmodium* est le résultat d'une endosymbiose secondaire d'une algue rouge. Cependant au cours de l'évolution, la majorité des gènes encodés par l'apicoplaste ont été transférés au noyau du parasite. Ce dernier a donc dû mettre en place une voie de trafic afin de transporter ces protéines à l'apicoplaste. De plus, afin d'atteindre leur cible les protéines doivent traverser les quatre membranes entourant l'apicoplaste, ce qui représente un défi majeur pour le parasite.

Il a été démontré que les protéines de l'apicoplaste possèdent deux signaux spécifiques à leur extrémité N-terminale. Un premier correspondant au PS, permettant la translocation au RE, suivi d'un second peptide transit (« plant-like transit peptide »)<sup>216</sup>. Suite à la translocation au RE, le PS est clivé révélant ainsi un nouveau signal en N-terminal, correspondant au signal d'adressage à l'apicoplaste<sup>217</sup>. Plusieurs théories ont été émises quant aux mécanismes et chemins empruntés par ces protéines. Les deux premières proposent que les protéines sont transportées directement à partir du RE sans passer par le Golgi. Selon la première hypothèse, le transport se ferait à l'intérieur de vésicules. Selon la seconde, il y aurait une proximité et un contact entre les membranes du RE et de l'apicoplaste permettant un passage direct du lumen du RE à l'espace entre les deux premières membranes de l'apicoplaste<sup>218</sup>. La troisième théorie penche plutôt vers un transport classique via l'appareil de Golgi suivi d'un transport à l'intérieur de vésicules<sup>219</sup>.

Finalement, une étude récente a cependant permis d'éclaircir le sujet et a démontré que possiblement toutes ces voies coexisteraient. De ce fait, les protéines associées aux membranes de l'apicoplaste voyageraient via la voie classique en passant par le Golgi, et les protéines solubles seraient plutôt transmises directement depuis le RE<sup>220</sup>. Cependant, plusieurs interrogations persistent à savoir comment ces protéines sont spécifiquement choisies et ciblées vers l'apicoplaste, que ce soit au RE ou au Golgi et quel est le rôle exact du peptide de transit dans l'adressage à l'apicoplaste.

#### *1.4.3.5 L'export de protéines*

Plusieurs des protéines nécessaires à la virulence et à la survie du parasite au cours de la pathogénèse sont exportées dans l'érythrocyte. Ces protéines exportées sont nombreuses et représentent environ 8% de l'ensemble des protéines codées chez *Plasmodium*. La majorité de ces protéines possèdent une séquence d'export nommée PEXEL (« *Plasmodium* export element »). Le PEXEL est situé à une vingtaine d'acides aminés du PS et est constitué d'un motif de type RxLxE/Q/D<sup>221,222</sup>. Suite à la translocation au RE, le PS puis la séquence PEXEL sont clivés par la signal peptidase et la protéine PMV (« plasmepsine V ») respectivement (Figure 17). La présence du signal PEXEL et son clivage par la protéine PMV au RE sont nécessaires à l'export de la protéine<sup>223</sup>. Il a cependant été démontré que certaines des protéines exportées ne possèdent pas de motif PEXEL : les PNEP (« PEXEL-negative exported protein »). Parmi ces dernières, certaines possèdent un SP et d'autres ne possèdent qu'un domaine transmembranaire<sup>224</sup>.



**Figure 17 : Séquences PEXEL et PNEP**

L'existence des PNEPs soulève plusieurs questions. Comment la machinerie de transport peut reconnaître et engager dans la voie d'export des protéines possédant un signal d'export et ceux sans signal particulier? La réponse résiderait dans la séquence des derniers acides aminés, laissés à l'extrémité N-terminale suite au clivage du PEXEL par la protéase PMV. Effectivement, il a été observé chez les différentes PNEP la présence d'une séquence similaire à celle des protéines PEXEL suite au clivage (Figure 17). Ces quelques acides aminés seraient suffisants pour dicter l'export<sup>225</sup>. Cependant, comment ces protéines sont sélectionnées et guidées pour l'export reste encore un mystère.

Les protéines destinées à l'export sont transportées via la voie de sécrétion vers la VP à l'intérieur de vésicules de transport (Figure 18). Les protéines solubles sont alors libérées dans la lumière de la VP tandis que les protéines transmembranaires sont délivrées à la MPP. Si nécessaire, les protéines de la MPP sont transloquées à la VP via un translocon inconnu à ce jour. Ensuite, les protéines possédant les signaux d'export sont prises en charge par un translocon spécialisé situé dans la membrane de la VP: PTEX<sup>226</sup>. Le PTEX assure le passage des protéines à travers la membrane de la VP jusqu'au cytosol du globule rouge. Après quoi elles sont transportées à la membrane de l'érythrocyte ou plus fréquemment aux « Maurer's clefts ». Cet organe, semblable à un appareil de Golgi, trie et assemble en complexe les protéines exportées. Finalement, les protéines sont transportées à l'intérieur de vésicules des « Maurer's clefts » vers la région de la membrane plasmique du globule rouge où elles remplissent leur fonction<sup>227,228</sup>.



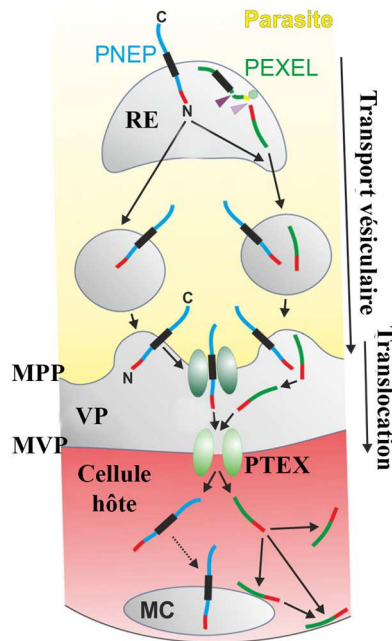


Figure 18 : L'export de protéines chez *P. falciparum* (Adaptée de <sup>225</sup>)

#### 1.4.4 Le transport protéique chez *Toxoplasma*

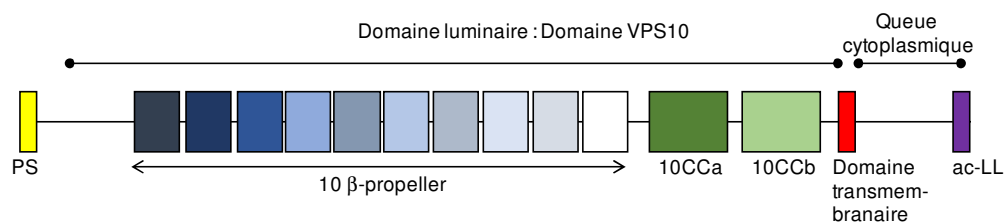
Il est important de rappeler que *Toxoplasma* est aussi un membre de la famille *Apicomplexa* et qu'il est fréquemment utilisé comme organisme modèle, car beaucoup plus facile à manipuler génétiquement que *Plasmodium*. De ce fait, plusieurs expériences et découvertes de biologie moléculaire et cellulaire sont d'abord réalisées sur *Toxoplasma* puis testées chez *Plasmodium*. Malgré que de nombreuses différences sont observées entre ces deux organismes, les connaissances acquises en étudiant *Toxoplasma* peuvent être très utiles afin de comprendre et d'étudier le parasite de la malaria. De façon similaire à *Plasmodium*, les protéines apicales de *Toxoplasma* sont transportées via le RE puis le Golgi et sont finalement transportées à destination à l'intérieur de vésicules de type endosome. En effet, il a été déterminé que *Toxoplasma* et *Plasmodium* possèdent des équivalents à la majorité des composantes de la voie de sécrétion ainsi que celles associées la machinerie de transport endocytaire<sup>229,230</sup>. Ceci suggère que les mécanismes mis en place chez les parasites apicomplexés ont plusieurs similarités avec leur homologue eucaryote. Le parasite a cependant adapté et simplifié l'utilisation de cette voie afin de répondre à l'unicité de sa biologie.

D'autre part, plusieurs homologues aux protéines impliquées dans le système endocytaire se sont révélées essentielles à la formation des rhoptries et des micronèmes, telle la dynamine, le récepteur de cargo sortiline, la chaîne lourde de la clathrine et la protéine Rab5<sup>231-234</sup>. Aussi, la protéine AP-1 joue un rôle essentiel dans le transport des protéines apicales. Il a été démontré que cette dernière

interagit avec les motifs tyrosine présents sur la queue cytoplasmique des protéines transmembranaires de rhoptries et de micronèmes. Cette interaction est importante pour le transport vers le complexe apical et à la biogenèse de ces organites<sup>235</sup>. Ce motif est similaire à celui retrouvé chez les eucaryotes supérieurs et la levure, où il permet d'adresser les protéines au système endocyttaire. Il semble donc que certaines protéines apicales possèdent des séquences conservées permettant l'interaction directe avec la machinerie de transport<sup>236,237</sup>. À l'opposé, les protéines apicales solubles nécessitent la présence d'escortes afin de faire le lien avec les molécules adaptatrices. L'une des candidates principales est la protéine escorte sortiline.

#### 1.4.4.1 La sortiline chez *Toxoplasma*

Une étude publiée en 2012, a permis d'identifier un homologue à la sortiline humaine, le TgSORTLR (« *Toxoplasma gondii* sortilin-like receptor »)<sup>232</sup>. Il s'agit du seul récepteur de cargo transmembranaire identifié chez les apicomplexés. Le TgSORTLR possède une structure conservée de la levure aux mammifères (Figure 19). Il possède en N-terminale un PS, suivi d'un vaste domaine constitué de 10 structures de type «  $\beta$ -propeller ». L'on retrouve ensuite deux régions composées de dix résidus cystéine (10CCa et 10CCb). Ensemble, les dix régions «  $\beta$ -propeller » et les 10CC correspondent au domaine VPS10 et sont impliqués dans la liaison avec les différents ligands. Finalement, l'extrémité C-terminale est constituée d'un domaine transmembranaire et d'une petite queue cytoplasmique se terminant par un motif acide-dileucine (« acidic cluster-dileucine motif », ac-LL), important pour la liaison à la machinerie de transport<sup>169</sup>.



**Figure 19 : La structure du TgSORTLR**

Chez *Toxoplasma*, le TgSORTLR est localisé à l'appareil de Golgi, mais est aussi associé aux compartiments apparentés aux endosomes. De façon plus précise, les auteurs ont montré qu'il est essentiel au transport et à la formation des rhoptries et des micronèmes. En effet, il a d'abord été démontré par immunoprécipitation suivie d'une analyse en spectrométrie de masse que le TgSORTLR interagit avec certaines des protéines de rhoptries et de micronèmes. Il a ensuite été prouvé qu'il est essentiel à la formation de ces organites apicaux puisqu'en son absence, les parasites sont déficients en rhoptries et en micronèmes. L'absence de ces organites essentiels entraîne des problèmes d'invasion, de rupture et de motilité occasionnant une diminution de la virulence chez la

souris<sup>232</sup>. Le rôle du TgSORTLR dans le transport protéique via le système de sécrétion et endocytairé est aussi mis en évidence de par l'interaction de la protéine avec le complexe de protéines AP-1/clathrine. Ce complexe interagit avec le domaine cytoplasmique du TgSORTLR, de façon similaire à la sortiline eucaryote<sup>232</sup>. En plus de la machinerie de transport antérograde, le domaine C-terminal de TgSORTLR est aussi retrouvé en association avec le complexe rétromère afin de médier le transport rétrograde de la protéine des endosomes vers le TGN<sup>238</sup>.

En résumé, le TgSORTLR agit comme récepteur de cargo spécifique afin de transporter les protéines de micronèmes et de rhoptries à destination. Afin d'y arriver, le domaine luminaire s'associe aux protéines apicales tandis que le domaine extracellulaire interagit avec la machinerie de transport antérograde. Suite à la livraison, le récepteur cargo est recyclé grâce aux rétromères vers le TGN où il peut à nouveau être utilisé. Cependant comment la machinerie de transport discrimine entre les protéines destinées à l'un ou l'autre des organites apicaux reste encore à élucider.

## 1.5 Les mécanismes de réponse au stress

En conditions de stress, les cellules eucaryotes possèdent deux voies métaboliques qui peuvent être activées afin de maintenir l'intégrité cellulaire, mais aussi afin de trouver les nutriments et l'énergie nécessaires à sa survie : la voie ERAD (« endoplasmique reticulum-associated protein degradation ») et l'autophagie. En effet, la cellule soumise à un stress doit rapidement réagir et s'adapter à ce changement environnemental, ce qui occasionne souvent un stress accru au RE. L'augmentation de la production protéique entraîne une augmentation de la charge de travail au RE et une accumulation de protéines mal repliées. Cette accumulation de protéines mal repliées active la UPR (« Unfolded protein response »). Afin de remédier à la situation de stress cellulaire, la cellule a accès à deux mécanismes afin d'éliminer les protéines endommagées et aberrantes, la voie dépendante du protéasome : la voie ERAD ou celle dépendante du lysosome : l'autophagie (section 1.5.1 et 1.5.2 respectivement)<sup>239-241</sup>. Cette dernière joue aussi un rôle important lors des périodes de carence, en participant à la destruction et au recyclage de composantes cellulaires à des fins de production d'énergie. Finalement, ces deux voies de dégradation protéique assurent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Afin de conserver un équilibre, la cellule doit balancer entre la synthèse et la dégradation protéique. Pour ce faire, la voie ERAD s'assure de la qualité et de l'intégrité des protéines nouvellement traduites tandis que l'autophagie dégrade les composantes cellulaires cytosoliques désuètes, inutiles ou abîmées.

### 1.5.1 Dégradation des protéines associées au RE

Chez les eucaryotes, la voie de dégradation des protéines associées au RE, ERAD, est un mécanisme de régulation clé impliqué dans le contrôle qualité des protéines produites. Cette voie assure la dégradation par le protéasome des protéines mal repliées dans le RE<sup>242</sup>. Cette dégradation protéique est dépendante de l'ubiquitination des protéines cibles par le complexe ERAD<sup>243</sup>. Plusieurs homologues aux composantes de la voie ERAD et du protéasome 26S ont été identifiées chez *Plasmodium* suggérant un mécanisme similaire de contrôle qualité des protéines chez le parasite<sup>244</sup>.

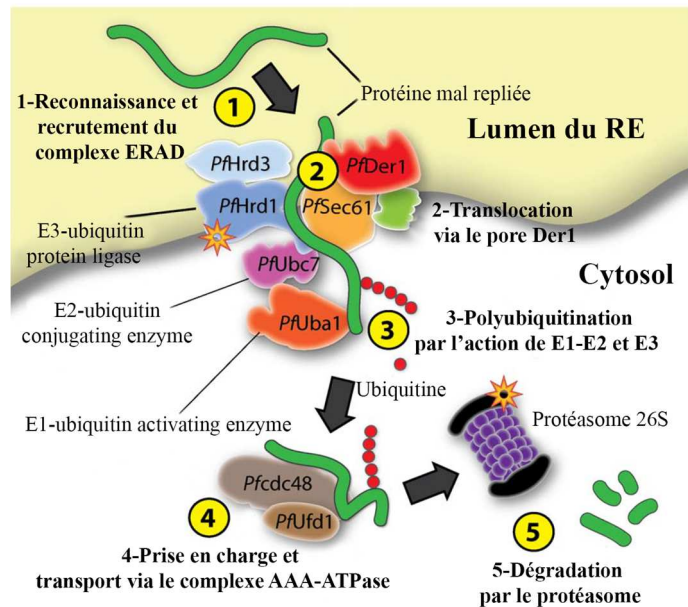


Figure 20 : La voie ERAD chez *P. falciparum* (Adaptée de <sup>244</sup>)

Tout d'abord, les protéines aberrantes sont reconnues et escortées par les chaperonnes et la PDI situées dans la lumière du RE jusqu'au complexe multiprotéique ERAD (Figure 20, étape 1)<sup>245</sup>. Les protéines aberrantes escortées sont ensuite transloquées au cytosol à travers un pore hydrophobique formé par la protéine Der1 dans la membrane du RE (Figure 20, étape 2)<sup>246,247</sup>. Ce rétro-translocon est aussi associé à trois enzymes essentielles responsables de l'ubiquitination des protéines : E1, E2 et E3<sup>248</sup>. La première, la « E1-ubiquitin-activating enzyme » ou Uba, est responsable de lier la protéine ubiquitine en présence d'ATP. Ensuite la protéine E1 transfère la molécule d'ubiquitine à la deuxième enzyme, la « E2-ubiquitine conjugating enzyme » ou Ubc. Finalement, la troisième enzyme, la « E3-ubiquitin-protein-ligase » ou HRD1, reconnaît et interagit avec les protéines mal repliées au niveau du rétro-translocon<sup>249,250</sup>. En parallèle, HRD1 recrute E2 chargée en ubiquitines puis assiste le transfert de l'ubiquitine de E2 vers le substrat (Figure 20, étape 3)<sup>249,251</sup>. HRD1 permet donc de faire le lien entre la protéine E2 et la protéine mal repliée, favorisant ainsi l'ajout d'une queue d'ubiquitines sur les résidus lysine des protéines en route pour la dégradation. Les protéines maintenant étiquetées

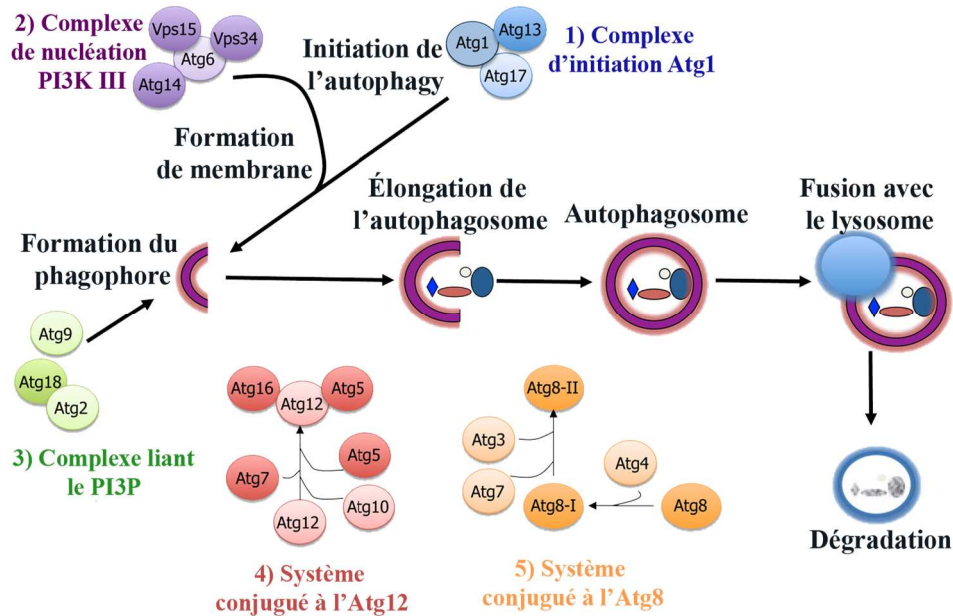
avec une chaîne d'ubiquitines sont prises en charge dans le cytosol par le complexe AAA-ATPase constitué des protéines CDC48 et UFD1. Ce complexe a pour rôle d'escorter les protéines polyubiquitinylées vers leur destination finale, le protéasome 26S (Figure 20, étape 4)<sup>252,253</sup>. Le protéasome 26S est un complexe composé de plusieurs sous-unités situé dans le cytosol et qui est responsable de la dégradation des protéines polyubiquitinylées (Figure 20, étape 5). Chez *Plasmodium*, il est composé de 32 protéines et est divisé en deux régions distinctes : le 19S et le 20S<sup>254</sup>. La région 19S « regulatory particle » est responsable de la reconnaissance, de la déubiquitination, du dépliement et de la translocation des protéines cibles. À l'inverse, la région 20S, « core particle », est associée à l'activité protéolytique du complexe<sup>255</sup>.

En plus de la voie classique ERAD associée au RE, une voie similaire a été identifiée et localisée à l'apicoplaste chez *Plasmodium*. En effet, plusieurs homologues aux protéines de la voie ERAD ont été retrouvés en duplicata chez *Plasmodium*. Cette deuxième série de protéines retrouvées à l'apicoplaste comprend entre autres des homologues aux protéines Der1, Uba1, Ubc et CDC48. Ces protéines sont différentes de celles retrouvées au RE et possèdent un peptide transit, dictant leur transport à l'apicoplaste<sup>256</sup>. Il a été suggéré que cette voie ERAD associée à l'apicoplaste serait impliquée dans le transport et la translocation de protéines à travers les différentes membranes entourant l'apicoplaste.

## 1.5.2 L'autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation de composantes cellulaires cytosoliques telles que des agrégats de protéines ou encore des organites entiers. Il s'agit d'un mécanisme important pour le contrôle de la qualité protéique ainsi que pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Un niveau basal d'autophagie permet de dégrader des complexes cellulaires redondants, endommagés ou inutiles et de recycler leurs composantes comme les lipides, les carbohydrates et les acides aminés. De plus, en période de stress intracellulaire ou environnementale, l'autophagie est activée. Il s'agit d'un mécanisme d'adaptation et de survie permettant à la cellule de dégrader et de recycler son propre matériel afin de produire de l'énergie<sup>257-259</sup>. Dans ces mêmes conditions, l'autophagie est aussi un mécanisme alternatif à la voie ERAD. Lorsque la voie ERAD est saturée et ne parvient pas à éliminer les protéines mal repliées et endommagées, l'autophagie prend le relais et dégrade ces agrégats protéiques provenant du RE<sup>239</sup>.

La dégradation de matériel cytosolique par autophagie s'effectue par séquestration d'une portion du cytoplasme à l'intérieur d'une vésicule entourée d'une double membrane. Cette vésicule nommée autophagosome, délivre ensuite son contenu au lysosome par fusion des membranes (Figure 21). Les différentes étapes du processus sont majoritairement réalisées par les protéines Atg (« autophagy related protein »)<sup>260,261</sup>.



**Figure 21 : Le processus d'autophagie** (Adaptée de<sup>262</sup>)

L'autophagie est initiée dans le cytosol par la formation du complexe Atg1 (Figure 21, étape 1). Ce complexe Atg1 a pour rôle de recruter et d'activer le complexe PI3K (phosphoinositide 3-kinase) au site d'assemblage du phagophore (PAS ; « phagophore assembly site »). La PI3K convertit ensuite le phosphatidyl-inositol en PI3P (phosphoinositide 3-phosphate) sur la membrane naissante (Figure 21, étape 2). La présence de PI3P au PAS permet de recruter la protéine Atg18, qui possède un domaine de liaison au PI3P<sup>261</sup>. Cette dernière est présente sous forme de complexe avec la protéine Atg2 puis avec la protéine transmembranaire Atg9. Cet échafaudage de protéines au PAS mène à la formation du phagophore, une structure membranaire en forme de croissant (Figure 21, étape 3). Le complexe Atg9-Atg2-Atg18 est responsable d'initier la formation et l'expansion du phagophore en transportant des lipides membranaires<sup>263</sup>. La provenance de ces membranes reste mal comprise, mais proviennent potentiellement du RE, du Golgi, des endosomes ou de la mitochondrie<sup>260,264</sup>. D'autres complexes (complexe conjugué à l'Atg12 et conjugué à l'Atg8) sont aussi recrutés au phagophore pour poursuivre l'élongation membranaire afin de former le phagosome autour du matériel à dégrader<sup>265,266</sup> (Figure 21, étape 4-5). Une fois le phagosome formé, il est transporté au lysosome.

S'ensuivent une fusion des membranes et un relargage du contenu du phagosome à l'intérieur du lysosome où il sera dégradé par les hydrolases résidentes.

Le mécanisme d'autophagie décrit ici correspond à la macro-autophagie c'est-à-dire la séquestration de matériel cytosolique à l'intérieur du phagosome. Cependant il existe deux autres types d'autophagie. La microautophagie, qui correspond à l'engloutissement de composantes directement par le lysosome, lorsque celles-ci sont localisées à proximité<sup>267</sup> et finalement, l'autophagie médiée par les chaperonnes. Comme son nom l'indique, les protéines portant une séquence cible sont reconnues par des chaperonnes cytosoliques puis escortées au lysosome afin d'y être dégradées<sup>268,269</sup>.

#### *1.5.2.1 L'autophagie chez P. falciparum*

Les bases du mécanisme de l'autophagie semblent être conservées chez les eucaryotes. Cependant, les membres de la famille *Apicomplexa* possèdent un répertoire abrégé de protéines Atg. À ce jour, seulement certaines des protéines associées à l'autophagie ont été identifiées chez *P. falciparum* et *T. gondii* (Tableau 4)<sup>270,271</sup>. De plus, de la même façon que les plantes et la levure, *Plasmodium* ne possède pas de lysosome, mais plutôt un organe semblable : la vacuole digestive. Cette VD semble en effet jouer le rôle de lysosome et être l'endroit où s'effectue la dégradation protéolytique chez le parasite<sup>272</sup>.

Un nouvel intérêt pour l'étude de l'autophagie a vu le jour suite à la découverte d'un lien entre le mécanisme de résistance à l'artémisinine et une mutation dans le gène de la protéine Atg18<sup>273</sup>. De plus, un phénotype de résistance à un autre agent anti-malaria, la chloroquine, a aussi été observé dans le cas de mutation sur la protéine Atg8<sup>274</sup>. Cette dernière est la protéine Atg la plus étudiée chez le parasite. Il s'agit étrangement d'une protéine impliquée à la fois dans l'autophagie, mais aussi dans la formation de l'apicoplaste<sup>272</sup>. En effet, cette dernière a été retrouvée en association avec la membrane de l'apicoplaste<sup>275</sup>, mais aussi avec les vésicules semblables à l'autophagosome<sup>272</sup>. Ces vésicules positives pour l'Atg8, mais aussi pour le marqueur des endosomes tardifs Rab7 fusionnent ultimement avec la VD, suggérant une voie semblable à l'autophagie eucaryote<sup>272</sup>.

L'association des protéines Atg à l'apicoplaste a également été observée dans le cas de la protéine Atg18<sup>276</sup>. Il a été démontré que Atg18 est essentielle à la survie du parasite, mais aussi à la formation de l'apicoplaste. Cette protéine interagit avec le PI3P présent dans la membrane de l'apicoplaste et régule le recrutement et la localisation de Atg8 à la membrane de l'apicoplaste. Cependant, aucun rôle clair dans le processus d'autophagie n'a été démontré dans le cas de la protéine Atg18.

En somme, peu de choses sont connues et peu d'études ont été publiées sur les composantes et les mécanismes de l'autophagie chez *Plasmodium*. Cependant son rôle ne semble pas restreint à la dégradation de matériels cellulaires, mais également dans la formation et la maintenance de l'apicoplaste. L'implication des protéines Atg dans la biogenèse d'un organite est sans précédent et semble être unique à *Plasmodium* et à la famille *Apicomplexa*.

**Tableau 4 : Homologues aux protéines Atg de la levure chez *P. falciparum* et *T. gondii***<sup>270,271</sup>

Groupe / Complexe	Protéine chez la levure	Orthologue chez <i>P. falciparum</i>	Orthologue chez <i>T. gondii</i>
<b>Complexe Atg1</b>	Atg1	Plusieurs candidats	TGME49_316150*
	Atg13	X	X
	Atg17	Plusieurs candidats	X
	Atg29	X	X
	Atg31	X	X
	Atg11	PF3D7_0216700*	X
<b>Complexe liant le PI3P</b>	Atg2	X	TGME49_304630
	Atg9	X	TGME49_260640
	Atg18	PF3D7_1012900	TGME49_288600 TGME49_220160
<b>Complexe PI3K</b>	Vps34	PF3D7_0515300	TGME49_215700
	Vps15	PF3D7_0823000	TGME49_310190
	Vps30/Atg6	X	TGME49_221360
	Atg14	X	X
<b>Système conjugué à l'Atg8</b>	Atg8	PF3D7_1019900	TGME49_254120
	Atg7	PF3D7_1126100	TGME49_229690
	Atg3	PF3D7_0905700	TGME49_236110
	Atg4	PF3D7_1417300	TGME49_206450*
<b>Système conjugué à l'Atg12</b>	Atg12	PF3D7_1470000	TGME49_321300
	Atg10	X	x
	Atg16	X	TGME49_200280*
	Atg5	PF3D7_1430400*	TGME49_230860*
<b>Autre</b>	Rab7	PF3D7_0903200	TGME49_248880