



**HAL**  
open science

# Caractérisation biochimique et biophysique des deux cytidylyltransférases de *Plasmodium falciparum*, enzymes clés du métabolisme des phospholipides

Alicia Contet

## ► To cite this version:

Alicia Contet. Caractérisation biochimique et biophysique des deux cytidylyltransférases de *Plasmodium falciparum*, enzymes clés du métabolisme des phospholipides. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Montpellier, France, 2015. Français. NNT: . tel-03476453

**HAL Id: tel-03476453**

**<https://hal.science/tel-03476453>**

Submitted on 12 Dec 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivrée par **L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale  
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Et de l'unité de recherche UMR 5235 CNRS – Dynamique  
des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques  
(DIMNP)

Spécialité : **Biochimie**

Présentée par : **Alicia CONTET**

**Caractérisation biochimique et biophysique des  
deux cytidyltransférases de  
*Plasmodium falciparum*, enzymes clés du  
métabolisme des phospholipides**

Soutenue le 6 mai 2015 devant le jury composé de

M. Gérard LAMBEAU, DR CNRS, Nice-Sophia Antipolis

Rapporteur

M. Fabrice REBEILLE, DR CEA, Grenoble

Rapporteur

Mme Magali FRUGIER, DR CNRS, Strasbourg

Examinatrice

Mme Catherine BRAUN-BRETON, PU, Université de Montpellier

Présidente du jury

M. Henri VIAL, DR INSERM, Montpellier

Co-Directeur de thèse

Mme Rachel CERDAN, MCU, Université de Montpellier

Directrice de thèse





*Ces jours qui te semblent vides  
Et perdus pour l'univers  
Ont des racines avides  
Qui travaillent les déserts.*

*[...]*

*Patience, patience,  
Patience dans l'azur!  
Chaque atome de silence  
Est la chance d'un fruit mûr!*

*Paul Valéry*



## Remerciements

Ces trois ans et demi de thèse ont été l'occasion de nombreuses rencontres. Presque arrivée au bout de ce marathon, il est l'heure pour moi de remercier tous ceux qui ont participé à ce travail, de près ou de loin, et qui m'ont accompagnée tout au long du parcours, parfois avec quelques petits remontants !

*A Rachel Cerdan, directrice de thèse,*

Je ne pourrai faire la liste de tout ce que tu m'as transmis pendant ces trois ans et demi passés sous ton aile... Mais si je ne devais retenir qu'une seule chose, c'est ta persévérance ! Je te remercie particulièrement pour ton énorme patience et ta pédagogie sans faille. Tu as toujours été là quand il le fallait, toujours disponible pour répondre à mes questions existentielles (scientifiques ou autres !). Merci de m'avoir permis de m'épanouir à tes côtés grâce à ce subtil cocktail fait de liberté d'action, de bienveillance et de regard critique porté sur mes travaux.

*A Henri Vial, co-directeur de thèse et directeur d'équipe,*

Je vous suis extrêmement reconnaissante de m'avoir fait confiance il y a 4 ans en me permettant de rejoindre votre équipe. Par la suite, vous m'avez permis de participer sans réserve à plusieurs cours et conférences, me donnant ainsi la possibilité de présenter mon travail et d'enrichir ma culture scientifique. Vos conseils avisés et votre expérience m'ont accompagnée depuis mes premiers pas au laboratoire et jusqu'à la révision de ce manuscrit.

*Aux membres de mon jury de thèse,*

Je tiens à remercier chaleureusement les Dr. Gérard Lambeau et Fabrice Rébeillé d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux, et les Dr. Magali Frugier et Catherine Braun-Breton pour leur participation à mon jury de thèse en tant qu'examinatrices.

*A mes Directeurs d'unité,*

- Catherine Braun-Breton, je vous remercie également de m'avoir accueillie au sein de l'UMR 5235 à l'occasion de mon stage de Master et encore plus particulièrement pour votre disponibilité et pour votre contribution à l'atmosphère si agréable de l'UMR.
- Georges Lutfalla, vous reprenez le flambeau et je n'ai nul doute que l'UMR reste ainsi entre de bonnes mains.

*A mes collaborateurs et sources de savoir hors-labo,*

Ce travail a été riche de nouvelles techniques, rencontres et découvertes. Il en aurait été totalement différent sans l'aide précieuse d'un grand nombre de personnes qui y ont contribué de très près ou d'un peu plus loin.

- Je tiens ainsi à remercier tout particulièrement les Dr. Dominique Douguet et Emilie Pihan à l'IPMC de Sophia-Antipolis avec qui nous avons collaboré sur le projet « inhibiteurs de la PfcCT ».
- J'adresse également mes sincères remerciements au Pr. Beáta Vértessy et à Gergely Nagy à l'Institut d'Enzymologie de Budapest qui m'ont offert la possibilité de participer à leurs travaux sur la « composite aromatic box », mais également de découvrir la cristallographie en m'invitant au cours BioStructX à Budapest.
- Merci également au Dr. Stéphane Betzi, avec qui j'ai pu réaliser les expériences d'ITC au CRCM de Marseille, ainsi qu'au Dr. Martine Pugnière et à Corinne Henriquet de la plateforme PP2I à Montpellier avec qui j'ai réalisé les expériences de SPR.
- Enfin, je souhaite remercier un certain nombre de personnes du CBS de Montpellier qui m'ont permis d'avancer et de mettre un peu plus le pied dans le monde de la biologie structurale grâce à leurs outils et leurs précieux conseils. Merci donc à Déborah pour les conseils divers et variés, François pour avoir essayé de cristalliser la ECT, Pau et Fatima pour le SAXS, Martin pour la bioch, Muriel et Gilles pour ma première expérience au synchrotron.

*A Kai, Marina et Alice, mes collègues du box 4,*

Merci à vous d'avoir fait de notre box probablement le meilleur bureau de toute l'UMR ! Un box où il fait bon travailler, rire et manger du sucre.

- Kai, chef du box et expert *ès* bio mol. Merci pour tous tes conseils pointus, pour ta patience et ton humour si allemand (c'est un compliment !). Tu n'auras peut-être pas réussi à faire de moi uneoureuse de la bio mol, mais grâce à toi j'ai appris beaucoup plus que cela (« Wo ist mein Tachenreichner ?! »).
- Marina, experte *ès* Äkta. Je crois qu'il faudrait plus d'une page pour te remercier Marina... Tu m'as épaulée dès mon arrivée et m'a initiée au monde merveilleux de la protéine recombinante et des tests d'activité radioactifs. Merci pour ton aide si précieuse et ton humour si ... caustique?
- Alice, experte *ès* microscopie. Merci à toi pour nos pauses air pur et discussion métaphysico-réaliste sur le monde de la recherche. Ta rigueur scientifique n'a d'égale que ta bonne humeur et ton grand sourire.

*Au canal historique : Marina (encore), Mag, Gaëlle et Lauriane,*

De vous 4, seule Gaëlle a survécu.... Merci à vous pour, en vrac, nos moments de rire, les bons petits repas (pas chez moi !), les apéros, les soirées Pizza-bière-Koh Lanta (Spécial Mag), le serrage de coudes (Spécial Gaëlle) et les papotages en pièce radioac (Spécial Marina et Lauriane).

*A mes collègues Palu-Toxo, passés et présents,*

Vous êtes trop nombreux pour que je vous remercie chacun comme il se doit... Travailler avec vous tous a été fantastique de A à Z. Toujours disponibles, prêts à partager votre savoir et votre bonne humeur. Evoluer dans un tel environnement est une chance et je vous en suis extrêmement reconnaissante. Un merci particulier à Sharon, Marjo, Laurence et Diana qui ont fortement contribué à ce que ce cher petit *Plasmodium* me paraisse beaucoup moins obscur !

*A la team Vidal et cie,*

Merci à vous quatre, Michel, Anne, Marianne et Pascale mais aussi à Luc, qui est un peu une extension de l'équipe... Votre bonne humeur (avec un soupçon de râlerie), vos blagues et votre centri ont égayé mes journées. Un merci particulier à Marianne qui m'a initiée au baculo et à Pascale pour les cours d'enzymo.

*A la « jeunesse » de l'UMR 5235, avenir de la recherche !*

- Merci aux filles du box 3, et avant tout à Ewelina, ma partenaire cytidyllyltransférase. Je m'en vais vers d'autres rivages mais je sais que notre chère CCT reste entre de bonnes mains avec toi. Merci aux «petites nouvelles» de l'équipe Toxo qui m'ont accompagnée pendant la dernière année (Maude et Amandine) ou les derniers mois (Caty) de ma thèse. Je sais qu'avec vous, on devrait continuer à rire dans cette partie du labo.
- Merci également à l'équipe des physiciens : Joachim, Luca, Olivier et Guilherme. Vous avez choisi le côté obscur de la force et je vous le fais payer chèrement. Mais dans le fond, vous êtes quand même des chics types. Merci pour les pauses café - mini hits. Il n'en demeure pas moins que je ne comprends toujours rien à ce que vous faites...
- Enfin, merci aux bactériologistes, passés et présents : Audrey, Claudine, Christian, Bertus, Vipul, Marco, Solène et Grégo. Peu d'entre vous sont toujours là malheureusement... Avoir passé ces 4 ans avec vous, à entendre notamment Christian râler et les Mous chanter (des chansons débiles) fut une joie de tous les instants !



*A mes amis « hors labo »,*

- Aux Chartrousines: Marine, Pauline B, Agathe, Pauline P et Manue, ainsi que vos pièces rapportées. Le temps a un peu passé depuis nos années à Plan Menu, mais vous êtes restées fidèles au poste et ce, malgré la distance. Merci à vous tous.
- Merci également à Raph et Gaëlle. Je pense que n'ai jamais autant décroché du labo que lors de mes séjours parisiens. Rien de mieux que nos discussions sans queue ni tête pour oublier la rigueur scientifique pour un temps !
- Merci à mes amis grenoblois, période UJF, et plus particulièrement à Chloé (qui comprend ce qu'est une vie de thésarde !). Merci également à Steph, Christ et Lucas que j'aurais aimé voir plus souvent...
- Enfin, j'adresse un énorme merci aux deux montpelliéraines d'adoption, Marine (encore) et Louisa. C'est vous qui avez eu à subir ma mauvaise humeur et mon stress avant et pendant la rédaction. Rien que pour ça, bravo ! Vous n'imaginez même pas comment nos pintes post-labo, nos bons petits plats et nos séances ciné ont été essentielles pendant tout ce temps.

*Enfin, à ma famille,*

Vous avez toujours été là et c'est tout ce qui compte... Vous savez que je ne suis pas forcément une grande communicante (malgré la longueur de ces remerciements !) et vous ne m'en voudrez pas si je résume ma pensée à un seul et unique mot : Merci, avec un très grand M.

# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre I. Le paludisme.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Bref historique du paludisme.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Biologie des Plasmodium humains.....</b>	<b>12</b>
2.1. Plasmodium : le parasite responsable du paludisme .....	12
2.2. Cycle de vie de Plasmodium falciparum.....	13
<b>3. Pathologies associées à l'infection par Plasmodium.....</b>	<b>22</b>
3.1. Pathogénie de Plasmodium .....	22
3.2. Physiopathologie du paludisme .....	23
3.3. Diagnostic.....	26
<b>4. Situation actuelle du paludisme dans le monde.....</b>	<b>27</b>
4.1. Paludisme et pauvreté .....	28
4.2. Succès et défis dans la lutte contre le paludisme .....	28
<b>5. Moyens de prévention.....</b>	<b>29</b>
5.1. Lutte anti-vectorielle .....	29
5.2. Chimio-prophylaxie .....	31
5.3. Approches vaccinales .....	31
<b>6. Les antipaludiques actuels et leurs limites.....</b>	<b>34</b>
6.1. Les 4-aminoquinoléines .....	35
6.2. Les 8-aminoquinoléines .....	37
6.3. Les amino-alcools.....	38
6.4. Les antifolates .....	39
6.5. Les dihydroxynaphtoquinones .....	40
6.6. Les antibiotiques .....	40
6.7. Les endopéroxydes .....	41
<b>7. Nouveaux axes thérapeutiques.....</b>	<b>43</b>
7.1. Antipaludiques en cours de développement .....	43
7.2. Nouveaux antipaludiques : quelques stratégies de recherche .....	48
<b>Chapitre II. Le métabolisme des phospholipides chez Plasmodium.....</b>	<b>51</b>
<b>1. Lipides et membranes chez Plasmodium .....</b>	<b>51</b>
1.1. Le cholestérol et les sphingolipides .....	52

1.2. Les phospholipides .....	53
1.3. Répartition des phospholipides chez <i>Plasmodium</i> .....	56
<b>2. Biosynthèse des phospholipides chez <i>Plasmodium</i> au stade intra-érythrocytaire .....</b>	<b>57</b>
2.1. Origine des précurseurs .....	58
2.2. Les différentes voies métaboliques .....	59
2.3. Les voies de biosynthèse de la phosphatidylcholine comme cibles thérapeutiques .....	65
<b>Chapitre III. Les cytidyltransférases.....</b>	<b>67</b>
<b>1. Caractéristiques générales des cytidyltransférases .....</b>	<b>67</b>
<b>2. CTP:phosphocholine cytidyltransférase (CCT).....</b>	<b>71</b>
2.1. Données génomiques et isoformes.....	71
2.2. Domaines protéiques .....	72
2.3. Localisation cellulaire et distribution tissulaire.....	75
2.4. Caractérisation biochimique et régulation.....	76
2.5. Particularités structurales .....	79
<b>3. CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférase (ECT).....</b>	<b>80</b>
3.1. Données génomiques et isoformes.....	80
3.2. Domaines protéiques .....	81
3.3. Localisation cellulaire et distribution tissulaire.....	84
3.4. Caractérisation biochimique et régulation .....	85
3.5. Particularités structurales .....	88
<b><u>RESULTATS</u>.....</b>	<b>91</b>
<b>Préambule : Objectifs des travaux de thèse.....</b>	<b>93</b>
<b>Chapitre I. Caractérisation biochimique et inhibition de la PfcCT.....</b>	<b>95</b>
<b>1. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>95</b>
1.1. Obtention des parasites <i>P. falciparum</i> .....	95
1.2. Western blot et immunofluorescence pour la localisation sub-cellulaire de <i>P. falciparum</i> .....	97
1.3. Clonage, expression et purification des domaines CT recombinants .....	98
1.4. Détermination des paramètres cinétiques et inhibition des domaines CT recombinants.....	100
1.5. Test d'inhibition de la croissance parasitaire <i>in vitro</i> .....	103
1.6. Test d'inhibition de la synthèse de phosphatidylcholine .....	104
1.7. Etudes biophysiques des interactions entre la PfcCT et ses ligands.....	104
<b>2. Résultats .....</b>	<b>107</b>
2.1. Caractérisation biochimique et cellulaire de la PfcCT .....	107
2.2. Identification d'inhibiteurs de la PfcCT par criblage virtuel basé sur la structure .....	113

2.3. Evaluation biochimique des composés issus du criblage virtuel.....	115
2.4. Caractérisation de l'inhibition par C12.....	118
<b>3. Conclusions - Perspectives.....</b>	<b>123</b>

## **Chapitre II. Caractérisation enzymatique et biophysique de la PfECT.....127**

<b>1. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>127</b>
1.1. Expression et purification des constructions de la PfECT .....	127
1.2. Etudes enzymatiques .....	128
1.3. Etudes biophysiques des interactions entre la PfECT et ses ligands .....	132
1.4. Essais de cristallisation .....	133
1.5. Analyses par SAXS et modélisation de l'enveloppe de la PfECT.....	133
<b>2. Résultats .....</b>	<b>134</b>
2.1. Purification de la PfECT entière.....	134
2.2. Mise au point d'un test colorimétrique pour l'étude de la PfECT.....	136
2.3. Mécanisme catalytique de la PfECT .....	137
2.4. Caractérisation biophysique des interactions entre la PfECT et ses ligands .....	140
2.5. Analyses structurales .....	145
<b>3. Conclusions.....</b>	<b>154</b>

## **Chapitre III. Identification et caractérisation du motif de liaison de la choline chez la PfCCT et la PfCK.....158**

### **DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....167**

<b>1. Aspects biochimiques et structuraux des cytidyltransférases.....</b>	<b>169</b>
1.1. Duplication des domaines CT .....	169
1.2. Mécanisme catalytique .....	170
1.3. Régulation .....	171
<b>2. Cibler les cytidyltransférases pour le développement de nouveaux antipaludiques....</b>	<b>173</b>
2.1. Caractère essentiel des cytidyltransférases chez <i>P. falciparum</i> .....	173
2.2. Caractère limitant dans les voies de biosynthèse <i>de novo</i> de la PC et de la PE .....	174
2.3. Cibler les domaines catalytiques des cytidyltransférases ?.....	175
2.4. La question de la spécificité .....	177
2.5. Cibler les autres domaines de la PfCCT et de la PfECT .....	178

### **REFERENCES.....181**

### **ANNEXES.....201**

## Liste des abréviations

	-A-
AQ	ammonium quaternaire
ADP	adénosine diphosphate
AI (domaine)	domaine d'auto-inhibition
AMA1	antigène membranaire apical 1
AQP	aquaglycéroporine
ARTs	dérivés d'artémisinine
ATP	adénosine triphosphate
	-B-
<i>Bb</i>	<i>Babesia bovis</i>
<i>Bs</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
	-C-
C12	composé 12
CCM	chromatographie sur couche mince
CCT	CTP:phosphocholine cytidyltransférase
CDP	cytidine diphosphate
CDP-Cho	CDP-choline
CDP-DAG	CDP-diacylglycérol
CDP-Etn	CDP-éthanolamine
CDS	CDP-DAG synthase
CEPT	choline/éthanolamine phosphotransférase
Cho	choline
CI <sub>50</sub>	concentration inhibitrice 50
CK	choline kinase
CMP	cytidine monophosphate
CR1	récepteur au complément 1
CRT	transporteur de résistance à la chloroquine
CSp	protéine circumsporozoïte
CT (domaine)	domaine cytidyltransférase
CTA	combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine
CTP	cytidine triphosphate
	-D-
DAG	diacylglycérol
DHFR	dihydrofolate réductase
DHODH	dihydroorotate déhydrogénase
DHPS	dihydroptéroate synthase
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTT	dithiothréitol
	-E-
EBA	antigène de liaison à l'érythrocyte
ECT	CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférase
EK	éthanolamine kinase

EMP1	protéine de la membrane de l'érythrocyte 1
Etn	éthanolamine
-F-	
FA	acides gras
FAS I	voie de synthèse des acides gras de type I
FASII	voie de synthèse des acides gras de type II
-G-	
G3P	glycérol-3-phosphate
G6PD	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GCT	CTP:glycérol-3-phosphate cytidyltransférase
GDP	guanosine diphosphate
GFP	green fluorescent protein
GK	glycérol kinase
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GR	globule rouge
GST	glutathion S-transférase
-H-	
Hb	hémoglobine
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
-I-	
IMPase	inositol-phosphate phosphatase
Ino	inositol
Ino3P	inositol-3-phosphate
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
ITC	titration calorimétrique isotherme
-L-	
LB	milieu Luria-Bertani
LysoPA	acide lysophosphatidique
LysoPC	lysophosphatidylcholine
-M-	
M (domaine)	domaine de liaison aux membranes
MMV	Medecine for Malaria Venture
MSP	protéine de surface du mérozoïte
-N-	
Ni-NTA	nickel-acide nitrilotriacétique
NPP	nouvelles voies de perméabilité
-P-	
P (domaine)	domaine riche en résidus phosphorylés
PA	acide phosphatidique
PAP	acide phosphatidique phosphatase
<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PC	phosphatidylcholine
P-Cho	phosphocholine
PDB	Protein Data Bank

PE	phosphatidyléthanolamine
PEMT	phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase
P-Etn	phosphoéthanolamine
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
P <sub>i</sub>	phosphate inorganique
PI	phosphatidylinositol
PIs	phosphoinositides
PIS	phosphatidylinositol synthase
PKC	protéine kinase C
PLAAT	acide lysosphosphatidique acyltransférase
PLs	phospholipides
PMT	phosphométhyltransférase
PPase	pyrophosphatase inorganique
PP <sub>i</sub>	pyrophosphate
PS	phosphatidylsérine
PSD	phosphatidylsérine décarboxylase
PSS	phosphatidylsérine synthase
<i>Py</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>
-R-	
RE	réticulum endoplasmique
RMN	résonance magnétique nucléaire
<i>Rn</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
RONs	protéines du col des rhoptries
RPMI	milieu Roswell Park Memorial Institute
-S-	
<i>Sa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAXS	diffusion des rayons X aux petits angles
SD	sérine décarboxylase
SDPM (voie)	voie de la sérine décarboxylase-phosphométhyltransférase
SEC-MALS	chromatographie d'exclusion de taille couplée à la diffusion de lumière multiangles.
SEM	erreur standard à la moyenne
Ser	sérine
SM	sphingomyéline
SMS	sphingomyéline synthase
SPR	résonance plasmonique de surface
SVF	sérum de veau fœtal
-T-	
<i>Ta</i>	<i>Theileria annulata</i>
TDR	tests de diagnostic rapide
TEV	Tobacco Etch Virus protease
TPI	traitements préventifs intermittents
-V-	
VD	vacuole digestive

# Liste des Figures

Figure 1. <i>Plasmodium falciparum</i> au stade mérozoïte. ....	13
Figure 2. Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	14
Figure 3. Les différentes étapes de l'invasion d'un érythrocyte par un mérozoïte. ....	16
Figure 4. Cycle intra-érythrocytaire de <i>P. falciparum</i> .....	17
Figure 5. Les stades de la gamétocytogenèse chez <i>P. falciparum</i> .....	21
Figure 6. Obstruction des capillaires sanguins dans le paludisme sévère à <i>P. falciparum</i> .....	23
Figure 7. Carte des pays touchés par le paludisme en 2013.....	27
Figure 8. Les trois stratégies de développement vaccinal contre <i>Plasmodium</i> .....	32
Figure 9. Stades ciblés par les principaux antipaludiques actuels .....	35
Figure 10. Résistances aux principaux antipaludiques.....	43
Figure 11. Molécules antipaludiques en développement au 4e trimestre 2014 .....	44
Figure 12. Principales classes d'antipaludiques actuels et en développement .....	45
Figure 13. Réseau tubovésiculaire et structures de Maurer.....	51
Figure 14. Les phospholipides et leurs propriétés. ....	53
Figure 15. Composition en phospholipides entre érythrocyte sain et infecté par <i>P. falciparum</i> .....	56
Figure 16. Voies de biosynthèse des phospholipides de <i>P. falciparum</i> au stade intra-érythrocytaire.....	60
Figure 17. Réactions catalysées par les CTP:phosphocholine, CTP:phosphoéthanolamine et CTP:glycérol-3-phosphate cytidyltransférases.....	67
Figure 18. Motifs conservés parmi les GCT, CCT et ECT.....	69
Figure 19. Structures cristallographiques des ECT humaine, GCT de <i>B. subtilis</i> et CCT du rat.....	70
Figure 20. Domaines protéiques chez les CCT humaines et de <i>P. falciparum</i> .....	72
Figure 21. Alignement des séquences en acides aminés des CCT de différents organismes.....	73
Figure 22. Séquence primaire de la <i>PfCCT</i> .....	74
Figure 23. Structure cristallographique des domaines CT et AI de la CCT $\alpha$ du rat. ....	80
Figure 24. Domaines protéiques des ECT du rat et de <i>P. falciparum</i> .....	81
Figure 25. Séquence primaire de la <i>PfECT</i> .....	82
Figure 26. Alignement des séquences en acides aminés des ECT de différents organismes. ....	83
Figure 27. Structures cristallographiques de la Pcyt2 $\alpha$ humaine en complexe avec le CMP [3ELB].....	89
Figure 28. Déroulement du test d'activité enzymatique de la <i>PfCCT</i> .....	101
Figure 29. Les différents types d'inhibition de l'activité enzymatique.....	103
Figure 30. Principe de la technique de titration calorimétrique isotherme .....	104
Figure 31. Principe de la technique de résonance plasmonique de surface.....	106
Figure 32. Localisation sub-cellulaire de la <i>PfCCT</i> .....	107
Figure 33. Organisation des domaines de la <i>PfCCT</i> entière et des constructions <i>PfCCT</i> <sub>(1-210)</sub> et <i>PfCCT</i> <sub>(528-795)</sub> ....	108
Figure 34. Purification des domaines CT de la <i>PfCCT</i> .....	110
Figure 35. Paramètres cinétiques des domaines CT recombinants. ....	112
Figure 36. Modèle comparatif des domaines CT de la <i>PfCCT</i> .....	114
Figure 37. Inhibition de l'activité <i>PfCCT</i> et de la croissance parasitaire <i>in vitro</i> par C12 .....	117
Figure 38. Effet de C12 sur la biosynthèse de phosphatidylcholine (PC) et phosphatidyléthanolamine (PE) du parasite. ....	119
Figure 39. Détermination du type d'inhibition de C12 sur la <i>PfCCT</i> <sub>(1-210)</sub> .....	120
Figure 40. Analyse par résonance plasmonique de surface (SPR) de l'interaction entre C12, la CDP-Cho et la <i>PfCCT</i> <sub>(1-210)</sub> .....	122
Figure 41. Mode de liaison prédit de C12 et de la CDP-choline dans le modèle structural de la <i>PfCCT</i> <sub>(1-210)</sub> ....	124



Figure 42. Organisation des domaines protéiques de la <i>PfECT</i> .....	126
Figure 43. Principe et réalisation expérimentale du test colorimétrique au vert de malachite. ....	129
Figure 44. Optimisation du test colorimétrique au vert de malachite.....	131
Figure 45. Principe et analyse des données de SAXS.....	134
Figure 46. Purification de la <i>PfECT</i> recombinante.....	135
Figure 47. Paramètres cinétiques de la <i>PfECT</i> recombinante déterminés par le test colorimétrique au vert de malachite.....	136
Figure 48. Représentation en double inverse des données de vitesse initiale pour différentes concentrations de substrat constant. ....	138
Figure 49. Type d'inhibition du produit CDP-Etn vis à vis du CTP et de la P-Etn.....	139
Figure 50. Interactions entre la <i>PfECT</i> et ses ligands naturels mesurées par ITC et SPR.....	142
Figure 51. Mécanisme réactionnel séquentiel ordonné proposé pour la <i>PfECT</i> .....	143
Figure 52. Evaluation de l'effet du CMP et du CDP sur l'activité enzymatique de la <i>PfECT</i> et analyse de leur interaction avec l'enzyme par ITC. ....	144
Figure 53. Prédiction de structures secondaires de la <i>PfECT</i> par le serveur PsiPred.....	146
Figure 54. Analyses <i>in silico</i> et biochimique de la <i>PfECT</i> en vue de l'optimisation de la protéine pour les essais de cristallisation. ....	147
Figure 55. Constructions réalisées pour la cristallisation de la <i>PfECT</i> .....	149
Figure 56. Purification des <i>PfECT</i> X-5 et <i>PfECT</i> X-2.....	150
Figure 57. Traitement des données brutes obtenues pour l'analyse de la <i>PfECT</i> entière par SAXS.....	152
Figure 58. Modèle <i>ab initio</i> de la <i>PfECT</i> entière obtenu à partir des données de SAXS. ....	154
Figure 59. Amarrage comparatif du CTP et de la CDP-Etn dans les sites catalytiques des domaines CT-1 et CT-2 de la <i>PfECT</i> .....	156
Figure 60. Réactions catalysées par la <i>PfCK</i> et la <i>PfCCT</i> .....	158
Figure 61. Conservation des motifs HxGH et RTxGxST(T/S) chez les CCT de <i>B. bovis</i> et <i>T. annulata</i> et chez les CCT et ECT de <i>P. falciparum</i> .....	170
Figure 62. Principe de l'approche par fragments et techniques utilisées.....	177
Figure 63. Différences structurales entre les sites actifs des ECT de <i>P. falciparum</i> et humaine.....	178
Figure 64. Translocation de la CCT du rat à la membrane. ....	179

## Liste des Tableaux

Tableau 1. Signes de gravité du paludisme du à <i>P. falciparum</i> .....	25
Tableau 2. Paramètres enzymatiques de la <i>PfCCT</i> endogène et des <i>PfCCT</i> recombinantes.....	79
Tableau 3. Paramètres enzymatiques de différentes ECT.....	86
Tableau 4. Paramètres cinétiques des <i>PfCCT</i> <sub>(1-210)</sub> et <i>PfCCT</i> <sub>(528-795)</sub> . ....	113
Tableau 5. Paramètres d'inhibition des 14 composés issus du criblage virtuel sur l'activité enzymatique de la <i>PfCCT</i> recombinante et la croissance de <i>P. falciparum in vitro</i> .....	116
Tableau 6. Paramètres d'inhibition des 8 analogues de C12 sur l'activité enzymatique de la <i>PfCCT</i> recombinante et la croissance de <i>P. falciparum in vitro</i> .....	118
Tableau 7. Paramètres cinétiques de la <i>PfECT</i> entière déterminés par test colorimétrique au vert de malachite (et par test radioactif utilisant la [ <sup>14</sup> C] P-Etn). ....	137
Tableau 8. Paramètres thermodynamiques de la liaison des substrats et produits à la <i>PfECT</i> déterminés par titration calorimétrique isotherme (ITC) et résonance plasmonique de surface (SPR) à 20 °C. ....	141
Tableau 9. Paramètres cinétiques des enzymes endogènes des voies de Kennedy.....	174

# ***Introduction***



# Chapitre I : Le paludisme

---

## 1. Bref historique du paludisme

Les premières descriptions correspondant à des symptômes de paludisme remontent à près de 5000 ans, dans des écrits de médecine chinoise. Il y serait mentionné des épisodes épidémiques de fièvres intenses associées à une augmentation de la taille de la rate (Carter and Mendis 2002). Vers 1600 avant J.C., le papyrus d'Ebers, en Egypte, fait état des mêmes symptômes et y ajoute une corrélation entre épisodes épidémiques et saisons des pluies. La présence attestée du paludisme chez l'homme remonte également à l'Egypte Ancienne. Des traces d'ADN génomique de *Plasmodium falciparum* ont en effet été retrouvées sur des momies datant d'environ 4000 ans (Nerlich et al. 2008). Au IV<sup>e</sup> siècle avant J.C., Hippocrate réalise les premières descriptions cliniques des accès palustres, caractérisés par des épisodes de fièvre intermittents. Il note le caractère périodique des accès de fièvre, apparaissant soit le 3<sup>e</sup> jour (fièvre tierce) soit le 4<sup>e</sup> jour (fièvre quarte) et établit également un lien entre l'apparition de ces fièvres typiques et la proximité de marais. Cette observation est à l'origine des différents noms attribués à la maladie : de paludisme (du latin « palus », marais) à malaria (de l'italien « mal aria », mauvais air).

L'idée que les fièvres palustres proviennent des miasmes émanant des marais a perduré pendant plus de 2500 ans. La découverte des protozoaires puis de leur incrimination dans plusieurs pathologies au XVII<sup>e</sup> et XIX<sup>e</sup> siècles soulèvera alors l'hypothèse d'une origine infectieuse pour le paludisme. La cause de la maladie est découverte en 1880 par Alphonse Laveran, un médecin militaire mobilisé à l'hôpital de Constantine en Algérie. Il remarque la présence systématique de parasites dans le sang des patients atteints de fièvres palustres et suggère alors que ces protozoaires sont la cause de la maladie. Cette découverte lui vaudra le prix Nobel de médecine en 1907. Quelques années plus tard, en 1885, le médecin italien Camillo Golgi démontre que les parasites se multiplient à intervalles réguliers dans les érythrocytes et que la rupture de ces derniers, associée à la dissémination des parasites, coïncide avec les épisodes fiévreux. Ses travaux mettent également en évidence deux espèces

distinctes de parasites, baptisés plus tard *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae*, respectivement responsables des fièvres tierces et quartes. La même année, Ettore Marchiafava et Angelo Celli confirment les résultats de Laveran et Golgi par l'observation et la description du parasite qu'ils nommeront *Plasmodium*.

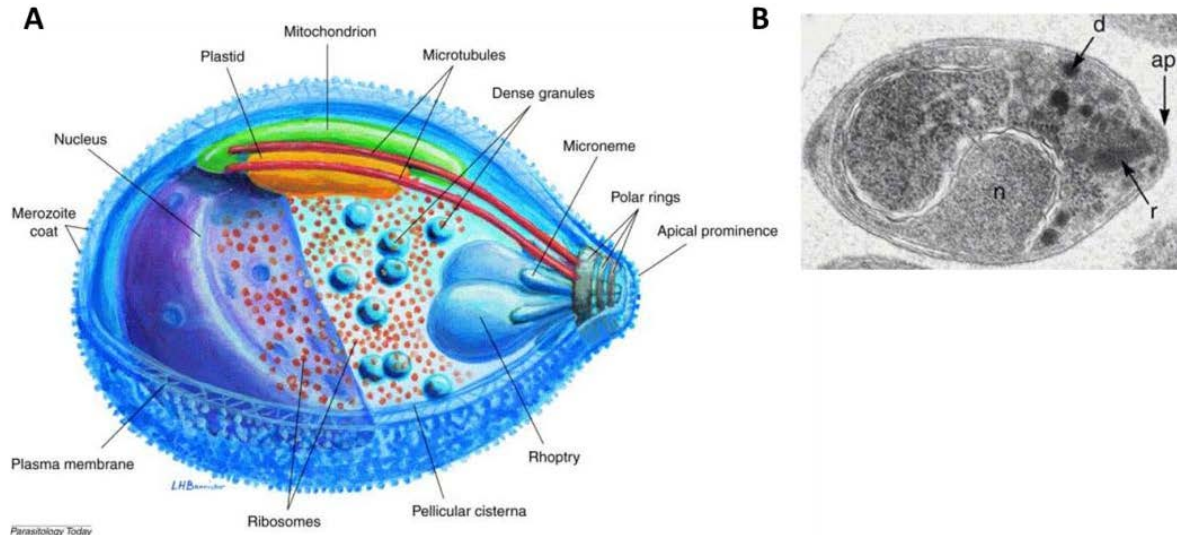
A cette époque, Sir Ronald Ross un chirurgien militaire britannique opérant en Inde avait rencontré le Docteur Patrick Manson lors d'une visite en Angleterre en 1894. Ce médecin avait découvert que les moustiques étaient vecteurs de la filariose. Il était convaincu qu'ils pouvaient également transmettre le paludisme et fit découvrir à Ross *Plasmodium*, l'hématozoaire dont Laveran avait montré le rôle comme agent du paludisme. C'est en 1897 que Ronald Ross met en évidence la présence de *Plasmodium* dans le tractus digestif de moustiques nourris sur un patient atteint de paludisme (Ross 1897). Poursuivant ses travaux sur des oiseaux, il montrera par la suite que des moustiques infectés peuvent transmettre le parasite à un organisme sain, démontrant ainsi le rôle de vecteur joué par le moustique. En 1902, Ross obtient le prix Nobel de médecine pour cette découverte. Les travaux de Ross sont confirmés au même moment par Giovanni Batista Grassi, un médecin et zoologiste italien, qui identifie alors le moustique *Anopheles* comme le seul vecteur de transmission des *Plasmodium* humains. Il faudra attendre 1948 et les travaux de Shortt et Garnham pour que soit complété le cycle de vie de *Plasmodium* avec l'identification d'un stade pré-érythrocytaire se déroulant dans le foie (Shortt and Garnham 1948).

## **2. Biologie des *Plasmodium* humains**

### **2.1. *Plasmodium* : le parasite responsable du paludisme**

L'agent causal du paludisme est un parasite protozoaire à cycle intracellulaire obligatoire, de genre *Plasmodium*. Il appartient au phylum des apicomplexes comprenant également les genres *Toxoplasma*, *Babesia* ou encore *Theileria*. Les parasites apicomplexes ont pour particularité commune la présence d'un complexe apical, donnant son nom au phylum, constitué d'organites de sécrétion : les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Ceux-

ci jouent un rôle clé dans les processus de motilité du parasite et d'invasion de la cellule hôte (Frenal and Soldati-Favre 2013) (Figure 1.)



**Figure 1. *Plasmodium falciparum* au stade mérozoïte.**

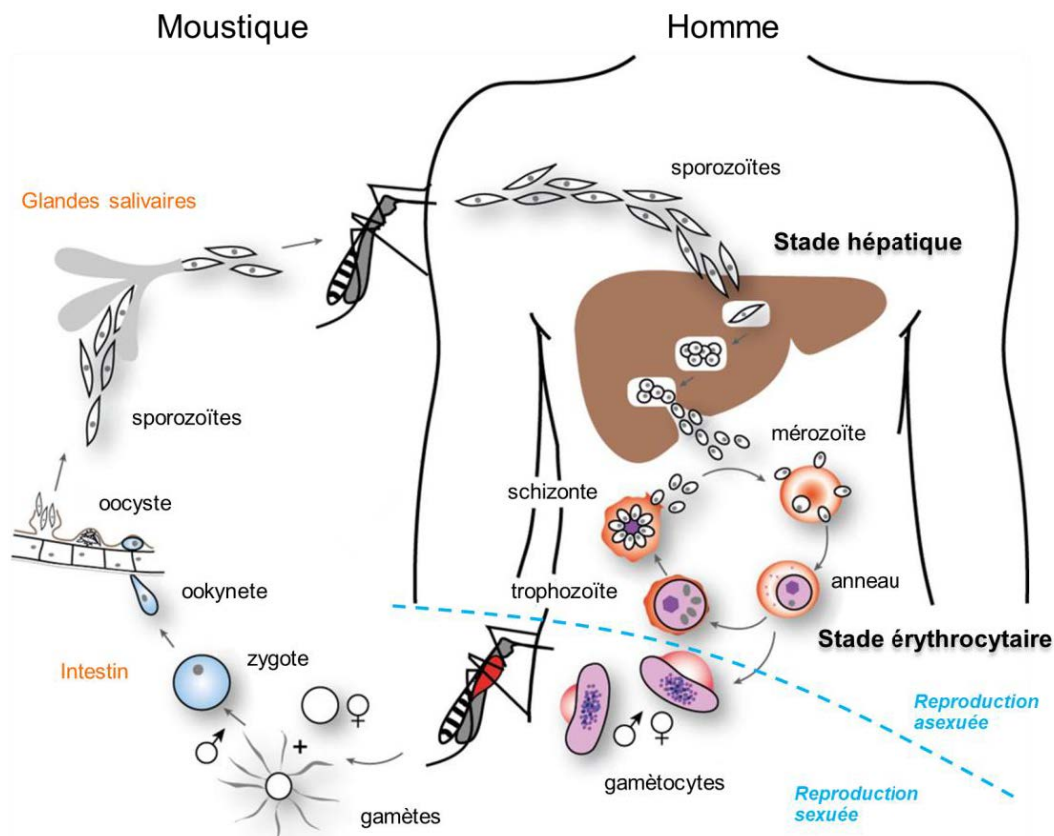
Schéma (A) et observation en microscopie électronique (B) de l'ultra-structure d'un mérozoïte. Abréviations : noyau (n), granules denses (d), rhoptries (r) et pôle apical (ap). D'après Bannister et al. 2000b

Il existe plus d'une centaine d'espèces de *Plasmodium* infectant un large spectre d'organismes vertébrés comme les primates, les rongeurs, les reptiles ou les oiseaux. Cinq espèces sont à l'origine d'infections chez l'homme dont *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* qui sont spécifiques des humains. *P. knowlesi*, qui infecte principalement les macaques, a été récemment identifié comme également responsable d'infections chez l'homme (Cox-Singh et al. 2008). Ces espèces diffèrent notamment par leur prévalence et leur pathogénicité. *P. falciparum* est l'espèce responsable de la majorité des décès liés au paludisme et, de fait, la plus redoutable.

## 2.2. Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

Tous les *Plasmodium* ont en commun un cycle de vie hétéroxène, c'est-à-dire qui se développe dans deux hôtes différents (Figure 2). Ils alternent entre une phase de multiplication sexuée (sporogonie) se déroulant chez l'hôte définitif, un moustique femelle de

genre *Anopheles*, et une phase de multiplication asexuée (schizogonie) chez l'hôte intermédiaire, un vertébré. Chez *P. falciparum*, la reproduction asexuée comprend une première phase de développement asymptomatique dans les hépatocytes. La seconde phase se déroule ensuite dans les érythrocytes et est responsable des manifestations cliniques associées au paludisme.



**Figure 2. Cycle de vie de *Plasmodium falciparum***  
Adapté de Cowman et al. 2012

### 2.2.1. La phase pré-érythrocytaire ou phase hépatique

L'infection par *Plasmodium* débute lors de la prise d'un repas sanguin par un anophèle infecté. Un peu moins de 50 parasites, sous forme de sporozoïte motile, sont inoculés dans la matrice extracellulaire de la peau et avancent activement à travers celle-ci jusqu'à atteindre les vaisseaux sanguins. Transportés par le sang, les parasites atteignent alors rapidement le

foie. Le sporozoïte traverse plusieurs cellules avant d'envahir un hépatocyte où il s'y développera à l'intérieur d'une vacuole parasitophore. La multiplication du parasite dure de 7 à 10 jours chez *P. falciparum* et consiste en une transformation du sporozoïte en trophozoïte hépatique suivi d'une période de répllication intense (schizogonie) menant à la formation de milliers de nouveaux parasites sous forme de mérozoïte (Menard et al. 2013). Ces derniers sortent alors de la cellule hôte via le bourgeonnement puis le détachement d'extensions cellulaires appelées mérosomes (Sturm et al. 2006). Les mérozoïtes sont enfin relâchés dans la circulation sanguine.

*P. vivax* et *P. ovale* ont la particularité de conserver certains parasites en état de dormance dans le foie, sous une forme appelée hypnozoïte (Markus 2011). Leur réactivation peut survenir après un temps variable pouvant aller de seulement deux semaines à plus d'un an après l'apparition des premiers symptômes selon les souches (Wells et al. 2010). Une fois réactivées, ces cellules évoluent alors en schizontes hépatiques qui seront responsables d'une recrudescence de la maladie.

### 2.2.2. La phase intra-érythrocytaire

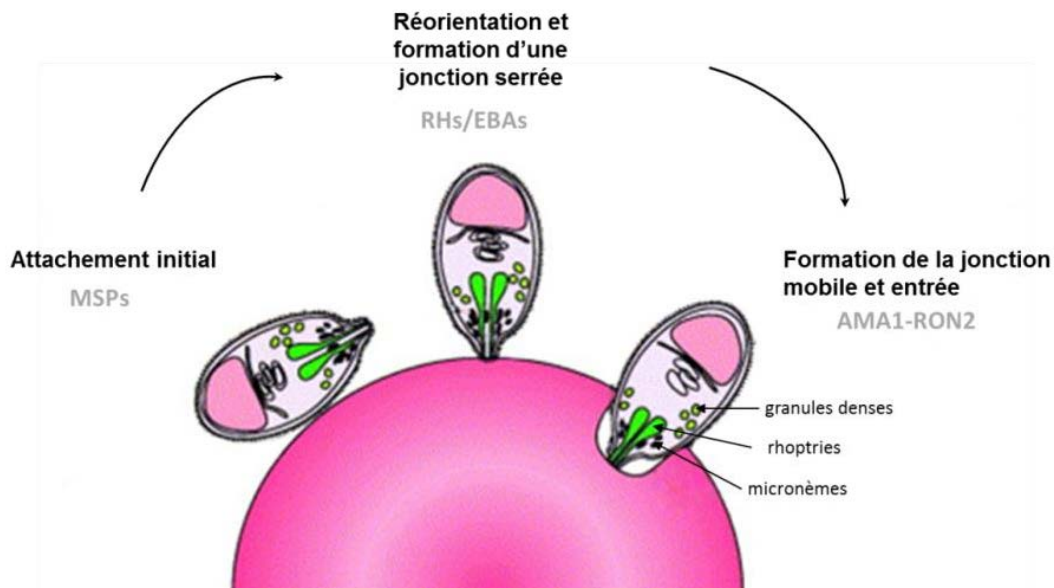
La prolifération de *Plasmodium* dans les érythrocytes constitue la phase symptomatique du paludisme. Elle consiste en un cycle d'invasion - croissance - multiplication - dissémination d'une durée de 42h à 48h chez *P. falciparum*, chaque parasite pouvant recommencer un nouveau cycle par l'invasion d'un nouvel érythrocyte.

#### *Mérozoïte et invasion :*

Le cycle débute par l'invasion d'un érythrocyte par un mérozoïte issu de la phase hépatique. Ce processus complexe, dont on pense qu'il fait intervenir plus de 50 protéines du parasite, se déroule principalement en 4 étapes (Figure 3) : **i)** une première **phase de reconnaissance** a lieu entre le parasite et un érythrocyte grâce à un ensemble de protéines appartenant à la famille des MSPs (mérozoïte surface proteins) recouvrant la surface du mérozoïte. Ce contact initial entre le parasite et sa future cellule hôte est réversible et peut se dérouler à n'importe quel point sur la surface du mérozoïte (Wright and Rayner 2014). **ii)** Il est rapidement suivi par une **phase de réorientation** et par l'établissement d'une jonction serrée irréversible



mettant en contact le pôle apical du parasite et la membrane de l'érythrocyte. Ce processus met en jeu des adhésines de la famille des EBAs (erythrocyte binding antigens) et des RHs (reticulocyte binding like proteins) se liant à des récepteurs à la surface de l'érythrocyte, dont les glycophorines et la protéine CR1 (complement receptor 1) (Tham et al. 2012) **iii)** La phase d'invasion proprement dite consiste en la sécrétion du contenu des rhoptries et la **formation d'une jonction mobile** à la zone de contact entre le parasite et la membrane de l'érythrocyte. La jonction mobile est constituée de protéines parasitaires : AMA1 (apical membrane antigen 1), sécrétée par les micronèmes, et RONs, sécrétées par le col des rhoptries (Harvey et al. 2014). L'interaction entre AMA1, présente à la surface du parasite, et RON2, insérée dans la membrane plasmique de la cellule hôte, est la clé de voute de l'architecture de la jonction mobile (Lamarque et al. 2011). **iv)** Le **parasite entre** enfin dans l'érythrocyte grâce à un moteur moléculaire de type actine-myosine connecté au complexe membranaire interne du parasite et aux récepteurs de la cellule hôte *via* des adhésines parasitaires. L'invasion se termine lorsque la jonction mobile se referme au pôle basal du parasite, laissant le mérozoïte à l'intérieur d'une vacuole parasitophore au sein de laquelle il se développera et se multipliera.



**Figure 3. Les différentes étapes de l'invasion d'un érythrocyte par un mérozoïte.**  
Adapté de Chitnis and Blackman 2000

Développement et multiplication au sein de l'érythrocyte (Figure 4) :

Quelques minutes après invasion, le parasite libère le contenu de ses granules denses dont les protéines s'associent avec la membrane de la vacuole parasitophore et le réseau membranaire intra-vacuolaire, permettant la mise en place d'échanges entre le parasite et l'érythrocyte (Dubremetz et al. 1998). Le parasite opère ensuite un rapide changement morphologique caractérisé par un aplatissement du mérozoïte en un fin **anneau** discoïdal. La phase anneau dure de 20 à 24 h chez *P. falciparum*, soit la moitié du cycle intra-érythrocytaire. Bien qu'elle soit considérée comme ayant une faible activité métabolique, de nombreux échanges avec la cellule hôte s'y mettent en place, tels que l'export de protéines parasitaires vers la membrane de l'érythrocyte et la mise en place de structures spécifiques.

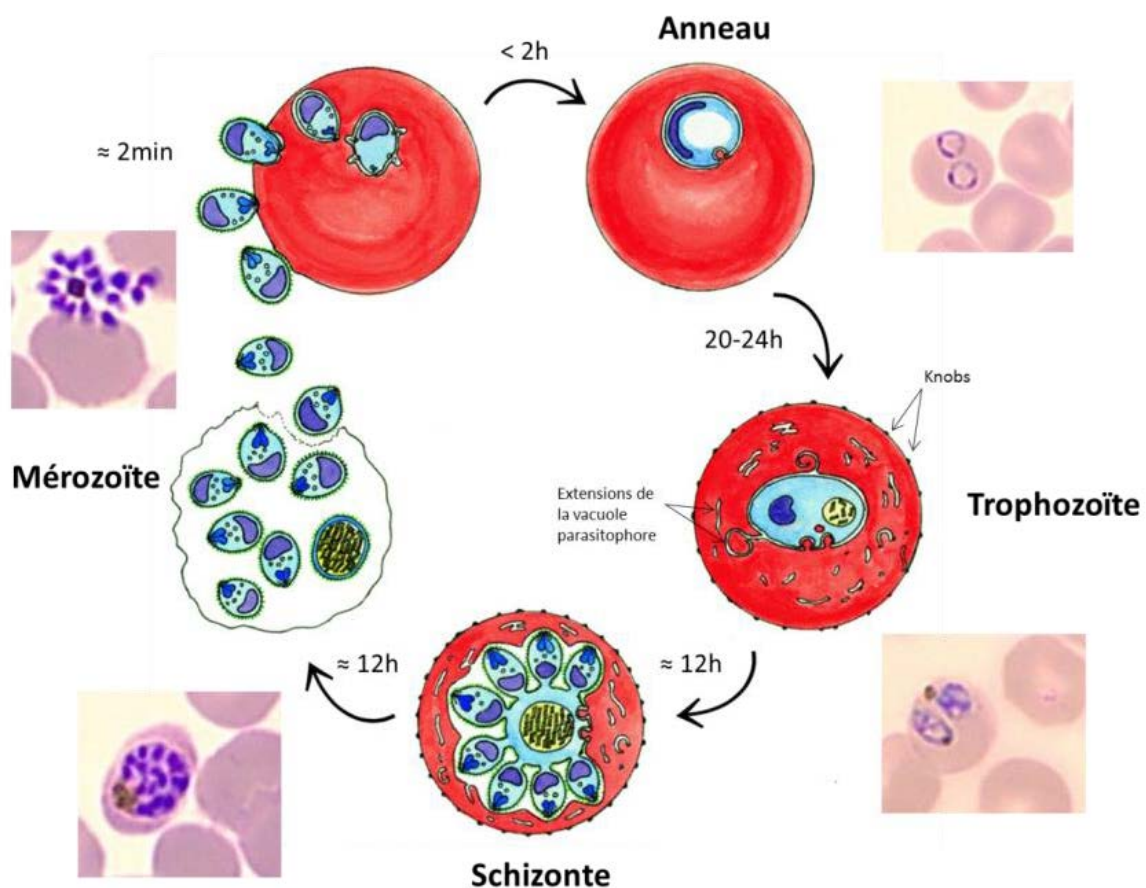


Figure 4. Cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum*

Adapté de Bannister and Mitchell 2003

Le parasite croît au sein de sa vacuole parasitophore jusqu'à aboutir au stade **trophozoïte**, d'une durée d'environ 12h. Toutefois, la distinction entre les stades anneau et trophozoïte dépend plus de la taille et de la forme du parasite plutôt que de différences internes fondamentales, les mécanismes d'échange avec l'érythrocyte mis en place au stade anneau se poursuivant au stade trophozoïte (Bannister et al. 2000a). Le stade trophozoïte se caractérise cependant par une forte augmentation de son activité métabolique et par la synthèse de nombreuses macromolécules.

Au cours des 12 dernières heures du cycle, correspondant au stade **schizonte**, le parasite effectue plusieurs cycles de division nucléaire aboutissant à la formation de 16 à 32 noyaux. Cette étape s'accompagne de nombreux changements cytoplasmiques dont la prolifération du réticulum endoplasmique (RE) et l'accumulation de larges vacuoles lipidiques, préfigurant la formation de nouveaux mérozoïtes. La dernière étape de mitose coïncide avec le début de la cytokinèse correspondant à la phase de division cellulaire proprement dite. Les noyaux nouvellement formés se répartissent alors en rosace à la périphérie du parasite et les cellules filles se forment par bourgeonnement (Francia and Striepen 2014). Plusieurs organites sont produits *de novo* durant cette étape dont les organites apicaux (micronèmes, rhoptries et granules denses), émergeant à partir du Golgi. *Plasmodium* contient également deux organites d'origine endosymbiotique : la mitochondrie et l'apicoplaste. Ceux-ci possèdent leur propre génome. Ils ne peuvent donc pas être produits *de novo* mais doivent croître puis se diviser avant d'être adressés vers les cellules filles en cours de formation (Striepen et al. 2007).

Les mérozoïtes matures sont libérés dans la circulation sanguine par la rupture successive de la vacuole parasitophore et de la membrane plasmique de l'érythrocyte. La sortie de la cellule hôte est un processus contrôlé principalement par le parasite. Il implique un arsenal de protéases et de protéines induisant la formation de pores, permettant ainsi la fragilisation des deux membranes entourant le parasite (Blackman and Carruthers 2013). Une fois libérés de la vacuole parasitophore, un ou deux mérozoïtes sont relâchés dans la circulation sanguine à travers la formation d'un pore dans la membrane de l'érythrocyte. S'en suit un rapide retournement (ou « buckling ») de la membrane ayant pour effet d'éjecter la totalité des mérozoïtes hors de ce qu'il reste de leur cellule hôte (Abkarian et al. 2011).

*Particularités des stades érythrocytaires et modifications de la cellule hôte :*

L'érythrocyte est une cellule hautement spécialisée, façonnée au cours de l'évolution pour accomplir une tâche essentielle : le transport de dioxygène vers les tissus. Son organisation structurale est simple, ne contenant ni noyau, ni organite. De fait, l'érythrocyte possède une activité métabolique résiduelle extrêmement restreinte et n'est plus capable de synthèse protéique et lipidique. Au cours de la phase intra-érythrocytaire, *P. falciparum* se retrouve isolé du plasma sanguin par deux membranes (membrane plasmique de l'érythrocyte et membrane de la vacuole parasitophore) et de ce fait se retrouve dépourvu de la plupart des nutriments dont il a besoin pour sa croissance. *P. falciparum* met donc en place une série de mécanismes lui permettant d'exploiter sa cellule hôte mais également d'établir des contacts avec le milieu extérieur.

Durant le cycle intra-érythrocytaire, jusqu'à 80 % de l'hémoglobine de l'hôte est ingérée puis dégradée. Ce processus débute peu de temps après l'invasion par l'absorption de petites quantités d'hémoglobine à travers la formation d'une structure endocytique appelée **cytostome**. Celle-ci peut être décrite comme une invagination de la membrane de la vacuole parasitophore et de la membrane plasmique du parasite, « encapsulant » le cytosol de l'érythrocyte. Du cytostome bourgeonnent par la suite de petites vésicules qui fusionneront au stade trophozoïte pour former la **vacuole digestive** (Abu Bakar et al. 2010). Par l'action de différentes protéases du parasite, dont la famille des plasmepsines, la partie protéique de l'hémoglobine est hydrolysée en acides aminés libres qui serviront pour la synthèse de protéines parasitaires. L'hème contenant un atome de fer est relâché et immédiatement oxydé en  $\alpha$ -hématine (ou ferriprotoporphyrine IX) qui est hautement toxique et doit donc être éliminée. Comme stratégie de protection, le parasite séquestre et détoxifie l' $\alpha$ -hématine sous une forme cristalline appelée hémozoïne au sein de sa vacuole digestive. (Coronado et al. 2014). Les cristaux d'hémozoïne, de couleur marron, sont aisément repérables en microscopie optique aux stades trophozoïte et schizonte (Figure 4.).

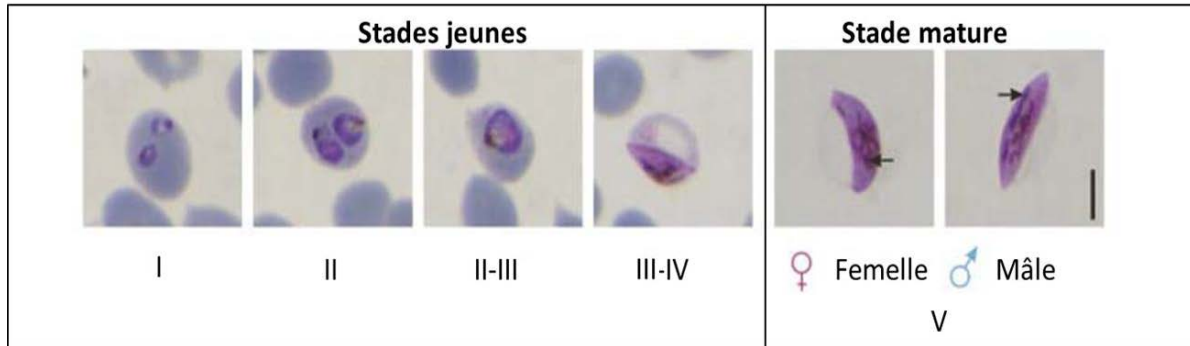
Se développer au sein d'une cellule aussi spécialisée que le globule rouge est un challenge pour *Plasmodium*. Afin de rendre cet environnement plus hospitalier, le parasite exporte de nombreuses protéines dans le cytoplasme et à la surface de sa cellule hôte, induisant un profond remodelage de celle-ci. Au stade anneau apparaissent les structures de Maurer. Elles sont localisées à proximité de la membrane plasmique et permettent le trafic de protéines de

virulence parasitaires, notamment PfEMP1 (erythrocyte membrane protein 1) qui est une des adhésines contenues dans les knobs (Tilley et al. 2011). Les **knobs**, ou « protrusions » sont des structures protéiques bourgeonnant à la surface de l'érythrocyte et sont mis en place plus tardivement lors du stade trophozoïte. Ils renferment des facteurs de virulence exportés par le parasite et responsables de l'adhésion des érythrocytes infectés aux parois des vaisseaux sanguins, limitant ainsi leur élimination par la rate (Elsworth et al. 2014).

*Plasmodium* ne modifie pas seulement la membrane du globule rouge à des fins de protection vis-à-vis de l'hôte. Au stade anneau s'opèrent également des changements significatifs dans les capacités de transport de la membrane érythrocytaire avec la mise en place de **nouvelles voies de perméabilité** (NPP). Elles permettent l'entrée d'une large gamme de molécules de petit poids moléculaire tels que des sucres, des cations et des anions organiques ou inorganiques ou encore des nucléosides. La nature exacte des NPP demeure incertaine en ce qui concerne leur nombre et leur diversité. Il s'agit cependant vraisemblablement de canaux possédant une spécificité large pour une grande gamme de solutés (Kirk and Saliba 2007).

### 2.2.3. Gamétocytogenèse

Après plusieurs cycles de croissance et de multiplication au sein du globule rouge, une petite partie des parasites opère une transition vers une forme sexuée appelée gamétocytes. Chez *P. falciparum*, cette phase se déroule en 8 à 12 jours durant lesquels le mérozoïte nouvellement installé dans sa cellule hôte grossira puis se différenciera en gamétocyte femelle ou mâle de forme allongée (Figure 5) (Dixon et al. 2012). Les mécanismes à l'origine de l'engagement du mérozoïte dans la gamétocytogenèse restent encore assez méconnus. Néanmoins, il semble clair que le processus s'initie dès le cycle précédent lors du stade schizonte, et que tous les parasites issus de la même vacuole parasitophore sont déjà « programmés » en tant que futurs gamétocytes mâles ou femelles (Baker 2010). Récemment, deux études réalisées chez *P. falciparum* (Kafsack et al. 2014) et *P. berghei* (Sinha et al. 2014) ont identifié le facteur de transcription du parasite AP2-G comme régulateur majeur de la gamétocytogenèse. Les gamétocytes matures ingérés par le moustique lors de son repas sanguin constituent la forme infectante responsable de la transmission.



**Figure 5. Les stades de la gamétocytogenèse chez *P. falciparum***

Adapté de Dixon et al. 2008

#### 2.2.4. Développement chez le moustique

Une fois ingurgités par le moustique, les globules rouges contenant les gamétocytes parviennent à l'intestin moyen de l'insecte. Les gamétocytes sentent le brusque changement d'environnement au sein de l'intestin et commencent leur différenciation en gamètes. Le gamétocyte mâle se transforme en huit microgamètes motiles après trois divisions nucléaires suivies d'une étape d'exflagellation. Le gamétocyte femelle émerge quant à lui directement du globule rouge sous forme de gamète (Alano 2007). Un zygote se forme ensuite par la fertilisation d'un gamète femelle par un gamète mâle. Il évolue rapidement vers une forme motile appelée ookinète. Après 24h de maturation, l'ookinète traverse la membrane péritrophique puis l'épithélium intestinal pour émerger à l'extérieur de l'intestin au niveau de la lame basale où il évoluera en oocyste. Le développement de l'oocyste représente à la fois la phase la plus longue et la seule se déroulant de manière extracellulaire au cours du cycle de vie de *P. falciparum*. Pendant deux à trois semaines, l'oocyste grossit et subit de nombreuses divisions nucléaires et cellulaires pour créer plusieurs centaines de sporozoïtes, la forme pathogène de l'homme (Matuschewski 2006) (Figure 2). Une fois libérés de l'enveloppe de l'oocyste, les sporozoïtes migrent vers les glandes salivaires du moustique dans lesquelles ils peuvent être stockés pendant plusieurs jours. Les parasites sont alors prêts à être injectés à l'homme lors de la prise d'un repas sanguin, commençant ainsi un nouveau cycle d'infection.

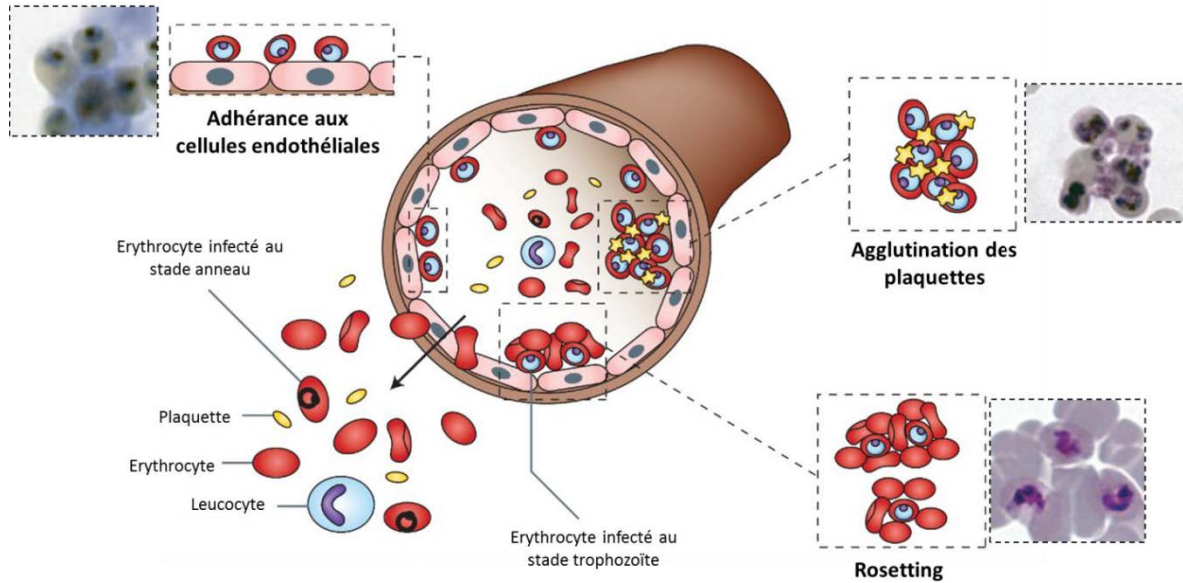
### 3. Pathologie associée à l'infection par *Plasmodium*

La phase symptomatique du paludisme correspond à la phase intra-érythrocytaire du parasite. Cependant, l'infection par *Plasmodium* ne rime pas forcément avec l'apparition de symptômes. En zone de transmission intense et permanente, la majeure partie de la population est porteuse du parasite à cause de piqûres répétées par des Anophèles infectées. Une immunité partielle dite de « prémunition » se met alors en place au fil des années, maintenant la parasitémie à un faible niveau et permettant ainsi de lutter contre la survenue de formes graves.

Certaines populations sont cependant particulièrement à risque. Il s'agit de personnes dont le système immunitaire, amoindri ou non préparé, n'est pas en mesure de lutter efficacement contre l'infection. Les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes et les migrants venant d'une zone non endémique courent donc un risque plus important d'être atteints par une forme sévère de la maladie. Les personnes immunodéprimées, notamment porteuses du VIH, représentent également une population à risque du fait du degré de prévalence élevé du virus en zone de transmission de *Plasmodium* (WHO 2014b).

#### 3.1. Pathogénie de *Plasmodium*

La forme grave du paludisme est due à l'infection par *P. falciparum*. Sa pathogénie repose sur l'adhérence et la séquestration des globules rouges infectés à l'endothélium vasculaire (Figure 6).



**Figure 6. Obstruction des capillaires sanguins dans le paludisme sévère à *P. falciparum***  
Adapté de Rowe et al. 2009

Le phénomène d'adhérence est dû à la présence des knobs à la surface des érythrocytes infectés aux stades trophozoïte et schizonte. Ces protubérances exposent des adhésines se liant à des récepteurs endothéliaux tels que l'ICAM-1 dans le cerveau et la chondroïtine sulfate 1 (CSA) dans le placenta. Les adhésines contenues dans les knobs, comme la plus connue *PfEMP1*, possèdent une grande variabilité génétique et sont souches-dépendantes. La cyto-adhérence est amplifiée par l'agglutination des érythrocytes sains autour des érythrocytes infectés (le rosetting) pouvant obstruer les capillaires profonds et aggraver le phénomène de séquestration.

### 3.2. Physiopathologie du paludisme

De multiples facteurs interviennent dans la gravité du paludisme (Pilly 2012) :

- Des facteurs parasitaires tels que l'espèce plasmodiale, la virulence et la capacité de cyto-adhérence propres à chaque souche.
- Le niveau de parasitémie, c'est-à-dire le pourcentage de globules rouges infectés.



- Des facteurs humains, en particulier le niveau de prémunition et la présence de facteurs génétiques.
- La présence d'éventuelles co-infections.
- L'efficacité du rôle de filtre joué par la rate et permettant de réguler la parasitémie.

Deux formes cliniques du paludisme doivent donc être distinguées en fonction de leur gravité : la forme non compliquée et la forme sévère nécessitant une prise en charge thérapeutique différente.

### **3.2.1. Paludisme non compliqué**

L'accès palustre simple est commun à toutes les espèces plasmodiales. Les premiers signes cliniques sont ceux d'une fièvre non spécifique associée à des frissons, sueurs, céphalées et courbatures. Les signes indiquant une hémolyse apparaissent souvent plus tardivement avec pâleur et hépato-splénomégalie (augmentation de la taille du foie et de la rate). Dans certains cas apparaît également un pic de fièvre cyclique, tous les 3 jours (fièvre tierce) pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* ou tous les 4 jours (fièvre quarte) pour *P. malariae*. Cette périodicité correspond à la libération des mérozoïtes et de substances pyrogènes dans la circulation sanguine. Lorsque non traitée, la fièvre tierce liée à *P. falciparum* peut évoluer vers une forme grave, le paludisme sévère, parfois très rapidement.

### **3.2.2. Paludisme sévère**

La forme sévère du paludisme est principalement causée par l'obstruction des vaisseaux sanguins par les érythrocytes infectés, provoquant la défaillance de la plupart des organes vitaux. Les symptômes associés sont donc variés, allant de l'anémie au coma profond. Selon les critères de l'OMS datant de 2000, tout patient diagnostiqué positif à une infection à *P. falciparum* et possédant au moins un des signes de gravité listés dans le Tableau 1, et pour lequel aucune autre cause n'est connue, doit être considéré comme souffrant de paludisme grave (WHO 2000).

Tableau 1. Signes de gravité du paludisme du à *P. falciparum*. D'après WHO. 2000.

Fréquence		Manifestations cliniques ou paracliniques	Valeur pronostique (gravité)	
Enfants	Adultes		Enfants	Adultes
+++	+++	Prostration	+	?
+++	++	Troubles de la conscience	+++	++
+++	+	Détresse respiratoire	+++	+++
+++	+	Convulsions multiples	+	+++
+	+	Collapsus circulatoire	+++	+++
+/-	+	Œdème pulmonaire (radiologique)	+++	+++
+	+++	Jaunisse	++	+
+/-	+	Hémorragies	+++	++
+/-	+	Hémoglobinurie	+	+
+++	+	Anémie sévère	+	+

La fréquence et la valeur pronostique associées à ces différents signes cliniques diffèrent cependant de manière significative entre les enfants et les adultes (Tableau 1). Elles nécessitent donc une prise en charge différente entre ces deux populations. Chez l'enfant, anémie sévère, convulsions multiples et prostration sont les principaux signes cliniques associés à un paludisme sévère. Dans le cas particulier d'atteintes cérébrales, 3 à 15% des enfants garderont des séquelles neurologiques alors que ce type d'atteintes n'est que très rarement retrouvée chez les adultes (< 3%) (White et al. 2014). Chez ces derniers, les manifestations cliniques les plus courantes sont un dysfonctionnement du foie mais également des atteintes cérébrales comme chez l'enfant. L'apparition d'une détresse respiratoire aiguë et d'une nécrose du rein sont deux des complications les plus à craindre.

Les femmes enceintes sont particulièrement à risque, d'autant plus qu'elles sont primipares, et les complications de cette infection sont considérables, aussi bien pour la mère que pour le bébé. Dans les zones de transmission permanente, la contamination placentaire par des érythrocytes infectés entraîne un doublement du risque de retard de croissance intra-utérin, avec pour conséquence une élévation de la mortalité périnatale. En zone de paludisme

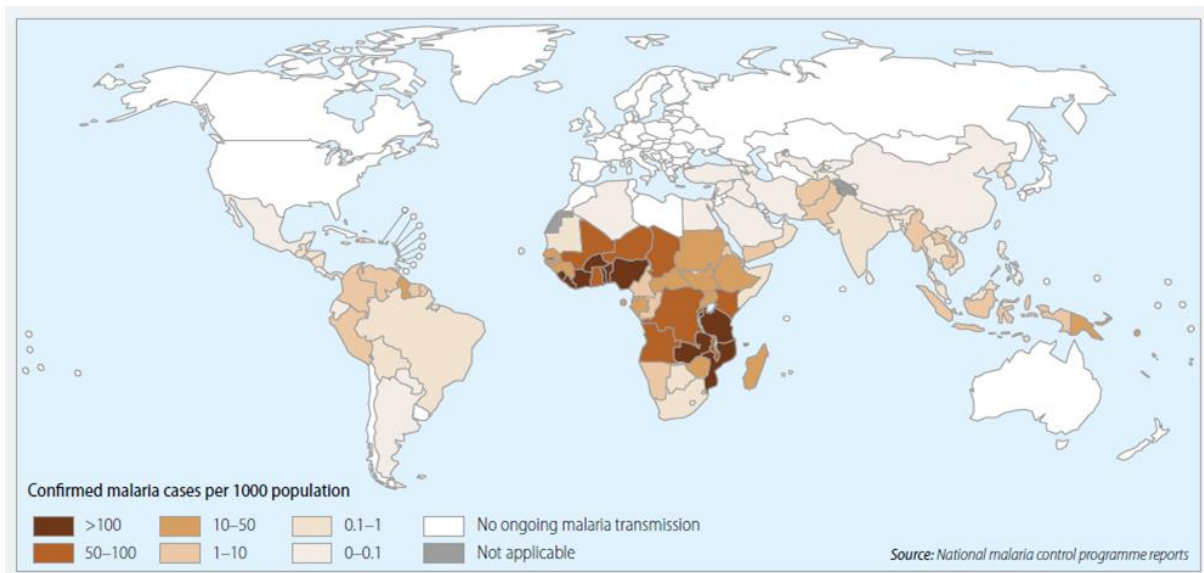
instable le danger est principalement pour la mère avec un risque élevé de fausse couche et de paludisme sévère associé à un taux de mortalité élevé ( $\approx 50\%$ ) (White et al. 2014).

### 3.3. Diagnostic

Un diagnostic précoce et exact du paludisme est capital pour assurer une bonne prise en charge et un traitement adapté. Au-delà du diagnostic clinique reposant sur la présence de symptômes évocateurs (Tableau 1), il est crucial d'identifier quelle espèce de *Plasmodium* est responsable de l'infection ainsi que son niveau de parasitémie. Les méthodes basées sur l'observation microscopique d'échantillons sanguins restent encore aujourd'hui la référence pour répondre à ces deux questions. Il en existe deux, la goutte épaisse et le frottis sanguin. Toutes deux reposent sur la réalisation de lames d'observation fixées puis colorées. Le frottis présente l'avantage de faciliter le diagnostic d'espèce mais il est limité par un faible seuil de détection. Il est alors associé à la goutte épaisse qui est plus sensible (Pilly 2012). L'amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction) est actuellement la technique la plus sensible et permet de détecter l'ADN du parasite en quelques heures avec une grande fiabilité. Néanmoins, cette technique est onéreuse et n'est disponible que dans certains laboratoires, pour la plupart dans les pays riches. Son indication se justifie principalement en cas de difficulté de diagnostic microscopique à cause de pauciparasitémies ou pour l'identification de l'espèce plasmodiale en cause et l'étude des gènes de résistance au traitement. Enfin, il existe également des tests de diagnostic rapide (TDR) basés sur la détection d'antigènes parasitaires. Leur sensibilité n'est cependant pas parfaite et ils ne permettent pas la quantification de la parasitémie. Leur rapidité et simplicité d'utilisation les rendent toutefois très utiles pour confirmer ou réfuter une infection à *P. falciparum*. De fait, la distribution de TDR est en forte augmentation, passant de 200 000 en 2005 à plus de 160 millions en 2013, et représente une des priorités de l'OMS dans le cadre de son projet de lutte contre le paludisme (WHO 2014b).

#### 4. Situation actuelle du paludisme dans le monde

Le paludisme demeure la principale endémie parasitaire dans le monde malgré les progrès importants réalisés ces dernières années en termes de diagnostic et de prévention. D'après les derniers chiffres de l'OMS, entre 124 et 283 millions de cas de paludisme ont été diagnostiqués en 2013, causant entre 367 000 et 755 000 morts, dont 78% sont des enfants de moins de 5 ans (WHO 2014b). La relative imprécision de ces chiffres provient du fait que beaucoup de patients ne bénéficient toujours pas d'un diagnostic précis de paludisme.



**Figure 7. Carte des pays touchés par le paludisme en 2013**

D'après WHO. 2014b.

Près de la moitié de la population mondiale vit dans une zone à risque, correspondant principalement aux régions subtropicales (Figure 7). 90% des cas de paludisme et des décès dus à cette maladie surviennent en Afrique subsaharienne. Toutefois, l'Asie du sud-est, le sous-continent indien, l'Amérique latine et, dans une moindre mesure, le Moyen-Orient sont également touchés. Des cinq espèces plasmodiales pouvant infecter l'homme, *P. falciparum* et *P. vivax* sont les plus répandues. *P. falciparum* est l'espèce prédominante dans les régions à transmission intense et permanente, c'est-à-dire dans les régions équatoriales comme en Afrique sub-saharienne ou en Asie du Sud-Est. Dans les régions de transmission plus faible et

saisonnaire comme en Amérique latine, *P. vivax* a tendance à être plus présent du fait de sa meilleure résistance à de plus faibles températures.

#### **4.1. Paludisme et pauvreté**

Paludisme et pauvreté sont intimement liés, s'encourageant l'un l'autre dans un cercle vicieux. La maladie affecte en premier lieu les populations les plus pauvres et ayant le moins accès aux moyens de prévention, de diagnostic et de traitement. D'après les chiffres de l'OMS de 2013, seulement 49 % des personnes à risque en Afrique subsaharienne ont eu accès à une moustiquaire imprégnée en moyen de prévention (voir §5.1.). Il en est de même pour l'accès aux soins où 56 à 69 millions d'enfants atteints de paludisme n'ont pu obtenir un traitement adapté (combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine ou CTA, voir §6.7) (WHO 2014b). Par conséquent, le contrôle du paludisme est inextricablement lié au un renforcement du système de santé et, de manière plus générale, à la réduction de la pauvreté. Au-delà de son impact sur la santé publique, le paludisme a des répercussions importantes sur la croissance économique et le développement des pays impaludés, principalement en Afrique. Les coûts liés à la prévention et au traitement de la maladie, associés à la perte de productivité qui en résulte, sont autant de freins au développement économique des pays concernés. Le fardeau du paludisme se retrouve également sur le plan social en compromettant l'apprentissage et en augmentant le taux d'absentéisme scolaire et professionnel, accroissant ainsi la pauvreté.

#### **4.2. Succès et défis dans la lutte contre le paludisme**

De nombreux progrès ont été réalisés au cours de la dernière décennie dans le contrôle du paludisme. Différents programmes ont été mis en place afin d'améliorer l'accès aux outils de prévention et de traitement préexistants, mais également de promouvoir la recherche de nouveaux moyens de lutte. Le plus emblématique de ces programmes est le Roll Back Malaria (RBM) qui a été lancé en 1998 conjointement par l'OMS, l'UNICEF, la banque mondiale et le programme des Nations Unies pour le développement (PNUD). L'objectif principal du RBM est de «réduire la mortalité et la morbidité associées au paludisme par le

biais d'une couverture universelle et d'un renforcement des systèmes de santé» (Roll Back Malaria, <http://www.rbm.who.int/fr/about/rbmmandate.php>). L'amélioration de la prévention (distribution de moustiquaires imprégnées), une plus grande accessibilité aux tests de diagnostic rapides et aux traitements par CTA ont permis de réduire le taux de mortalité de 47% à travers le monde entre 2000 et 2013 (WHO 2014b). Ces résultats sont importants et encourageants mais sont loin de l'objectif initial de zéro décès dû au paludisme en 2015. Il reste donc de nombreux défis dans la réduction et, à terme, l'éradication de la maladie. La pauvreté et le manque d'éducation restent des freins importants à l'accès aux différents outils de prévention et aux soins. De plus, outre les résistances bien établies aux antipaludiques tels que la chloroquine ou les antifolates, des résistances récentes aux dérivés d'artémisinine, les composants essentiels des nouveaux traitements du paludisme à *P. falciparum*, ont été rapportés dans 5 pays d'Asie du Sud-Est (WHO 2014b). A cela s'ajoutent également des résistances à différents insecticides, dont les pyréthriinoïdes, imprégnant les moustiquaires de prévention.

## 5. Moyens de prévention

La vaccination représente généralement le moyen le plus efficace pour prévenir les maladies infectieuses. Elle serait donc une arme considérable dans la lutte contre le paludisme et, à terme, son éradication. Cependant, en dépit d'une recherche intense, aucune des approches envisagées n'a pu encore aboutir et aucun vaccin contre le paludisme n'est aujourd'hui disponible sur le terrain (Heppner 2013). La prévention du paludisme pour les populations vivant en zone endémique se base donc principalement sur la lutte anti-vectorielle et, dans une moindre mesure, sur la chimio-prophylaxie.

### 5.1. Lutte anti-vectorielle

La lutte anti-vectorielle reste le moyen général le plus efficace pour prévenir la transmission du paludisme. Elle représente donc l'un des piliers de la stratégie mondiale de lutte antipaludique. Son principal objectif est de réduire les niveaux de transmission du

parasite, soit par l'élimination du vecteur, soit par la prévention des piqûres. Plusieurs mesures existent, individuelles ou collectives, mais elles diffèrent considérablement en ce qui concerne leur champ d'application, leur coût et leur efficacité à long terme. La stratégie de lutte anti-vectorielle doit donc être adaptée à chaque situation locale, en tenant compte des vecteurs présents et du mode de vie des populations. Les différentes mesures sont (WHO 2006) :

- **Les pulvérisations intra-domiciliaires** d'insecticides à effet rémanent : leur effet est de tuer les moustiques lorsqu'ils se posent à l'intérieur des habitations, diminuant ainsi le risque de transmission. Cette mesure serait actuellement en recul en Afrique à cause de l'interruption ou de la réduction des programmes de pulvérisation dans certains pays (WHO 2014b).
- **L'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII)**: elles ont également pour objectif de protéger les populations à l'intérieur des habitations, cette fois-ci en réduisant les contacts entre l'homme et le moustique durant la nuit. L'accès aux moustiquaires imprégnées est en forte progression grâce à d'importants programmes de promotion et de distribution dans la plupart des pays endémiques. En 2013, environ 44% de la population à risque dormaient sous une MII contre seulement 2% en 2004 (WHO 2014b).
- **Les opérations larvicides** : elles sont destinées à tuer les larves du moustique mais ne sont recommandées que si les sites de reproduction sont peu nombreux et faciles à traiter.
- **La gestion de l'environnement** : l'objectif est de rendre l'environnement moins favorable à la survie et à la reproduction du moustique, notamment en éliminant les eaux stagnantes.

L'efficacité de la lutte anti-vectorielle est menacée par les résistances aux insecticides reportées dans 49 des 97 pays endémiques. Il est donc crucial d'adopter certaines pratiques afin de limiter leur propagation ainsi que l'émergence de nouvelles résistances. Il est recommandé d'alterner entre au moins deux insecticides présentant un mode d'action différent et d'en combiner plusieurs dans une même habitation. La stratégie actuelle reposant lourdement sur une seule classe d'insecticides, les pyréthriinoïdes, il apparaît également

essentiel de développer de nouvelles molécules présentant de nouveaux modes d'action chez le moustique.

## 5.2. Chimio-prophylaxie

Les traitements préventifs ont pour objectif de diminuer le risque de développer un accès palustre. Cependant, leur utilisation est généralement réservée aux voyageurs se rendant en zone impaludée. Le choix du type de chimio-prophylaxie dépend de l'intensité du niveau de transmission dans le pays visité mais également des éventuelles résistances du parasite aux molécules utilisées, notamment à la chloroquine. Dans tous les cas, la prise du traitement doit avoir lieu avant, pendant mais également après l'exposition (Pilly 2012).

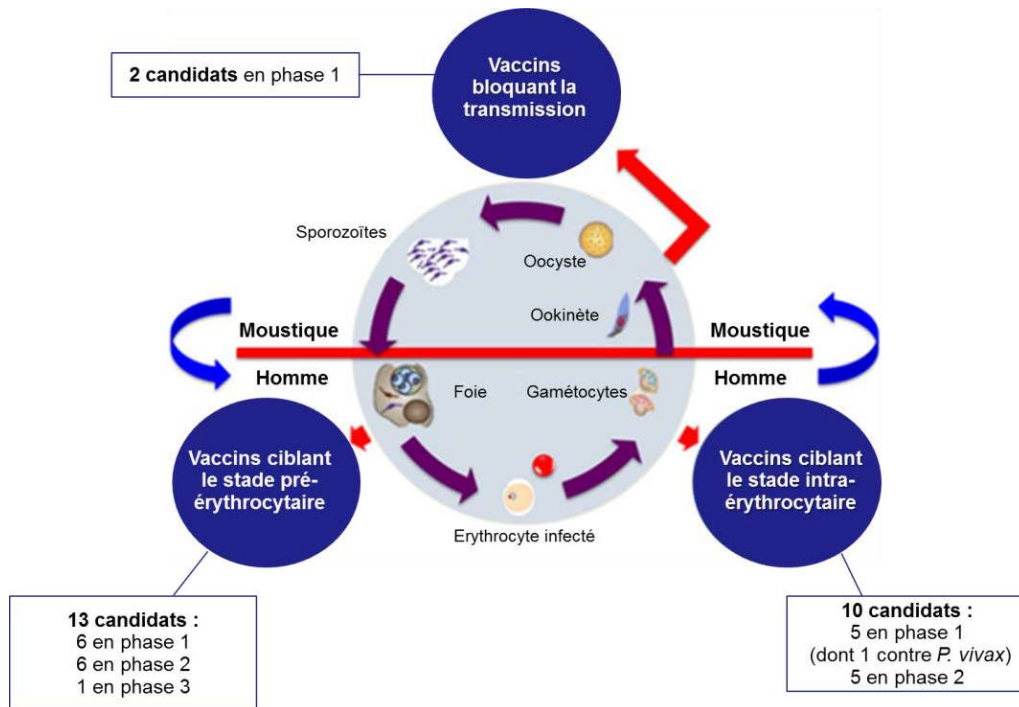
Au-delà des voyageurs, il existe également une volonté de la part de l'OMS d'étendre la chimio-prophylaxie aux femmes enceintes et aux enfants de moins de 5 ans dans certains pays endémiques à transmission saisonnière. L'administration d'un traitement préventif intermittent (TPI) est recommandée pour les femmes enceintes lors de chaque visite prénatale à partir du second trimestre de grossesse. Concernant les jeunes enfants, la distribution d'un TPI durant la saison des pluies est encouragée depuis 2010 *via* le Programme élargi de vaccination (White et al. 2014). Cette recommandation reste néanmoins peu appliquée à l'heure actuelle (WHO 2014b).

## 5.3. Approches vaccinales

L'élaboration d'une approche vaccinale contre *Plasmodium* se heurte principalement à deux obstacles que sont la grande variété de formes prises par le parasite au cours de son cycle de vie et son importante variabilité antigénique. Le vaccin idéal requerrait donc trois caractéristiques essentielles : **i.** la présence de plusieurs composants permettant d'induire une réponse immunitaire contre les différents stades de l'infection, **ii.** de multiples épitopes afin de contourner la grande variabilité antigénique du parasite et **iii.** la capacité d'induire plusieurs types de réponses immunitaires (Arama and Troye-Blomberg 2014). Malgré ces contraintes, plusieurs approches sont actuellement développées. 25 candidats vaccins sont en



essais cliniques d'après l'OMS, dont un seul est en phase 3. Il existe globalement trois stratégies vaccinales présentées dans la Figure 8.



**Figure 8. Les trois stratégies de développement vaccinal contre *Plasmodium***

Les candidats vaccins recensés par l'OMS ainsi que les phases cliniques correspondantes sont indiqués pour chaque approche. Adapté de Arama and Troye-Blomberg 2014 et WHO 2014a.

### 5.3.1. Bloquer la transmission du parasite

Cette stratégie a pour but d'interrompre le cycle de vie du parasite chez le moustique après que celui-ci a pris un repas sanguin sur un individu vacciné. Les vaccins bloquant la transmission contiennent donc des antigènes présents sur les formes sexuées du parasite. Ce type d'approche ne permet pas à la personne à qui est administré le vaccin d'être protégée mais elle pourrait permettre de prévenir la transmission de la maladie. Il s'agit donc de vaccins « altruistes ». Il existe à ce jour deux candidats en essais cliniques dans ce groupe. Tous deux contiennent un antigène de surface des gamètes, zygotes et ookynètes de *P. falciparum*, *Pfs25* (Jones et al. 2013; Shimp et al. 2013). Cependant, les antigènes présents sur les formes sexuées ne sont normalement jamais présentés au système immunitaire humain,

l'absence d'une stimulation naturelle suivant l'immunisation pourrait limiter l'efficacité de ce type d'approche.

### 5.3.2. Cibler la phase pré-érythrocytaire

Les vaccins pré-érythrocytaires ont pour objectif de bloquer le développement du parasite dès le stade hépatique. Toutefois, due à l'intense réplication du parasite dans les hépatocytes, les vaccins pré-érythrocytaires doivent se rapprocher du 100% d'efficacité pour pouvoir empêcher la poursuite de l'infection au stade érythrocytaire.

Le premier essai clinique de vaccination contre *P. falciparum* était basé sur la répétition de piqûres par des moustiques infectés et irradiés afin d'atténuer la virulence des parasites (Clyde et al. 1973). Cependant, une telle approche basée sur l'injection de sporozoïtes à hautes doses a longtemps été considérée comme irréalisable à grande échelle. Ce concept est récemment revenu à l'ordre du jour avec le candidat **PfSPZ** (Sanaria Inc.) et les importants progrès réalisés dans la production et la purification de quantités importantes de sporozoïtes (Vanderberg 2009). Les résultats de l'étude de phase 1 sont encourageants mais doivent être confirmés à plus grande échelle, notamment concernant la durée de l'immunité acquise et le degré de protection vis à vis de différentes souches de *P. falciparum* (Seder et al. 2013).

Outre l'utilisation de parasites entiers atténués, l'autre stratégie ciblant le stade pré-érythrocytaire consiste en l'injection d'antigènes pré-érythrocytaires, en particulier la protéine circumsporozoïte (CSp). Plusieurs essais cliniques basés sur l'administration de portions de CSp, associées à différents types d'adjuvants, sont actuellement en cours. Le plus avancé, et seul candidat vaccin en phase 3 toutes approches confondues, est le **RTS,S/A S101E**. Il consiste en la fusion d'une forme tronquée de CSp à un antigène de surface de l'hépatite B. La dernière étude clinique de phase 3 fait état de 45% d'efficacité dans la prévention de l'infection chez les nourrissons de 5 à 17 mois, 18 mois après administration (The RTS,S Clinical Trials Partnership. 2014). Bien que ces résultats soient modérés et toujours en deçà des objectifs de l'OMS (80% d'efficacité d'ici à 2025), GlaxoSmithKline (GSK) a soumis une demande d'autorisation de mise sur le marché à l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en juillet 2014.

### 5.3.3. Cibler la phase intra-érythrocytaire

La dernière approche vaccinale cherche à provoquer une réponse immunitaire anti-invasion pendant la phase érythrocytaire. A ce jour, plusieurs antigènes du mérozoïte font l'objet d'études cliniques dont AMA1 et les MSPs. Néanmoins, les vaccins ciblant AMA1 et MSP1 n'ont pour l'instant pas montré d'efficacité chez les enfants africains. Ceci est probablement dû au haut degré de polymorphisme présent chez ces deux protéines, représentant le principal challenge de l'approche intra-érythrocytaire. Les efforts se concentrent maintenant sur l'identification d'antigènes moins polymorphiques et sur leur combinaison afin d'induire des réponses immunitaires croisées (Arama and Troye-Blomberg 2014).

## 6. Les antipaludiques actuels et leurs limites

La pharmacopée du paludisme regroupe différentes classes chimiques qui seront brièvement présentées dans la suite de cette introduction. Trois grands types de mécanisme d'action peuvent être distingués en fonction du stade ciblé :

- les schizonticides sanguins qui agissent contre les formes sanguines asexuées.
- les schizonticides tissulaires qui ciblent les formes hépatiques.
- les gamétocytocides qui exercent leur action sur les formes sanguines sexuées.

Toutefois, la grande majorité des antipaludiques sont en premier lieu des schizonticides sanguins. Les différentes molécules actuellement utilisées ainsi que les stades qu'elles ciblent sont présentés dans la Figure 9.

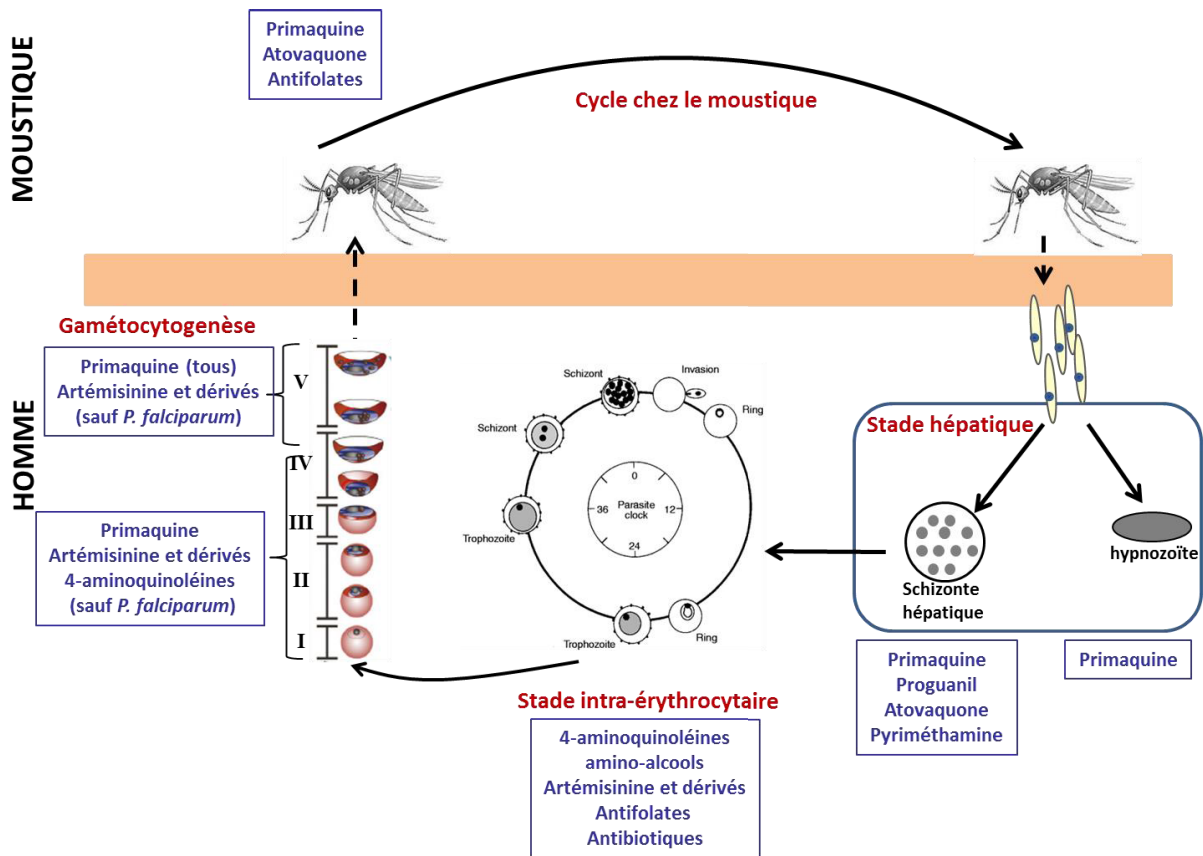
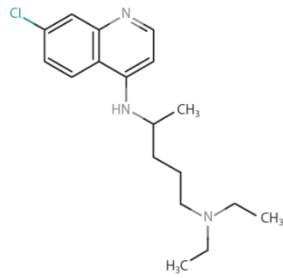


Figure 9. Stades ciblés par les principaux antipaludiques actuels

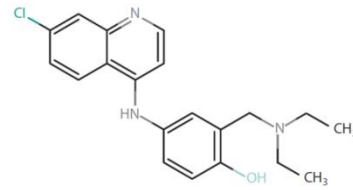
Adapté de Wein 2012

## 6.1. Les 4-aminoquinolés

Les principaux représentants de cette classe chimique sont la chloroquine et l'amodiaquine. Toutes deux agissent sur les stades sanguins, sexués et asexués. Le mécanisme d'action des 4-aminoquinolés est surtout basé sur celui de la chloroquine qui a été l'objet de nombreuses études depuis sa découverte. Aujourd'hui, il est admis que ces molécules exercent leur action principalement au sein de la vacuole digestive du parasite où elles sont fortement accumulées. Une fois bloquée à l'intérieur de ce compartiment, la chloroquine interfère avec le processus de détoxification de l'hème en hémotoïne en s'associant à l' $\alpha$ -hématine (Coronado et al. 2014).



Chloroquine



Amodiaquine

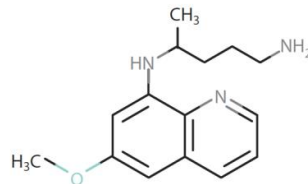
La **chloroquine** a été synthétisée pour la première fois en 1934. Son excellente efficacité, sa faible toxicité ainsi que son faible coût en ont fait le principal antipaludique à partir de la fin de la seconde guerre mondiale jusqu'à l'apparition des premières résistances à la fin des années 1950, une décennie seulement après son introduction. Aujourd'hui, la chloroquine n'est pratiquement plus utilisée pour la prévention et le traitement du paludisme à *P. falciparum* car les résistances sont généralisées. Elle reste cependant une molécule de référence dans le traitement des accès palustres dus à *P. vivax*. (WHO 2012).

L'**amodiaquine** est partiellement active contre certaines souches chloroquino-résistantes. Toutefois, elle présente un profil de toxicité plus élevé que la chloroquine et peut provoquer des troubles hépatiques graves et une granulocytose lors d'une prophylaxie prolongée (Eastman and Fidock 2009). L'amodiaquine est donc principalement utilisée pour le traitement des formes non-complicée et sévère de paludisme dû à *P. falciparum*.

Les résistances à la chloroquine sont causées par une plus faible accumulation de la molécule au sein de la vacuole digestive, probablement suite à une augmentation de son efflux hors de la vacuole *via* un mécanisme de transport actif. Cette augmentation de l'efflux serait notamment due à une mutation dans le gène codant pour le transporteur *PfCRT* (Chloroquine Resistance Transporter) localisé dans la membrane de la vacuole digestive. Des mutations dans le gène *Pfmdr*, codant pour une pompe à efflux, ont également été observées dans les souches chloroquino-résistantes. Elles sont cependant insuffisantes pour expliquer à elles seules le phénomène de résistance mais jouent un rôle important dans sa modulation (Thome et al. 2013).

## 6.2. Les 8-aminoquinoléines

La **primaquine** a été développée dans les années 1940 et est la seule représentante de la famille des 8-aminoquinoléines actuellement utilisée dans le traitement du paludisme. Il s'agit de la seule molécule agissant sur les hypnozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale* lors du stade hépatique et permettant de contrôler les rechutes dues à ces deux espèces. La primaquine exerce également une puissante activité sur les formes hépatiques et sur les gamétocytes, y compris au stade mature, de *P. falciparum*. Son mécanisme d'action précis reste inconnu mais il est probable qu'elle agisse au niveau de la mitochondrie en interférant avec le transport d'électrons dans la chaîne respiratoire (Vale et al. 2009).

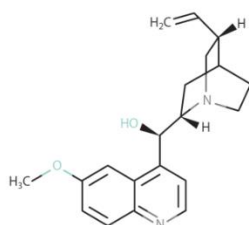


*Primaquine*

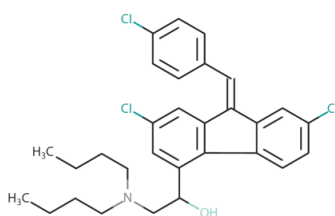
La primaquine est principalement prescrite en association avec la chloroquine, soit pour l'élimination des formes dormantes de *P. vivax* et *P. ovale*, soit dans le traitement des accès palustres causés par des formes non chloroquino-résistantes de *P. falciparum* (WHO 2012). Toutefois, son utilisation est associée à un risque hémolytique important chez les patients présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), une affection génétique principalement présente dans les régions tropicales (Ashley et al. 2014b). A ce jour aucune résistance à la primaquine n'a été rapportée (Gamo 2014). De ce fait, son association avec d'autres antipaludiques et à une grande échelle pourrait être intéressante. Néanmoins, une telle mise en œuvre fait l'objet d'intenses discussions en raison de sa toxicité chez les patients déficients en G6PH, mais également afin de préserver l'efficacité du seul antipaludique efficace contre les stades hypnozoïtes.

### 6.3. Les amino-alcools

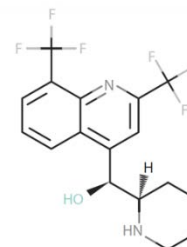
Les amino-alcools regroupent des molécules dérivées de la **quinine**, un composé naturel extrait de l'écorce de l'arbre quinquina utilisé depuis le XVII<sup>e</sup> siècle pour le traitement du paludisme. Ils agissent sur les formes schizontes intra-érythrocytaires de toutes les espèces plasmodiales ainsi que sur les gamétocytes, à l'exception de ceux de *P. falciparum* (Dechy-Cabaret and Benoit-Vical 2012). Leur mécanisme d'action demeure peu connu mais il s'apparente semble-t-il à celui des 4-aminoquinoléines. Tout comme la chloroquine, la quinine inhiberait la bio-cristallisation de l'hémozoïne en se liant à l' $\alpha$ -hématine libre au sein de la vacuole digestive (Gorka et al. 2013).



*Quinine*



*Luméfántrine*



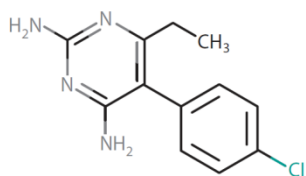
*Méfloquine*

Bien qu'utilisée depuis plus longtemps, la quinine n'a jamais été prescrite de manière aussi massive que la chloroquine. Les premières résistances n'ont été rapportées qu'à partir de 1910 et celles-ci restent d'une manière générale plutôt faibles (Achan et al. 2011). La quinine demeure efficace sur les souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum* et reste donc très utilisée en Afrique pour le traitement du paludisme sévère, généralement en monothérapie, mais également en prophylaxie chez la femme enceinte (WHO 2012).

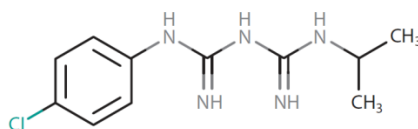
La **luméfántrine** et la **méfloquine** sont deux dérivés de quinine utilisés en association avec un dérivé d'artémisinine. Ces combinaisons sont très efficaces contre les souches multi-résistantes de *P. falciparum* et sont encouragées par l'OMS en tant que traitement de première intention contre le paludisme non-complicé (WHO 2010).

## 6.4. Les antifolates

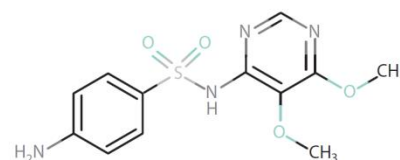
La pyriméthamine, le proguanil et la sulfadoxine sont les principaux représentants de la famille des antifolates. Celle-ci regroupe des molécules ciblant des enzymes de la voie de biosynthèse du folate, essentielle pour la synthèse des purines et par conséquent pour la réplication de l'ADN. La **pyriméthamine** et le **proguanil** (sous sa forme métabolisée *in vivo*, le cycloguanil) inhibent la dihydrofolate réductase (DHFR) alors que la **sulfadoxine** inhibe la dihydroptéroate synthase (DHPS) (Muller and Hyde 2013). Ces molécules agissent comme des inhibiteurs compétitifs des substrats naturels. De façon générale, les antifolates agissent préférentiellement sur les formes sanguines matures et sur la maturation des sporozoïtes.



*Pyriméthamine*



*Proguanil*



*Sulfadoxine*

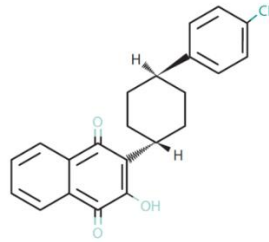
A partir du début des années 1960, la pyriméthamine et la sulfadoxine ont été massivement prescrites en combinaison pour le traitement du paludisme dû à *P. falciparum*, en remplacement de la chloroquine qui perdait son efficacité antipaludique. L'apparition et le développement de résistances dans les années 1990 mènera toutefois à l'arrêt de leur utilisation pour le traitement du paludisme (Muller and Hyde 2013). Aujourd'hui, l'association pyriméthamine/sulfadoxine et le proguanil ne sont utilisés principalement qu'en prophylaxie (Venkatesan et al. 2013).

Les mécanismes de résistance aux antifolates sont liés à la présence de plusieurs mutations dans les gènes codant pour la DHFR et la DHPS.



## 6.5. Les dihydroxynaphtoquinones

L'**atovaquone** est le seul représentant de cette classe d'antipaludiques actuellement sur le marché. Son mécanisme d'action implique une inhibition du cytochrome b (Cytb) qui est essentiel pour le maintien du transfert d'électrons au sein de la mitochondrie et, *in fine*, pour la biosynthèse des pyrimidines chez *Plasmodium*.

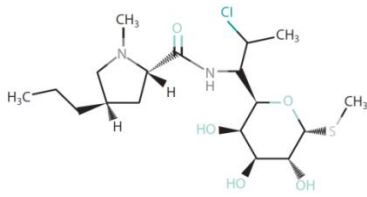


*Atovaquone*

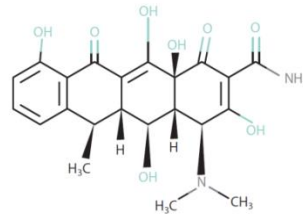
L'atovaquone agit principalement sur les stades hépatiques initiaux et ce, avec une même efficacité quel que soit le niveau de chloroquino-résistance chez *P. falciparum*. Elle est donc particulièrement efficace dans le cadre d'une prophylaxie. Cependant, son utilisation en monothérapie a très rapidement donné lieu à l'apparition de résistances liées à des mutations sur le Cytb (Nixon et al. 2013). Elle est donc actuellement prescrite en bithérapie en association avec le proguanil sous le nom commercial Malarone®.

## 6.6. Les antibiotiques

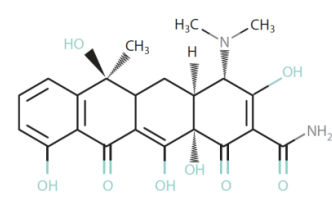
Certains antibiotiques présentent également une activité contre *Plasmodium*, parmi lesquels les plus utilisés sont la **clindamycine**, la **doxycycline** et la **tétracycline**. Leur mécanisme d'action repose sur la présence unique chez les apicomplexes d'un organe d'origine procaryote appelé apicoplaste, acquis par endosymbiose au cours de l'évolution.



Clindamycine



Doxycycline

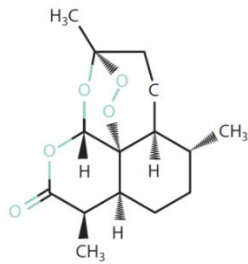
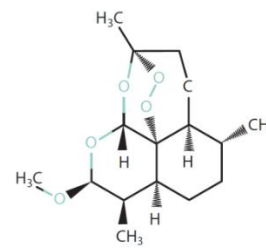
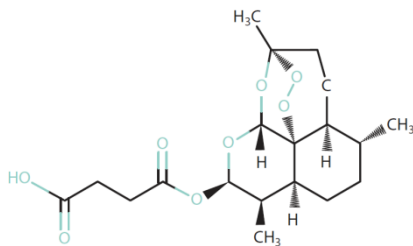
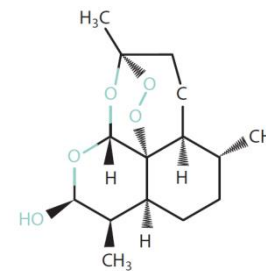


Tétracycline

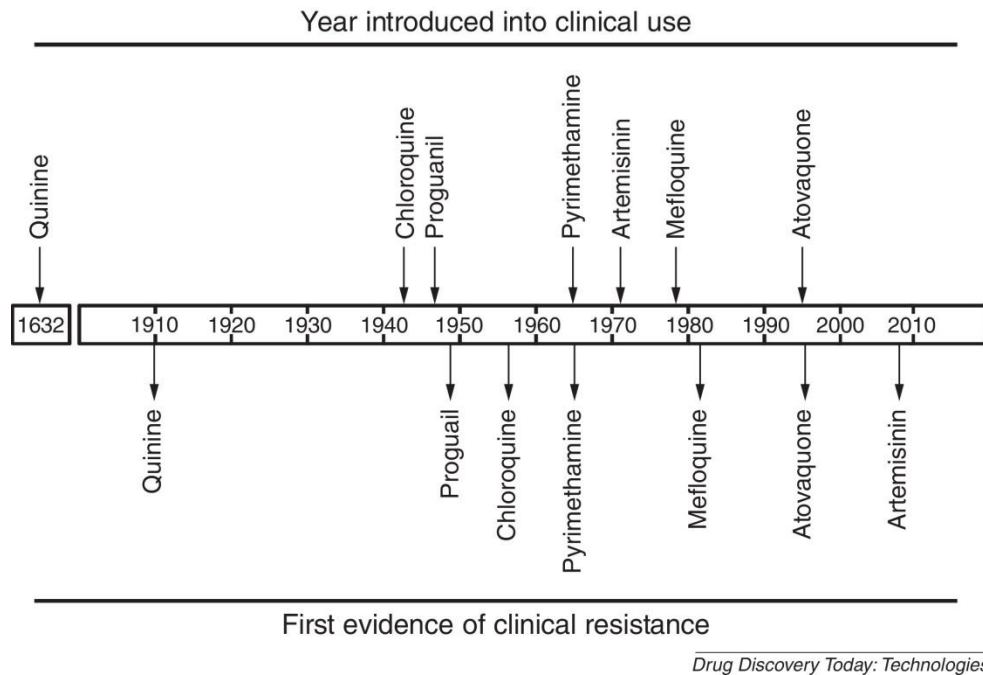
La clindamycine, la doxycycline et la tétracycline bloquent la machinerie de traduction d'origine apicoplastique en interagissant avec le ribosome 70S. Par conséquent, ces antibiotiques n'affectent pas les fonctions métaboliques déjà mises en place au sein de l'apicoplaste mais interfèrent avec sa réplication. Ceci se traduit par un profil de « mort retardée » du parasite à la fin du second cycle intra-érythrocytaire suivant l'exposition à la drogue (Dahl and Rosenthal 2008). Les antibiotiques sont donc des molécules à action lente et ne sont jamais utilisés seuls pour un traitement curatif (Schlitzer 2008).

## 6.7. Les endopéroxydes

Cette classe a pour point de départ l'artémisinine et ses dérivés (ARTs) qui représentent aujourd'hui les molécules de référence pour le traitement du paludisme causé par *P. falciparum*. L'artémisinine est une molécule naturelle extraite de la plante Quinhao, connue depuis plus de 2000 ans dans certaines régions chinoises pour ses vertus antipaludiques. Il aura fallu toutefois attendre les années 1970 pour que l'**artémisinine** soit extraite et caractérisée. De nombreux dérivés plus efficaces, dont l'**artémether**, l'**artésunate** et la **dihydroartémisinine** ont par la suite été synthétisés et sont actuellement disponibles sur le marché. Les ARTs sont très actifs sur les stades sanguins précoces. Leur mode d'action reste cependant sujet à débat. Néanmoins, la plupart des études s'accordent sur le fait que leur toxicité pour le parasite provient de la génération de radicaux libres au sein de la vacuole digestive (Haynes et al. 2013).

*Artémisinine**Artémether**Artésunate**Dihydroartémisinine*

L'aggravation des résistances à la plupart des antipaludiques utilisés dans les années 1990 poussera l'OMS à recommander les ARTs comme traitements de première-intention pour le paludisme causé par des souches multi-résistantes de *P. falciparum*. Afin de limiter le risque d'apparition de nouvelles résistances, les ARTs sont majoritairement utilisés en association avec une ou deux autres molécules présentant un mode d'action différent dans le cadre des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) (WHO 2010). Les CTA, associées à différentes mesures de prévention, ont permis de réduire de manière significative le fardeau du paludisme au cours de ces dix dernières années et constituent aujourd'hui la colonne vertébrale de la chimiothérapie du paludisme. Cependant, des résistances aux ARTs ont récemment été confirmées dans quatre pays du sud-est de l'Asie et soulèvent d'importantes inquiétudes quant à leur propagation et leur amplification (Ashley et al. 2014a). Un marqueur moléculaire associé aux souches résistantes, nommé *kelch13*, a été identifié en 2014 sur la base d'analyses *in vivo* et *in vitro* (Ariey et al. 2014). Sa fonction chez *Plasmodium* ainsi que son implication dans la résistance aux ARTs restent néanmoins inconnues.



**Figure 10. Résistances aux principaux antipaludiques**

Années d'introduction des principaux antipaludiques et première évidence de cas de résistance. D'après Gamo 2014

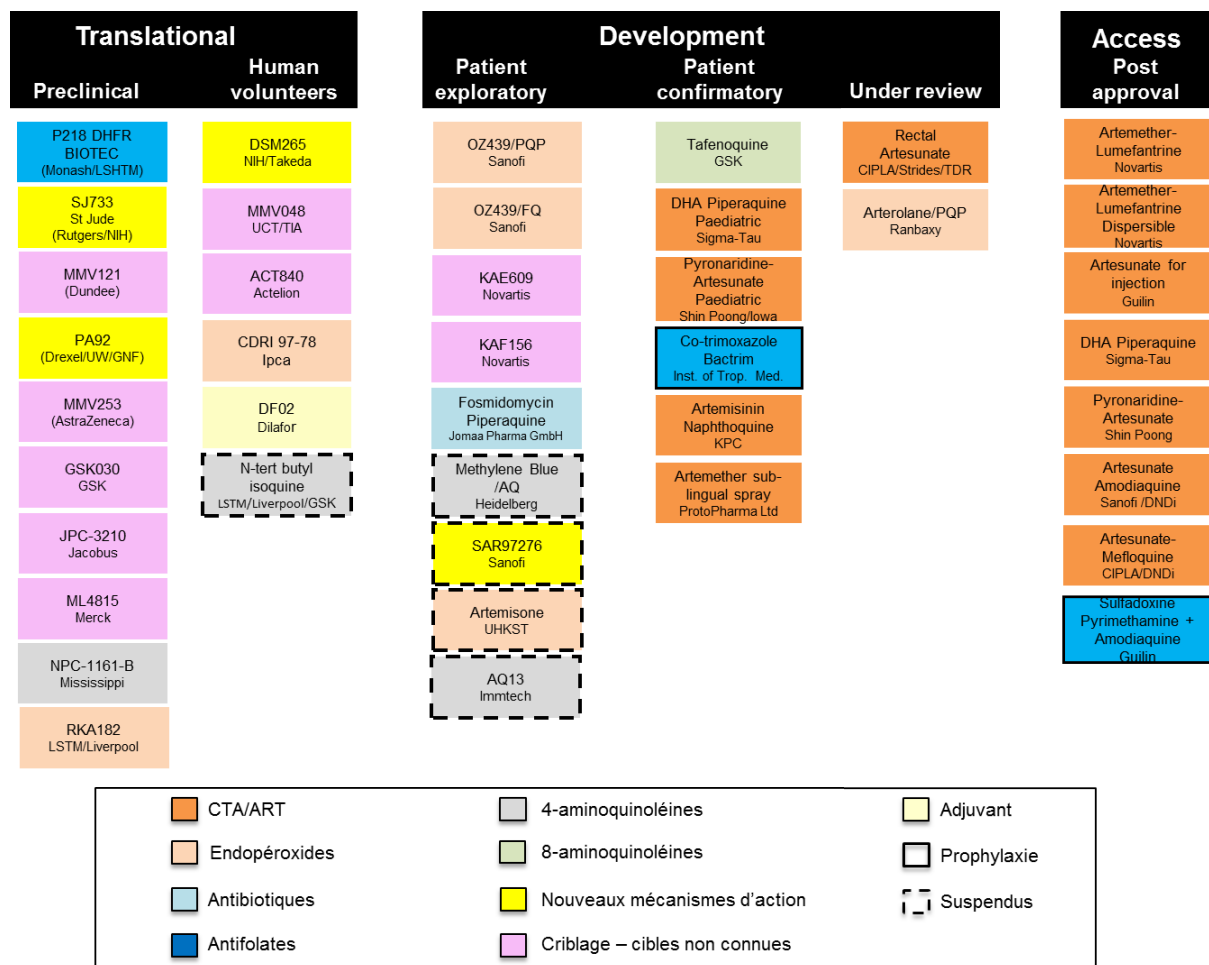
## 7. Nouveaux axes thérapeutiques

Actuellement, le traitement du paludisme reste dans l'ensemble efficace grâce à l'apport crucial des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Toutefois, l'émergence récente de résistances aux ARTs est source d'inquiétudes, d'autant plus que la plupart des autres molécules plus anciennes présentent également des résistances bien établies (résumées dans la Figure 10). Il apparaît donc comme une nécessité de développer de nouveaux antipaludiques, si possible présentant un nouveau mode d'action et un faible coût.

### 7.1. Antipaludiques en cours de développement

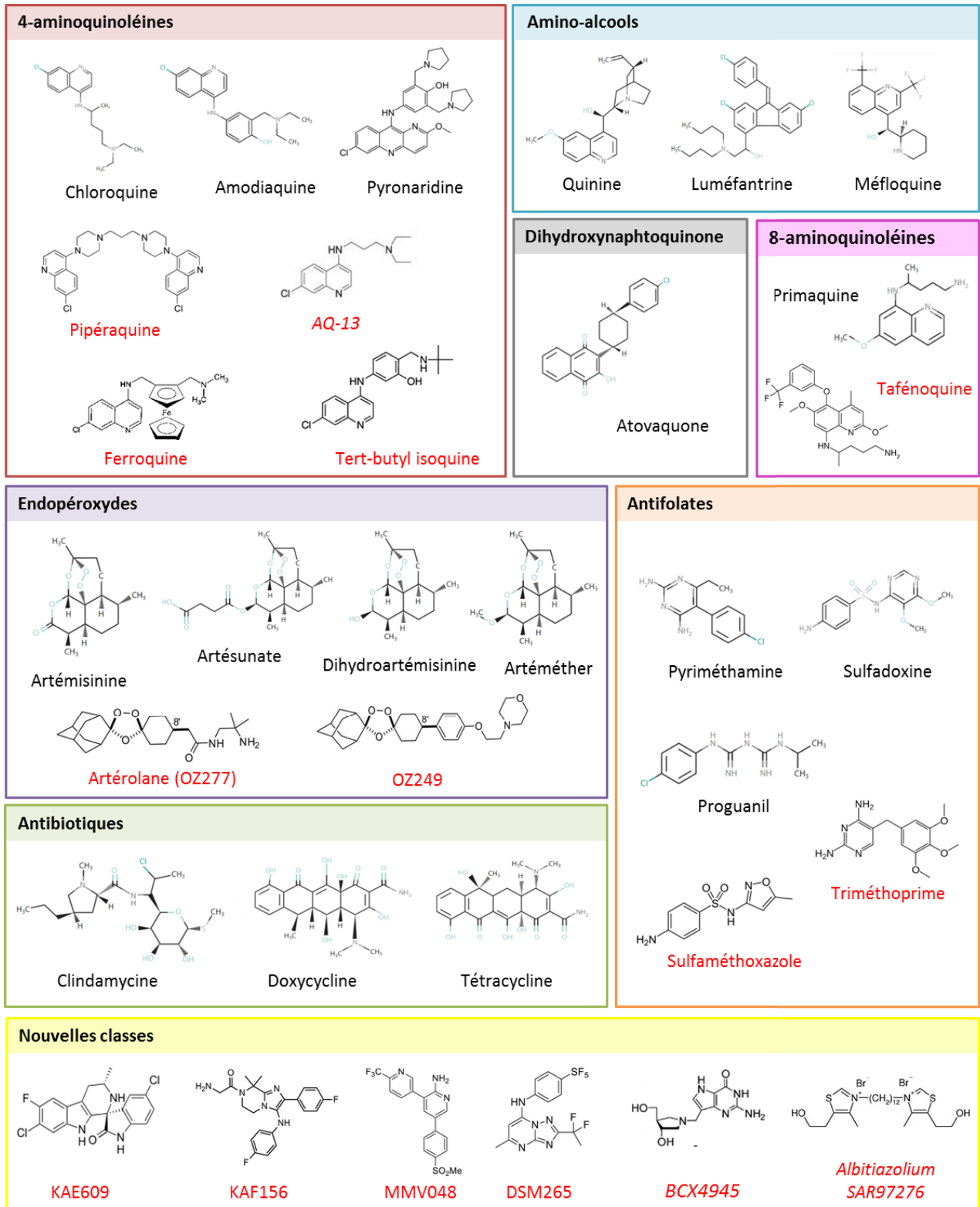
Une quarantaine de nouveaux traitements sont actuellement en cours de développement, depuis la phase préclinique jusqu'à leur autorisation de mise sur le marché. Leur liste est régulièrement mise à jour par le Medecines for Malaria Venture (MMV), un partenariat public-privé en lien avec l'OMS (Figure 11). Il est important de noter que la quasi-totalité des

traitements les plus avancés (patient confirmatory-phase 3 ou plus) sont en fait de nouvelles combinaisons ou de nouvelles formulations de molécules déjà disponibles sur le marché. Outre ceux-ci, une partie importante des nouveaux traitements sont des dérivés de molécules existantes pour lesquelles des résistances ont déjà été observées. De manière générale, peu de nouvelles classes de molécules présentant un mode d'action original sont en développement clinique. L'ensemble des nouvelles molécules sont présentées dans la Figure 12.



**Figure 11. Molécules antipaludiques en développement au 4e trimestre 2014**

La coloration est fonction du type de molécule ou de leur mécanisme d'action comme indiqué dans l'insert. Les antipaludiques indiqués en « under review » ou « access post approval » sont respectivement en cours d'enregistrement ou récemment introduits sur le marché (phase 4). MMV, site web : <http://www.mmv.org/research-development/rd-portfolio>. MMV 2014.



**Figure 12. Principales classes d'antipaludiques actuels et en développement**

Les structures des principaux antipaludiques actuels (en noir) ou en développement (en rouge) sont présentées en fonction de leur classe chimique. Le développement des molécules en italique a été suspendu au 4<sup>e</sup> trimestre 2014 selon MMV .

### 7.1.1. Optimisation d'antipaludiques préexistants

La classe chimique la plus représentée est celle des endopéroxydes à laquelle appartiennent les ARTs. On y trouve notamment l'**Artérolane** (précédemment **OZ277**) et l'**OZ439**. Ces deux composés sont des ozonides conservant le pont endopéroxyde responsable de la forte activité de l'artémisine et des ARTs sur les stades intra-érythrocytaires. Ils sont cependant totalement synthétiques. L'artérolane est le premier ozonide rentré en étude clinique. Les résultats de la phase 2 se sont cependant avérés décevants en raison de mauvaises propriétés pharmacocinétiques dues à une instabilité dans le sang (Flannery et al. 2013). Son développement a néanmoins été poursuivi et il est actuellement en étude clinique de phase 3 en combinaison avec la pipéraquline. L'OZ439 appartient à la seconde génération d'ozonides. Il présente un meilleur profil pharmacocinétique et une efficacité supérieure à celle de l'artérolane, permettant d'envisager son administration en une seule dose (Charman et al. 2011). Il est actuellement en phase clinique 2, associé à la pipéraquline ou à la ferroquine.

Plusieurs analogues structuraux de la chloroquine sont également en essais cliniques. La **pyronaridine**, la **pipéraquline**, la **ferroquine**, la **tert-butyl isoquine** et l'**AQ13** sont structurellement proche de la chloroquine mais leur activité n'est pas touchée par les résistances dues au transporteur *PfCRT*. Parmi ces molécules, la ferroquine présente l'association originale d'un groupement ferrocène au squelette de base de la chloroquine (Figure 12). L'addition de ce groupement provoquerait la formation de radicaux libres au sein du parasite en plus du mécanisme d'action habituel des 4-aminoquinoléines. Il permettrait également de contourner le mécanisme de résistance à la chloroquine causé par *PfCRT* (Dive and Biot 2008).

La **tafénoquine** est un analogue de la primaquine et la molécule leader en essai clinique pour l'élimination des formes dormantes de *P. vivax* (Price and Nosten 2014). Son principal avantage vis-à-vis de la primaquine est sa demi-vie plus longue, lui permettant d'être administrée en une seule dose pour la prévention des rechutes à *P. vivax*. Comme la primaquine, elle présenterait cependant des effets secondaires pour les patients atteints d'un déficit en G6PD.

Le Cotrimoxazole est une combinaison de deux antifolates, le **triméthoprime** et le **sulfaméthoxazole**, utilisé depuis 50 ans, notamment pour la prévention des infections

bactériennes opportunistes chez les personnes HIV positives. Il est actuellement évalué pour la prévention du paludisme chez la femme enceinte.

### 7.1.2. Nouvelles classes chimiques – Nouveaux modes d'action

Il existe une volonté importante d'identifier de nouvelles classes chimiques afin de diversifier les approches thérapeutiques et de contourner les résistances déjà établies. Le développement des approches de criblage phénotypique haut débit ces dernières années a permis l'identification de plusieurs nouvelles séries chimiques dont les **spiroindolones** (KAE609) ou les **imidazopipérazines** (KAF156).

Le **KAE609** représente une des nouvelles molécules les plus prometteuses avec une forte efficacité sur les stades sanguins sexués et asexués ainsi qu'un profil pharmacocinétique permettant d'envisager son administration en une seule dose. Le mode d'action des **spiroindolones** a récemment été élucidé. Ces molécules ciblent une pompe à proton de la vacuole parasitophore, *Pf*ATP4, qui régule l'homéostasie du  $\text{Na}^+$  (Spillman et al. 2013). Le **KAF156** présente l'avantage d'être efficace aussi bien sur les formes sanguines sexuées et asexuées que sur les stades hépatiques. Il pourrait donc être utilisé en traitement curatif mais également en prophylaxie. Les **imidazopipérazines** exercent leur effet par une inhibition de la *Pf*PI(4)K (phosphatidylinositol-4 kinase), impliquée dans la régulation du trafic et de la signalisation intracellulaire (McNamara et al. 2013).

Plusieurs approches ciblées sur de nouvelles voies de biosynthèse essentielles à la survie du parasite ont également mené à l'entrée en phase clinique de nouvelles molécules.

Le **DSM265**, actuellement en phase clinique 1, fait partie de la famille des triazolopyrimidines. Il s'agit de la seule molécule développée par une approche ciblée et présentant un mode d'action original actuellement en développement clinique. Il cible la *Pf*DHODH (dihydroorotate déshydrogénase), une enzyme clé de la synthèse de la pyrimidine. Cette nouvelle classe chimique a été identifiée par criblage haut débit basé sur un test enzymatique utilisant la *Pf*DHODH recombinante. Par la suite, plusieurs étapes



d'optimisation ont été développées grâce à l'apport de structures cristallographiques de la PfDHODH en complexe avec différents composés hit (Coteron et al. 2011).

D'autres cibles thérapeutiques prometteuses ont fait l'objet d'études approfondies ayant permis l'entrée de nouvelles molécules en développement pré-clinique et clinique. Ces molécules ont cependant été interrompues pour le moment pour des raisons d'efficacité ou de toxicité. On peut notamment citer le BCX4945 ciblant la voie de récupération des purines, ou le SAR97276, développé au laboratoire, agissant sur le métabolisme des phospholipides (voir §II.2.3.)

## 7.2. Nouveaux antipaludiques : quelques stratégies de recherche

Comme nous l'avons vu précédemment, les nouvelles classes chimiques actuellement en développement sont issues de différentes stratégies de recherche. De manière générale on distingue les approches basées sur le criblage phénotypique (ou criblage à l'échelle du parasite) et les approches guidées par des cibles pharmacologiques (Target-based Approaches).

### 7.2.1. Criblage phénotypique

La majorité des nouvelles classes d'antipaludiques a été identifiée par des approches de criblage phénotypique à haut débit de banques de molécules (Flannery et al. 2013). Concrètement, il s'agit d'exposer une culture de parasites à la molécule test puis d'évaluer si celle-ci est capable de bloquer leur prolifération, le tout en plaques 384 ou 1536 puits. Ce type de stratégie est en plein développement grâce aux progrès conséquents réalisés ces dernières années en termes d'automatisation, d'analyse d'image, d'assemblage de banques de composés mais également de compréhension de la biologie du parasite.

En 2008, les premiers tests phénotypiques à haut débit ciblaient le développement du parasite dans les érythrocytes. Les stratégies ont consisté à évaluer la croissance parasitaire en évaluant le contenu en acides nucléiques grâce à un marqueur fluorescent ou en mesurant

l'activité de la lactate déshydrogénase du parasite (Miller et al. 2013). Ces différents criblages, réalisés à la fois par des industries pharmaceutiques et des laboratoires académiques, ont notamment donné lieu à la création d'une banque de molécules inhibitrices de la croissance parasitaire (ChEMBL, Neglected Tropical Disease archive). La nouvelle classe des spiroindolones, à laquelle appartient le KAE609 (Spillman et al. 2013), a été identifiée par ce type de stratégie.

Des tests phénotypiques permettant d'identifier des composés capables de cibler les stades hépatiques ont été récemment développés. L'un d'entre eux est basé sur une technique de microscopie automatisée permettant d'évaluer la présence de schizontes hépatiques ou d'hypnozoïtes chez des hépatocytes de singe. Il a permis l'identification de la classe des imidazolopipérazine qui, après optimisation, a conduit à la synthèse du candidat clinique KAF156 (McNamara et al. 2013).

Toutefois, l'approche par criblage phénotypique ne permet pas d'identifier la cible du composé inhibiteur ce qui peut notamment représenter un frein pour son optimisation. MMV a donc pris l'initiative originale de mettre à disposition gratuitement une sélection de 400 de ces molécules agissant sur les stades sanguins, appelée Malaria Box (Spangenberg et al. 2013), afin de permettre à la communauté de participer à la détermination de leurs mécanismes d'action.

### 7.2.2. Approches basées sur la cible

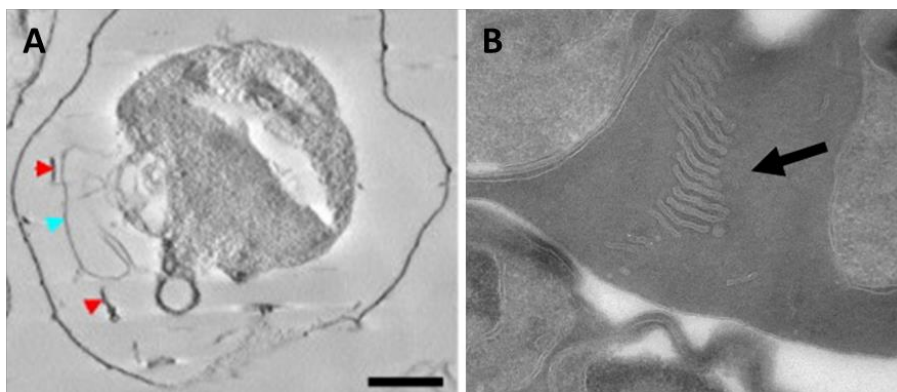
Ce type d'approche consiste en la recherche de molécules inhibant des protéines essentielles ou importantes pour la survie du parasite. L'identification et la validation de nouvelles cibles thérapeutiques sont aujourd'hui facilitées par la présence d'outils de génétique inverse chez *Plasmodium*, et chez son modèle d'étude *Toxoplasma gondii*, permettant d'inactiver un gène et de déterminer le phénotype qui en résulte. Une fois une cible identifiée, de nombreuses stratégies existent afin de trouver des molécules inhibitrices. L'une d'entre elle consiste à synthétiser des molécules analogues au substrat ou au ligand de la cible. Ce type d'approche a par exemple été développé pour cibler la voie de biosynthèse de la phosphatidylcholine pour laquelle des analogues de choline ont été synthétisés. L'un

d'entre eux, l'albitiazolium (SAR97276), a fait preuve de son efficacité jusqu'à atteindre la phase d'étude clinique 2 avec succès chez les adultes. Dans le cas d'enzymes, des criblages à haut débit de banques de composés sur l'activité enzymatique de protéines recombinantes peuvent être également employés. C'est notamment l'approche qui a été utilisée dans le cas du candidat clinique DSM265 ciblant la *PfDHODH*. Néanmoins, il n'existe pas toujours de test enzymatique facilement utilisable pour un criblage haut débit. De même, l'optimisation d'un test biochimique ou biophysique à grande échelle pour les interactions protéines-protéines peut également être compliqué. Dans ces cas, des approches basées sur la structure de la protéine cible peuvent être particulièrement appropriées. On compte parmi celles-ci le criblage virtuel de banques de molécules basé sur la structure du ligand et/ou de la cible. Ceci conduit à la découverte de composés princeps qui peuvent ensuite être source de molécules originales optimisées pour leur activité antipaludique. C'est ce type d'approche que nous avons employé au cours de cette thèse.

# Chapitre II : Le métabolisme des phospholipides chez *Plasmodium*

## 1. Lipides et membranes chez *Plasmodium*

Les lipides sont des petites molécules hydrophobes impliquées dans une multitude de fonctions biologiques. Ils représentent les éléments structuraux essentiels des membranes mais permettent également le stockage d'énergie et/ou agissent encore comme molécules de signalisation dans de nombreux processus cellulaires. Comme chez l'ensemble des êtres vivants, les lipides jouent un rôle essentiel chez *Plasmodium*. A cours de son cycle de vie, le parasite passe par trois phases d'intense multiplication cellulaire (formation des mérozoïtes aux stades hépatique et sanguin et sporogénèse) nécessitant la synthèse d'une quantité considérable de membranes afin d'assurer la formation des nouveaux organites et de la membrane plasmique des cellules filles. Comme nous l'avons vu précédemment, *Plasmodium* met également en place une variété de processus lui permettant d'établir des échanges avec sa cellule hôte et le milieu extérieur lors de son développement dans l'érythrocyte. Ceux-ci incluent des structures membranaires comme le réseau tubovésiculaire, émanant de la membrane parasitophore, et les structures de Maurer (Figure 13).



**Figure 13. Réseau tubovésiculaire et structures de Maurer**

**A.** Section virtuelle d'un érythrocyte infecté au stade trophozoïte tardif à partir d'une tomographie électronique. Les structures de Maurer sont indiquées par les flèches rouges et le réseau tubovésiculaire par la flèche bleue. D'après Hanssen et al. 2010. **B.** Observation des structures de Maurer par microscopie électronique. Les structures de Maurer sont indiquées par la flèche noire. D'après Mundwiler-Pachlatko and Beck 2013

La composition des membranes de *Plasmodium* au cours de son cycle de développement reste peu connue à l'exception du stade intra-érythrocytaire qui a fait l'objet de nombreuses études. Les glycérophospholipides représentent les lipides majoritaires chez le parasite, toutefois le cholestérol et les sphingolipides jouent également des rôles importants.

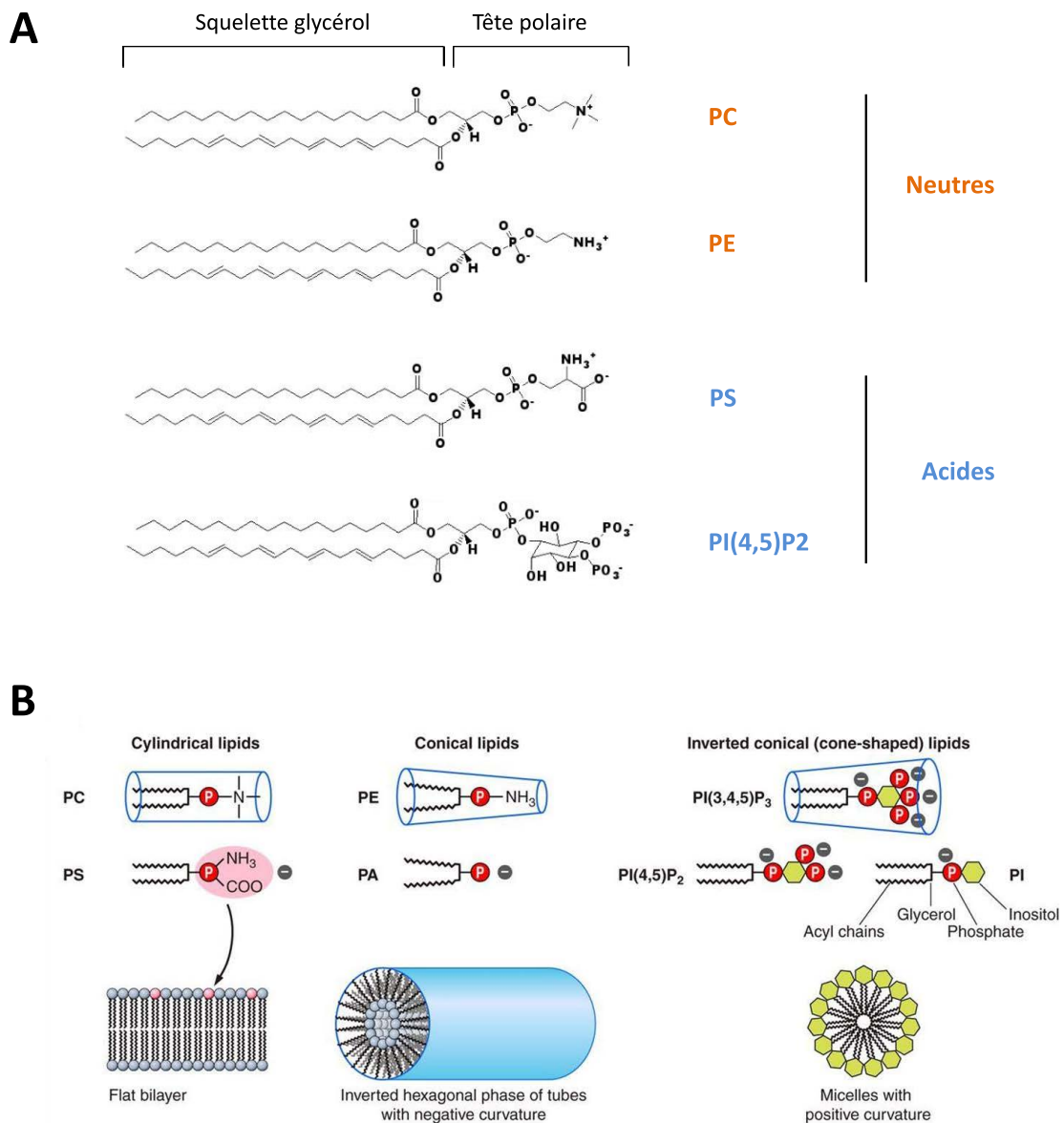
### 1.1. Le cholestérol et les sphingolipides

Le **cholestérol** est un lipide important dans les membranes des cellules eucaryotes, représentant environ 50% du contenu lipidique total. Il contribue à leur rigidité et à leur imperméabilité aux molécules hydrophiles. Le cholestérol joue également un rôle central dans l'organisation des lipides de signalisation et des protéines au sein des radeaux lipidiques, également appelés rafts. Tout comme l'ensemble des apicomplexes, *Plasmodium* ne possède pas la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse de cholestérol (Vial and Ancelin 1992). Logiquement, les membranes du parasite ne contiennent qu'une quantité très faible de cholestérol, équivalente au stade trophozoïte à environ un dixième de celle des membranes de l'érythrocyte (Wunderlich et al. 1991). Ce lipide joue néanmoins un rôle important pour *Plasmodium*. Il a notamment été montré qu'une forte diminution du cholestérol dans les membranes de l'érythrocyte affecte le processus d'invasion par les mérozoïtes (Samuel et al. 2001). Le cholestérol du parasite se concentre particulièrement au niveau des rafts lipidiques détectés notamment dans les structures de Maurer et dans la membrane de la vacuole parasitophore (Yam et al. 2013). Au stade intra-érythrocytaire, *Plasmodium* a accès à deux sources de cholestérol, provenant soit des lipoprotéines de haute densité circulant dans le plasma, soit directement de la membrane plasmique du globule rouge (Vial and Ancelin 1992). Son mécanisme d'import par le parasite demeure cependant méconnu. Une partie du cholestérol semble toutefois provenir des rafts de la membrane de l'érythrocyte et pourrait être acquise lors de l'invasion (Dechamps et al. 2010b; Coppens 2013).

Comme le cholestérol, les **sphingolipides** sont des constituants importants des rafts. Parmi eux, la sphingomyéline (SM) contribue également chez *Plasmodium* à la stabilisation du réseau tubovésiculaire. Certains sphingolipides, dont la SM, sont synthétisés *de novo* par le parasite à partir de la sérine, ou à partir des céramides détournés depuis la cellule hôte ou provenant du recyclage au sein du parasite (Sonda and Hehl 2006) (Coppens 2013).

## 1.2. Les phospholipides

Les glycérophospholipides (également appelés phospholipides en excluant les sphingolipides) sont les composants lipidiques majoritaires des membranes de *Plasmodium*. Ils sont constitués de deux chaînes d'acides gras attachées à un squelette glycérol. La 3<sup>ème</sup> fonction alcool du glycérol est reliée à un groupement phosphate lui-même attaché à une tête polaire, substance hydrophile qui définit la classe du phospholipide.



**Figure 14. Les phospholipides et leurs propriétés.**

**A.** Structure chimique de la PC, PE, PS et du PI(4,5)P2. D'après de Hamard-Peron and Muriaux 2011 **B.** Schéma illustrant la diversité des phospholipides et de leurs propriétés physiques et chimiques. D'après Suetsugu et al. 2014

Les principaux phospholipides retrouvés chez le parasite sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI). De par la nature de leur tête polaire (charge, taille) et de leurs chaînes aliphatiques (longueur, insaturations), les phospholipides possèdent des propriétés physiques très différentes, définissant l'épaisseur, la densité et la charge de la membrane (Figure 14). Leur rôle n'est toutefois pas que structural. Certains d'entre eux, comme le PI, sont également impliqués dans de nombreux processus de régulation cellulaire.

Au même titre que dans les membranes eucaryotes, la **phosphatidylcholine (PC)** et la **phosphatidyléthanolamine (PE)** sont les phospholipides majoritaires chez *Plasmodium*. A elle seule, la PC représente la moitié des phospholipides totaux. A cause de sa large tête polaire, la PC possède une forme cylindrique et s'assemble spontanément en bicouche stable et plane. Elle possède généralement une chaîne d'acide gras insaturé (acide oléique, C18 :1) qui provoque une torsion dans la queue hydrophobe et rend l'assemblage moins compact, conférant à la membrane une certaine fluidité (Holthuis and Menon 2014). Contrairement à la PC, la PE possède une tête hydrophile relativement petite qui lui donne une forme conique. Cette caractéristique a pour effet d'imposer une contrainte de courbure négative et un défaut de compacité lorsqu'elle est insérée dans la membrane plasmique. Cette modulation de la courbure des membranes est indispensable pour leur fission et leur fusion et joue également un rôle essentiel pour le recrutement, le repliement et l'activité des protéines transmembranaires ou périphériques. La PE est principalement localisée du côté cytoplasmique de la membrane. Elle est capable d'interagir avec de nombreux acides aminés *via* la formation de liaisons hydrogènes mais, à l'inverse, inhiberait la localisation des acides aminés chargés négativement du côté cytoplasmique de la membrane. Cette caractéristique joue un rôle important dans la topologie d'insertion des protéines transmembranaires (Gibellini and Smith 2010).

Au-delà de leur rôle structural au sein de la membrane, la PC et la PE sont également impliquées dans plusieurs voies métaboliques et/ou agissent comme régulateurs de différents processus cellulaires. Chez la plupart des eucaryotes, la PC peut servir comme substrat pour la synthèse de sphingomyéline *via* la sphingomyéline synthase (SMS) qui transfère la tête polaire phosphocholine à une molécule de céramide. Le génome de *Plasmodium* contient un gène codant pour une SMS putative (Coppens 2013). Son activité et sa spécificité n'ont

cependant pas été caractérisées. La PE joue un rôle clé durant la division cellulaire des eucaryotes en étant requise pour le désassemblage des filaments d'actine à la fin de la cytokinèse (Vance 2008). Elle peut également être conjuguée à certaines protéines afin de permettre leur ancrage dans la membrane. C'est le cas notamment d'ATG8, impliquée dans le processus d'autophagie et ancrée dans la membrane de l'apicoplaste chez *Plasmodium* (Mizushima and Sahani 2014).

Bien que la **phosphatidylsérine (PS)** représente généralement moins de 10% des PLs totaux, ses propriétés physiques et biochimiques uniques lui confèrent des fonctions essentielles dans les membranes biologiques et dans de nombreux mécanismes de signalisation. A la différence de la PC et de la PE qui sont des zwitterions, la PS est un phospholipide anionique. Cette caractéristique lui permet de créer des interactions électrostatiques avec des poly-cations et de recruter certaines protéines portant des domaines de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  de type C2 ou gamma-carboxyglutamique (Lemmon 2008). Tout comme la PE, la localisation de la PS dans la membrane est principalement restreinte à la face cytoplasmique. Sa présence sur la surface extracellulaire apparaît toutefois de manière exceptionnelle et constitue un signal précoce de l'apoptose chez les eucaryotes. Enfin, l'externalisation de la PS par les plaquettes activées permet le recrutement de complexes protéiques impliqués dans le processus de coagulation (Leventis and Grinstein 2010).

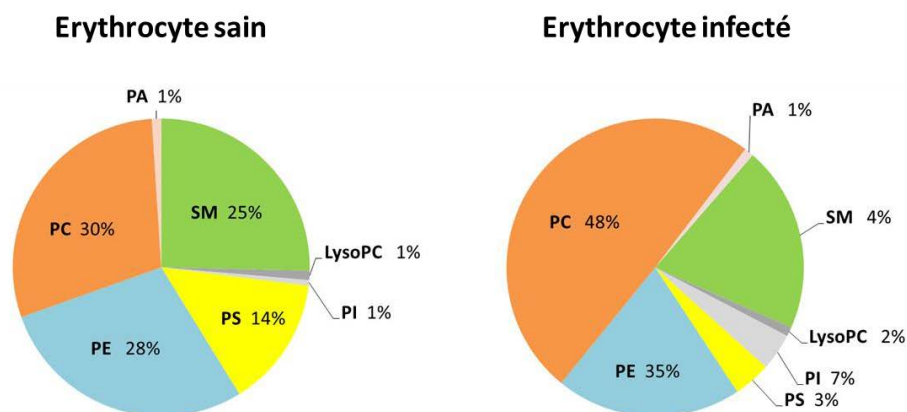
Le **phosphatidylinositol (PI)** exerce un rôle spécifique et important dans le métabolisme et la pathogénicité de *Plasmodium*. Bien que représentant moins de 10% des PLs totaux comme la PS, son abondance chez le parasite est bien supérieure à nombre de cellules eucaryotes. Le PI est le précurseur du glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui permet l'ancrage de protéines à la surface de la cellule. Chez *Plasmodium*, le GPI permet notamment l'exposition des nombreuses protéines de surface du parasite dont *PfMSP1*, impliquée dans les premiers instants de l'invasion (Channe Gowda 2002). Il est aussi impliqué dans la pathogénicité du parasite en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires, de monoxyde d'azote et en augmentant l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales (Kumar et al. 2012). Le PI joue également un rôle important chez *Plasmodium* en tant que précurseur des phosphoinositides (PIs). Ces derniers sont formés par phosphorylation du groupement inositol du PI par différentes kinases, menant à la formation



de plusieurs espèces de PIs différant par leurs propriétés physiques et biochimiques (Figure 14). Ils interagissent avec de nombreuses protéines *via* différents motifs de liaison de type FYVE ou PX (spécifiques du PI(3)P) ou PH (spécifique du PI(3,4,5)P<sub>3</sub> et du PI(3,4)P<sub>2</sub>). Chez les eucaryotes, les PIs sont impliqués dans une multitude de fonctions, et plus particulièrement dans le trafic et la signalisation cellulaire (Di Paolo and De Camilli 2006).

### 1.3. Répartition des phospholipides chez *Plasmodium*

La fraction lipidique des membranes de *Plasmodium* au stade intra-érythrocytaire est principalement composée de phospholipides et ne possède qu'une infime proportion de lipides neutres. Dans l'érythrocyte sain, les principaux phospholipides sont la PC (≈30%), la PE (≈30%), la SM (≈25%) et la PS (≈15%). Le PI, l'acide phosphatidique (PA) et la lysophosphatidylcholine (LysoPC) représentent chacun environ 1% seulement des phospholipides totaux (Dodge and Phillips 1967; Van Deenen 1974). Au cours de l'infection d'un érythrocyte par *Plasmodium*, on observe au stade trophozoïte une multiplication par six du contenu en PLs ainsi qu'un remaniement important de leurs proportions respectives (Figure 15). Dans le parasite isolé (*P. falciparum*), les phospholipides majoritaires sont la PC (50%), la PE (20-35%), la SM (4-20%), le PI (4-7%) et la PS (<5%) (Vial and Ancelin 1992; Botte et al. 2013).



**Figure 15. Composition en phospholipides entre érythrocyte sain et infecté par *P. falciparum***

PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidylinositol, LysoPC : lysophosphatidylcholine, SM : sphingomyéline, PA : acide phosphatidique

Ensemble la PC et la PE comptent pour 70 à 85% du contenu en phospholipides du parasite et représentent donc la grande majorité du contenu lipidique membranaire en raison de la quasi-absence de cholestérol. Il est important de noter que la proportion de PI est exceptionnellement élevée chez *Plasmodium* par rapport à celle observée dans l'érythrocyte et plus généralement chez la plupart des cellules eucaryotes. A l'inverse, le contenu en PS du parasite est fortement diminué.

## 2. Biosynthèse des phospholipides chez *Plasmodium* au stade intra-érythrocytaire

Au cours de son cycle de vie, *Plasmodium* infecte plusieurs types cellulaires différant considérablement par leur capacité de synthèse des phospholipides. Récemment, il a été montré que le parasite dépend de la production de PC de la cellule hôte pour se multiplier efficacement pendant le stade hépatique (Itoe et al. 2014). L'absence de PC provenant de l'hépatocyte n'altère ni la croissance ni la différenciation du parasite mais elle réduit de manière importante la charge parasitaire. A ce stade au moins, le parasite ne peut compter seulement sur sa propre machinerie de synthèse pour fournir la quantité considérable de PC dont il a besoin pour la formation de milliers de mérozoïtes lors du stade hépatique.

A l'inverse de l'hépatocyte, le métabolisme biosynthétique des lipides est absent dans les érythrocytes matures (Van Deenen 1974) et, bien que le parasite puisse établir des échanges avec des lipoprotéines de haute et basse densité (Grellier et al. 1991), l'apport de lipides exogènes à partir du sérum ne contribue que très faiblement au pool total de phospholipides du parasite (Vial and Ancelin 1992). *Plasmodium* possède sa propre machinerie enzymatique codée par son génome pour synthétiser lui-même l'essentiel des phospholipides dont il a besoin pour sa croissance et sa multiplication intra-érythrocytaire à partir d'unités de montage (acide gras et têtes polaires) provenant en majeure partie du sérum (Dechamps et al. 2010b)

## 2.1. Origine des précurseurs

### 2.1.1. Les têtes polaires

*Plasmodium* puise les précurseurs solubles des phospholipides principalement à partir du sérum. Au cours du développement du parasite se mettent en place les nouvelles voies de perméabilité (NPP) à la membrane du globule rouge, permettant l'import de nombreuses petites molécules.

Plusieurs études, réalisées principalement chez des *Plasmodium* simiens ou murins, ont montré que **la choline** est transportée dans l'érythrocyte *via* le transporteur de choline érythrocytaire (Ancelin et al. 1991; Kirk et al. 1991) mais également par les NPP (Kirk et al. 1994; Staines and Kirk 1998). Une fois dans le globule rouge, la choline entre dans le parasite par un transporteur de cations organiques  $\text{Na}^+$  dépendant qui a été caractérisé mais dont le gène reste encore à identifier (Biagini et al. 2004).

**L'éthanolamine** provient du sérum par diffusion passive à travers les membranes ou par décarboxylation de la sérine (Elabbadi et al. 1997). Dans le parasite, la choline et l'éthanolamine sont rapidement phosphorylées en phosphorylcholine et phosphoryléthanolamine (Ancelin and Vial 1986; Vo Duy et al. 2012).

**La sérine** provient du sérum ou de la dégradation de l'hémoglobine se déroulant dans la vacuole digestive (Goldberg 2005).

**L'inositol** est importé depuis l'érythrocyte et le sérum ou bien synthétisé par le parasite à partir du glucose en trois étapes enzymatiques successives (Figure 16). Toutefois, il a récemment été montré que seul l'inositol synthétisé par le parasite est incorporé dans le GPI et que sa voie de biosynthèse est probablement essentielle à sa survie lors des stades asexués (Macrae et al. 2014).

Enfin, **le glycérol-3-phosphate (G3P)** est principalement formé lui aussi à partir du glucose par glycolyse anaérobie (Woodrow 2005). Il semble cependant qu'il puisse également être synthétisé par une voie alternative utilisant le glycérol de l'hôte récupéré via une aquaglycéroporine (*PfAQP*) codée par le parasite, puis phosphorylé par la glycérol kinase (*PfGK*). Cette seconde source n'est pas essentielle pour la survie du parasite mais son

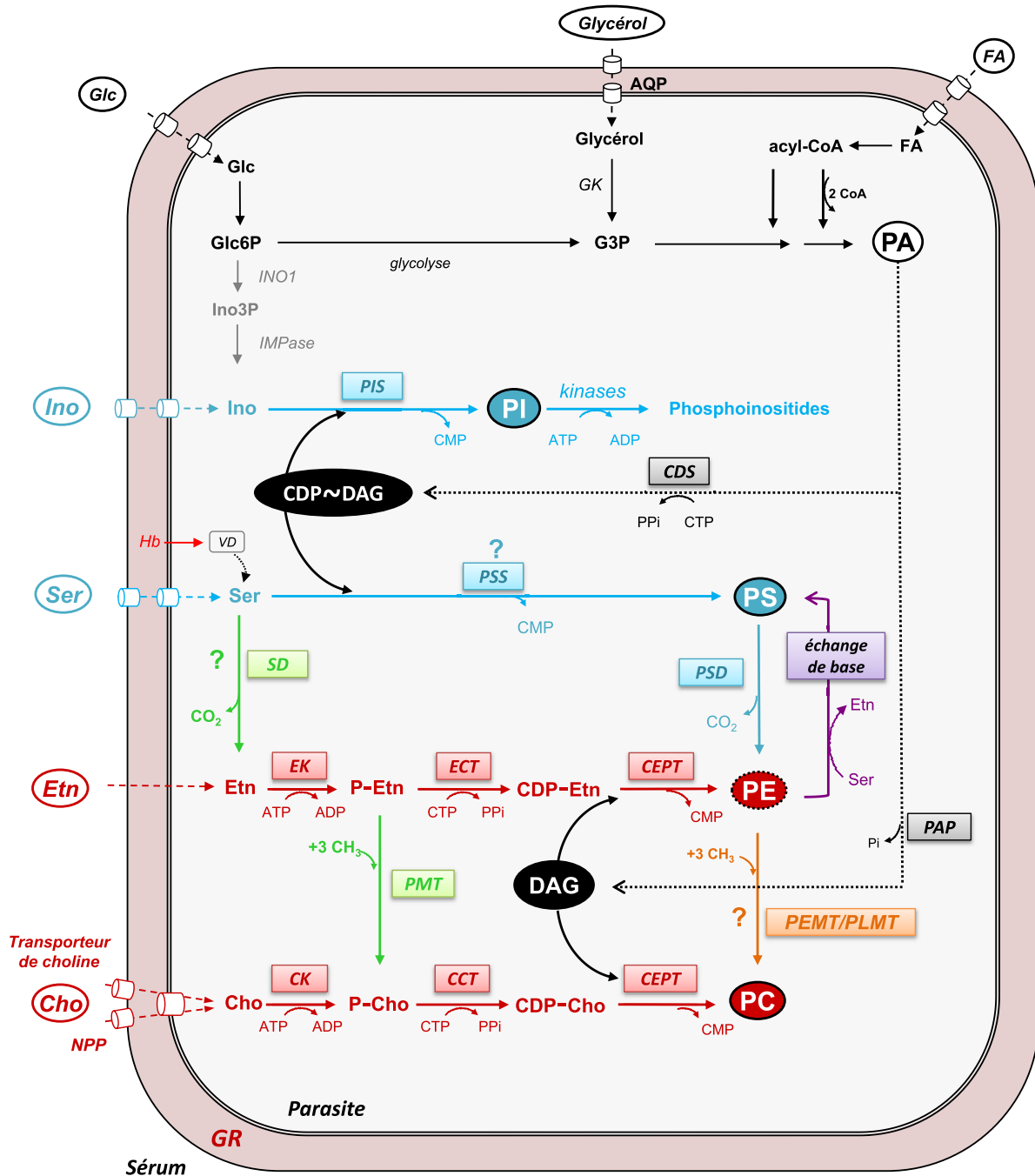
interruption par délétion du gène codant pour la *PfGK* provoque une diminution de la croissance parasitaire lors des stades sanguins (Naidoo and Coetzer 2013).

### 2.1.2. Les acides gras

*Plasmodium* ne possède pas les enzymes de la voie de synthèse des acides gras de type I (FASI) communément retrouvée chez les mammifères mais également chez certains apicomplexes comme *Toxoplasma* (Ramakrishnan et al. 2013). En revanche, le génome de l'apicoplaste code pour les enzymes de la voie de synthèse des acides gras de type II (FASII), préférentiellement utilisée par les procaryotes. Le rôle de la voie FASII diffère toutefois considérablement au cours du cycle de vie du parasite. Il apparaît en effet que la synthèse des acides gras *via* FASII n'est essentielle que lors de son développement dans le foie et chez le moustique. A l'inverse, au cours du développement érythrocytaire, les enzymes de synthèse FASII sont peu ou non exprimées et leur délétion n'affecte pas la multiplication du parasite (Vaughan et al. 2009; van Schaijk et al. 2014). Le parasite ne semble alors compter que sur l'apport des acides gras provenant de l'hôte.

## 2.2. Les différentes voies métaboliques

*Plasmodium* possède la grande majorité des enzymes nécessaires à la synthèse des différents phospholipides et les gènes correspondants ont pour la plupart été identifiés. Le métabolisme des phospholipides chez *Plasmodium* est complexe dans le sens où il fait intervenir une multitude de voies, retrouvées chez les eucaryotes, chez les procaryotes mais également uniquement chez les plantes (Figure 16).



**Figure 16. Voies de biosynthèse des phospholipides de *P. falciparum* au stade intra-érythrocytaire**

En noir, voie de biosynthèse de l'acide phosphatidique (PA) et des deux intermédiaires des principales voies de synthèse, le DAG et le CDP-DAG. En bleu, voies de biosynthèse CDP-DAG dépendantes de la phosphatidylsérine (PS), du phosphatidylinositol (PI) et des phosphoinositides. En rouge, voies de synthèse *de novo* de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE). En vert, voie transversale Sérine Décarboxylase-Phosphométhyltransférase (SDPM). En violet, voie de synthèse de la PS par échange de base. En orange, voie transversale de méthylation de la PE en PC. En gris, voie de synthèse de l'inositol. Les points d'interrogation indiquent les enzymes pour lesquelles les gènes correspondant n'ont pas encore été identifiés dans le génome de *Plasmodium*.

### 2.2.1. Synthèse de l'acide phosphatidique (PA), du DAG et du CDP-DAG (voies noires)

La première étape commune aux différentes voies de biosynthèse correspond à la formation de l'**acide phosphatidique (PA)** à partir des acides gras et du glycérol-3-phosphate (G3P). Une première chaîne d'acide gras est transférée au G3P par l'intermédiaire d'une G3P acyltransférase (*PfGAT*) produisant de l'acide lyso-phosphatidique (LysoPA) (Santiago et al. 2004). Le lysoPA est ensuite rapidement pris en charge par une lysoPA acyltransférase (*PfLPAAT*) qui ajoute une seconde chaîne d'acide gras pour former le PA (Lindner et al. 2014). Par la suite, le PA sera soit déphosphorylé par une ou plusieurs PA phosphatase(s) (PAP) pour donner du **diacylglycérol (DAG)**, soit converti en **cytidine-diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG)** par la CDP-DAG synthase (*PfCDS*) (Figure 16, voies noires en pointillés) (Martin et al. 2000; Shastri et al. 2010).

Le DAG et le CDP-DAG sont les deux précurseurs des voies de synthèse des phospholipides chez *Plasmodium*. Le DAG entrera dans la biosynthèse de la PC et de la PE. Le CDP-DAG servira quant-à-lui pour la synthèse du PI et de la PS.

### 2.2.2. Les voies CDP-DAG dépendantes (voies bleues)

*Plasmodium* utilise les voies CDP-DAG dépendantes pour la synthèse des phospholipides anioniques, le PI et la PS. Ces voies mettent en jeu des enzymes capables de transférer une tête polaire, inositol ou sérine, sur du CDP-DAG pour former du PI ou de la PS ainsi qu'une molécule de CMP (Figure 16, voies bleues). Les deux enzymes sont respectivement appelées PI synthase (PIS) (Elabbadi et al. 1994; Wengelnik and Vial 2007) et PS synthase (PSS). La synthèse de PS *via* une PS synthase CDP-DAG dépendante est communément retrouvée chez la levure et chez les procaryotes. Cette activité a été détectée chez *Plasmodium* mais le gène codant pour cette enzyme n'a toutefois pas encore été identifié dans le génome du parasite (Vance and Tasseva 2013)(Baunaure. F., Vial. H., données non publiées). La PS synthétisée est pour partie incorporée dans les membranes mais sert également de métabolite pour la synthèse de PE *via* la décarboxylation de la sérine par la phosphatidylsérine décarboxylase (PSD) (Baunaure et al. 2004).

### 2.2.3. Les voies de Kennedy (voies rouges)

Comme tous les eucaryotes, *Plasmodium* possède les voies de biosynthèse *de novo* DAG-dépendantes de ses deux phospholipides principaux, la PC et la PE. Ces deux voies portent également le nom de voies de Kennedy depuis leur description complète chez le rat par Eugène Kennedy à la fin des années 1950 (Kennedy 1956; Kennedy et al. 1956). Les voies de Kennedy consistent en trois réactions enzymatiques successives permettant la synthèse de PC et de PE à partir de choline et d'éthanolamine, respectivement (Figure 16, en rouge). Ici, ce sont les têtes polaires choline et éthanolamine qui sont activées par liaison au CTP avant d'être condensées avec une molécule de DAG. Elles ont depuis été identifiées et caractérisées chez plusieurs espèces de *Plasmodium* infectant l'homme, le singe et les rongeurs (Vial et al. 1982; Ancelin and Vial 1989; Dechamps et al. 2010c; Wein et al. 2012)

#### *Les choline et éthanolamine kinases :*

La première étape consiste en la phosphorylation rapide de la choline et de l'éthanolamine en phosphorylcholine (P-Cho) et phosphoryléthanolamine (P-Etn). Cette réaction est catalysée respectivement par la choline kinase (CK) et l'éthanolamine kinase (EK). Les travaux réalisés sur protéines recombinantes ont montré que la *PfCK* et la *PfEK* possèdent une activité spécifique vis-à-vis de leur substrat respectif (Ancelin and Vial 1986; Choubey et al. 2006; Alberge et al. 2010). Toutes deux sont exprimées principalement durant les stades trophozoïte et schizonte et sont localisées dans le cytoplasme du parasite (Choubey et al. 2006; Alberge et al. 2010).

#### *Les CTP:phosphocholine et CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférases :*

Dans une seconde étape, la P-Cho et la P-Etn sont couplées au CTP pour former respectivement la CDP-choline (CDP-Cho) et la CDP-éthanolamine (CDP-Etn). Cette étape est considérée comme limitante dans les voies de Kennedy, aussi bien chez les mammifères (Sundler and Akesson 1975a) que chez *Plasmodium* (Ancelin and Vial 1989; Maheshwari et al. 2013). Elle est catalysée par la CTP:phosphocholine cytidyltransférase (CCT) et la CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférase (ECT). Ces deux enzymes sont l'objet principal de ces travaux de thèse et seront présentées en détails dans le chapitre suivant.

*La choline/éthanolamine phosphotransférase :*

La dernière étape des voies de Kennedy implique le transfert de la CDP-Cho et de la CDP-Etn à une molécule de DAG par la choline-phosphotransférase (CPT) et l'éthanolamine-phosphotransférase (EPT). Les activités CPT et EPT ont toutes deux été identifiées chez *Plasmodium*. Des études biochimiques réalisées chez *P. knowlesi* ont suggéré que ces activités puissent être portées par la même protéine (Vial et al. 1984). Cette hypothèse est fortement soutenue par la présence d'un seul gène codant pour ce type d'activité dans le génome de *Plasmodium*. La dernière étape des voies de Kennedy est donc probablement catalysée par une enzyme bi-fonctionnelle, la choline/éthanolamine phosphotransférase (CEPT). Chez *P. berghei*, la CEPT présente un profil de localisation à la membrane du réticulum endoplasmique, classiquement retrouvé chez les CPT et EPT d'autres organismes (Dechamps et al. 2010c).

Les tentatives de délétion des gènes codant pour la CK, la CCT, la ECT et la CEPT par double recombinaison homologue chez *P. berghei* n'ont pas permis d'obtenir des parasites viables. Ces résultats suggèrent que ces gènes sont essentiels à la survie du parasite murin (Dechamps et al. 2010c).

**2.2.4. Voies transversales***Voie de la sérine décarboxylase – phosphométhyltransférase (SDPM) (voie verte):*

Cette voie permet la synthèse de la PC à partir de la sérine et de l'éthanolamine, et de la PE à partir de la sérine (Figure 16, en vert).

La sérine est tout d'abord décarboxylée en éthanolamine par la **sérine décarboxylase (SD)**. Cette éthanolamine, comme celle provenant du sérum, est ensuite phosphorylée par la EK (voie de Kennedy) pour former la P-Etn. La formation d'éthanolamine à partir de la sérine a initialement été découverte au laboratoire chez *P. falciparum* et *P. knowlesi* à partir de sérine radiomarquée (Elabbadi et al. 1997). L'activité sérine décarboxylase, ainsi que le gène codant pour la SD, ont depuis été caractérisés chez les plantes (Rontein et al. 2001) mais le gène correspondant chez *Plasmodium* reste à identifier.



Dans un second temps, la P-Etn peut conduire à la synthèse de PE *via* la voie de Kennedy ou être convertie en P-Cho par triple méthylation S-adénosylméthionine (SAM) dépendante, catalysée par la **phosphométhyltransférase (PMT)** (Pessi et al. 2004; Pessi et al. 2005). La délétion du gène codant pour la *PfPMT* n'est pas létale pour le parasite lors des stades sanguins asexués mais provoque cependant un défaut de croissance (Witola et al. 2008). En revanche, la *PfPMT* paraît essentielle pour la maturation des gamétocytes et, par conséquent, pour la transmission du parasite chez le moustique (Bobenchik et al. 2013). Il faut noter que la PMT n'est pas présente chez toutes les espèces de *Plasmodium* et n'est pas retrouvée chez les espèces infectant les rongeurs (Dechamps et al. 2010a). Ceci met en évidence une différence cruciale dans le métabolisme des phospholipides au sein du genre *Plasmodium* et impose des précautions quant à l'utilisation de modèles murins pour l'identification et la caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques.

*Le mécanisme d'échange de base (voie violette):*

Chez les mammifères, la synthèse de PS est réalisée par un mécanisme d'échange de base en remplaçant les têtes polaires de la PC ou de la PE par la sérine. Ces réactions sont catalysées par les phosphatidylsérine synthases de type I ou II selon qu'elles prennent en charge la PC (PSSI) ou la PE (PSSII) pour former la PS (Vance and Tasseva 2013). Un gène codant pour une PSS de type base-exchange est retrouvé dans le génome de *Plasmodium* (PF3D7\_1366800). Récemment, des données préliminaires obtenues sur protéine recombinante dans le laboratoire suggèrent que celle-ci possède une activité de type PSSII (L. Berry et H. Vial, communication personnelle) (Figure 16, en violet).

*La PEMT (voie orange):*

La formation de PC par triple méthylation de la PE par la phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase (PEMT) a été détectée chez certains procaryotes, levures mais également dans certains types cellulaires de mammifère, notamment dans les hépatocytes. Une activité de type PEMT a été identifiée chez *P. knowlesi* et *P. falciparum* par incorporation de précurseurs solubles ou de PE radiomarqués (Moll et al. 1988; Elabbadi et al. 1997) (Figure 16, en orange). Toutefois aucun gène codant pour une enzyme à activité PEMT n'a encore été

identifié dans le génome de *Plasmodium*. L'existence de la voie menant de la PE à la PC reste aujourd'hui sujette à controverse. Il a en effet été rapporté que la délétion du gène codant pour la PfPMT, permettant la synthèse de P-Cho à partir de P-Etn (voie SDPM), abolit totalement l'incorporation d'éthanolamine dans la PC (Witola et al. 2008).

### 2.3. Les voies de biosynthèse de la phosphatidylcholine comme cibles thérapeutiques

Au cours de son développement dans l'érythrocyte, *Plasmodium* ne peut compter que sur ses propres voies métaboliques pour synthétiser les quantités considérables de PLs indispensables à sa croissance et sa multiplication. Les voies de biosynthèse des phospholipides, et particulièrement de la PC, représentent donc des cibles thérapeutiques de choix pour la recherche de nouveaux antipaludiques présentant un mode d'action original.

L'approche la plus réussie à ce jour est sans doute celle conçue et développée au cours de ces vingt dernières années au laboratoire en collaboration avec une équipe de chimistes de l'Université de Montpellier. Cette stratégie antipaludique est basée sur des analogues de choline capables de bloquer l'import de choline et/ou d'inhiber des enzymes impliquées dans la synthèse de la PC. Des études de relation structure-activité ont mené à une première génération de bis-ammonium quaternaires dont le composé leader, G25, présentait une puissante activité *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Wengelnik et al. 2002). Plusieurs générations de bi-ammonium quaternaires ont par la suite été développées et ont mené à la synthèse des bis-thiazolium. Cette famille a fourni le candidat clinique T3 (SAR97276, renommé albitiazolium), développé en partenariat avec Sanofi pour le traitement du paludisme sévère. Le mécanisme d'action de T3 semble impliquer en premier lieu l'inhibition d'un transporteur de choline parasitaire (Biagini et al. 2004; Wein et al. 2012). De plus, T3 présente la particularité d'être accumulé 400 fois au sein des globules rouges infectés, lui permettant éventuellement d'atteindre les concentrations nécessaires pour inhiber les trois enzymes de la voie de Kennedy (Wein et al. 2012). Une partie de l'albitiazolium est retrouvée accumulée à concentration élevée dans la vacuole digestive du parasite. Une interaction de la drogue avec l' $\alpha$ -hématine contribue alors à l'activité antiparasitaire en plus de l'effet anti-

phospholipides (Biagini et al. 2003; Richier et al. 2006). L'albitiazolium exercerait donc son activité antipaludique par un mécanisme d'action dual.

Le développement clinique de l'albitiazolium contre le paludisme sévère par voie parentérale a été entrepris par Sanofi. Les essais cliniques multicentriques de phases 2 ont montré une activité antipaludique satisfaisante chez les adultes à la très faible dose de 0,18 mg/kg. Chez les enfants, en raison d'une clairance plus rapide de la drogue, les effets sur la parasitémie sont amoindris mais une augmentation de la dose a pu être réalisée après retour en phase 1. Il demeure que le développement de nouvelles molécules contre le paludisme sévère paraît être un marché de niche qui ne semble pas prioritaire au niveau mondial (il n'y a actuellement pas de résistance à l'artesunate pour cette indication). L'albitiazolium présente une biodisponibilité orale faible (<5%) qui ne permet pas son développement clinique pour le traitement du paludisme non-complicqué qui regroupe l'essentiel des besoins et du marché. L'approche actuelle du laboratoire vise à concevoir une formulation innovante pour un traitement du paludisme non complicqué à grande échelle.

# Chapitre III : Les cytidylyltransférases

Ce chapitre traitera principalement des deux enzymes limitantes des voies de Kennedy: la CTP:phosphocholine cytidylyltransférase (CCT, EC 2.7.7.15) et la CTP:phosphoéthanolamine cytidylyltransférase (ECT, EC 2.7.7.14). Il sera également question, dans une moindre mesure, de la CTP:glycérol-3-phosphate cytidylyltransférase (GCT, EC 2.7.7.39). La GCT est présente seulement chez les procaryotes mais elle est enzymatiquement et structurellement proche des CCT et ECT eucaryotes. Son étude approfondie, notamment biochimique, a permis d'améliorer considérablement la compréhension du fonctionnement des enzymes de la famille des cytidylyltransférases.

## 1. Caractéristiques générales des cytidylyltransférases

Les CCT, ECT et GCT catalysent toutes trois le transfert d'un groupement cytidyl provenant du CTP à un phosphomonoester, respectivement la phosphocholine (P-Cho), la phosphoéthanolamine (P-Etn) et le glycérol-3-phosphate (G3P), pour former un intermédiaire de haute énergie, la CDP-choline (CDP-Cho), la CDP-éthanolamine (CDP-Etn) et le CDP-glycérol (CDP-Gly) ainsi qu'une molécule de pyrophosphate (PPi) (Figure 17).

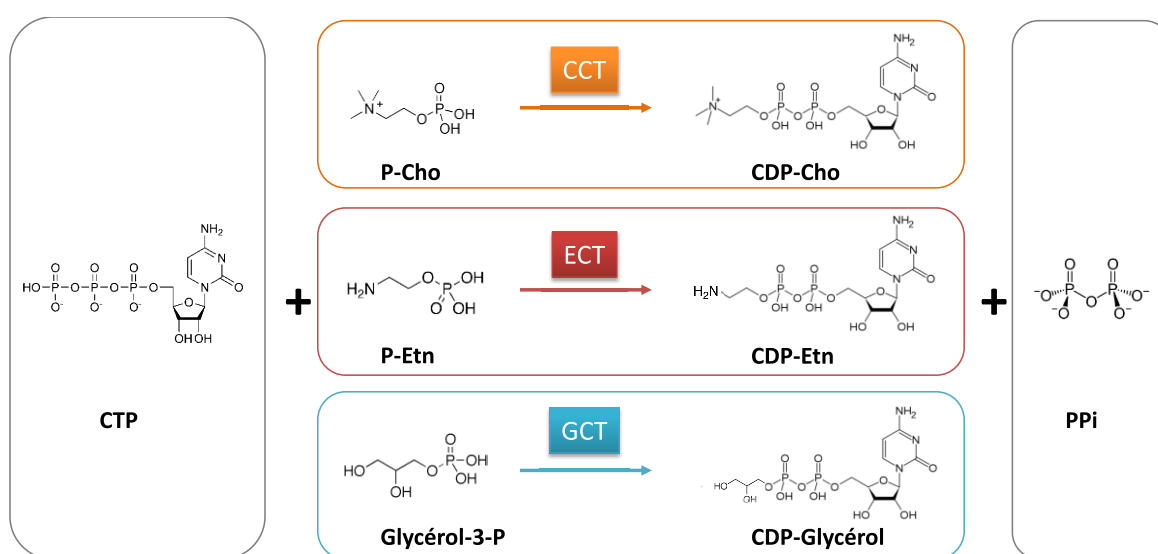


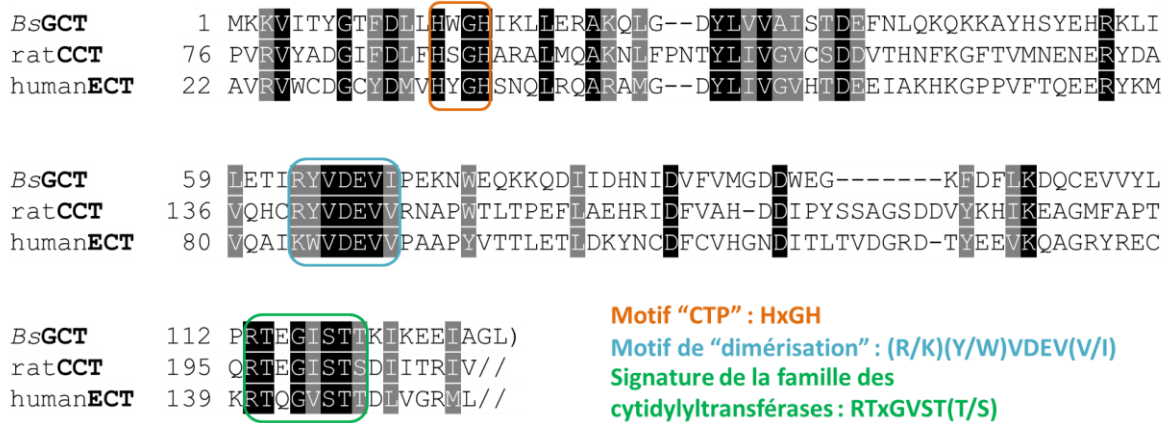
Figure 17. Réactions catalysées par les CTP:phosphocholine, CTP:phosphoéthanolamine et CTP:glycérol-3-phosphate cytidylyltransférases.

### 1.1. Motifs conservés et mécanisme catalytique

Les alignements des séquences primaires de plusieurs GCT, CCT et ECT ont permis l'identification puis la caractérisation biochimique de motifs conservés chez ces trois enzymes (Park et al. 1993)(Figure 18). Les travaux réalisés sur la GCT de *Bacillus subtilis* et la CCT du rat ont mis en évidence le rôle critique joué par le motif **HxGH**, appelé également « motif CTP », pour la liaison du CTP et pour l'activité catalytique de l'enzyme. Le remplacement de chacune des histidines du motif par une alanine chez la *Bs*GCT provoque une diminution drastique de la constante catalytique  $k_{cat}$  d'au moins trois ordres de magnitude (Park et al. 1997), résultats par la suite confirmés chez la CCT du rat (Veitch et al. 1998). Chez cette dernière, le remplacement de la glycine du motif HSGH par une sérine provoque également une diminution sensible de la  $V_{max}$  mais surtout une diminution par 25 de l'affinité pour le CTP. Il a donc été proposé que ce motif puisse être directement impliqué dans la liaison du CTP (Veitch and Cornell 1996). La présence d'un motif de type HxGH est également retrouvée chez les nucléotidyltransférases de la famille des aminoacyl-tRNA synthases de classe I catalysant le transfert d'un motif adényl de l'ATP pour former un aminoacyl adénylate. Basé sur les résultats obtenus chez ces enzymes, il a été proposé que les réactions catalysées par les cytidyltransférases impliquent la formation d'un état de transition penta-coordonné où le phosphate du phosphomonoester est le nucléophile et attaque le phosphate  $\alpha$  du CTP (Leatherbarrow et al. 1985; Park et al. 1997; Lee et al. 2009). Dans ce modèle, le motif HxGH serait directement impliqué dans la stabilisation de l'état de transition. Ce mécanisme est fortement supporté par de nombreuses études cinétiques montrant la formation d'un complexe ternaire chez les GCT (Park et al. 1993; Badurina et al. 2003), CCT (Veitch et al. 1998; Nagy et al. 2013) et ECT (Sundler 1975), plutôt que la formation d'un intermédiaire covalent (mécanisme Ping-Pong).

La séquence **RTxGVST(T/S)** est également fortement conservée chez les cytidyltransférases mais n'est pas retrouvée chez les aminoacyl-tRNA synthases de classe I, ni chez d'autres familles d'enzymes. Ce motif unique constitue la « signature de la famille des cytidyltransférases » (Figure 18). La structure cristallographique de la *Bs*GCT en complexe avec le CTP (PDB:1COZ) a permis de mettre en évidence le rôle direct de ce motif dans la coordination du CTP (Weber et al. 1999) (Figure 19B). Le remplacement de l'arginine du motif par une alanine chez la CCT du rat (*Rn*CCT) provoque une forte diminution de l'affinité

pour le CTP. Cette arginine est en effet en interaction directe avec le phosphate  $\beta$  du CTP (Weber et al. 1999).



**Figure 18. Motifs conservés parmi les GCT, CCT et ECT**

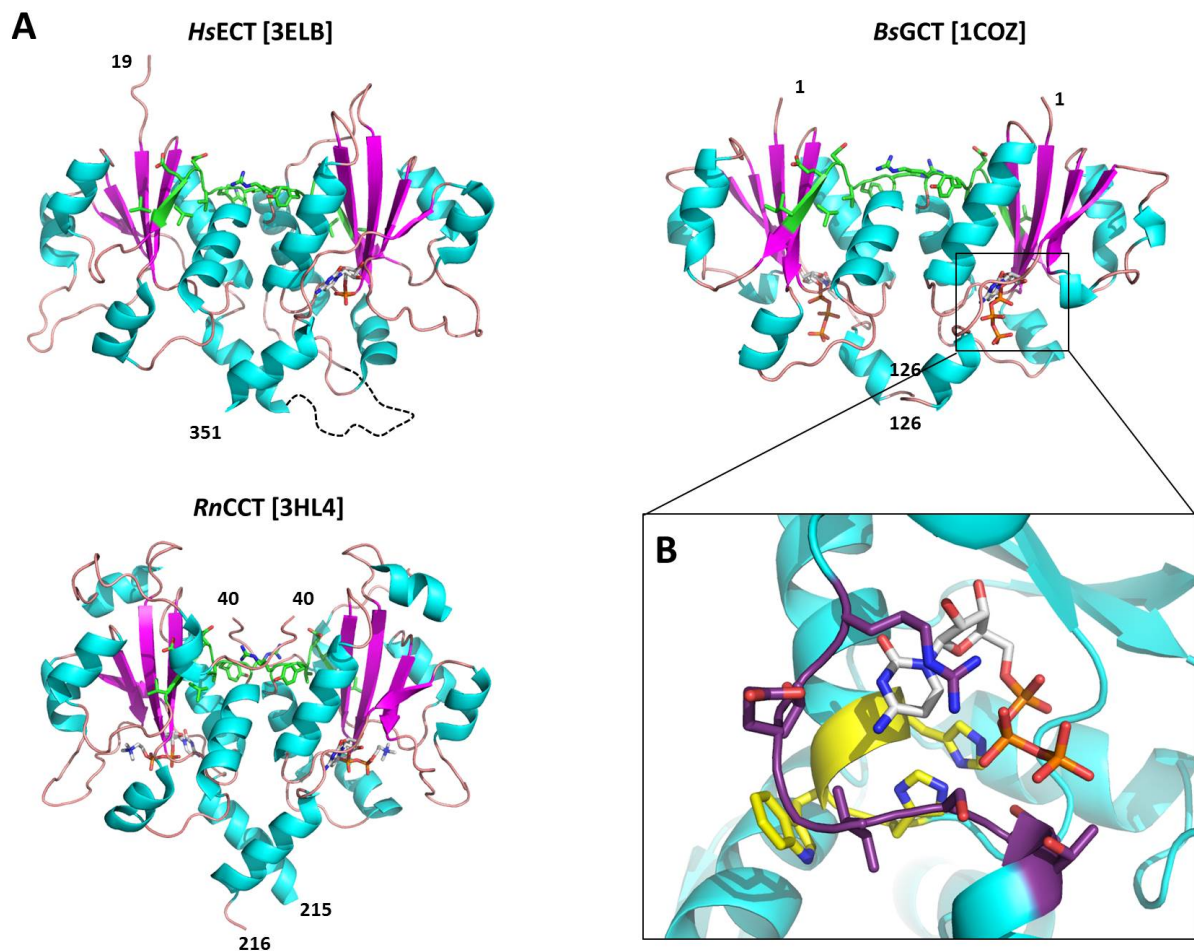
Alignement des séquences en acides aminés de la GCT de *Bacillus subtilis* et des domaines catalytiques de la CCT du rat et de l'ECT humaine présentant les domaines conservés parmi les cytidylyltransférases.

Enfin, le dernier motif conservé chez les cytidylyltransférases est la séquence **(R/K)(Y/W)VDEV(V/I)** qui n'est pas impliquée dans l'activité catalytique mais est nécessaire pour la stabilité de sa conformation tridimensionnelle (Sweitzer and Kent 1994). Récemment, les structures de la CCT du rat, de la *Bs*GCT et de la ECT humaine ont montré que ce motif est éloigné du site catalytique et est impliqué dans la dimérisation des cytidylyltransférases (Weber et al. 1999; Lee et al. 2009). Toutefois, seuls les deux premiers résidus du motif se trouvent à l'interface de dimérisation dans ces trois structures. Les autres résidus sont plus éloignés du site de dimérisation et, pour certains, exposés au solvant.

## 1.2. Similarités structurales

Parmi les cytidylyltransférases, la GCT de *Bacillus subtilis* est la première dont la structure cristallographique a été résolue, à 2,0 Å de résolution en complexe avec le CTP (PDB :1COZ (Weber et al. 1999)) et avec le CDP-glycérol (PDB :1N1D (Patridge et al.

2003)). Elle a été suivie par les structures des domaines catalytiques de la CCT de *Rattus norvegicus* à 2,2 Å en complexe avec la CDP-choline (PDB :3HL4 (Lee et al. 2009)) et de la ECT humaine à 2.0 Å en complexe avec le CMP (PDB :3ELB (Structural Genomic Consortium)). Ces trois structures présentent un repliement de type Rossmann consistant en cinq brins  $\beta$  parallèles entourés de six hélices  $\alpha$  dans une topologie  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ . Les structures des domaines catalytiques de *BsGCT*, *RnCCT* et *HsECT* sont toutes trois dimériques, formant un homodimère pour la *BsGCT* et la *RnCCT* et un dimère intrachaine pour la *HsECT* (Figure 19A). Cette caractéristique suggère un rôle crucial de la dimérisation au sein des cytidyllyltransférases.



**Figure 19. Structures cristallographiques des ECT humaine, GCT de *B. subtilis* et CCT du rat.**

**A.** Les structures sont colorées en fonction du type de structures secondaires. Les résidus appartenant au motif conservé (R/K)(Y/W)VDEV(V/I) sont colorés en vert. Ces structures sont en complexe avec le CMP pour la *HsECT*, le CTP pour la *BsGCT* et la CDP-Cho pour la *RnCCT* (gris/orange). **B.** Zoom du site actif de la *BsGCT* en complexe avec le CTP. Les résidus du motif HxGH sont en jaune et les résidus du motif RTxGVST(T/S) sont en violet.

La structure de la *Bs*GCT en complexe avec le CTP a montré que ce dernier se lie dans une large cavité dont une face est constituée des résidus appartenant aux motifs conservés HxGH et RTxGVST(T/S) (Figure 19B). La présence de la cavité permettant la liaison du CTP est retrouvée chez la *Rn*CCT et la *Hs*ECT. Toutefois, le reste du site actif chez les cytidylyltransférases diffère significativement afin d'établir la spécificité vis-à-vis du phosphoglycérol, de la phosphocholine ou de la phosphoéthanolamine. Nous verrons les différences structurales propres aux CCT et ECT dans les parties dédiées à chacune d'elles.

## 2. CTP:phosphocholine cytidylyltransférase (CCT)

### 2.1. Données génomiques et isoformes

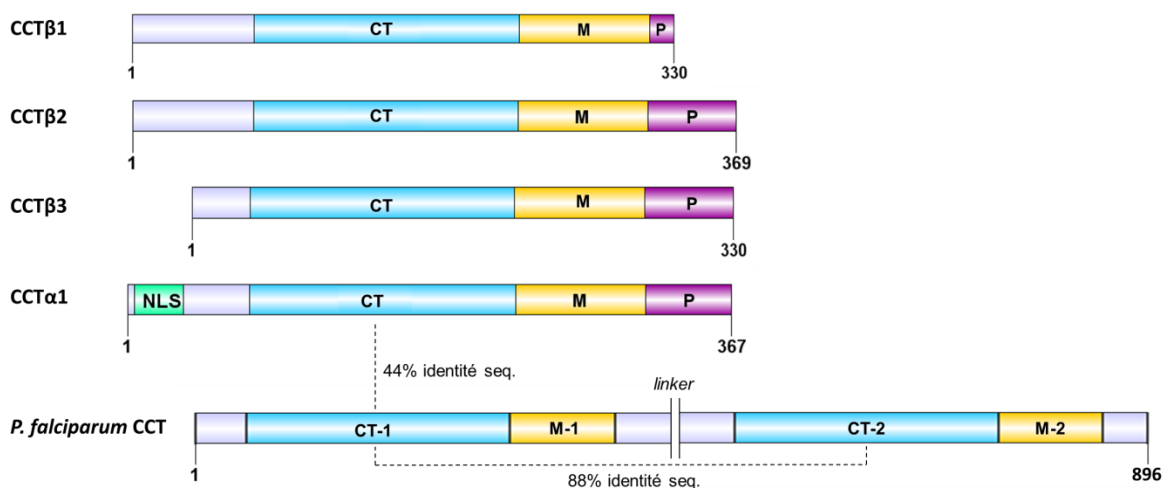
Des gènes codant pour des CCT ont été identifiés chez la plupart des organismes eucaryotes unicellulaires et multicellulaires. Les eucaryotes unicellulaires comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Friesen et al. 2001b) possèdent généralement une seule copie du gène *Cct* à l'inverse des eucaryotes multicellulaires qui en possèdent deux, comme *Arabidopsis thaliana* (Choi et al. 1997) et *Drosophila melanogaster* (Helmink and Friesen 2004), ou potentiellement trois comme le ver *Caenorhabditis elegans* (Lykidis 2007; Braker et al. 2009). Chez l'homme et les rongeurs, les gènes nommés *Pcyt1a* et *Pcyt1b* codent respectivement pour la CCT $\alpha$  et pour les 3 variants d'épissage CCT $\beta$ 1, CCT $\beta$ 2 et CCT $\beta$ 3 (Lykidis et al. 1999; Karim et al. 2003; Lykidis 2007).

A l'instar des autres eucaryotes unicellulaires, *P. falciparum* ne possède qu'un gène codant pour une CCT (PlasmoDB ID: PF3D7\_1316600). Il est constitué de trois exons et de deux introns et code pour une protéine de 896 acides aminés. Les nombreuses données de séquençage ARN (ou RNA seq.) disponibles sur la base de données génomiques PlasmoDB (Aurrecochea et al. 2009) semblent indiquer l'absence de variant d'épissage alternatif et, par conséquent, la présence d'un seul isoforme de la CCT chez *P. falciparum*.



## 2.2. Domaines protéiques

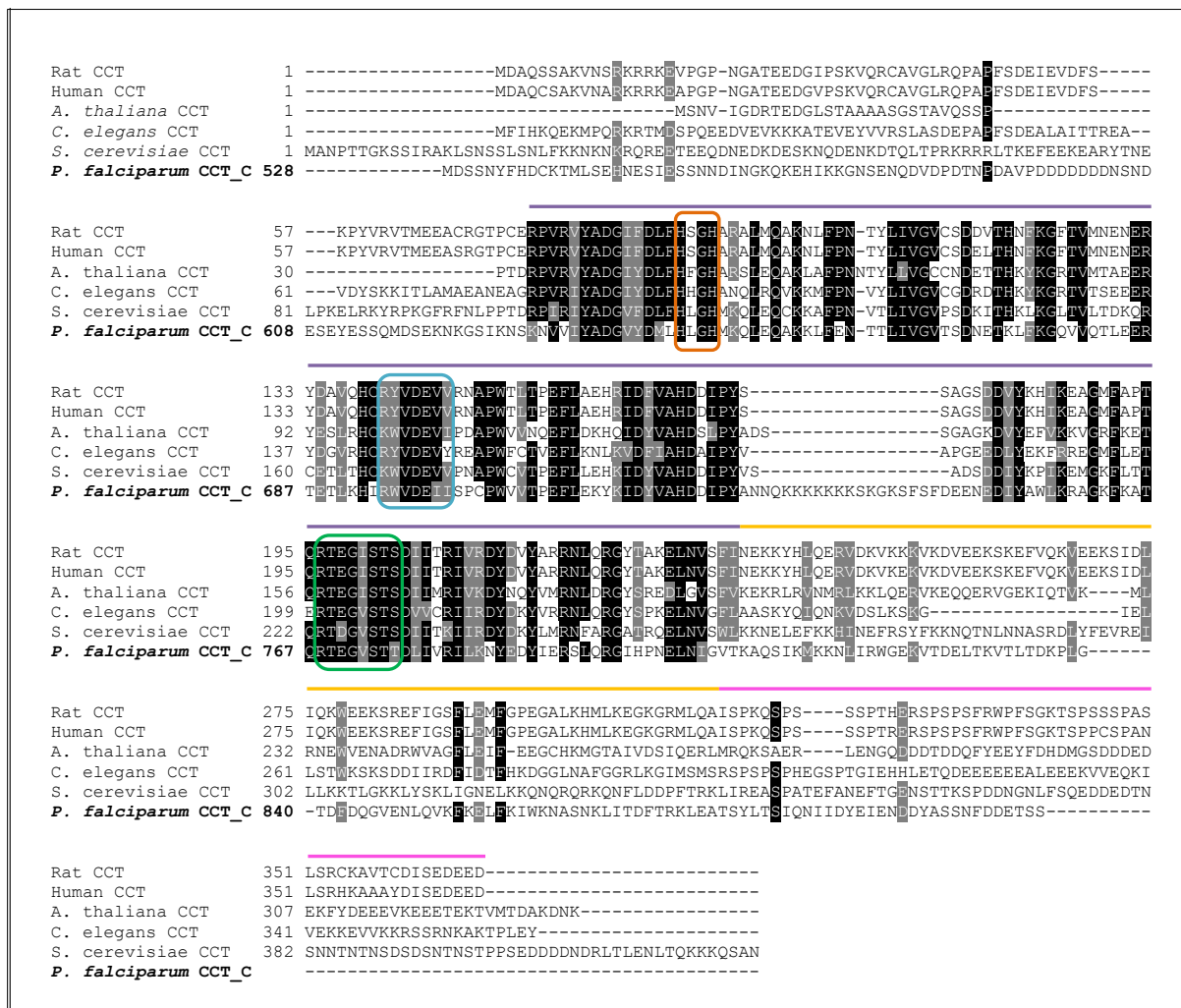
L'analyse des séquences de CCT provenant de différents organismes a permis d'identifier la présence d'au moins deux domaines fonctionnels distincts : un « domaine cytidylyltransférase » (domaine CT), ou domaine catalytique, et un domaine de liaison aux membranes (domaine M) (Figure 20). Ce dernier consiste en une longue hélice  $\alpha$  amphipathique jouant un rôle clé dans la régulation des CCT en permettant leur activation *via* les lipides de la membrane. Le domaine M constitue une caractéristique unique des CCT au sein de la famille des cytidylyltransférases puisqu'il n'est retrouvé ni chez les GCT, ni chez les ECT. Les domaines CT sont fortement conservés avec un pourcentage d'identité de séquence égal ou supérieur à 50% parmi les CCT de levure, de plantes ou encore de mammifères. Il est à noter que le domaine CT est totalement conservé entre les CCT de rat et humaine. A l'inverse, les domaines M sont nettement moins conservés, suggérant des spécificités vis-à-vis de la composition des membranes propres à chaque organisme (Figure 21). La présence d'un domaine additionnel riche en sérines phosphorylées a également été identifiée, à ce jour uniquement dans la partie C-terminale des CCT de mammifères (Domaine P). Le domaine P pourrait également intervenir dans la régulation de l'enzyme, toutefois son rôle exact reste à définir. Nous reviendrons sur le rôle des domaines M et P dans une prochaine section traitant des mécanismes de régulation des CCT.



**Figure 20. Domaines protéiques chez les CCT humaines et de *P. falciparum***

CT : domaine cytidylyltransférase, M : domaine de liaison aux membranes, P : domaine phosphorylé, NLS : signal de localisation nucléaire.

Chez les mammifères, la région N-terminale de la CCT $\alpha$  se caractérise par la présence d'une séquence polybasique permettant son adressage spécifique vers le noyau (NLS) (Wang et al. 1995). Les domaines CT et M des CCT $\alpha$  et CCT $\beta$  sont particulièrement conservés avec 98% de similarité de séquence entre les deux protéines. Ces deux isoformes diffèrent toutefois de manière importante à leurs extrémités N-terminale et C-terminale. (Dennis et al. 2011).



**Figure 21. Alignement des séquences en acides aminés des CCT de différents organismes.**

Les séquences des CCT de *Rattus norvegicus* (RnCCT), *Homo sapiens* (HsCCT), *A. thaliana*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* et la séquence de la partie C-terminale de la *PfCCT* sont présentées. Les motifs de liaison du CTP, la signature des cytidylyltransférases et le motif de dimérisation sont encadrés respectivement en orange, bleu et vert. Les domaines CT, M et P chez les mammifères sont respectivement représentés par un trait violet, jaune et rose.

10	20	30	40	50	60
MI IKVNSVQT	QKSQDGNKVH	NSQDDMDNEE	KSIRIYADGV	YDLLHLGHMK	QLEQAKHVDK
70	80	90	100	110	120
NVTLIVGVGTG	DNETRKFQGO	IVQTLERTE	TLKHIRWVDE	IISPCPWVIT	PEFMEEHKID
130	140	150	160	170	180
YVAHDDIPYA	NNQKKKKKKK	SKGKSFSFDE	ENEDIYAWLK	RAGKFKATQR	TEGVSTTDLI
190	200	210	220	230	240
VRILKNYEDY	IERSLQRGIH	PNELNIGVTK	AQSIKMKKNL	IRWGEKVTDE	LTKVTLTDKP
250	260	270	280	290	300
LGTDFDQGID	IIRDKVHDLF	KLWRYHSKKL	LKDFAKSFDP	MFIIIRKRYR	KDNL SAMYLS
310	320	330	340	350	360
DSNYFSSSMK	DELKKKKSLS	STFNNIDEYY	YSADEEDTRD	NSFYRVINKI	ANHTYYSEKE
370	380	390	400	410	420
NYETCFELEH	SLRDKKKSLS	FKDKNMKLSP	DLLLHFTNPM	NSKYDHNYYY	YNNYTDKLSN
430	440	450	460	470	480
VTFNLNGIKK	KSYDNESSYI	KTAYHDIIDE	DKNLLNKEKS	FNKDEKSKKK	SILETDQYKN
490	500	510	520	530	540
CEDQQFDNKY	NHIIIGKKKS	DSTYDNSL DK	ESSNEKKLSI	DKGQYSNMDS	SNYFHDCKTM
550	560	570	580	590	600
LSEHNSIES	SNNDDINGKQK	EHIKKGNSEN	QDVDPDTNPD	AVPDDDDDDD	NSNDESEYES
610	620	630	640	650	660
SQMDSEKNKG	SIKNSKNVVI	YADGVYDMLH	LGHMKQLEQA	KKLFENTTLI	VGVTSDNETK
670	680	690	700	710	720
LFKQGVVQTL	EERTETLKH I	RWVDEIISPC	PWVVTPEFLE	KYKIDYVAHD	DIPYANNQKK
730	740	750	760	770	780
KKKKKSKGKS	FSFDEENEDI	YAWLKRAGKF	KATQRTEGVS	TTDLIVRILK	NYEDYIERSL
790	800	810	820	830	840
QRGIHPNELN	IGVTKAQS I K	MKKNLIRWGE	KVTDELTKVT	LTDKPLGTDF	DQGVENLQVK
850	860	870	880	890	
FKELEFKIWK N	ASNKLITDFT	RKLEATSYLT	SIQNIIDYEI	ENDDYASSNF	DDETSS

**Figure 22. Séquence primaire de la PfCCT**

Les domaines CT et M sont respectivement indiqués en violet et jaune. Les deux motifs de liaison du CTP (HxGH) sont en rouge, le motif de dimérisation ((R/K)(Y/W)VDEV(V/I)) est en bleu et la signature des cytidyllyltransférases (RTxGVST(T/S)) est en vert.

Les CCT des espèces de *Plasmodium*, contrairement à la grande majorité des CCT, possèdent deux domaines CT (CT-1 et CT-2) et deux domaines M (M1 et M2) séparés par une région de liaison prédite comme étant non structurée (Figures 20 et 22). Cette duplication des domaines CT et M n'a pour le moment été retrouvée que chez les parasites *Babesia* et *Theileria*, appartenant également au phylum des apicomplexes. Les deux domaines CT de la PfCCT présentent une forte homologie avec 88% d'identité de séquence (sur 99 résidus). A l'inverse, les domaines CT-1 et CT-2 des CCT de *Theileria annulata* et *Babesia bovis* ne partagent respectivement que 35% et 41% d'identité de séquence. Nous avons récemment montré par des études phylogénétiques que la présence de deux domaines CT et M chez *Plasmodium*, *Babesia* et *Theileria* résulterait de deux événements de duplication indépendants au cours de l'évolution : un premier commun aux différentes espèces de *Babesia* et *Theileria* et un second, plus récent, spécifique aux différentes espèces de *Plasmodium* (Nagy et al.

2013). L'importance de cette duplication reste toutefois inconnue, au même titre que le rôle de la région de liaison dont la longueur varie de  $\approx 40$  résidus chez *Theileria* à  $\approx 300$  résidus chez *P. falciparum*. La présence d'un domaine riche en résidus phosphorylés adjacent au domaine M n'a pas été mise en évidence chez les CCT de *Plasmodium*. Néanmoins, deux phosphoprotéomes des stades sanguins de *P. falciparum* ont identifié neuf sérines, une tyrosine et une thréonine potentiellement phosphorylées chez la CCT (Treeck et al. 2011; Pease et al. 2013). Ces sites sont principalement situés dans la région de liaison mais ne forment pas de domaine clairement identifiable. De même, aucun signal d'adressage vers le noyau n'a été identifié dans la séquence de la PfCCT.

### 2.3. Localisation cellulaire et distribution tissulaire

Parmi les cytidylyltransférases, les CCT sont les seules protéines de nature amphitropique. Elles possèdent une double localisation caractérisée par une fraction soluble et une fraction associée aux membranes, souvent celles du réticulum endoplasmique (RE). La forme soluble des CCT constitue la forme inactive de l'enzyme. Son activation est provoquée par sa translocation et son association à la membrane par le biais du domaine M (Stern et al. 1976; Tronchere et al. 1994; Wang and Kent 1995b). La localisation et la distribution des différentes CCT ont principalement été étudiées chez les mammifères. Bien que les isoformes CCT $\alpha$  et CCT $\beta$  possèdent des séquences très proches, ils présentent une expression spécifique au sein des tissus ainsi qu'une localisation différente dans un même type cellulaire. La CCT $\alpha$  est exprimée de manière ubiquitaire et en quantité relativement similaire dans la plupart des types cellulaires de mammifères (Lykidis et al. 1999). Elle est principalement retrouvée dans le noyau mais également en plus faibles proportions associée au RE (Wang et al. 1993). Son rôle au sein du noyau reste toutefois sujet à débat. Récemment, il a été montré que l'homologue de la CCT $\alpha$  chez la drosophile est exportée en faible proportion hors du noyau où il s'associe avec les gouttelettes lipidiques en cours de formation et permet la stimulation de la formation de PC (Krahmer et al. 2011). En comparaison avec la CCT $\alpha$ , les différents isoformes de la CCT $\beta$  sont exprimés en quantités beaucoup plus faibles dans la plupart des organes, à l'exception du cerveau (Lykidis et al. 1999; Karim et al. 2003). Les CCT $\beta$  ont une localisation uniquement cytoplasmique et interagissent avec la membrane du RE (Lykidis et al. 1999). Le

rôle des différents variants d'épissage de la CCT $\beta$  reste méconnu, d'autant plus que leur distribution au sein des différents tissus semble relativement proche. Il a été suggéré que le variant CCT $\beta$ 2, le plus proche de la CCT $\alpha$ , puisse être redondant et servir comme soutien à la CCT $\alpha$  (Kent 1997). Enfin, les CCT $\beta$ 1 et CCT $\beta$ 2 diffèrent de manière importante dans leur domaine de phosphorylation, suggérant différents types de régulation entre ces deux isoformes (Lykidis et al. 1999).

Chez *Plasmodium*, l'expression et la localisation de la CCT ont été caractérisées seulement lors des stades intra-érythrocytaires asexués chez *P. berghei*. *PbCCT* étiquetée GFP est retrouvée de manière diffuse dans le cytoplasme et elle ne présente pas le profil classique des protéines associées au RE chez *Plasmodium* (Dechamps et al. 2010c). Concernant les autres phases du cycle de vie du parasite, des données de transcriptomique semblent indiquer un faible niveau d'expression de la *PfCCT* chez les gamétocytes. De même, son expression n'a pas été détectée lors des stades hépatiques par une étude de protéomique chez *P. yoelii* (Tarun et al. 2008). Au contraire, d'autres données de protéomique semblent indiquer que la *PfCCT* est exprimée lors du développement du parasite chez le moustique (Lindner et al. 2013).

## 2.4. Caractérisation biochimique et régulation

En 1966, les premiers travaux portant sur la CCT du rat ont révélé que son activité est dépendante de la présence de lipides (Fiscus and Schneider 1966). La CCT présente dans le surnageant du foie de rat n'était active qu'en présence de fractions membranaires préalablement bouillies et il fut montré que cette activation était due à la présence de certains phospholipides. Ces données ont par la suite été largement confirmées à la fois *in vitro* et *in vivo* chez les mammifères (Stern et al. 1976; Pelech et al. 1984; Mages et al. 1988) mais également chez *C. elegans* (Friesen et al. 2001a), la drosophile (Helmink and Friesen 2004) ou la levure (Friesen et al. 2001b). Il est maintenant bien établi que leur activité est régulée par leur inter-conversion entre une forme active liée à la surface des membranes et une forme inactive soluble, contrôlée par la composition lipidique des membranes. De nombreux travaux ont été réalisés afin d'identifier la nature des lipides promouvant la translocation et l'activation des CCT. Chez les mammifères, deux principales classes de lipides activateurs

ont été identifiés : **i.** les PLs anioniques dont l'acide phosphatidique (PA) et les acides gras, et **ii.** les lipides neutres possédant une petite tête polaire et le DAG (Arnold and Cornell 1996; Cornell 1998). Les CCT de drosophile (Helmink and Friesen 2004), *C. elegans* (Friesen et al. 2001a), levure (Friesen et al. 2001b) et plantes (Wang and Moore 1990) sont toutes fortement activées par les lipides anioniques mais répondent de manière variable aux lipides neutres.

Chez les mammifères, différentes approches ont permis l'identification du domaine M comme senseur de la composition des membranes (Craig et al. 1994; Wieder et al. 1994; Cornell et al. 1995). Des études par RMN et dichroïsme circulaire ont montré que des peptides correspondant au domaine M prennent préférentiellement une conformation non structurée en solution aqueuse ou en présence de vésicules de PC, mais se structurent en hélice  $\alpha$  en présence de lipides anioniques, signifiant que les lipides activant la translocation favorisent la formation d'une structure permettant l'interaction avec la membrane (Taneva et al. 2003). La structure d'une partie du domaine M de la CCT du rat a tout d'abord été résolue par RMN (Dunne et al. 1996). Il s'agit d'une longue hélice  $\alpha$  possédant une face polaire, constituée principalement de résidus chargés, et d'une face hydrophobe comprenant également quelques sérines. Le mécanisme par lequel cette hélice interagit avec la membrane est complexe et semble faire intervenir des interactions hydrophobes et électrostatiques, mais également la reconnaissance de défauts de compaction dans la membrane (Cornell 1998). Les CCT de mammifères sont activées par la présence de lipides neutres possédant une petite tête polaire et connus pour créer des espaces dans l'arrangement régulier de la membrane, permettant ainsi l'intercalation du domaine M dans la bicouche lipidique.

Il a été suggéré que le domaine riche en sérines phosphorylées (domaine P) puisse jouer un rôle dans la translocation de la protéine à la membrane chez les mammifères. En effet, une diminution drastique du taux de phosphorylation de la CCT a été observée dans des conditions favorisant la translocation et l'activation de l'enzyme, par traitement à la phospholipase C (Watkins and Kent 1991) ou encore en condition de déprivation en choline (Weinhold et al. 1994), soulevant l'idée que la déphosphorylation puisse déclencher la translocation de la protéine à la membrane. Toutefois, la mutation phosphomimétique des 16 sérines du domaine P de la CCT du rat n'empêche pas la translocation de l'enzyme, laissant penser que le domaine P n'est pas responsable à lui seul de l'activation de la protéine, mais

que la déphosphorylation pourrait stabiliser la protéine dans sa forme liée aux membranes (Wang and Kent 1995a).

Le domaine CT sans les domaines M et P est constitutivement actif et à un niveau similaire à celui de l'enzyme entière activée par les lipides (Friesen et al. 1999). Ces résultats supportent l'idée que le domaine M agit comme inhibiteur de l'activité catalytique dans la forme soluble. Une séquence de 22 résidus du domaine M a été identifiée comme responsable de l'inhibition de l'activité des CCT mammifères dans leur forme soluble (Ding et al. 2012) et des études par réticulation chimique (cross-linking) ont montré que ce domaine d'auto-inhibition (domaine AI) interagit avec l'hélice  $\alpha E$  du domaine CT (Huang et al. 2013). Récemment, la structure cristallographique d'une construction de la CCT $\alpha$  comprenant le domaine CT et le domaine AI a confirmé ces données et permis de suggérer que l'auto-inhibition de la protéine impliquerait notamment une occlusion partielle du site catalytique par le domaine AI (Figure 23) (Lee et al. 2014).

De nombreuses CCT ont fait l'objet d'études enzymologiques, en présence ou absence de lipides régulateurs. Tout comme les autres cytidylyltransférases, l'activité des CCT est dépendante de la présence de cations divalents et plus particulièrement de magnésium (Mages et al. 1988; Tilley et al. 2008). Plusieurs études réalisées chez la CCT du rat, mais également chez le domaine CT-2 de la PfCCT, indiquent que la réaction suit un mécanisme enzymatique de type séquentiel dans lequel l'ordre d'addition des substrats est aléatoire (Mages et al. 1988; Nagy et al. 2013). Ce mécanisme est similaire à celui décrit chez la GCT de *Bacillus subtilis* (Park et al. 1993) mais diffère de celui de la GCT de *Staphylococcus aureus* dans lequel la liaison du substrat glycérol-3-P doit avoir lieu avant celle du CTP (Badurina et al. 2003).

La PfCCT<sub>(528-896)</sub> a été clonée et exprimée chez *E.coli* (Yeo et al. 1995). Ce n'est que lorsque le génome de *P. falciparum* a été entièrement séquencé (Gardner et al. 2002) qu'il est apparu que la protéine possédait une duplication des domaines CT et M. La PfCCT<sub>(528-896)</sub> possède une activité en absence de lipides mais celle-ci est activée jusqu'à 6 fois en présence de vésicules d'acide oléique et de PC (ratio 1:1) (Yeo et al. 1997). La protéine est généralement activée par les lipides anioniques mais pas par les lipides neutres, à l'inverse des CCT de mammifères. Elle est également inactivée par les lipides cationiques comme la sphingosine. Le domaine M de la PfCCT<sub>(528-896)</sub> a été identifié par une étude basée sur des peptides synthétiques. Il consisterait en deux hélices distinctes présentant une affinité

différente pour les lipides (Larvor et al. 2003). Récemment, l'étude du domaine CT-2 a montré que l'enzyme présente une meilleure affinité pour son produit (CDP-Choline) que pour ses deux substrats, le CTP et la P-Cho (Nagy et al. 2013). Les différents paramètres enzymatiques déterminés pour la *PfCCT* sont résumés dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Paramètres enzymatiques de la *PfCCT* endogène et de *PfCCT* recombinantes**

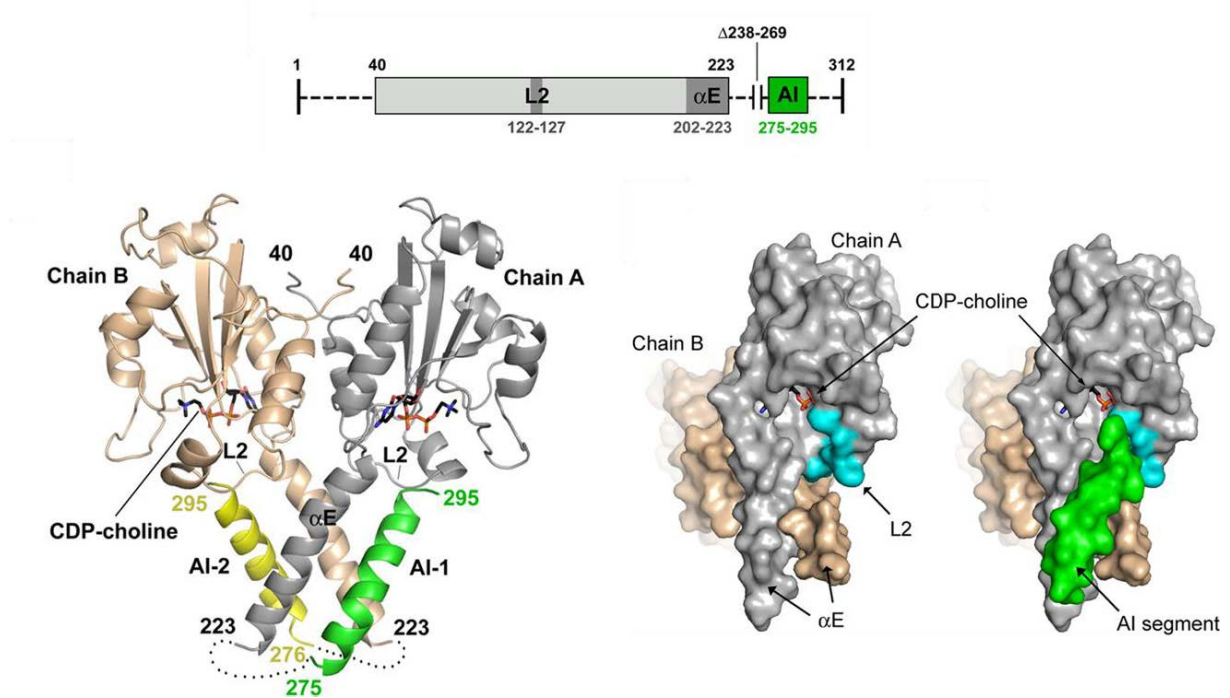
	lipides	$K_m$ CTP (mM)	$K_m$ P-Cho (mM)	$V_{max}$
<i>PfCCT</i> endogène*	oui	n.d	$0,51 \pm 0,02$	$5,2 \pm 1,4$ ( $\mu\text{mol} / 10^7 \text{ GRI} / \text{min}^{-1}$ )
<i>PfCCT</i> <sub>(528-896)</sub> <sup>†</sup>	oui	$10,9 \pm 0,5$	$0,49 \pm 0,03$	0,55 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$
<i>PfCCT</i> <sub>(528-896)</sub> <sup>†</sup>	non	$28,9 \pm 0,8$	$0,66 \pm 0,07$	0,10 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$
<i>PfCCT</i> <sub>(528-795)</sub> <sup>‡</sup>	non	$0,17 \pm 0,02$	$1,8 \pm 1,1$	2,8 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$

n.d : non déterminé, \* (Wein et al. 2012), † (Yeo et al. 1997), ‡ (Nagy et al. 2013)

## 2.5. Particularités structurales

Les structures du domaine catalytique de la CCT $\alpha$  du rat, seul (PDB:3HL4) ou associé au domaine d'auto-inhibition AI (PDB:4MVC), sont disponibles dans la PDB (Lee et al. 2009; Lee et al. 2014). Les deux structures de la CCT $\alpha$  sont en complexe avec le produit de la réaction, la CDP-choline. L'homodimérisation des domaines CT de la CCT $\alpha$  implique une hélice  $\alpha$  du domaine CT mais également une partie de l'extension N-terminale, non conservée parmi les CCT non mammifères (Figure 23). Le domaine d'auto-inhibition forme une hélice  $\alpha$  antiparallèle à l'hélice  $\alpha$ E qui interagit également par son extrémité C-terminale avec une boucle constituant le site actif (L2). La boucle L2 contient une lysine (Lys 122) largement conservée parmi la famille des cytidylyltransférases et ayant un rôle important pour l'activité enzymatique (Helmink et al. 2003). Il est proposé que l'interaction entre le domaine AI et la boucle L2 contraigne l'orientation de la Lys 122 (Lee et al. 2014).





**Figure 23. Structure cristallographique des domaines CT et AI de la CCT $\alpha$  du rat.**

Les deux domaines CT de l'homodimère sont colorés en saumon et gris et les domaines AI en jaune et vert. Le ligand CDP-choline est présent dans les deux sites catalytiques. La boucle L2 est colorée en bleu. Les portions non résolues de la construction 1-312  $\Delta$ 238-269 sont représentées en pointillés sur le schéma des domaines protéiques ainsi que sur la structure cristallographique. D'après Lee et al. 2014.

### 3. CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférase (ECT)

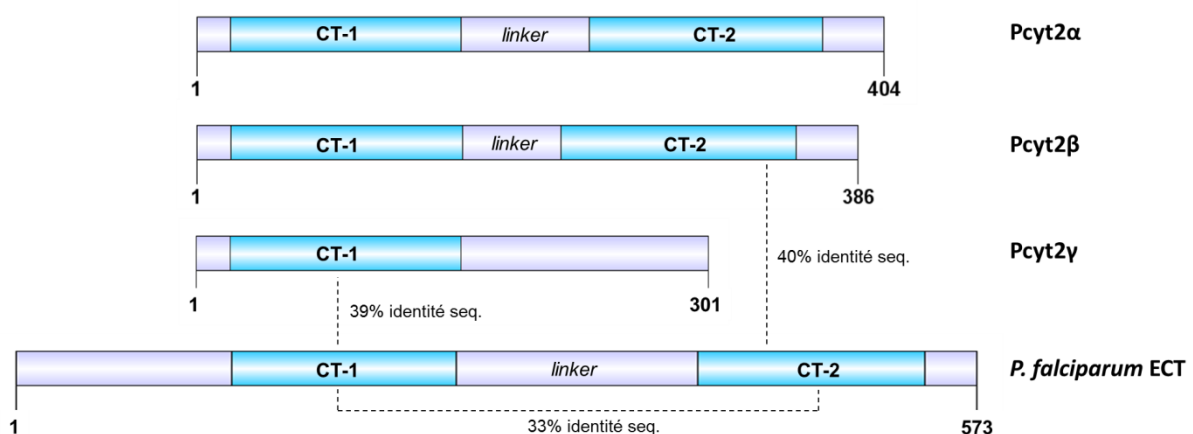
#### 3.1. Données génomiques et isoformes

Au même titre que la CCT, des gènes codant pour des ECT sont retrouvés chez la plupart des organismes eucaryotes dont le parasite *Trypanosoma brucei* (Gibellini et al. 2009), l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (Yang et al. 2004), *S. cerevisiae* (Min-Seok et al. 1996) ou encore le rat (Sundler 1975). La majorité des organismes, unicellulaires ou multicellulaires ne possèdent qu'un seul gène *Ect*, exception faite du poisson *Takifugu rubripes*, de certaines amibes, et de *C. elegans* possédant deux copies du gène (Lykidis 2007). Chez l'homme et les rongeurs, le gène *Ect*, nommé *Pcyt2*, code pour au moins deux isoformes de la protéine appelés *Pcyt2 $\alpha$*  et *Pcyt2 $\beta$*  (Tie and Bakovic 2007). Un troisième isoforme, *Pcyt2 $\gamma$* , a également été récemment identifié chez la souris (Pavlovic et al. 2014a).

Les génomes de plusieurs espèces de *Plasmodium* ne contiennent qu'une seule copie du gène *Ect*. Chez *P. falciparum*, le gène PF3D7\_1347700, constitué de trois exons et de deux introns, code pour une protéine de 573 acides aminés pour  $\approx$  66 kDa. Similairement à la *PfCCT*, les données de séquençage ARN ne semblent pas indiquer l'existence de variant d'épissage et, par conséquent, suggèrent la présence d'un seul isoforme de la ECT chez le parasite.

### 3.2. Domaines protéiques

L'analyse des séquences de ECT provenant de différents organismes a permis d'identifier la présence commune de deux domaines cytidylyltransférases (CT-1 et CT-2) séparés par une région de liaison de longueur variable et non conservée. Contrairement aux CCT, la duplication des domaines CT semble être une caractéristique commune parmi les ECT, suggérant qu'elle provient d'un seul évènement de duplication au cours de l'évolution. Néanmoins, il a récemment été montré que le gène *Pcyt2* chez la souris code par épissage alternatif pour un isoforme (*Pcyt2 $\gamma$* ) ne retenant que le domaine CT-1 et possédant une longue extension C-terminale non structurée à la place du domaine CT-2 (Pavlovic et al. 2014a) (Figure 24). A ce jour, il s'agit du seul exemple de ECT ne possédant qu'un seul domaine CT.



**Figure 24. Domaines protéiques des ECT du rat et de *P. falciparum***  
CT : domaine cytidylyltransférase

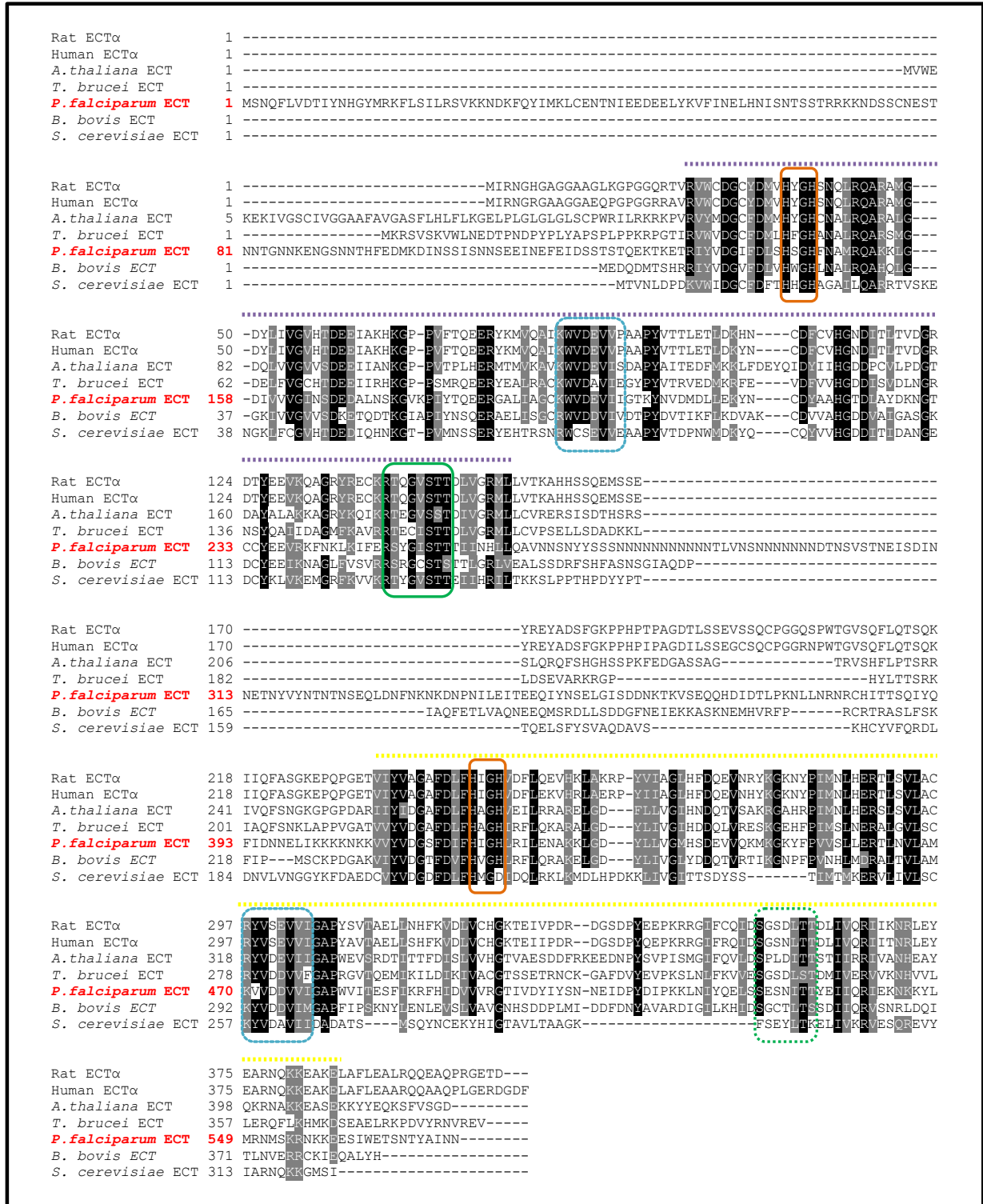
La conservation entre les domaines CT-1 et CT-2 est particulièrement faible, allant de 25% d'identité de séquence chez la levure à 36% chez le rat. La signature des cytidyltransférases RTxGVST(T/S) n'est pas totalement conservée chez l'ensemble des domaines CT-2. Il est à noter que la ECT de *S. cerevisiae* semble avoir perdu plusieurs portions du domaine CT-2 dont certains résidus conservés parmi les ECT (Figure 25).

La PfECT possède une région de liaison particulièrement longue par rapport à la plupart des ECT, constituée d'environ 140 acides aminés, ainsi qu'une longue extension N-terminale de 130 acides aminés (Figures 25 et 26).

10	20	30	40	50	60
MSNQFLVDTI	YNHGYMRKFL	SILRSVKKND	KFQYIMKLCE	NTNIEEDEEL	YKVFINELHN
70	80	90	100	110	120
ISNTSSSTRK	KNDSSCNEST	NNTGNNKENG	SNNTHFEDMK	DINSSISNNS	EEINEFEIDS
130	140	150	160	170	180
STSTQEKTKE	TRIIYVDGIFD	LSHSGHFNAM	RQAKKLGDIV	VVGINSDEDA	LNSKGVKPIY
190	200	210	220	230	240
TQEERGALIA	GCKWVDEVII	GTKYNVMDML	LEKYNCDYAA	HGTDLAYDKN	GTCCYEEVRK
250	260	270	280	290	300
FNKLIKIFERS	YGISTTTIIN	HLLQAVNNSN	YYSSSNNNNN	NNNNNTLVN	SNNNNNNDT
310	320	330	340	350	360
NSVSTNEISD	INNETNYVYN	TNTNSEQLDN	FNKNKDNPI	LEITEEQIYN	SELGISDDNK
370	380	390	400	410	420
TKVSEQQHDI	DTLPKNLLNR	NRCHITTSQI	YQFIDNNELI	KKKKNKKVVY	VDGSFDIFHI
430	440	450	460	470	480
GHLRILENAK	KLGDYLLVGM	HSDEVVQMK	GKYFPVVSLL	ERTLNLVAMK	VDDVVIQAP
490	500	510	520	530	540
WVITESFIKR	FHIDVVVRGT	IVDYIYSNNE	IDPYDIPKKL	NIYQELSES	NITTYEIIQR
550	560	570			
IEKNKKYLMR	NMSKRNKKEE	SIWETSNTYA	INN		

**Figure 25. Séquence primaire de la PfECT**

Les domaines CT sont indiqués en violet. Les deux motifs de liaison du CTP (HxGH) sont en rouge, le motif de dimérisation ((R/K)(Y/W)VDEV(V/I)) est en bleu et la signature des cytidyltransférases (RTxGVST(T/S)) est en vert.



**Figure 26. Alignement des séquences en acides aminés des ECT de différents organismes.** Les séquences des ECT de *Rattus norvegicus* (rat ECTα), *Homo sapiens* (human ECTα), *A. thaliana*, *T. brucei*, *S. cerevisiae*, *B. bovis* et de *P. falciparum* sont présentées. Les motifs de liaison du CTP, la signature des cytidylyltransférases et le motif de dimérisation intra-chaîne sont encadrés respectivement en orange, bleu et vert. Les domaines CT-1 et CT-2 sont respectivement indiqués par un trait violet et jaune.

### 3.3. Localisation cellulaire et distribution tissulaire

Les études réalisées sur les ECT de différents organismes semblent indiquer des différences notables en termes de localisation au sein de la cellule. Des études biochimiques réalisées par centrifugation différentielle ou par perméabilisation à la digitonine ont montré que la Pcyt2 des hépatocytes de rat est retrouvée seulement dans la fraction cytosolique, en accord avec l'absence de domaine de liaison à la membrane (Vermeulen et al. 1993). Toutefois, la localisation de la protéine par microscopie électronique a montré que Pcyt2 n'est pas aléatoirement distribuée à travers le cytoplasme mais est en partie associée au RE ou concentrée entre les citernes du RE. Cette localisation suggère que la protéine puisse interagir de manière réversible avec la membrane du RE où est également localisée la dernière enzyme de la voie de Kennedy, l'éthanolamine phosphate transférase (EPT) (van Hellemond et al. 1994). La ECT est également retrouvée dans le cytoplasme du parasite *Trypanosoma brucei* par immunofluorescence, sans toutefois présenter un marquage typique du RE (Gibellini et al. 2009). A l'inverse, chez les plantes *Arabidopsis thaliana* et *Ricinus communis* et l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la ECT est principalement localisée à la mitochondrie (Tang and Moore Jr 1997; Yang et al. 2004; Mizoi et al. 2006). Ces différences de localisation entre les organismes photosynthétiques, les unicellulaires non photosynthétiques et les mammifères pourraient signifier l'existence de différents mécanismes de régulation. Chez les mammifères, les isoformes de la ECT diffèrent significativement concernant leur niveau d'expression au sein des différents types cellulaires. Chez le rat, Pcyt2 $\alpha$  est l'isoforme prédominant dans tous les tissus et est particulièrement surexprimé dans foie et le rein. Pcyt2 $\beta$  et Pcyt2 $\gamma$  sont également exprimés de manière ubiquitaire mais en quantité plus faible (Tie and Bakovic 2007; Pavlovic et al. 2014a).

Chez *Plasmodium*, l'expression et la localisation de la ECT n'ont pour le moment été étudiées que lors des stades intra-érythrocytaires asexués chez *P. berghei* (Dechamps et al. 2010c). PbECT étiquetée GFP est retrouvée dans le cytosol avec la présence de zones de concentrations ne pouvant toutefois pas être associées à un organite spécifique. Concernant les autres phases du cycle de vie du parasite, des études de protéomique réalisées chez les gamétocytes et les sporozoïtes de *P. falciparum* ont identifié plusieurs peptides de la PfECT, semblant indiquer que l'enzyme est exprimée à ces stades (Silvestrini et al. 2010; Lindner et

al. 2013). En revanche, la PyECT n'a pas été détectée lors d'une étude protéomique aux stades hépatiques de *P. yoelii* (Tarun et al. 2008).

### 3.4. Caractérisation biochimique et régulation

#### 3.4.1. Etudes enzymatiques

A l'inverse des CCT, l'activité enzymatique des ECT n'est pas dépendante de la présence de lipides exogènes, en accord avec l'absence de domaine de liaison aux membranes et leur localisation cytosolique (Vermeulen et al. 1993). La première ECT à avoir été caractérisée enzymatiquement est celle du rat, purifiée directement à partir du foie (Sundler 1975). Comme toutes les ECT étudiées depuis, son activité est strictement dépendante de la présence d'agent réducteur et de cations divalents, l'activité maximale étant obtenue en présence de magnésium. Seuls les paramètres enzymatiques des ECT du rat (Sundler 1975), de *T. brucei* (Gibellini et al. 2009), de la Pcyt2 $\beta$  humaine (Tian et al. 2014) et des deux isoformes Pcyt2 $\alpha$  et Pcyt  $\beta$  de la souris (Tie and Bakovic 2007) ont été déterminés à ce jour (résumés dans le tableau 3). D'une manière générale, les ECT possèdent des affinités similaires de l'ordre du  $\mu\text{M}$  pour leurs deux substrats : le CTP et la phosphoéthanolamine (P-Etn). Grâce à des études d'inhibition par le produit CDP-Etn et des expériences d'échange d'isotopes, il a été montré que la réaction catalysée par la ECT du rat suit un mécanisme de type séquentiel (formation d'un complexe ternaire) de manière similaire aux GCT et CCT (Sundler 1975; Tie and Bakovic 2007). Toutefois, l'ordre d'addition des substrats n'est pas aléatoire mais ordonné, avec la liaison du CTP précédant celle de la P-Etn. Cette différence notable vis-à-vis des CCT et de certaines GCT est surprenante et, à ce jour une seule étude mécanistique de ce type a été réalisée chez les ECT (Sundler 1975).

Tableau 3. Paramètres enzymatiques de différentes ECT

Organisme	Nature	<i>K<sub>m</sub></i> CTP μM	<i>K<sub>m</sub></i> P-Etn μM	<i>V<sub>max</sub></i>
<i>Mus musculus</i> Pcyt2α*	recombinante	102	318,4	138 nmol/min/μmol
<i>Mus musculus</i> Pcyt2β*	recombinante	84,1	140,3	114,4 nmol/min/μmol
<i>T. brucei</i> <sup>§</sup>	recombinante	12,67 ± 0,78	12,09 ± 0,87	1,55 ± 0,03 nmol/min/μg
<i>Homo sapiens</i> Pcyt2β <sup>†</sup>	recombinante	48 ± 9	179 ± 27	0,33 ± 0,01 nmol/min/μg
<i>Rattus norvegicus</i> <sup>‡</sup>	Purifiée à partir du foie	53	65	-

\* (Tie and Bakovic 2007), § (Gibellini et al. 2009), † (Tian et al. 2014), ‡ (Sundler 1975)

Les ECT semblent posséder une forte spécificité vis-à-vis du nucléoside triphosphate (CTP) et du phosphomonoester (P-Etn). En effet, les ECT du rat et de *T. brucei* ne sont pas actives en présence d'ATP, d'UTP ou de GTP comme substrat (Vermeulen et al. 1994; Gibellini et al. 2009). Elles peuvent toutefois utiliser le désoxycytidine triphosphate (dCTP) mais avec une plus faible efficacité catalytique qu'en présence de CTP. L'enzyme est donc capable de faire la distinction entre les groupes fonctionnels désoxyribonucléotide et ribonucléotide. De même, la ECT du rat est spécifique de la P-Etn et ne présente aucune activité en présence de P-Cho, suggérant des différences structurales importantes entre les ECT et CCT pour la reconnaissance du substrat phosphomonoester (Vermeulen et al. 1994).

L'analyse des séquences des domaines CT-2 de ECT appartenant à divers organismes a montré une conservation partielle des motifs communément retrouvés chez la famille des cytidyltransférases. Le motif HxGH, essentiel pour l'activité catalytique est conservé, à l'exception de *S. cerevisiae*, mais le motif RTxGVST(T/S) n'est pas totalement conservé chez l'ensemble des ECT. Cette observation soulève la question de l'activité du domaine CT-2 chez les ECT. Nous avons montré récemment que seul le domaine CT-1 est en fait responsable de l'activité catalytique chez la PfECT. En effet, l'inactivation du domaine CT-1 par le remplacement de la seconde histidine du motif HxGH par une alanine résulte en la perte totale de l'activité catalytique *in vitro*. La mutation équivalente réalisée dans le domaine CT-2

n'affecte pas les paramètres catalytiques de la *PfECT* sauvage (Maheshwari et al. 2013). Récemment, une étude similaire sur la *Pcyt2 $\beta$*  humaine a montré que seule l'inactivation du domaine CT-1 provoque la perte de l'activité cytidylyltransférase *in vitro* sur protéine recombinante mais également *in vivo* chez la levure (Tian et al. 2014). Néanmoins, des données contradictoires suggérant que les deux domaines CT sont responsables de l'activité catalytique ont été obtenues chez la *Pcyt2 $\alpha$*  de la souris (Pavlovic et al. 2014a). Dans cette étude, le remplacement de la première ou de la deuxième histidine du motif HxGH par une alanine dans les deux domaines CT provoque une baisse drastique de l'activité cytidylyltransférase chez des cellules COS7 exprimant ces différents mutants. Le rôle du domaine CT-2 chez les ECT est donc sujet à controverse et nous reviendrons plus en détail sur cet aspect dans la partie Résultats.

### 3.4.2. Régulation

La régulation des ECT au niveau protéique reste peu étudiée et assez méconnue, en l'absence d'un mécanisme de translocation à la membrane clairement identifié, comme il en existe un pour les CCT. Les données disponibles proviennent uniquement d'études réalisées chez les mammifères, exprimant plusieurs isoformes de la protéine. Chez la souris, il a été montré que *Pcyt2 $\alpha$*  et *Pcyt2 $\beta$*  surexprimées chez des cellules COS-7 diffèrent par leur niveau d'activité, la *Pcyt2 $\alpha$*  étant quatre fois plus active que la *Pcyt2 $\beta$* . Ces deux isoformes diffèrent seulement par une séquence de 18 acides aminés dans la région de liaison de *Pcyt2 $\alpha$*  et il a été proposé que celle-ci joue un rôle majeur dans la modulation de l'activité de *Pcyt2* (Tie and Bakovic 2007). Il a également été montré que *Pcyt2 $\alpha$*  et *Pcyt2 $\beta$*  n'existent que sous forme dimérique,  $\alpha/\alpha$  et  $\beta/\beta$  mais également  $\alpha/\beta$  et le ratio homodimère/hétérodimère pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'enzyme. Toutefois, aucune évidence expérimentale ne permet de valider ces hypothèses. Une étude récente de la même équipe a mis en évidence l'existence d'un isoforme catalytiquement inactif (*Pcyt2 $\gamma$* ), ne possédant que le domaine CT-1 (identique à celui de *Pcyt2 $\alpha$*  et *Pcyt2 $\beta$* ). Il a été suggéré que *Pcyt2 $\gamma$*  puisse interagir avec *Pcyt2 $\alpha$*  et interférer avec sa fonction en formant un complexe protéique inactif qui serait également dégradé de manière préférentielle par le protéasome (Pavlovic et al. 2014a).



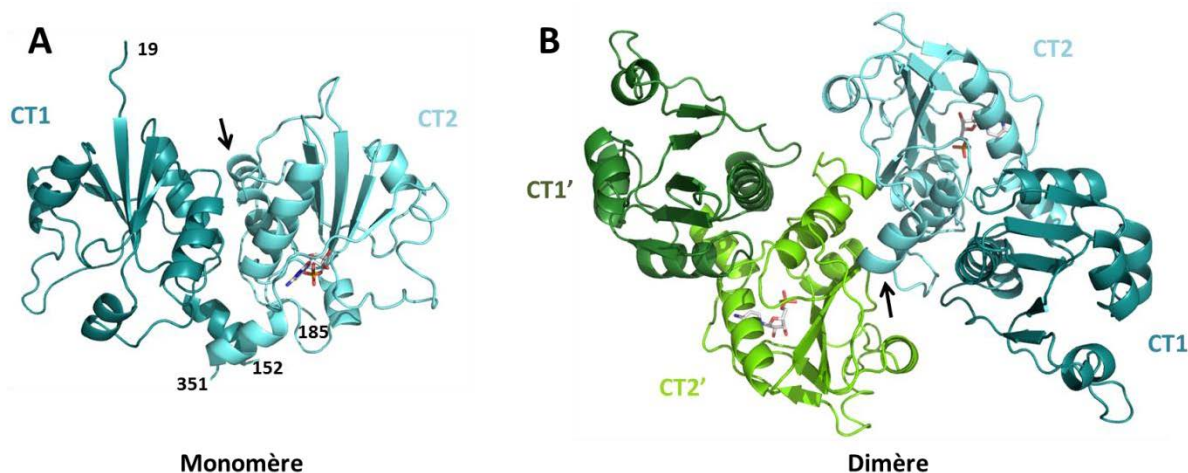
L'activité de la Pcyt2 humaine est augmentée en condition de déprivation en sérum dans des cellules de cancer du sein, s'accompagnant d'une augmentation du niveau de phosphorylation de l'enzyme (Zhu and Bakovic 2012). Des analyses par spectrométrie de masse ont récemment montré que les isoformes Pcyt2 $\alpha$  et Pcyt2 $\beta$  de la souris sont phosphorylés de manière particulièrement distincte dans ces conditions (Pavlovic et al. 2014b). Notamment, les trois derniers résidus du motif RTQGVSTT ont été identifiés comme phosphorylés et ce, uniquement chez Pcyt2 $\beta$  en absence de sérum. La plupart des sites de phosphorylation ont été identifiés dans la région de liaison, dont deux sont spécifiques de Pcyt2 $\alpha$ . Les kinases impliquées demeurent inconnues à l'exception de la protéine kinase C (PKC), responsable de deux phosphorylations chez Pcyt2 $\alpha$  uniquement. Il est maintenant bien établi que des activateurs de la protéine kinase C (PKC), comme le phorbol ester, augmentent la production de PE (Tijburg et al. 1987; Kiss 1997). Toutefois, le mécanisme par lequel PKC régule la synthèse de PE n'est pas élucidé. L'activation de Pcyt2 $\alpha$  par PKC pourrait constituer une des pièces du puzzle. Toutefois, le rôle direct de ces phosphorylations sur la structure et l'activité de Pcyt2 $\alpha$  et Pcyt2 $\beta$  reste sujet à spéculation, notamment parce que la majorité des sites sont localisés dans la région de liaison dont la structure cristallographique n'est pas résolue. Comment les phosphorylations présentes dans le motif RTQGVSTT, interagissant avec le CTP, augmentent l'activité de Pcyt2 $\beta$  reste également particulièrement intrigant (Zhu and Bakovic 2012).

Il faut noter que les sites de phosphorylation identifiés chez les Pcyt2 $\alpha$  et Pcyt2 $\beta$  humaines ne sont absolument pas conservés chez *P. falciparum* et que le parasite ne possède pas d'homologue de PKC. Néanmoins, deux sérines ont été identifiées comme phosphorylées chez la PfECT lors d'une étude de phosphoprotéomique et il est donc envisageable que la protéine soit substrat d'autres kinases chez *Plasmodium* (Treeck et al. 2011).

### 3.5. Données structurales

Une seule structure cristallographique de ECT est actuellement disponible dans la Protein Data Bank (PDB). Il s'agit de celle de la Pcyt2 $\alpha$  humaine (18-356) en complexe avec le CMP, résolue en 2008 par un consortium et n'ayant pas encore fait l'objet d'une publication (Structural Genomic Consortium, PDB:3ELB). Seule la structure des domaines CT est résolue

[19-152/185-351], indiquant que la majorité de la région de liaison est flexible. Les deux domaines CT présentent un repliement similaire à celui observé pour les *BsGCT*, *SaGCT* et *RnCCT*, formant cette fois-ci un « dimère intra-chaine » (Figure 27A). Toutefois, une seconde unité biologique dimérique est également proposée dans laquelle les deux monomères de *Pcyt2 $\alpha$*  interagissent *via* les domaines CT-2 et plus particulièrement par une hélice  $\alpha$  initialement décrite comme faisant partie de la région de liaison (Figure 27B). Cette hélice est constituée de la séquence TSQKIIQF, partiellement conservée chez *Plasmodium*. Différentes structures quaternaires des ECT ont été décrites, dimérique chez les mammifères (Sundler 1975; Tie and Bakovic 2007) et monomérique chez *T. brucei* (Gibellini et al. 2009). Il faut également noter que, dans la structure de la *HsECT* (PDB:3ELB), le ligand CMP n'est retrouvé que dans le domaine CT-2 qui a été identifié comme catalytiquement inactif chez la *Pcyt2  $\alpha$*  et la *PfECT* (Tian et al. 2014).



**Figure 27. Structures cristallographiques de la *Pcyt2 $\alpha$*  humaine en complexe avec le CMP [3ELB]**

Les deux unités biologiques déposées dans la PDB sont présentées. **A.** Structure monomérique **B.** Structure dimérique. Les flèches indiquent l'hélice impliquée dans la dimérisation.



## ***Résultats***



# Préambule : Présentation des travaux de thèse

---

Le développement de *P. falciparum* dans l'érythrocyte requiert la synthèse massive de phospholipides qui représentent les composants lipidiques majoritaires des membranes parasitaires. La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) constituent ensemble environ 80 % des phospholipides du parasite et sont synthétisés *via* sa propre machinerie en l'absence de métabolisme lipidique au sein de sa cellule hôte (Dechamps et al. 2010b; Botte et al. 2013). Chez *Plasmodium falciparum*, la PC et la PE sont majoritairement synthétisées *de novo* par les voies CDP-choline et CDP-éthanolamine dépendantes du diacylglycérol, également appelées voies de Kennedy. Certaines enzymes de ces voies sont essentielles pour la survie du parasite murin *P. berghei* (Dechamps et al. 2010c). De précédentes études réalisées au laboratoire ont démontré la pertinence de cibler la synthèse de la PC pour le développement de nouveaux antipaludiques en utilisant des analogues de choline capables de bloquer son import par le parasite (Wengelnik et al. 2002). L'arrêt de la synthèse de PC inhibe la croissance parasitaire. Parmi les analogues de choline, le candidat clinique albitiazolium exerce une puissante activité antipaludique à la fois *in vitro* et *in vivo* mais ne peut pas être administré oralement du fait de la présence de charges cationiques (Wein et al. 2012).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'intègrent dans un projet d'étude des voies de biosynthèse *de novo* de la PC et de la PE chez *P. falciparum*. L'objectif est de cibler ces voies pour le développement de nouvelles stratégies antipaludiques présentant un mode d'action original. Parmi les enzymes de ces voies, la CTP:phosphocholine cytidylyltransférase (*PfCCT*) et la CTP:phosphoéthanolamine cytidylyltransférase (*PfECT*) représentent des cibles potentielles de par leur caractère limitant (Ancelin and Vial 1989; Maheshwari et al. 2013) et probablement essentiel chez *P. falciparum* (Dechamps et al. 2010c). Ces deux enzymes sont le sujet d'étude principal des travaux présentés dans ce manuscrit.

Le premier volet du projet abordé au cours de cette thèse a eu pour objectif d'explorer le potentiel de la *PfCCT* comme cible thérapeutique. En d'autres termes, nous avons voulu

déterminer si la *PfCCT* peut être inhibée *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*. Tout d'abord, la caractérisation biochimique de la *PfCCT*, qui présente une duplication atypique de son domaine catalytique, a été réalisée. Puis, en collaboration avec une équipe de chimio-informaticiens à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) à Sophia-Antipolis, nous avons développé un projet visant à identifier des inhibiteurs de la *PfCCT* par criblage virtuel et à évaluer expérimentalement leur activité sur la cible et sur le parasite.

Dans la deuxième partie du projet, nous nous sommes attachés à décortiquer le mode de fonctionnement et de régulation de la *PfECT*, qui pourrait elle aussi représenter une cible intéressante pour le développement de molécules antipaludiques. Grâce à des approches biochimiques, biophysiques et structurales, nous avons disséqué le mécanisme catalytique de l'enzyme et répondu à un certain nombre de questions. Comment la *PfECT* interagit-elle avec ses substrats et produits ? Comment s'opère la catalyse chez cette enzyme ? Comme nous l'avons vu en introduction, les ECT possèdent deux domaines cytidyltransférases distincts, dont un semble avoir perdu sa capacité de catalyse au cours de l'évolution. Nous nous sommes donc intéressés au rôle que peut jouer ce domaine, en termes de régulation et/ou de stabilité conformationnelle de la protéine.

Enfin, un travail collaboratif avec l'équipe du Pr. Beatá Vertessy à l'Institut d'Enzymologie de Budapest, ayant pour but la caractérisation enzymatique et structurale du mode de liaison des ammoniums quaternaires (choline), est présenté brièvement dans ce manuscrit.

# Chapitre I. Caractérisation biochimique et inhibition de la *PfCCT*

---

Le caractère limitant et probablement essentiel de la *PfCCT* dans la voie de synthèse *de novo* de la PC en font une nouvelle cible attractive pour le développement de molécules bloquant la synthèse de PC chez le parasite. Cette première partie des travaux de thèse a donc eu pour objectif d'explorer le potentiel de la *PfCCT* comme cible antipaludique, par la recherche et l'évaluation de composés capables d'inhiber son activité enzymatique. En l'absence d'un test biochimique moyen ou haut débit nous permettant de cribler un grand nombre de molécules en un temps et un coût raisonnables, nous avons utilisé une approche de criblage virtuel de chimiothèques commerciales basé sur le ligand (ligand-based virtual screening) et sur la structure de l'enzyme (structure-based virtual screening) afin de réduire à environ une dizaine le nombre de molécules candidates. Ce volet du projet a été développé en collaboration avec l'équipe du Dr. Dominique Dougnet à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) à Sophia-Antipolis. Dans ce chapitre, nous détaillerons la caractérisation biochimique de la cible *PfCCT* ainsi que l'évaluation expérimentale des candidats inhibiteurs obtenus à l'issue du criblage virtuel (Pihan 2013).

## 1. Matériels et Méthodes

### 1.1. Obtention des parasites *P. falciparum*

#### 1.1.1. Culture de *P. falciparum* *in vitro*

La souche 3D7 de *P. falciparum*, obtenue *via* le Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, est maintenue en culture asynchrone dans des globules rouges (GR) humains de groupe O<sup>+</sup> (Etablissement Français du Sang, EFS), préalablement lavés en milieu RPMI 1640 afin d'éliminer le sérum et les leucocytes. Les GR parasités sont cultivés en flasque à 5 % d'hématocrite en milieu RPMI 1640 (Gibco) additionné de 25 mM HEPES, 10



% v/v sérum humain AB<sup>+</sup> et 40 µg/ml gentamycine (Trager and Jensen 1976). Le milieu complet est changé quotidiennement et la culture est diluée régulièrement afin de maintenir une parasitémie inférieure à 8 %. La culture est maintenue dans une étuve à 37 °C et sous une atmosphère 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> et 90 % N<sub>2</sub>. Afin de suivre l'évolution de la parasitémie ainsi que l'état général de la culture, un frottis sur lame est réalisé à chaque changement de milieu et observé au microscope optique. En pratique, le frottis est fixé au méthanol puis coloré selon la méthode Giemsa permettant la coloration des GR en rouge et des parasites en bleu/violet.

### **1.1.2. Synchronisation des cultures**

Lorsque nécessaire, les cultures de *P. falciparum* sont synchronisées par deux traitements espacés de 26 h au D-sorbitol qui permet la lyse spécifique des GR infectés par les parasites matures (trophozoïte et schizonte)(Lambros and Vanderberg 1979). Après centrifugation de la culture à 200 g pendant 10 min, le culot de GR est resuspendu dans 5 fois son volume de 5 % D-sorbitol (dans H<sub>2</sub>O) préalablement chauffé à 37 °C. Les parasites en solution sont laissés à incuber pendant 5 min à température ambiante puis centrifugés à 200 g pendant 5 min. Le culot de GR infectés par les parasites au stade anneau est ensuite lavé deux fois en milieu complet puis remis en culture.

### **1.1.3. Isolement des parasites**

Un traitement à la saponine est effectué afin de lyser les globules rouges et isoler les parasites. La saponine agit sur la perméabilité des membranes du globule rouge en complexant le cholestérol. Elle laisse donc intactes les membranes du parasite qui n'en contiennent qu'une infime proportion. Après centrifugation de la culture à 200 g pendant 10 min, le culot de GR est resuspendu dans 10 fois son volume de 0,01 % saponine (en RPMI 1640). Les parasites sont incubés à 4 °C pendant 5 min puis centrifugés à 400 g pendant 10 min. Le surnageant contenant les GR lysés est éliminé et le culot de parasite est ensuite lavé 3 fois en milieu RPMI 1640. Les parasites isolés sont ensuite conservés à -20 °C.

## 1.2. Western blot et immunofluorescence pour la localisation sub-cellulaire de *P. falciparum*

L'anticorps polyclonal utilisé pour les analyses par Western blot et par immunofluorescence a été produit par immunisation de souris BALB/c par injection sous-cutanée de la protéine recombinante *PfCCT*<sub>(617-769)</sub> (Maheshwari 2012).

### 1.2.1. Fractionnement cellulaire et analyse par Western blot

Les parasites schizontes isolés après traitement à la saponine sont lysés hypotoniquement 15 minutes sur glace dans un mélange eau + anti-protéases. 40 µl d'extrait total est conservé à 4 °C et le reste de l'échantillon est ensuite centrifugé à 55 000 g pendant 30 min à 4 °C pour séparer les fractions solubles et membranaires. Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré et le culot membranaire est repris par un volume d'eau + anti-protéases identique au volume de surnageant. 40 µl de la fraction soluble et de la fraction membranaire sont récupérés et les échantillons correspondant aux parasites totaux, fraction membranaire et fraction soluble sont ensuite incubés à 99 °C pendant 5 min en présence de 10 µl de tampon Laemmli. Un volume correspondant à  $5 \cdot 10^6$  parasites par échantillon est séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10 %) en présence de SDS puis transféré sur membrane de nitrocellulose par transfert liquide. Pour l'analyse par Western blot, l'anticorps primaire anti-*PfCCT*<sub>(617-769)</sub> est utilisé à dilution 1/400<sup>e</sup>. L'anticorps secondaire anti-souris couplé à la phosphatase alcaline est utilisé à dilution 1/6000<sup>e</sup> (anti-mouse IgG AP conjugate, Promega). La révélation est effectuée à l'aide du kit BCIP/NBT color development substrate (Promega).

### 1.2.2. Analyse par immunofluorescence

Les globules rouges infectés sont fixés pendant 4 h à température ambiante dans 4 % paraformaldéhyde puis lavés deux fois en PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées dans 0,1 % Triton X-100 pendant 10 min, bloquées dans 2 % sérum de veau fœtal (SVF) et incubées avec l'anticorps anti-*PfCCT*<sub>(617-769)</sub> (dilution 1:200) dans 2% SVF. Après trois lavages, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris IgG Alexa Fluor red 594 à dilution 1:1000 (Invitrogen) dans 2 % SVF. Après trois lavages, les cellules sont montées sur une lame recouverte de poly-lysine à l'aide du milieu de montage Vectashield-DAPI (Vector Laboratories Inc.). Les parasites sont ensuite observés à l'aide du microscope à

épifluorescence Zeiss Axioimager équipé d'un apotome (Carl Zeiss Inc.). Les images sont acquises avec un objectif à immersion x63 et analysées à l'aide des logiciels Axiovision (Carl Zeiss Inc.) et Image J (MacBiophotonics).

### 1.3. Clonage, expression et purification des domaines CT recombinants

#### 1.3.1. Clonage des domaines CT (1-210) et (528-795)

Les séquences des amorces utilisées pour les clonages et mutagenèses dirigées sont données en annexes de ce manuscrit.

La séquence codante de la *PfCCT* (PlasmoDB : PF3D7\_1316600) a été optimisée pour l'expression de la protéine chez *Escherichia coli* (GeneScript). Les séquences codantes des *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> ont été amplifiées par PCR avec une polymérase de haute-fidélité (Phusion Polymérase, New England Biolabs) en introduisant les sites de restriction NdeI et BamHI, respectivement en 5' et 3' des séquences codantes. Les fragments PCR purifiés ont ensuite été sous-clonés dans le vecteur PCR Blunt II Topo (Life technologies) puis séquencés (Eurofins Genomics). Le clonage final dans le vecteur d'expression pET15b (Novagen), permettant l'expression de protéines possédant une étiquette 6 x His en N-terminal, a été effectué par digestion du vecteur et des inserts par les enzymes NdeI et BamHI, purification, puis ligation par la T4 ligase (NEB) et transformation dans une souche de *E. coli* XL1-blue. Concernant la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub>, des difficultés de purification de la protéine, probablement dues à une mauvaise accessibilité de l'étiquette 6 x His, nous ont menés à ajouter une seconde étiquette 6 x His en C-terminal. Cette insertion a été effectuée par mutagenèse dirigée en utilisant le kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). La séquence du vecteur final a également été vérifiée par séquençage.

#### 1.3.2. Expression chez *E. coli*

Les vecteurs pET15b *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et pET15b *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> ont été transformés dans la souche *E. coli* BL21(DE3) et les souches d'expression ont ensuite été conservées à -80 °C en présence de 7 % DMSO. Pour l'étape d'expression, une pré-culture de 5 ml est réalisée sur la nuit à 37 °C puis inoculée dans 500 ml de milieu Luria-Bertani (LB) additionné de 50 µg/ml d'ampicilline. La culture est mise à incuber à 37 °C sous agitation jusqu'à ce que sa densité

optique à 600 nm ( $OD_{600}$ ) atteint 0,6, puis la culture est transférée à 16 °C sous agitation. Après 20 minutes d'incubation, l'expression est induite par l'addition de 0,5 mM final d'isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranose (IPTG) et se poursuit pendant 24 h. L'induction est arrêtée par centrifugation de la culture à 3000 g pendant 15 min à 4 °C, puis les culots bactériens sont stockés à -80 °C jusqu'à l'étape de purification.

### 1.3.3. Purification

Les différentes étapes de purification sont réalisées dans un tampon A consistant en 20 mM HEPES pH 7, 400 mM NaCl et 2 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol (pour la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub>) ou 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl et 2 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol (pour la *PfCCT*<sub>(528-795)</sub>). Le culot bactérien provenant de 500 ml de culture est resuspendu dans 50 ml de tampon de lyse constitué du tampon A supplémenté par une tablette d'anti-protéases (Complete EDTA-free, Roche), 0,1% v/v Triton X-100 et 1 mg/ml de lysozyme. Après 30 min sur la glace, les bactéries sont lysées mécaniquement par deux passages en French Press (Thermo Spectronic) sous une pression de 1000 Pa et le lysat est ensuite centrifugé à 40 000 g pendant 50 min, à 4 °C. La purification s'effectue par la suite en deux étapes. Dans un premier temps, le surnageant contenant les protéines recombinantes est passé sur filtre 0,2  $\mu$ m puis déposé sur une colonne de nickel-acide nitrilotriacétique, ou Ni-NTA (HisTrap HP 1 ml, GE Healthcare) à l'aide d'une pompe péristaltique. La protéine est retenue sur la colonne grâce à la présence des étiquettes 6 x His. Le reste de la purification est ensuite réalisé en utilisant le système automatisé ÄKTA Purifier (GE Healthcare) permettant d'éluer les protéines à débit stable et de contrôler le processus de purification en continu à 280 nm. Les lavages et l'élution des protéines sont effectués en 5 paliers de concentrations croissantes en imidazole (20 mM, 75 mM, 150 mM, 250 mM et 500 mM) en solution dans le tampon A à un débit de 1 ml/min. Les protéines sont éluées par 500 mM d'imidazole. Avant de procéder à la deuxième étape de purification, les fractions contenant les protéines recombinantes sont concentrées à un volume final de 1 ml à l'aide d'un concentrateur (Amicon Ultra-15 10 kDa, Merck Millipore) puis centrifugées à 30 000 g pendant 5 min à 4 °C pour éliminer d'éventuels agrégats protéiques. Les protéines sont ensuite injectées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (HiLoad Superdex 200pg S200, GE Healthcare) et l'élution est effectuée en tampon A à un débit constant de 1 ml/min. En fin de purification, les fractions correspondant au pic de  $DO_{280}$  sont récupérées et stockées à 4 °C. La qualité de la purification est vérifiée sur gel SDS-

PAGE 12% et la concentration des fractions protéiques purifiées est déterminée par absorbance à 280 nm (NanoDrop 2000 spectrophotometer, ThermoScientific) en utilisant les coefficients d'extinction molaire de  $26\,930\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (*PfCCT*<sub>(1-210)</sub>) et  $31\,525\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (*PfCCT*<sub>(528-795)</sub>), calculés sur la base de leur composition en acides aminés, à l'aide du serveur ProtParam (ExpASy).

## 1.4. Détermination des paramètres cinétiques et inhibition des domaines CT recombinants

Afin d'étudier les paramètres cinétiques de la *PfCCT* et d'évaluer l'effet de molécules inhibitrices, nous avons utilisé un test enzymatique basé sur la quantification directe du produit CDP-choline formé à partir du substrat radiomarqué [<sup>14</sup>C]P-Cho (Figure 28).

### 1.4.1. Test enzymatique

Le test est typiquement réalisé dans un volume de 50 µl de mélange réactionnel contenant 100 mM HEPES pH 7 (*PfCCT*<sub>(1-210)</sub>) ou 100 mM Tris/HCl pH 8 (*PfCCT*<sub>(528-795)</sub>), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µCi [<sup>14</sup>C]P-Cho et des concentrations finales variables en CTP et P-Cho froide, selon le type de test réalisé. Le mélange est mis à incuber pendant 5 min à 37 °C puis la réaction est initiée par l'ajout de 0,5 µg d'enzyme. Après 10 min de réaction, le mélange est incubé à 99 °C pendant 5 min afin d'arrêter la réaction par inactivation thermique de l'enzyme. 20 µl d'échantillon sont déposés sur une plaque de chromatographie sur couche mince de silice (CCM), préalablement inactivée à 100°C pendant 1 h (TLC silica gel 60 with concentrating zone, Merck). Les substrats et produits de la *PfCCT* sont ensuite séparés pendant 5 h dans un solvant de migration composé de 98 % éthanol/0,5 % NaCl/30 % ammoniac (50:50:1, v/v/v). Afin de détecter le signal radioactif, les plaques de CCM sont exposées sur un écran (storage phosphorscreen, Molecular Biodynamics) pendant au moins 3 h. Le signal est ensuite visualisé par un PhosphoImager (Storm 840, Amersham Biosciences). La silice correspondant à chaque tache de CDP-Cho est excisée et mise à incuber dans 3 ml de liquide à scintillation (Ultima Gold, Perkin Elmer) pendant environ 5 min à température ambiante. La quantification de la radioactivité est ensuite effectuée par un spectrophotomètre à scintillation liquide (LS6500 counter, Beckman).

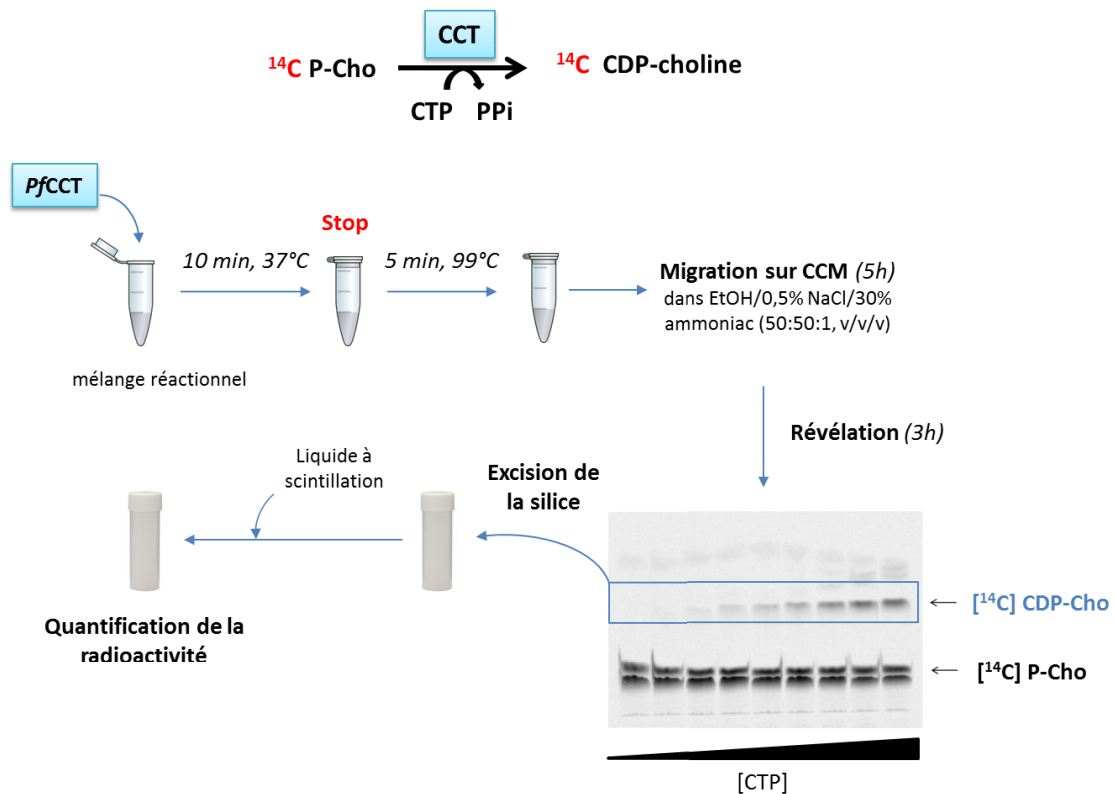


Figure 28. Déroulement du test d'activité enzymatique de la *PfCCT*

#### 1.4.2. Détermination des paramètres cinétiques à l'état quasi-stationnaire

La détermination des paramètres enzymatiques  $K_m$  (constante de Michaelis), permettant d'évaluer l'affinité de l'enzyme pour ses substrats, et la vitesse maximale de la réaction  $V_{max}$  des deux domaines CT de la *PfCCT* a été réalisée selon le test décrit précédemment. En théorie, l'équation de Michaelis-Menten (1) s'applique aux systèmes enzymatiques à un seul substrat. Toutefois, les réactions impliquant deux substrats, comme celle de la *PfCCT*, peuvent être traitées de la même manière à condition que la concentration d'un seul substrat varie (Cornish-Bowden et al. 2005). Pour la détermination des paramètres cinétiques, nous avons donc fait varier la concentration du substrat A et maintenu fixe le substrat B à une concentration saturante, équivalente à 3 fois son  $K_m$ . Les paramètres  $K_m$  et  $V_{max}$  ont ensuite été déterminés à partir de l'analyse des données par l'équation de Michaelis-Menten au moyen du logiciel GraphPad Prism6 (GraphPad software Inc.).

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

où  $v$  (mol.min<sup>-1</sup>) est la vitesse de réaction,  $V_{max}$  (mol.min<sup>-1</sup>) est la vitesse maximale de la réaction,  $K_m$  (M) est la concentration en substrat pour laquelle la moitié de la  $V_{max}$  est atteinte et  $[S]$  (M) est la concentration en substrat.

### 1.4.3. Détermination des paramètres d'inhibition

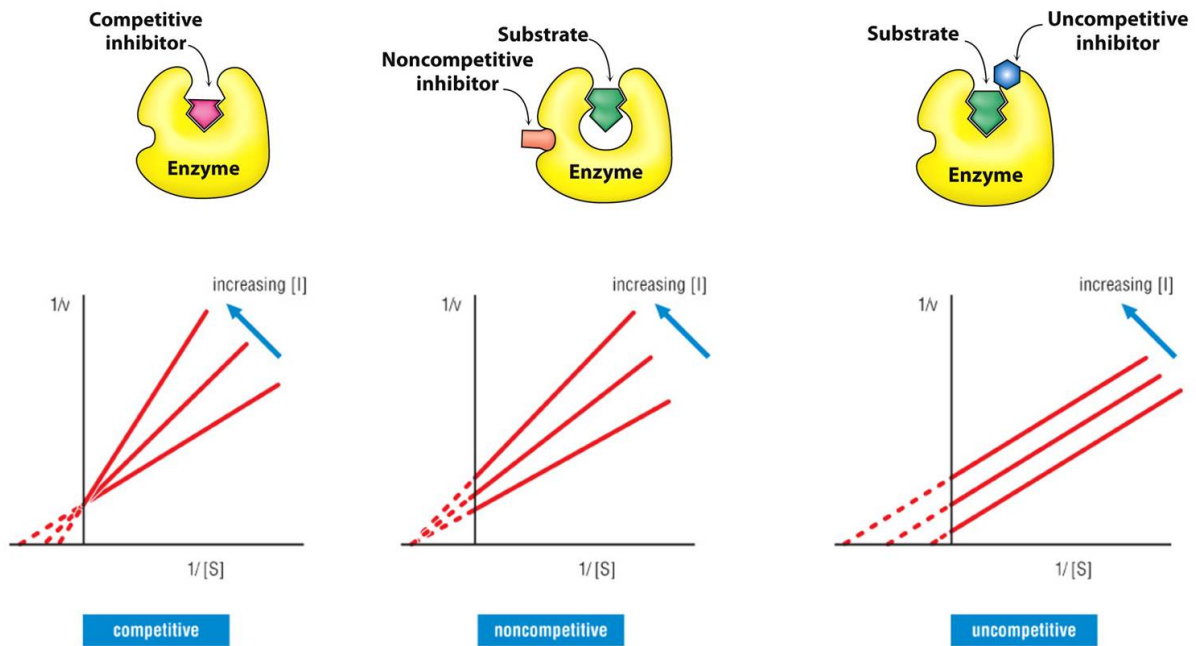
Pour évaluer l'effet des molécules inhibitrices sur l'activité de la PfcCT recombinante, le test enzymatique a été réalisé à concentrations fixes des deux substrats CTP et P-Cho équivalentes à leur  $K_m$ . Les composés dissous dans le DMSO ont été ajoutés au mélange réactionnel en maintenant la quantité de DMSO  $\leq 1\%$  v/v. L'effet inhibiteur des composés est exprimé en fonction de la concentration de composé nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique (CI<sub>50</sub>).

### 1.4.4. Détermination du type d'inhibition

Le type d'inhibition du composé 12 (C12) pour chacun des deux substrats a été déterminé en quantifiant les paramètres enzymatiques  $K_m$  et  $V_{max}$  en présence de concentrations croissantes de composé. Les données ont ensuite été confrontées sur GraphPad aux trois différents modèles d'inhibition : compétitif, non-compétitif, et incompétitif (Figure 29)). Les courbes ont été ajustées avec le modèle d'inhibition compétitif (eq. 2) pour le calcul de la constante d'inhibition  $K_i$ .

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2)$$

où  $v$  (mol.min<sup>-1</sup>) est la vitesse de réaction,  $V_{max}$  (mol.min<sup>-1</sup>) est la vitesse maximale de la réaction,  $K_m$  (M) est la concentration en substrat pour laquelle la moitié de la  $V_{max}$  est atteinte,  $[S]$  (M) est la concentration en substrat,  $[i]$  (M) est la concentration en inhibiteur et  $K_i$  (M) est la constant d'inhibition.



**Figure 29. Les différents types d'inhibition de l'activité enzymatique**

Les types d'inhibition compétitive, non-compétitive et incompétitive sont schématisés avec leur représentation cinétique en double-inverse correspondante. [I] : concentration en inhibiteur, [S] : concentration en substrat, v : vitesse initiale de réaction.

### 1.5. Test d'inhibition de la croissance parasitaire *in vitro*

L'activité antipaludique des composés est évaluée en utilisant un protocole modifié du test de Desjardins, basé sur l'incorporation de [<sup>3</sup>H]hypoxanthine dans les acides nucléiques du parasite après 48 h d'incubation en présence de composé (Desjardins et al. 1979; Ancelin et al. 2003). Le test est réalisé en plaques 96 puits à 1,5 % d'hématocrite et 0,6 % de parasitémie. 30 µl de [<sup>3</sup>H]hypoxanthine (0,6 µCi/puit) en milieu complet sont ajoutés à 200 µl de culture parasitaire et l'incubation est poursuivie pendant 18 h. Les plaques sont ensuite congelées à -80 °C pour arrêter l'incorporation. Les cellules sont lysées par décongélation et l'ADN parasitaire est récupéré en transférant le lysat sur une microplaque à filtres (Unifilter 96 GF/C ; Perkin-Elmer) au moyen d'un collecteur de cellules (FilterMate cell harvester, Packard Instruments). Après ajout de liquide à scintillation, la radioactivité est quantifiée en utilisant un spectrophotomètre à scintillation liquide pour microplaques (Top Count NXT, Perkin-Elmer). Les données sont analysées avec GraphPad Prism6 et l'effet antipaludique des composés est exprimé par la CI<sub>50</sub>, correspondant à la concentration en composé inhibant 50% de la croissance parasitaire.

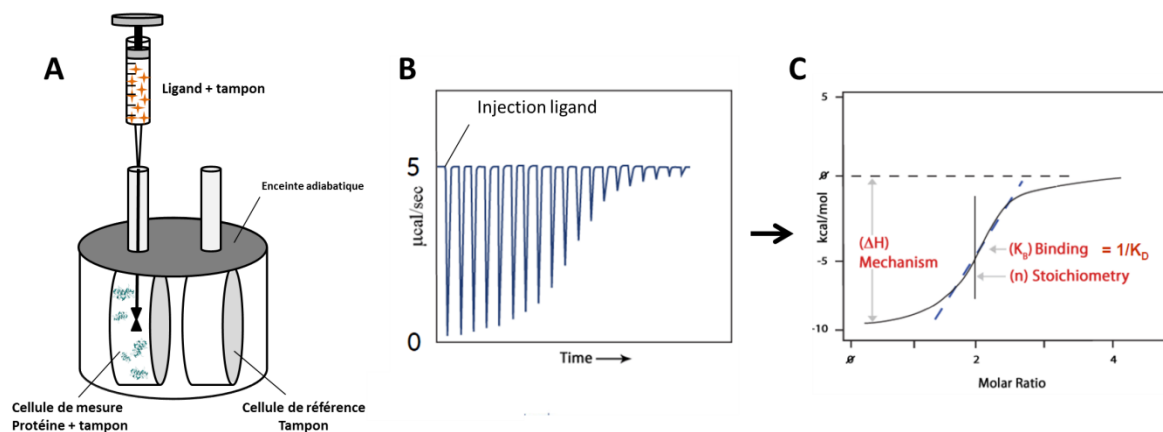


## 1.6. Test d'inhibition de la synthèse de phosphatidylcholine

La synthèse de PC et de PE est évaluée en plaques 96 puits en mesurant l'incorporation de [ $^3\text{H}$ ]choline (20  $\mu\text{M}$ , 0,5 Ci/mmol) et de [ $^3\text{H}$ ]éthanolamine (2  $\mu\text{M}$ , 4,2 Ci/mmol) en PC et PE, respectivement. Les cultures de GR infectés (2 % hématocrite, 5 % parasitémie) sont cultivées dans 150  $\mu\text{l}$  de milieu modifié RPMI 1640 sans choline supplémenté par 25 mM HEPES, avec ou sans composé. Après 30 min à 37 °C, 50  $\mu\text{l}$  de précurseur radiomarqué est ajouté pour une courte incubation de 3 h à 37 °C afin d'éviter tout effet toxique. L'incorporation est arrêtée par congélation des plaques à -80 °C. Les lipides du parasite sont ensuite récupérés et la radioactivité est quantifiée comme décrit précédemment pour le test d'inhibition de la croissance parasitaire. Les résultats sont exprimés en  $\text{CI}_{50(\text{PC})}$  ou  $\text{CI}_{50(\text{PE})}$  correspondant à la concentration en composé réduisant de 50% la quantité de PC ou de PE synthétisée.

## 1.7. Etudes biophysiques des interactions entre la PfcCT et ses ligands

### 1.7.1. Titration calorimétrique isotherme (ITC)



**Figure 30. Principe de la technique de titration calorimétrique isotherme**

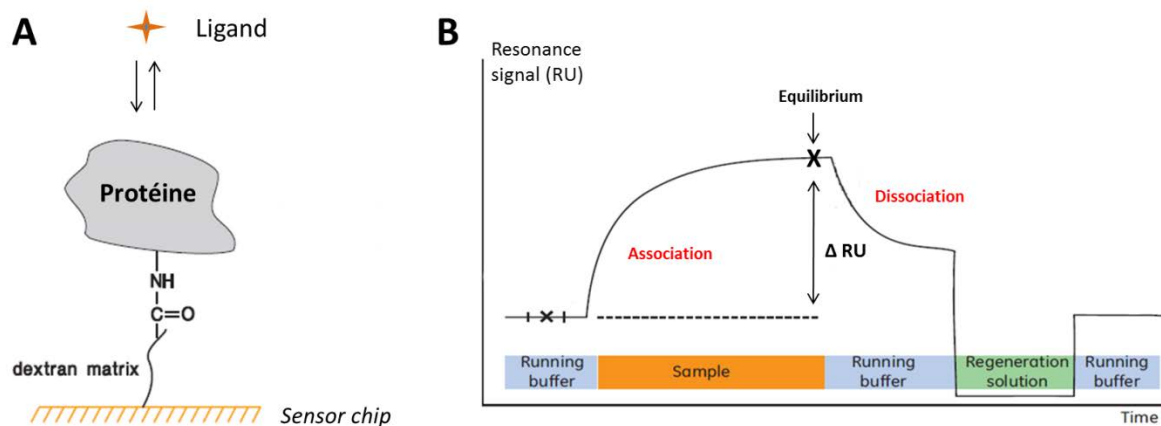
**A.** Montage expérimental. **B.** Déroulement de la titration. A chaque injection, la liaison entre le ligand et la protéine produit une variation de chaleur entre la cellule de mesure et la cellule de référence, visualisée par l'apparition d'un pic suivi par un retour à la ligne de base. Arrivé à saturation, seule la chaleur de dilution du ligand est visualisée, en absence de nouvelle liaison entre la protéine et le ligand. **C.** Intégration des pics de chaleur permettant la détermination des paramètres thermodynamiques. La chaleur est intégrée par mole de ligand en fonction du ratio molaire  $[\text{ligand}]/[\text{protéine}]$ .

L'ITC est une technique thermodynamique basée sur la mesure de la chaleur émise ou absorbée durant le processus de liaison moléculaire. Elle permet de déterminer en une seule expérience la constante de dissociation ( $K_D$ ), la stœchiométrie de liaison (N), l'enthalpie ( $\Delta H$ ) et l'entropie ( $\Delta S$ ). En pratique, la protéine, placée dans une cellule de mesure, est titrée par injections de quantités croissantes de ligand. Le signal mesuré correspond à la quantité de chaleur appliquée par le système pour maintenir une température identique entre la cellule de mesure et la cellule de référence. Le principe de la technique est présenté dans la Figure 30.

Les mesures d'interactions sont réalisées sur un appareil MicroCal-ITC 200 titration calorimeter (GE Healthcare). Les ligands sont dissous ou dilués dans le tampon de purification de la protéine contenant 20 mM HEPES pH 7, 400 mM NaCl et 2 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol (tampon A). Le DMSO, dans lequel est dissous C12, étant très exothermique, sa concentration dans l'échantillon protéique et dans la solution de titration doit être strictement identique pour ne pas produire de chaleur parasite. Pour la titration, la protéine à une concentration de 100  $\mu$ M en tampon A seul, ou additionné de 2 % DMSO, est placée dans la cellule de mesure. La seringue d'injection contient les ligands à une concentration de 1 mM pour la CDP-Cho ou 1,7 mM pour C12 (2 % DMSO final). Chaque titration est réalisée à 20 °C sous agitation à 500 tours/min et consiste en 17 injections de 2,3  $\mu$ L de ligand espacées de 180 sec. La même titration en absence de ligand est ensuite réalisée afin de pouvoir retrancher la chaleur de dilution du tampon. Les données sont analysées à l'aide du logiciel Microcal Origin (OriginLab) pour déterminer les paramètres thermodynamiques selon le modèle d'interaction à un site liaison.

### **1.7.2. Résonance plasmonique de surface (SPR)**

Cette technique se base sur la détection optique des variations de masse induites par la liaison d'un ligand sur une protéine immobilisée, de façon covalente ou non, sur une puce contenant une surface d'or. Le ligand est injecté par un système micro-fluidique dans un flux continu de tampon à la surface de la puce. La masse fixée sur la surface est alors mesurée et visualisée en temps réel (Figure 31).



**Figure 31. Principe de la technique de résonance plasmonique de surface**

**A.** Immobilisation de la protéine sur la puce de dextran par couplage amine. Le ligand est libre en solution. **B.** Déroulement de la mesure. Le ligand en solution est injecté dans le flux. L'augmentation du signal de résonance correspond alors à la phase d'association du ligand jusqu'à atteindre un plateau d'équilibre. Après retour dans le flux de tampon, la diminution du signal correspond à la phase de dissociation.

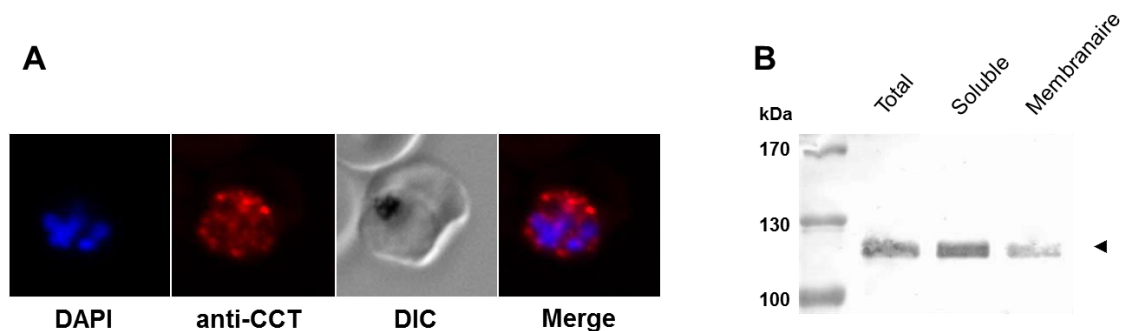
Les études d'interaction entre la  $PfCCT_{(1-210)}$  et C12 ou la CDP-Cho sont réalisées à 20 °C sur un appareil Biacore T200 (GE Healthcare) en tampon 20 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0,005% surfactant P20 (GE Healthcare) à un flux de 30  $\mu$ l/min. La  $PfCCT_{(1-210)}$  est immobilisée de façon covalente sur une puce CM5S (GE Healthcare) par couplage amine, en tampon 10 mM acétate pH 6,2. Pour la détermination des constantes d'affinité, des concentrations croissantes des ligands allant de 25 à 1600  $\mu$ M sont successivement injectées pendant un temps d'association de 150s et dissociés par passage du tampon de flux pendant 400 s. Le guanosine diphosphate (GDP) est utilisé comme contrôle négatif. Les niveaux d'association (RU) à l'équilibre sont reportés en fonction de la concentration en ligand et les données sont analysées à l'aide du logiciel BiaT200-Evaluation (GE Healthcare) selon le modèle de calcul par plateaux à l'équilibre.

## 2. Résultats

### 2.1. Caractérisation biochimique et cellulaire de la *PfCCT*

#### 2.1.1. Localisation sub-cellulaire

Jusqu'à présent, seule la CCT de *P.berghei* a fait l'objet d'une caractérisation cellulaire concernant son expression et sa localisation chez le parasite (Dechamps et al. 2010c). La *PbCCT* étiquetée GFP présente, au stade schizonte, une localisation diffuse à travers le cytoplasme. Afin d'étudier la localisation sub-cellulaire de la CCT de *P. falciparum*, nous avons produit chez la souris des anticorps dirigés contre la protéine recombinante *PfCCT*<sub>(617-769)</sub>, correspondant au domaine CT-2 (Maheshwari 2012). Un signal correspondant à la *PfCCT* n'est observable qu'au stade schizonte par immunofluorescence. Le marquage est diffus avec la présence de signaux plus intenses dans le cytoplasme (Figure 32A). Chez les mammifères, la CCT $\alpha$  est en partie localisée dans le noyau (Wang et al. 1995). Un tel marquage n'est toutefois pas observé pour la *PfCCT*. Ces résultats suggèrent que la *PfCCT* est uniquement localisée dans le cytoplasme du parasite où elle présente certaines zones de plus forte concentration. Une localisation plus précise n'a néanmoins pas pu être réalisée mais notre hypothèse est que la *PfCCT* pourrait être transitoirement associée à la membrane du RE comme observé chez les mammifères (Lykidis et al. 1999) et où réside également la dernière enzyme des voies de Kennedy, la CEPT (Dechamps et al. 2010c).

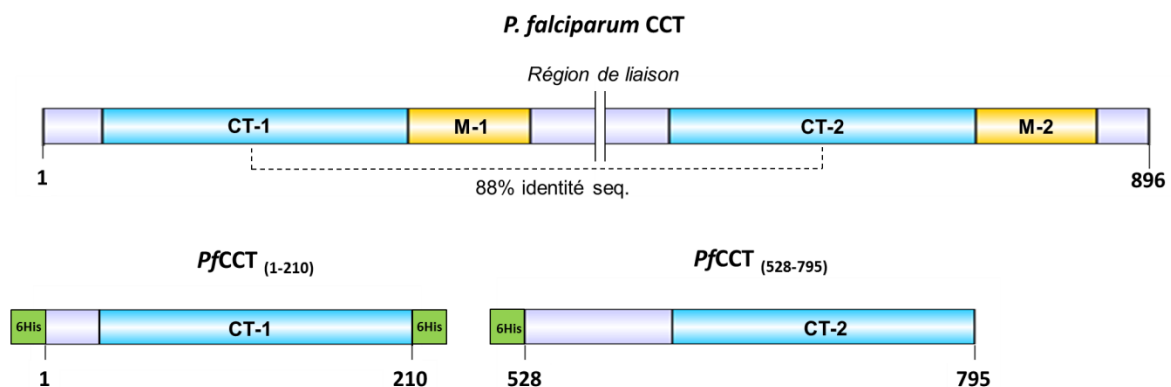


**Figure 32. Localisation sub-cellulaire de la *PfCCT***

**A.** Immunofluorescences réalisées sur des GR parasités par *P. falciparum* au stade schizonte. La *PfCCT* est visualisée via le sérum immun anti *PfCCT* (rouge, dilution 1/200<sup>e</sup>). Le noyau est marqué au DAPI (bleu). L'image de contraste interférentiel différentiel (DIC) montre le contour du GR et du parasite. **B.** Localisation de la *PfCCT* dans les fractions soluble et membranaire de parasites matures purifiés. Western blot réalisé avec le sérum immun anti *PfCCT* (dilution 1/400<sup>e</sup>).

L'analyse par Western blot d'un lysat de parasites schizontes révèle la présence d'une bande unique, correspondant à une protéine d'environ 115 kDa (Figure 32B). Cette bande est spécifique de la *PfCCT*, en absence de signal obtenu avec le sérum pré-immun (Maheshwari 2012). La masse moléculaire apparente est légèrement supérieure à celle prédite sur la base de la composition en acide aminés de la protéine (105 kDa) mais cette différence est souvent observée pour les protéines de *Plasmodium* et pourrait être due à la présence de séquences répétées en résidus polaires. Après fractionnement cellulaire par lyse hypotonique, la *PfCCT* est retrouvée à la fois dans les fractions soluble et insoluble. Ceci suggère une double localisation de la protéine dans le cytosol et liée aux membranes comme décrit notamment chez les CCT mammifères (Stern et al. 1976).

### 2.1.2. Expression et purification des domaines CT recombinants



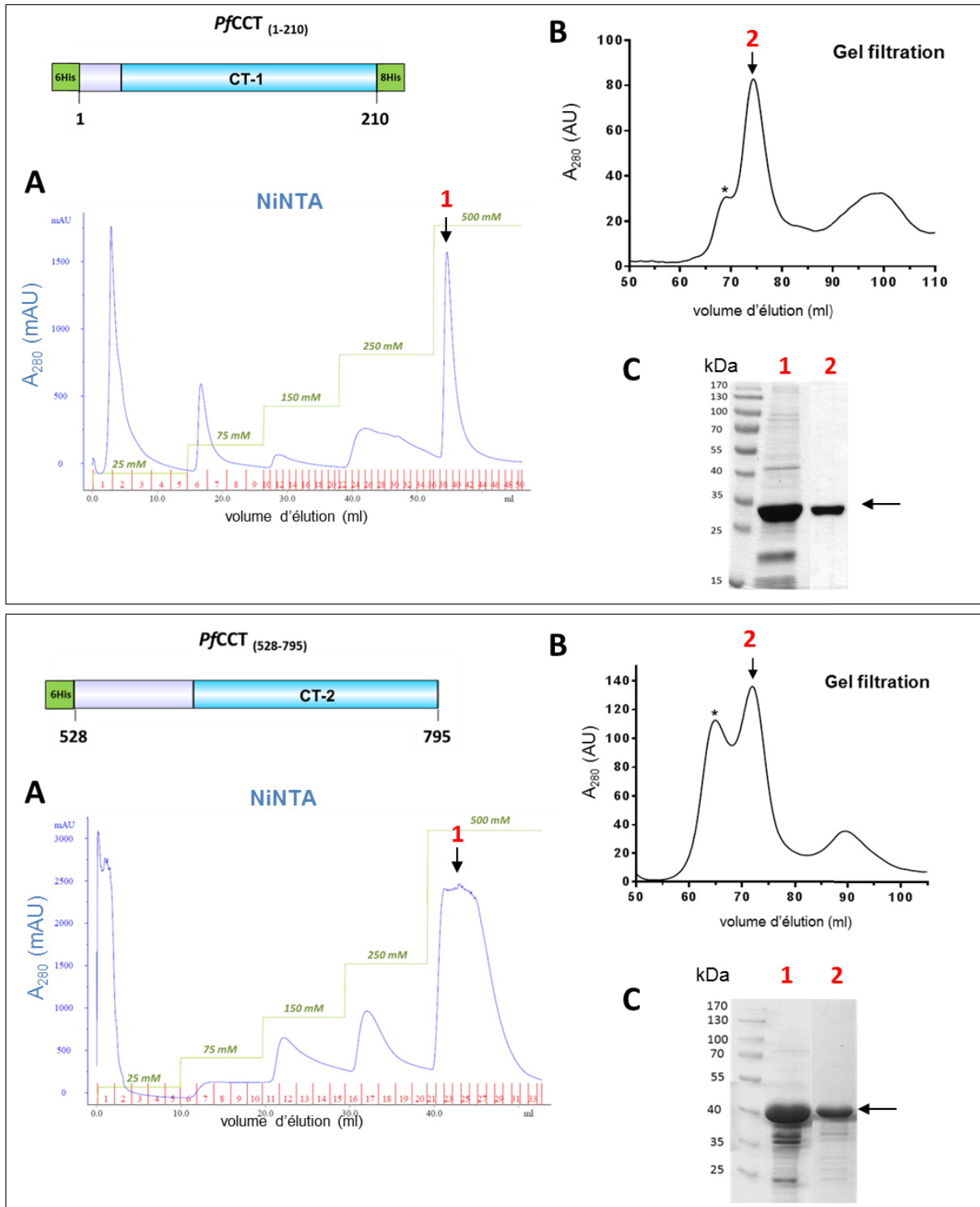
**Figure 33. Organisation des domaines de la *PfCCT* entière et des constructions *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub>**  
 La position des domaines catalytiques (CT, en bleu) et des domaines d'association aux membranes (M, en jaune) est indiquée sur la séquence primaire de la *PfCCT* entière. Les constructions *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> correspondent respectivement aux domaines CT-1 et CT-2 et une partie de leur extension N-terminale. La position des étiquettes poly-His est indiquée en vert.

De nombreux essais d'expression de constructions de la *PfCCT* recombinante comprenant le domaine de liaison à la membrane ont été réalisés au laboratoire, chez *E.coli* et en cellules d'insecte/baculovirus. Toutefois, ces constructions n'ont pas pu être obtenues sous forme soluble et, au mieux, ont parfois nécessité la réalisation d'une étape de dénaturation/renaturation (Yeo et al. 1997). Chez les CCT mammifères, le domaine CT a été identifié comme étant constitutivement actif en l'absence du domaine M (Friesen et al. 1999).

Nous avons donc choisi d'exprimer sous forme recombinante deux constructions comprenant uniquement les domaines CT-1 et CT-2 afin de caractériser indépendamment leurs paramètres cinétiques et d'évaluer l'activité de molécules inhibitrices (Figure 33).

Des données structurales récentes obtenues sur la CCT $\alpha_{(1-236)}$  du rat ont révélé l'importance de l'extension N-terminale du domaine CT (résidus 40 à 75) pour la stabilisation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme (Lee et al. 2009). Gardant ces données à l'esprit, les constructions *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub>, comprenant respectivement les domaines CT-1 et CT-2 ainsi que leur extension N-terminale, ont été clonées dans le vecteur pET15b permettant la surexpression chez *E.coli* de protéines possédant une étiquette poly-His à leur extrémité N-terminale. Les premiers essais de purification de la construction *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel ont montré une mauvaise accessibilité de l'étiquette poly-His. Afin de remédier au problème, nous avons choisi d'ajouter une seconde étiquette poly-His par mutagenèse dirigée en C-terminal de la protéine. Les protéines *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> étiquetées poly-His ont une masse moléculaire respective de 27 kDa et 33 kDa sous leur forme monomérique.

Les protéines retrouvées dans la fraction soluble du lysat bactérien ont été purifiées en deux étapes en utilisant le système de purification automatisé ÄKTA prime (GE Healthcare). Une première purification par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel (Ni-NTA) a été réalisée afin d'éliminer la majorité des protéines contaminantes. Les *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> sont majoritairement éluées à une concentration de 500 mM d'imidazole comme indiqué par le suivi de l'absorbance à 280 nm au cours du processus de purification. Une seconde étape de purification par filtration sur gel sur colonne S200 a ensuite été réalisée afin d'améliorer la pureté des protéines. Leur état d'oligomérisation a pu être évalué à partir des profils d'élution de la colonne de filtration sur gel étalonnée. Les *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> sont éluées sous forme dimérique et tétramérique. Pour la suite des études biochimiques, seules les fractions d'élution correspondant à la forme dimérique des protéines ont été utilisées. Les différentes étapes de purification des deux protéines sont illustrées dans la Figure 34.



**Figure 34. Purification des domaines CT de la PfCCT**

Les profils de purification par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Ni-NTA)(A) et filtration sur gel (B) sont présentés pour les deux constructions  $PfCCT_{(1-210)}$  (cadre supérieur) et  $PfCCT_{(528-795)}$  (cadre inférieur). La pureté des protéines après chaque étape de purification a été analysée par SDS-PAGE 12% (C). La piste 1 correspond au pic d'éluion concentré de la purification par Ni-NTA à 500 mM d'imidazole. La fraction 2 correspond à la fraction la plus concentrée après éluion par filtration sur gel.

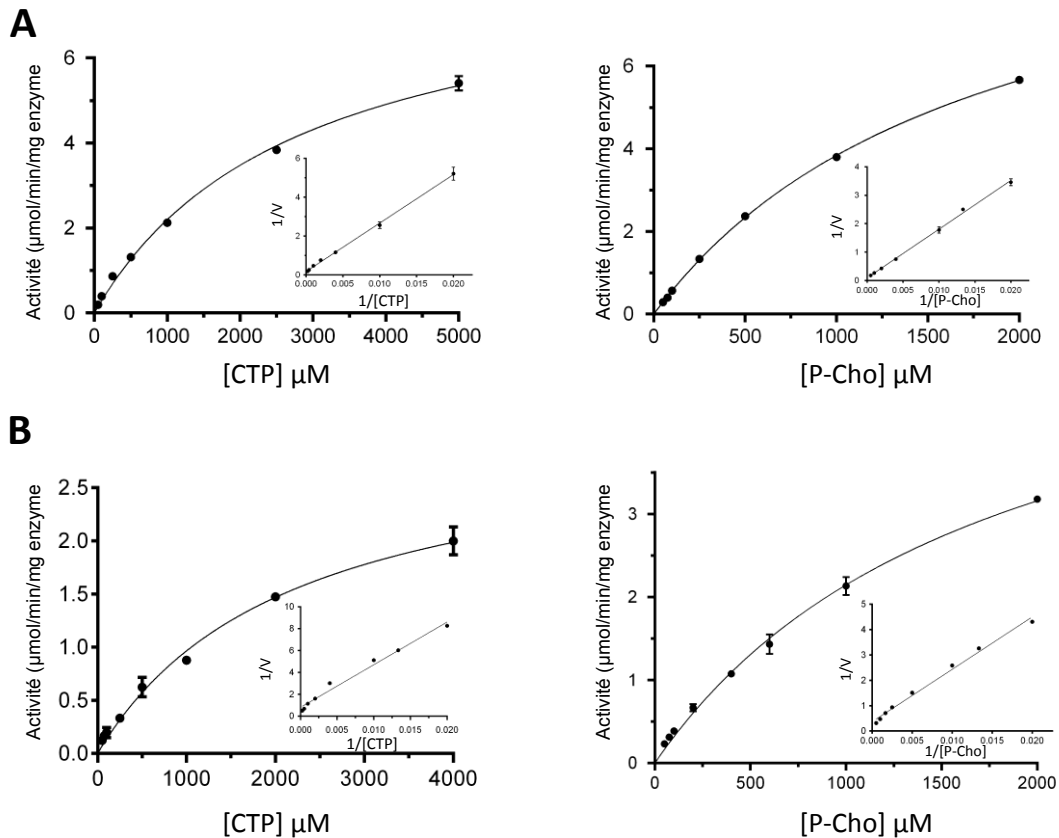
A l'issue des deux étapes de purification, les  $PfCCT_{(1-210)}$  et  $PfCCT_{(528-795)}$  ont une pureté supérieure à 95 % d'après analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. La quantité de protéines purifiées obtenue par l'utilisation de ce protocole optimisé est d'environ 3 à 4 mg de protéines par litre de culture bactérienne. Elles peuvent être conservées à 4 °C jusqu'à 7 jours sans perte d'activité enzymatique mais ne peuvent cependant pas être congelées.

### 2.1.3. Caractérisation enzymatique des domaines CT

Afin d'étudier l'activité catalytique de chacun des domaines CT recombinants, nous avons utilisé un test enzymatique direct basé sur la transformation du substrat radiomarqué [ $^{14}C$ ]Phosphocholine (P-Cho) en produit CDP-Choline. Les paramètres cinétiques ont été déterminés dans les conditions d'état quasi stationnaire et au pH optimum de l'enzyme, c'est-à-dire à pH 7 pour la  $PfCCT_{(1-210)}$  et pH 7,5 pour la  $PfCCT_{(528-795)}$ . Les paramètres cinétiques des domaines CT ont été évalués en incubant l'enzyme avec des concentrations croissantes d'un des substrats tout en maintenant constante la concentration du second substrat. Les activités enzymatiques des  $PfCCT_{(1-210)}$  et  $PfCCT_{(528-795)}$  suivent une cinétique michaelienne vis-à-vis de leurs deux substrats (Figure 35).

Les paramètres cinétiques  $K_m$  (constante de Michaelis) et  $k_{cat}$  (constante catalytique) ont ensuite été déduits à partir des données expérimentales avec l'équation de Michaelis-Menten (Figure 35 et Tableau 4). Les  $PfCCT_{(1-210)}$  et  $PfCCT_{(528-795)}$  possèdent une affinité similaire vis-à-vis du CTP et de la P-Cho de l'ordre du mM, avec une valeur de  $K_m$  pour le CTP de 2,53 mM ( $PfCCT_{(1-210)}$ ) et 5,74 mM ( $PfCCT_{(528-795)}$ ), et une valeur de  $K_m$  pour la P-Cho de 1,10 mM ( $PfCCT_{(1-210)}$ ) et 2,47 mM ( $PfCCT_{(528-795)}$ ). Les deux domaines CT possèdent également une activité catalytique maximale similaire avec un  $k_{cat}$  de 2,96 s $^{-1}$  pour la  $PfCCT_{(1-210)}$  et 2,45 s $^{-1}$  pour la  $PfCCT_{(528-795)}$ .





**Figure 35. Paramètres cinétiques des domaines CT recombinants.**

Courbes de Michaelis-Menten (représentations en double-inverse de Lineweaver-Burk en insertion) représentant l'activité des *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> (A) et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> (B) recombinantes en fonction de la concentration en substrat CTP (gauche) ou P-Cho (droite). Courbes représentatives de 3 expériences réalisées indépendamment en triplicata. Les données représentent la moyenne ± SEM de trois mesures.

Les deux domaines CT de la *PfCCT* sont donc actifs et possèdent des paramètres cinétiques semblables. Leur affinité vis-à-vis de la P-Cho est similaire à celle déterminée pour la *PfCCT* endogène (0,51 mM (Wein et al. 2012)). Les paramètres cinétiques d'une autre construction comprenant le domaine CT-2 de la *PfCCT* [(528–795)<sup>Δ720–737</sup>] ont également été récemment publiés par nos collaborateurs (Nagy et al. 2013). L'affinité pour le CTP de cette construction diffère significativement de celle que nous avons observée, avec un  $K_m$  de 168 μM. Cette divergence de  $K_m$  pour le CTP pourrait s'expliquer par l'utilisation de méthodes de dosage différentes entre nos deux études, celle de nos collaborateurs ayant été réalisée en utilisant un test enzymatique couplé basé sur la détection en continu du produit PP<sub>i</sub>.

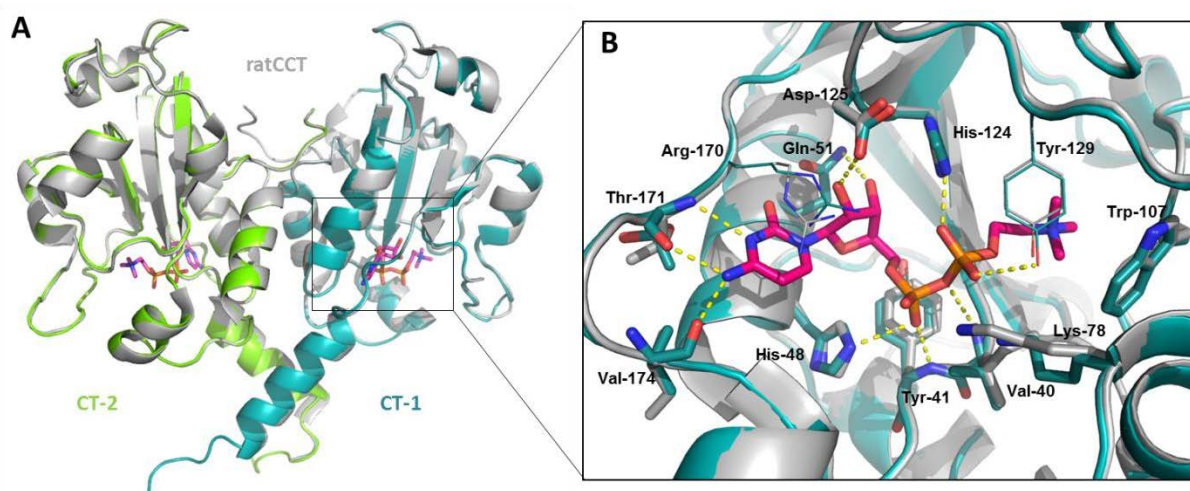
**Tableau 4 . Paramètres cinétiques des *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub>.** Moyennes  $\pm$  SEM des paramètres cinétiques calculées à partir de trois expériences indépendantes.

<i>Enzyme</i>	<i>Substrat</i>	$K_m$ (mM)	$V_{max}$	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
<i>PfCCT</i> <sub>(1-210)</sub>	phosphocholine	1,10 $\pm$ 0,12	6,59 $\pm$ 0,27	2,96 $\pm$ 0,12
	CTP	2,53 $\pm$ 0,62	( $\mu$ mol/min/mg)	
<i>PfCCT</i> <sub>(528-795)</sub>	phosphocholine	2,47 $\pm$ 0,33	4,46 $\pm$ 0,70	2,45 $\pm$ 0,38
	CTP	5,74 $\pm$ 0,37	( $\mu$ mol/min/mg)	

## 2.2. Identification d'inhibiteurs de la *PfCCT* par criblage virtuel basé sur la structure (Coll. D. Douguet)

Cette partie du projet a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Dominique Douguet à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) à Sophia-Antipolis. L'identification de molécules inhibitrices de la *PfCCT* par criblage virtuel a fait l'objet des travaux de thèse d'Emilie Pihan (Pihan 2013). Afin d'expliquer comment ces molécules ont été sélectionnées, la méthode utilisée et le choix des composés sont résumés ci-dessous.

En l'absence de structure cristallographique de la *PfCCT*, un modèle comparatif des domaines CT-1<sub>(8-189)</sub> et CT-2<sub>(581-779)</sub> a été réalisé à partir de la structure du domaine CT de la CCT $\alpha$ <sub>(40-216)</sub> du rat (PDB 3HL4), partageant 44 % d'identité de séquence avec les domaines CT de la *PfCCT*. Le produit de la réaction CDP-choline co-cristallisé avec la *RnCCT* a été conservé afin d'améliorer la qualité du modèle.



**Figure 36. Modèle comparatif des domaines CT de la *PfcCT***

**A.** La structure cristallographique de la *RnCCT*<sub>(40-216)</sub> (PDB 3HL4) est représentée en gris. Le modèle comparatif des domaines CT-1<sub>(8-189)</sub> et CT-2<sub>(581-779)</sub> sont respectivement représentés en bleu et vert. Le ligand CDP-Choline est présent dans les deux sites catalytiques et coloré en rose. **B.** Zoom du site actif du domaine CT-1 (bleu) et de la *RnCCT* (gris). Les résidus impliqués dans la liaison avec la CDP-Cho sont représentés en bâton ainsi que le ligand.

Le modèle comparatif de la *PfcCT* présente une structure très similaire à la *RnCCT* avec la présence d'un repliement de Rossmann (Figure 36A). L'enzyme adopte une conformation en dimère intra-chaîne avec les deux domaines CT en contact, similairement à ce qui est observé pour la structure cristallographique de la ECT humaine (PDB 3ELB). Les résidus impliqués dans la liaison à la CDP-Cho sont totalement conservés entre les domaines CT-1 et CT-2 de la *PfcCT*. En revanche, le site actif de la *PfcCT* présente une différence majeure avec celui de la *RnCCT*. En effet, une glutamine (Gln51) interagissant avec le ribose de la CDP-Cho chez la *PfcCT* est remplacée par une alanine chez la *RnCCT* (Figure 36B).

Afin d'identifier des molécules inhibitrices de la *PfcCT*, un criblage virtuel de banques de composés commerciaux a été réalisé (Pihan 2013). Les données précédemment obtenues par titration calorimétrique isotherme (ITC) ont indiqué que le produit CDP-Cho présente la meilleure affinité pour la *PfcCT* parmi les ligands naturels de l'enzyme, avec un  $K_D$  de  $88,5 \pm 7,2 \mu\text{M}$  (Nagy et al. 2013). Basé sur ces données, et afin de sélectionner des composés spécifiques de la CCT, des molécules mimant la CDP-Cho ont été sélectionnées en utilisant trois méthodes de criblage indépendantes basées sur **1.** la similarité de forme **2.** la recherche d'un pharmacophore et **3.** la similarité de structure avec la CDP-Cho. A l'issue de cette

première étape de criblage basée sur le ligand, plus de 100 000 molécules ont été sélectionnées à partir d'une collection de criblage initiale d'environ 7,5 millions de molécules. Notre test enzymatique ne permettant pas d'évaluer un nombre aussi important de composés, un second filtre basé cette fois-ci sur la structure de la protéine a été employé afin de réduire le nombre de candidats. Les molécules issues de la première étape de criblage ont été amarrées dans le site catalytique du modèle de la *PfCCT*. L'inspection visuelle des poses d'amarrage et l'évaluation des interactions avec les résidus du site actif ont permis de retenir 10 composés suite à cette seconde étape de criblage. En parallèle, trois analogues de choline et un analogue de cytidyl ont également été sélectionnés par recherche de sous-structures.

### 2.3. Evaluation biochimique des composés issus du criblage virtuel

*Les structures chimiques des composés testés sont présentées en annexe de ce manuscrit.*

Les 14 composés issus du criblage virtuel (10 analogues de CDP-Cho, 1 analogue de cytidyl et 3 analogues de choline) ont été évalués pour leur activité inhibitrice sur la *PfCCT* et sur la croissance parasitaire. Sur les 14 composés, 3 ont été éliminés pour des problèmes de stabilité ou de solubilité en solution aqueuse.

#### 2.3.1. Inhibition de l'activité *PfCCT* *in vitro*

L'activité des composés a été évaluée en utilisant le test enzymatique précédemment décrit pour la détermination des paramètres cinétiques des domaines CT recombinants. Dans un premier temps, nous avons réalisé les essais d'inhibition sur la *PfCCT*<sub>(528-795)</sub>, puis nous les avons confirmés sur la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> lorsqu'une inhibition était observée. Les composés ont été testés à une concentration finale en DMSO  $\leq$  à 1%, soit une concentration inférieure à celle inhibant l'activité enzymatique ( $\geq$  5%). Parmi les 12 composés évalués, seul le composé 12 (C12) présente une  $CI_{50} <$  à 1 mM sur l'activité *PfCCT* (Tableau 5). C12 inhibe les deux domaines CT de la *PfCCT* de manière dose dépendante avec une  $CI_{50}$  de 641  $\mu$ M pour la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et 826  $\mu$ M pour la *PfCCT*<sub>(528-795)</sub>. Une inhibition complète est obtenue dans les deux cas, en environ un log de concentration en composé (Figure 37A).

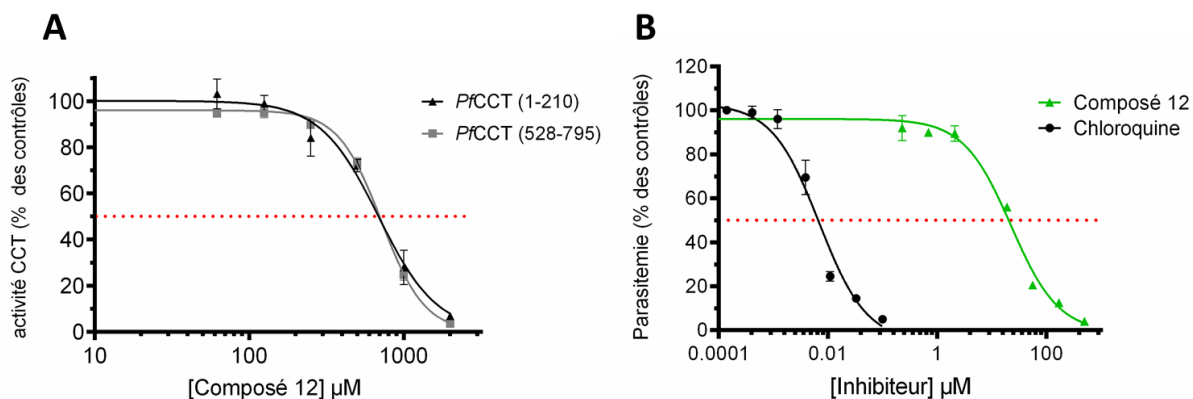
**Tableau 5. Paramètres d'inhibition des 14 composés issus du criblage virtuel sur l'activité enzymatique de la PfCCT recombinante et la croissance de *P. falciparum* in vitro.** Les valeurs correspondent à la moyenne des données obtenues ( $\pm$ SEM quand au moins 3 expériences ont été réalisées). Les méthodes de criblage ayant permis l'identification de chaque composé sont également indiquées.

Composé	Méthode de criblage	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M) PfCCT	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <i>P. falciparum</i>	Observation
1	Forme	1200		instable
2	Forme	>1500		faible solubilité
3	Pharmacophore	>1500	>>500	
4	Forme	>1500	48 $\pm$ 13	
5	Forme	1420	64	
6	Forme			insoluble
7	Analogue de choline	>2000	>>500	
8	Forme	>2000	223	
9	Analogue de choline	>2000	>>500	
10	Analogue de choline			insoluble
11	Analogue de cytidyl	>2000	263	
<b>12</b>	<b>Forme</b>	<b>641 <math>\pm</math>83</b>	<b>42<math>\pm</math>10</b>	
13	Pharmacophore	>2000	254	
14	Sous-structures	>2000	136	

### 2.3.2. Inhibition de la croissance parasitaire

L'activité antipaludique de 10 des 14 composés a été évaluée *in vitro* dans les érythrocytes humains selon la méthode de Desjardins (Desjardins et al. 1979). La culture de *P. falciparum* a été mise en contact avec des concentrations de composé allant de 0 à 500  $\mu$ M pendant une durée de 48 h, puis la croissance parasitaire a été évaluée par mesure de l'incorporation de [<sup>3</sup>H]hypoxanthine, un précurseur des acides nucléiques du parasite. En parallèle, avons également utilisé la chloroquine, un antipaludique commercial, comme contrôle positif. Parmi les composés testés, C4 et C12 présentent la meilleure efficacité d'inhibition de la croissance parasitaire avec, respectivement, une CI<sub>50</sub> de 48  $\mu$ M et 42  $\mu$ M

(Tableau 5). Le composé C12 inhibe totalement la croissance de *P. falciparum* en environ un log de concentration (Figure 37B).



**Figure 37. Inhibition de l'activité *PfCCT* et de la croissance parasitaire *in vitro* par C12**

**A.** Inhibition de l'activité des *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> recombinantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport aux contrôles sans inhibiteur (100% d'activité). **B.** Inhibition de la croissance de *P. falciparum* (3D7) *in vitro* par C12 et par la chloroquine. Les résultats sont exprimés en pourcentage de parasitémie par rapport au contrôle sans inhibiteur. Les courbes présentées sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois mesures.

### 2.3.3. Analogues du composé 12

Suite à l'évaluation des molécules issues du criblage virtuel, nous avons retenu le composé C12 qui présente la meilleure activité à la fois sur protéines recombinantes et sur la croissance parasitaire. Des analogues de ce composé ont alors été recherchés par criblage de banques de molécules commerciales (Pihan 2013). 8 nouvelles molécules ont ainsi été sélectionnées et évaluées selon les mêmes critères que précédemment. Néanmoins, aucun de ces composés n'a présenté une meilleure efficacité que C12 sur l'inhibition de l'activité *PfCCT* et la croissance parasitaire (Tableau 6). Parmi ces composés, C18 présente une  $CI_{50}$  similaire à C12 sur la *PfCCT* recombinante (672  $\mu$ M) mais est trois fois moins actif sur parasite avec une  $CI_{50}$  de 130  $\mu$ M.

**Tableau 6. Paramètres d'inhibition des 8 analogues de C12 sur l'activité enzymatique de la PfCCT recombinante et la croissance de *P. falciparum* in vitro.** Les valeurs correspondent à la moyenne des données obtenues ( $\pm$ SEM quand au moins 3 expériences ont été réalisées)

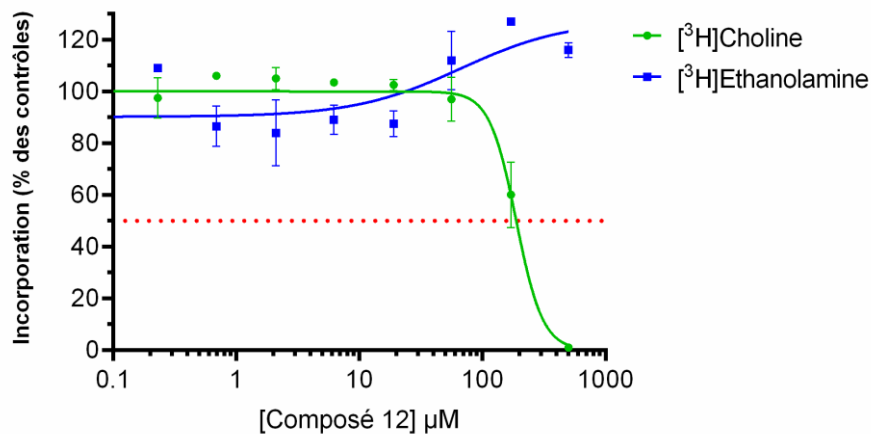
Composé	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <i>PfCCT</i>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <i>P. falciparum</i>	Observation
<b>12</b>	<b>641 <math>\pm</math>83</b>	<b>42<math>\pm</math>10</b>	
15	1945	174	
16			insoluble
17	>1000	630	faible solubilité
<b>18</b>	<b>672</b>	<b>130</b>	
19	>1000	87	
20	>1000	66	
21	>1000	93	
22	>1000	45	

#### 2.4. Caractérisation de l'inhibition par C12

Parmi les 22 composés évalués, C12 reste le plus efficace. C12 présente une plus forte activité chez le parasite (IC<sub>50</sub>= 42  $\mu$ M) que sur l'activité de la PfCCT recombinante (IC<sub>50</sub>= 641  $\mu$ M). Ces résultats pourraient signifier que l'effet antipaludique de C12 est dû à l'inhibition d'autres cibles que la PfCCT chez le parasite. Nous avons donc cherché à caractériser la spécificité du composé ainsi que son mécanisme d'action sur la PfCCT.

### 2.4.1. Inhibition de la synthèse de phosphatidylcholine chez *P. falciparum*

Afin d'explorer la spécificité de C12 chez *P. falciparum*, nous avons évalué l'effet du composé sur la synthèse de PC et de PE chez le parasite. Les érythrocytes infectés ont été incubés avec différentes concentrations de C12 en présence des précurseurs [<sup>3</sup>H]choline ou [<sup>3</sup>H]éthanolamine. La quantité de PC et de PE nouvellement synthétisée a ensuite été évaluée par quantification de l'incorporation des précurseurs dans les lipides finaux. L'incorporation de choline décroît en présence de concentrations croissantes de C12, indiquant une inhibition de la synthèse parasitaire de PC avec une  $CI_{50(PC)}$  de 187  $\mu$ M (Figure 38). En parallèle, l'incorporation d'éthanolamine dans la PE n'est pas significativement affectée jusqu'à une concentration de 500  $\mu$ M de C12. Ces données indiquent que C12 est capable de réduire la synthèse de PC à partir de choline sans affecter la voie de biosynthèse de la PE. C12 agit donc sur la voie de biosynthèse *de novo* (voie de Kennedy) de la PC et ce, dans une gamme de concentration comparable à celle de son effet antipaludique.



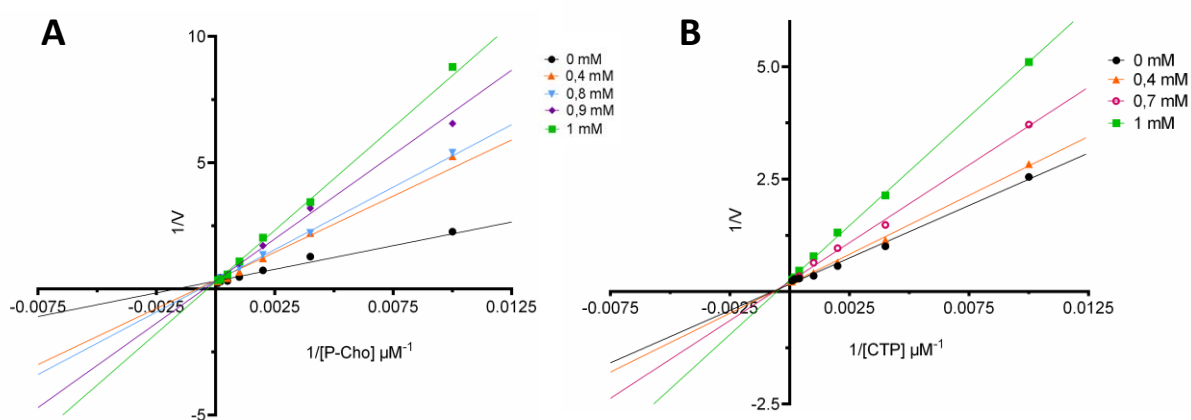
**Figure 38. Effet de C12 sur la biosynthèse de phosphatidylcholine (PC) et phosphatidyléthanolamine (PE) du parasite.**

La synthèse des phospholipides est évaluée en mesurant la quantité [<sup>3</sup>H]choline et [<sup>3</sup>H]éthanolamine incorporée respectivement dans la PC et la PE, en présence de concentrations croissantes de C12. Les courbes présentées sont représentatives de deux expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois mesures.



### 2.4.2. Mécanisme d'inhibition de la *PfCCT*

L'approche de criblage *in silico* avait pour objectif d'identifier des analogues de CDP-choline et donc des inhibiteurs capables de se lier dans le site actif de l'enzyme. Afin de valider le mécanisme d'inhibition de C12, nous avons caractérisé le type d'inhibition du composé vis-à-vis des deux substrats CTP et P-Cho en déterminant les paramètres cinétiques de la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> recombinante en absence ou en présence de concentrations variables d'inhibiteur. La vitesse de réaction a été mesurée à concentrations croissantes de substrat, en maintenant constantes les concentrations du second substrat et de C12. L'analyse des données cinétiques par l'équation de Michaelis-Menten ( $v$  en fonction de  $[s]$ ) et la représentation graphique en double-inverse ( $1/v$  en fonction de  $1/[s]$ ) indiquent que C12 se comporte comme un inhibiteur de type compétitif à la fois vis-à-vis du CTP et de la P-Cho, en diminuant leur affinité pour l'enzyme ( $K_m$  apparent augmenté) sans affecter la vitesse maximale de la réaction  $V_{max}$  (Figure 39).



**Figure 39. Détermination du type d'inhibition de C12 sur la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub>**

Représentations en double-inverse de Lineweaver-Burk selon la concentration en composé 12. **A.** Activité de la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> en fonction de la concentration en P-Cho pour différentes concentrations en C12 (indiquées dans la figure) et 2 mM CTP **B.** Activité de la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> en fonction de la concentration en CTP pour différentes concentrations en C12 (indiquées dans la figure) et 2 mM P-Cho. Les courbes présentées sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes réalisées en duplicata.

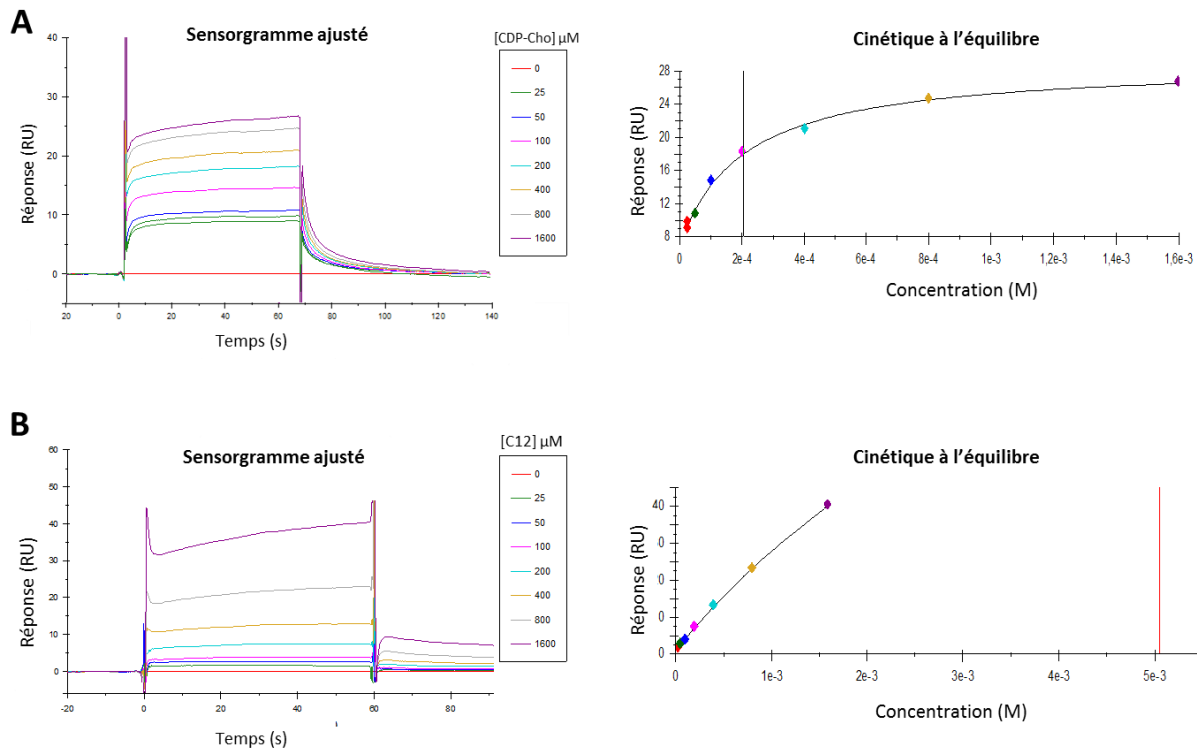
La détermination des constantes d'inhibition  $K_i$  pour les deux substrats a été réalisée par régression non linéaire des données expérimentales par l'équation du modèle d'inhibition

compétitive. Les  $K_i$  ainsi calculés pour le CTP et la P-Cho sont respectivement de 423  $\mu\text{M}$  et 870  $\mu\text{M}$ . Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les  $\text{CI}_{50}$  de C12 mesurées au  $K_m$  des deux substrats, corroborant ainsi l'inhibition compétitive de C12 et sa liaison dans le site actif de l'enzyme.

Des études cinétiques d'inhibition de la  $Pf\text{CCT}_{(528-795)}$  par la CDP-Cho ont indiqué un profil d'inhibition compétitive vis-à-vis du CTP et de la P-Cho, impliquant que la CDP-Cho peut se lier à la même conformation de l'enzyme que chacun des substrats (Nagy et al. 2013). Par conséquent, il est attendu que C12, en tant que composé mimant la CDP-Cho, se comporte de manière compétitive pour les deux substrats.

### 2.4.3. Caractérisation biophysique de la liaison à la $Pf\text{CCT}$

Nous avons ensuite tenté de caractériser la liaison entre C12 et sa cible par des approches biophysiques. Pour cela, nous avons utilisé la technique de SPR qui permet d'avoir accès au  $K_D$  du ligand. La  $Pf\text{CCT}_{(1-210)}$  a été immobilisée sur puce via ses  $\text{NH}_2$  libres puis une cinétique d'interaction a été réalisée avec des concentrations allant de 25 à 1600  $\mu\text{M}$  de C12 ou de CDP-Cho. Pour la CDP-Cho, l'analyse des données à l'équilibre, c'est-à-dire avant la phase de dissociation, donne un plateau typique d'une interaction saturable (Figure 40A). Nous avons ainsi pu déterminer une valeur de  $K_D$  de 200  $\mu\text{M}$ . La cinétique réalisée avec C12 montre une interaction spécifique, en l'absence de signal significatif sur la protéine inactivée par dénaturation thermique et d'interaction de la protéine avec le GDP (contrôles négatifs). Cependant, aucun plateau n'est atteint jusqu'à une concentration de 1,6 mM, pouvant signifier soit une interaction non saturable, soit une faible affinité du composé pour l'enzyme (Figure 40B).



**Figure 40. Analyse par résonance plasmonique de surface (SPR) de l'interaction entre C12, la CDP-Cho et la  $PfCCT_{(1-210)}$**

Sensorgramme et réponse à l'équilibre enregistrés lors de l'interaction entre la  $PfCCT_{(1-210)}$  et la CDP-Cho (A) ou C12 (B). Les différentes concentrations correspondant à chaque courbe d'interaction sont indiquées sur la Figure. L'interaction entre la protéine et ses ligands est exprimée en RU (response unit), unité arbitraire. Les courbes présentées sont représentatives des données obtenues sur deux canaux de mesure.

En parallèle, nous avons utilisé la technique de titration calorimétrique isotherme (ITC) car elle permet de déterminer la constante d'affinité  $K_D$  mais également les paramètres thermodynamiques  $\Delta H$  et  $\Delta S$  ainsi que la stœchiométrie de liaison. Malheureusement, aucune donnée exploitable n'a pu être obtenue par cette approche car nous n'avons pas détecté de signal de liaison significatif lors de la titration de la  $PfCCT_{(1-210)}$  par C12 dans nos conditions expérimentales. Collectivement, les données obtenues par ITC et SPR semblent indiquer que la liaison de C12 à la  $PfCCT$  se fait avec une faible affinité de l'ordre du mM.

Les études par ITC ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Stéphane Betzi à l'Institut de Recherche en Cancérologie de Marseille. Les études par SPR ont quant à elles été réalisées à la plateforme de Protéomique Imagerie et Interaction Moléculaire (PP2I) de Montpellier avec le Dr. Martine Pugnère et Corinne Henriquet.

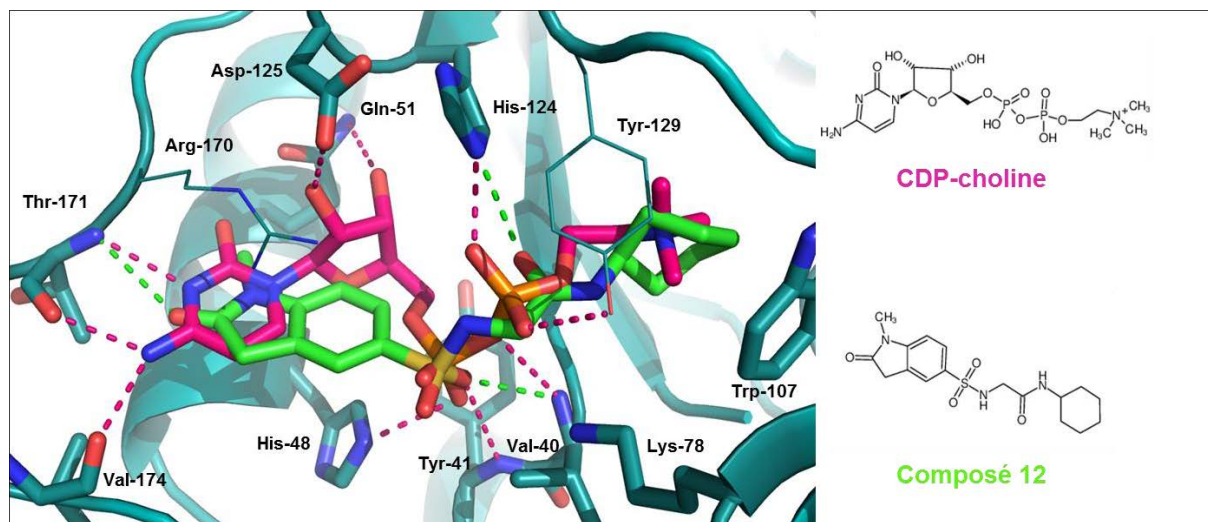
### 3. Conclusions - Perspectives

De par son caractère limitant dans la voie de synthèse *de novo* de la PC, ainsi que son probable rôle essentiel, la *PfCCT* pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique attractive. Nous avons montré que, comme l'ensemble des CCT étudiées à ce jour, la *PfCCT* possède une double localisation membranaire et cytosolique chez *Plasmodium*. Néanmoins nos études réalisées par immunofluorescence n'ont pas permis de déterminer une localisation plus précise. Il serait intéressant à l'avenir de réaliser des co-localisations de la protéine avec des marqueurs connus des différents organites du parasite. Notamment, il a été montré que les CCT de mammifères sont associées la membrane du RE. Cette localisation n'apparaît pas clairement pour la *PfCCT* et il est également possible que la protéine interagisse avec les membranes d'autres organites chez *Plasmodium*. La *PfCCT* possède une duplication atypique de son domaine CT, retrouvée seulement chez deux autres parasites apicomplexes *Babesia* et *Theileria*. Au cours de cette étude, nous avons montré que les deux domaines CT de la *PfCCT* sont catalytiquement actifs et possèdent des paramètres cinétiques similaires. Cette caractéristique est une différence majeure avec la *PfECT* dont le second domaine CT a perdu sa capacité de catalyse (Maheshwari et al. 2013).

Afin d'explorer le potentiel de la *PfCCT* comme nouvelle cible thérapeutique, nous avons réalisé un criblage virtuel de molécules qui a consisté en un filtre reposant sur le ligand CDP-choline comme molécule de référence et une étape d'amarrage utilisant un modèle comparatif de la structure de la *PfCCT* (Pihan 2013). Les 22 composés identifiés à l'issue du criblage virtuel ont ensuite été évalués pour leur activité biologique *in vitro*. Nous avons ainsi identifié le composé C12 inhibant aussi bien l'activité *PfCCT* recombinante ( $IC_{50} = 641 \mu M$ ) que la croissance de *P. falciparum* dans les érythrocytes humains ( $IC_{50} = 42 \mu M$ ). Malgré son inhibition modérée, C12 apparaît comme capable d'inhiber sélectivement la synthèse de PC parasitaire. Toutefois, il n'est actuellement pas possible d'exclure totalement la présence de cible(s) additionnelle(s) chez le parasite. A ce titre, il est tout à fait envisageable que la CEPT, l'enzyme suivante dans la voie de Kennedy et dont l'un des substrats est la CDP-Cho, soit une cible de C12 chez le parasite.

Nous avons montré que C12 exerce son activité sur la *PfCCT* en se liant dans le site actif de l'enzyme, où il entre en compétition avec les deux substrats CTP et P-Cho. Néanmoins, les

études biophysiques de l'interaction entre C12 et la *PfCCT* indiquent que C12 se lie à l'enzyme avec une affinité nettement plus faible que la CDP-Cho, avec un  $K_D$  de l'ordre du mM. L'analyse de la pose d'amarrage théorique de C12 suggère que si d'une manière générale C12 se superpose relativement bien à la CDP-Cho, son mode de liaison impliquerait toutefois un nombre limité de liaisons hydrogène (Figure 41).



**Figure 41. Mode de liaison prédit de C12 et de la CDP-choline dans le modèle structural de la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub>**  
C12 (atomes de carbone en vert) est superposé à la CDP-choline (atomes de carbone en rose) dans le site actif de la *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> (bleu). Les liaisons hydrogène avec les résidus de la poche catalytique sont représentées en pointillés.

En effet, seules trois liaisons hydrogène, avec les His-124, Val-40 et Thr-171, sont conservées entre le mode de liaison théorique de C12 et celui de la CDP-choline (d'après la structure cristallographique de la *RnCCT*). Les liaisons hydrogène impliquant les Thr-41, His-48, Asp-125, Val-174 et potentiellement la Lys-78 ne sont quant à elles pas retrouvées chez C12. Il apparaît donc clairement que l'amélioration de l'affinité du composé passe en partie par l'augmentation de sa capacité à établir des liaisons hydrogène avec les résidus du site actif. D'autres pistes d'optimisation pour la synthèse de futurs analogues peuvent également être envisagées. Plus spécifiquement, le groupement mimant le motif cytidyl de la CDP-Cho n'est pas positionné de manière optimale, potentiellement parce que la liaison sulfonamide mimant les groupements phosphates de la CDP-Cho est trop courte. Jouer sur la longueur de cette liaison peut donc représenter une possibilité d'optimisation pour la synthèse de futurs analogues de C12. Enfin et surtout, il sera important d'établir une spécificité des composés

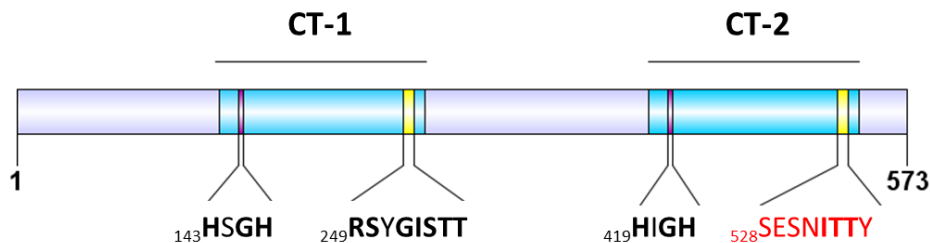
pour la *PfCCT* versus la CCT humaine, en établissant par exemple des interactions avec la Gln-51 (Ala95 chez la hCCT $\alpha$ ) qui constitue une différence majeure entre les deux sites catalytiques.

Par ailleurs, les structures cristallographiques à 2,4 Å des formes libre et liée à la CDP-choline de la *PfCCT*<sub>(581-775)</sub> ont été récemment résolues au laboratoire (Ewelina Guca, article en préparation). La structure de l'holoenzyme et le modèle utilisé pour le criblage sont très proches avec un RMDS (root mean square deviation) de 1,03Å sur 138 résidus (monomère) et nous tentons actuellement de cristalliser l'enzyme en présence de C12. L'obtention de la co-structure est nécessaire pour confirmer le mode de liaison de C12 dans le site actif de la *PfCCT* et représentera une aide majeure pour l'optimisation future du composé.

La majeure partie de ces résultats sont inclus dans un article accepté pour publication dans FEBS Letters, présent en annexe de ce manuscrit.

## Chapitre II. Caractérisation enzymatique et biophysique de la *PfECT*

Au même titre que la *PfCCT*, la *PfECT* catalyse l'étape limitante de la voie de synthèse *de novo* de la PE. La *PfECT* est constituée de deux domaines CT séparés par une longue région de liaison de 140 résidus mais possède également une extension N-terminale de 130 résidus, non conservés parmi les ECT homologues identifiées à ce jour. L'analyse de la séquence de la *PfECT* indique une absence de conservation de la signature des cytidyltransférases RTxGVST(T/S) dans le domaine CT-2 et nous avons récemment montré qu'à la différence de la *PfCCT*, seul le domaine CT-1 est catalytiquement actif chez la *PfECT* (Maheshwari et al. 2013). En effet, l'inactivation du domaine CT-1 par la mutation H146A dans le motif HxGH provoque la perte complète de l'activité enzymatique de la *PfECT*. En revanche, la mutation similaire H422A dans le domaine CT-2 n'induit aucun changement des paramètres cinétiques de l'enzyme. L'article correspondant à ces travaux auxquels j'ai participé est joint en annexe de ce manuscrit.



**Figure 42. Organisation des domaines protéiques de la *PfECT*.**

La position des signatures HxGH et RTxGVST(T/S) est indiquée respectivement par les cadres violets et jaunes.

Suite aux travaux précédemment réalisés, il apparaissait alors intéressant d'étudier le comportement enzymatique de la protéine et de caractériser plus en détails les interactions entre la *PfECT* et ses substrats et produits.

## 1. Matériels et Méthodes

### 1.1. Expression et purification des constructions de la *PfECT*

#### 1.1.1. Expression et purification

L'expression des différentes constructions de la *PfECT* dans les vecteurs pET15b (étiquette poly-His en N-ter) ou pET24b (étiquette poly-His en C-ter) est réalisée de manière similaire à l'expression des protéines recombinantes *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> et *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> (voir chapitre I).

Les différentes étapes de purification sont réalisées dans un tampon A consistant en 40 mM Tris/HCl pH 8, 400 mM NaCl et 2 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol. La purification se fait en deux étapes comme précédemment décrit dans le chapitre I pour la *PfCCT* recombinante. Les modifications suivantes ont cependant été apportées : les lavages et l'élution des protéines durant l'étape de purification sur colonne Ni-NTA sont effectués en 3 paliers de concentrations croissantes en imidazole (100 mM, 250 mM et 500 mM) en solution dans le tampon A à un débit de 1 ml/min et la *PfECT* est éluée à 250 mM d'imidazole. Dans le cas des constructions *PfECT* X-5 (résidus 70 à 573) et de la *PfECT* X-2 (résidus 114 à 573), le surnageant de lyse est chargé sur la colonne de Ni-NTA en continu pendant 2 h à 4 °C afin d'améliorer le rendement d'accrochage de la protéine. La deuxième étape de purification par filtration sur gel est effectuée sur une colonne HiLoad Superdex 200pg (GE Healthcare). En fin de purification, la qualité de la purification est vérifiée sur gel SDS-PAGE 12% et la concentration des fractions protéiques purifiées est déterminée par absorbance à 280 nm en utilisant les coefficients d'extinction molaire de 58 595 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour la *PfECT* entière, 59 250 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour la *PfECT* X-5 et 55 052 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour la *PfECT* X-2.

#### 1.1.2. Détermination de la masse de la *PfECT* par filtration sur gel couplée à la diffusion multi-angles de la lumière (SEC-MALS)

100  $\mu$ l de la *PfECT* entière a une concentration de 2 mg/ml sont injectés sur une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) préalablement équilibrée en tampon PBS pH 7. L'élution de la protéine est effectuée à un flux de 0,5 ml/min en tampon PBS pH 7. En sortie,



la colonne est couplée un détecteur de diffusion de lumière 3 angles (43.6°, 90° et 136.4°) (MiniDRAWN, TREOS) et un réfractomètre différentiel Optilab T-rEX (Wyatt Technology). L'élution de la protéine est suivie en continu par mesure de la réfractométrie différentielle, de l'UV à 280 nm et de la diffusion de lumière. Les données sont analysées à l'aide du logiciel ASTRA 6.1.2.83 (Wyatt Technology).

## 1.2. Etudes enzymatiques

Les études enzymatiques sur la *PfECT* ont été réalisées en utilisant deux tests enzymatiques différents, basés soit sur la quantification directe du produit CDP-éthanolamine formé à partir du substrat radiomarqué [<sup>14</sup>C]P-Etn, soit sur la quantification spectrophotométrique du deuxième produit de la réaction, le pyrophosphate (PP<sub>i</sub>).

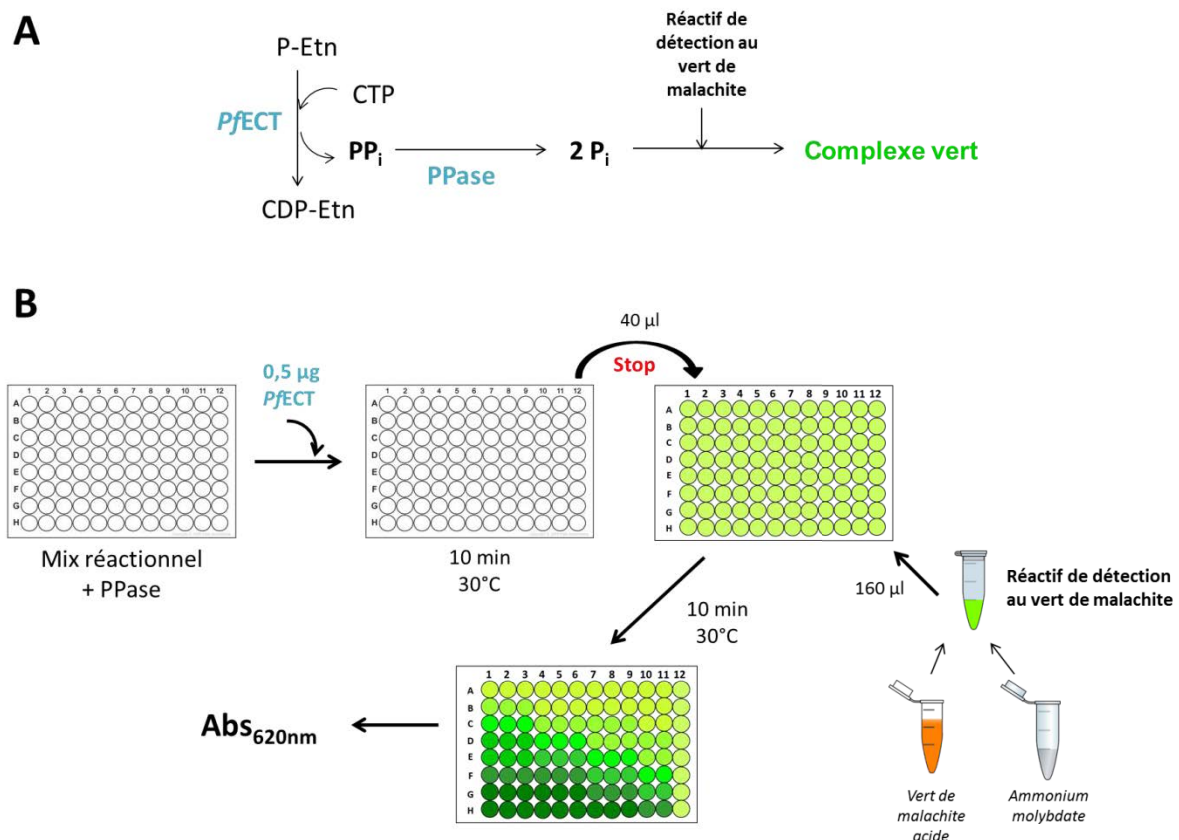
### 1.2.1. Test enzymatique radiomarqué basé sur l'incorporation de [<sup>14</sup>C]P-Etn

Le principe de ce test est identique à celui précédemment décrit pour la *PfCCT*. Le test est typiquement réalisé dans un volume de 50 µl de mélange réactionnel contenant 100 mM Tris/HCl pH8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,1 µCi [<sup>14</sup>C]P-Etn (American Radiolabeled Chemicals), et des concentrations finales variables en CTP et P-Etn froide, selon le type de test réalisé. Le mélange est mis à incuber pendant 5 min à 37 °C puis la réaction est initiée par l'ajout de 0,5 µg d'enzyme. Après 10 min de réaction, le mélange est incubé à 99 °C pendant 5 min afin d'arrêter la réaction par inactivation thermique de l'enzyme. 20 µl d'échantillon sont déposés sur une plaque de CCM, préalablement inactivée à 100 °C pendant 1 h (TLC silica gel 60 with concentrating zone, Merck). Les substrats et produits de la *PfECT* sont ensuite séparés dans un solvant de migration composé de 98 % éthanol/0,5 % NaCl/30 % ammoniac (50:50:1, v/v/v). La séparation des substrats et des produits ainsi que leur quantification sont effectués de manière similaire à la *PfCCT*.

### 1.2.2. Test colorimétrique au vert de malachite

Principe et réalisation du test :

L'activité ECT est déterminée par détection colorimétrique du  $P_i$  provenant de l'hydrolyse du produit  $PP_i$  grâce à une enzyme couplée : la pyrophosphatase inorganique (PPase). En présence de  $P_i$ , le réactif de détection constitué de vert de malachite, ammonium molybdate et Tween 20, forme un complexe phosphomolybdate vert qui peut être quantifié par spectrophotométrie à 620 nm (Baykov et al. 1988). Le principe du test est schématisé dans la Figure 43.



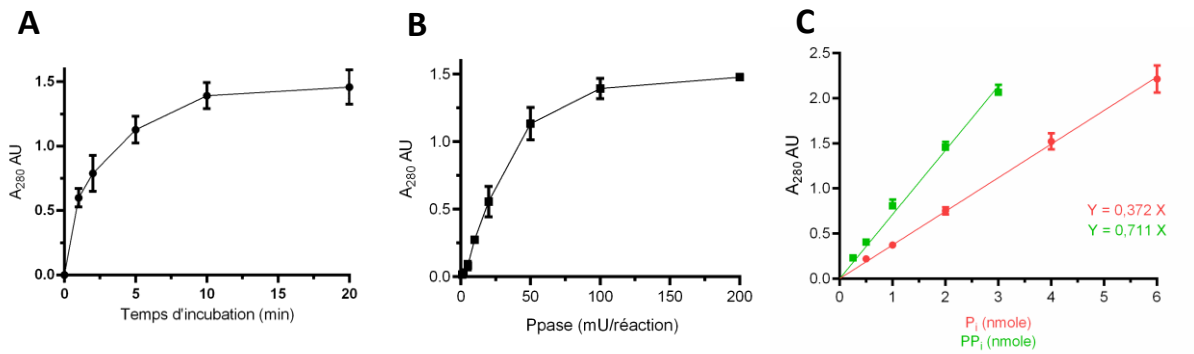
**Figure 43. Principe et réalisation expérimentale du test colorimétrique au vert de malachite.**

**A.** Principe du test enzymatique couplé colorimétrique au vert de malachite. La réaction catalysée par la *PfECT* produit une molécule de CDP-Etn et une molécule de  $PP_i$ . La pyrophosphatase inorganique (PPase) effectue la conversion du  $PP_i$  formé en 2 molécules de  $P_i$ . L'ajout d'un réactif à base de vert de malachite acide et d'ammonium molybdate va former un complexe de couleur verte en présence de  $P_i$  qui sera quantifié par absorbance à 620 nm. **B.** En pratique, le test est réalisé en plaque 96 puits. La réaction est initiée par l'ajout de 0.5 µg d'enzyme à 100 µl de mélange réactionnel contenant les substrats et la PPase. Après 10 min de réaction à 30 °C dans un thermocycleur, la réaction est arrêtée en prélevant 40 µl du mélange réactionnel qui sont immédiatement ajoutés dans une nouvelle plaque 96 puits à 160 µl de réactif de détection contenant le mélange de vert de malachite acide et d'ammonium molybdate. La plaque de détection est incubée pendant 10 min à 30 °C pour le développement de la couleur puis l'absorbance à 620 nm est quantifiée.

Le test est réalisé en plaque 96 puits dans un volume final de 100  $\mu\text{l}$  contenant 100 mM Tris pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTT, 100 mU/ml PPase et des concentrations variables de CTP et P-Etn. Le mélange est mis à incuber à 30 °C pendant 5 min puis la réaction est initiée par l'ajout de 0,5  $\mu\text{g}$  d'enzyme. Après 10 min d'incubation à 30 °C, la réaction est stoppée par transfert de 40  $\mu\text{l}$  du mix réactionnel dans 120  $\mu\text{l}$  d'eau et 40  $\mu\text{l}$  d'une solution acide de vert de malachite (2,4 M acide sulfurique, 1,5% p/v ammonium molybdate, 2,2 % v/v Tween 20 et 7,5 % p/v vert de malachite). Le mélange de détection est alors incubé à 30 °C pendant 10 min, afin de permettre le développement de la couleur, puis l'absorbance à 620 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur d'absorbance pour microplaques (Sunrise, Tecan). Un contrôle correspondant au mélange réactionnel sans enzyme est soustrait des valeurs expérimentales et une courbe étalon de  $\text{PP}_i$  est utilisée afin de quantifier la quantité de  $\text{PP}_i$  formée au cours de la réaction catalysée par la *PfECT*.

*Optimisation du test colorimétrique au vert de malachite pour l'activité de la PfECT :*

Le test a été initialement optimisé pour la *PfCCT* (Marina Lavigne, données non publiées) d'après la méthode développée pour la détection de l'activité CDP-méthyl-érythritol-phosphate (CDP-MEP) synthase (Bernal et al. 2005). L'activité maximale de la PPase est obtenue à pH 7,5, nécessitant le choix de ce pH pour les essais d'activité. Celui-ci est compatible avec le pH optimum de la *PfECT* (Maheshwari et al. 2013). Nous avons déterminé qu'un temps d'incubation de 10 min en présence de 100 mU de PPase permet la conversion totale du  $\text{PP}_i$  en  $\text{P}_i$  (Figure 44A et 44B). L'activité *PfECT* étant linéaire sur 30 min, elle est compatible avec les conditions optimales d'activité de la PPase choisies pour la réalisation du test (Maheshwari et al. 2013). La quantification du  $\text{PP}_i$  formé par la *PfECT* à partir du  $\text{P}_i$  détecté est réalisée à partir d'une gamme étalon de  $\text{P}_i$ . Nous avons donc vérifié que, dans nos conditions et pour chaque nouveau stock de PPase, la quantité de  $\text{PP}_i$  peut être directement reliée au  $\text{P}_i$  détecté, sachant qu'une molécule de  $\text{PP}_i$  est hydrolysée en 2 molécules de  $\text{P}_i$  (Figure 44C). L'absorbance à 620 nm est linéaire de 0,5 nmole à 6 nmoles de  $\text{P}_i$ . De même le signal est linéaire entre 0.25 nmole et 3 nmoles de  $\text{PP}_i$  est équivalent à 2 fois le signal obtenu pour les mêmes quantités de  $\text{P}_i$ .



**Figure 44. Optimisation du test colorimétrique au vert de malachite.**

- A. Détermination du temps d'incubation avec la PPase (100 mU/réaction) afin d'obtenir une conversion totale du PP<sub>i</sub> en P<sub>i</sub>.  
 B. Détermination de la quantité de PPase nécessaire pour obtenir une conversion totale du PP<sub>i</sub> en P<sub>i</sub> (10 min d'incubation).  
 C. Courbes étalon du signal à 620 nm en fonction de la quantité de PP<sub>i</sub> et de P<sub>i</sub> (nmole).

### 1.2.3. Etudes d'inhibition par le produit de la réaction CDP-Etn

Le type d'inhibition de la CDP-Etn pour chacun des deux substrats a été déterminé en quantifiant les paramètres enzymatiques  $K_m$  et  $V_{max}$  en présence de concentrations croissantes de CDP-Etn. Les données ont ensuite été confrontées sur GraphPad aux trois différents modèles d'inhibition : compétitif, non-compétitif, et incompétitif. Les courbes ont été ajustées avec le modèle d'inhibition compétitif (eq. 2) ou non-compétitif (eq.3) pour le calcul de la constante d'inhibition  $K_i$ .

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2)$$

où  $v$  (mol.min<sup>-1</sup>) est la vitesse de réaction,  $V_{max}$  (mol.min<sup>-1</sup>) est la vitesse maximale de la réaction,  $K_m$  (M) est la concentration en substrat pour laquelle la moitié de la  $V_{max}$  est atteinte,  $[S]$  (M) est la concentration en substrat,  $[i]$  (M) est la concentration en inhibiteur et  $K_i$  (M) est la constant d'inhibition.

$$v = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right)} \times \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

### 1.3. Etudes biophysiques des interactions entre la PfECT et ses ligands

#### 1.3.1. Titration calorimétrique isotherme (ITC)

Les mesures d'interactions entre la PfECT entière et différents ligands sont réalisées sur un appareil MicroCal-ITC 200 titration calorimeter (GE Healthcare). La protéine est dialysée sur la nuit dans un tampon contenant 40 mM HEPES pH 7,8, 400 mM NaCl et 2 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les ligands sont directement dissous dans le tampon de dialyse. Dans le cas du CTP, le pH de la solution stock est préalablement ajusté à pH 7,8. Pour la titration, la protéine (60-120  $\mu$ M) est placée dans la cellule de mesure et la seringue d'injection contient les ligands en solution. Chaque titration est réalisée à 20 ou 30 °C sous agitation à 500 tours/min et consiste typiquement en 17 injections de 2,6  $\mu$ L de ligand espacées de 180 s. La même titration en absence de ligand est ensuite réalisée afin de pouvoir retrancher la chaleur de dilution du tampon. Les données sont analysées à l'aide du logiciel Microcal Origin (OriginLab) pour déterminer les paramètres thermodynamiques  $K_D$ , N,  $\Delta H$  et  $\Delta S$  selon le modèle d'interaction à un site de liaison.

#### 1.3.2. Résonance plasmonique de surface (SPR)

Les études d'interaction entre la PfECT entière et différents ligands sont réalisées à 20 °C sur un appareil Biacore T200 (GE Healthcare) en tampon 20 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0,005 % surfactant P20 (GE Healthcare) à un flux de 30  $\mu$ l/min. La PfECT est immobilisée de façon covalente sur une puce CM5S (GE Healthcare) par couplage amine, en tampon 10 mM acétate pH 5,5. Pour la détermination des constantes d'affinité, des concentrations croissantes des ligands allant de 25 à 800  $\mu$ M sont successivement injectées pendant un temps d'association de 150s et dissociés par passage du tampon de flux pendant 400 s. Le guanosine diphosphate (GDP) est utilisé comme contrôle négatif. Les niveaux d'association (RU) à l'équilibre sont reportés en fonction de la concentration en ligand et les données sont analysées à l'aide du logiciel BiaT200-Evaluation (GE Healthcare) selon le modèle calcul par plateaux à l'équilibre.

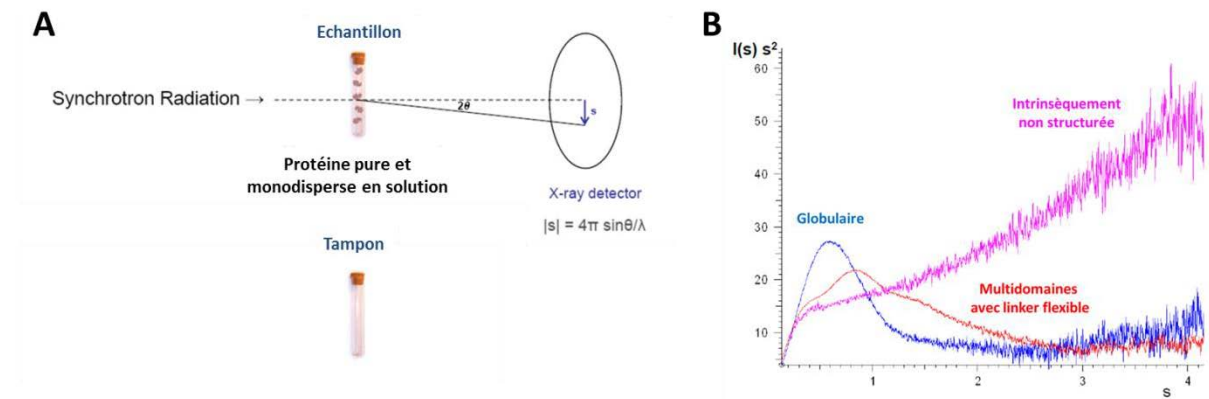
#### 1.4. Essais de cristallisation

Les essais de cristallisation sont effectués en plaque 96 puits à 20°C, selon la méthode de diffusion de vapeur en goutte assise. 100 nl de solution de protéine (seule ou additionnée de 40 équivalents de CTP ou de CDP-Etn) sont déposés par goutte en utilisant le robot Nano X8 (Cartesian). Dans un premier temps, deux concentrations en protéine sont testées dans les conditions du kit de cristallogénèse Classic (Quiagen) afin de déterminer la concentration optimale pour la suite des essais (9 et 5 mg/ml pour la *PfECT* entière, 10 et 5 mg/ml pour la *PfECT* X5 et 10 et 5 mg/ml pour la *PfECT* X2). Par la suite, une concentration de 5 mg/ml a été choisie pour la *PfECT* entière et les conditions des 12 kits suivants ont été testées: Classics II, JCSJ Plus, JCSJ 2, JSG 3, JCSG 4, ComPAS, pH Clear II, JCSG core 1, PEG, Pegs 2 PACT (Quiagen), ClearStrategy 1 et ClearStrategy 2 (Molecular Dynamics). Pour la *PfECT* X5, une concentration à 7 mg/ml a été choisie et les conditions des 7 kits suivants ont été testées : Classics II, JCSJ Plus, ClearStrategy 1, ClearStrategy 2, pH Clear II, PACT et CompPAS. Les gouttes de cristallisation sont suivies régulièrement à l'aide du robot de visualisation R1000 (Formulatrix).

#### 1.5. Analyses par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et modélisation de l'enveloppe de la *PfECT*

Le principe de la technique de SAXS est présenté dans la Figure 45A. 80 µl d'échantillon de la *PfECT* entière à 1, 3, 5 et 15 mg/ml ont été préparés en concentrant la protéine à l'aide d'un concentrateur (Amicon Ultra 10 kDa, 0,5 ml, Millipore) dans un tampon contenant 40 mM Tris pH8, 400 mM NaCl et 2 mM β-mercaptoéthanol. Le filtrat récupéré lors de la concentration a été conservé comme tampon de référence pour la collection des données. Les données ont été collectées at the EMBL/DESY bioSAXS beam line P12 du synchrotron PETRAIII. La courbe de diffusion des particules contenues dans le tampon seul a été retranchée de celle obtenue pour les différents échantillons protéiques afin de ne conserver que le signal provenant de la protéine. Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel SAS Data Analysis (ATSAS 2.6.0, EMBL-Hambourg) pour déterminer les paramètres structuraux et générer la fonction de distribution des distances. Le modèle *ab initio* de la *PfECT* a été réalisé en utilisant le logiciel DAMMIF (ATSAS 2.6.0, EMBL-Hambourg). 10

modèles ont été générés à partir de la fonction de distribution des distances en ajoutant une contrainte de symétrie C2. Le modèle par homologie des domaines CT de la PfECT a ensuite été intégré dans le modèle *ab initio* final filtré en utilisant le logiciel PyMOL 1.3 (Schrodinger, LLC).

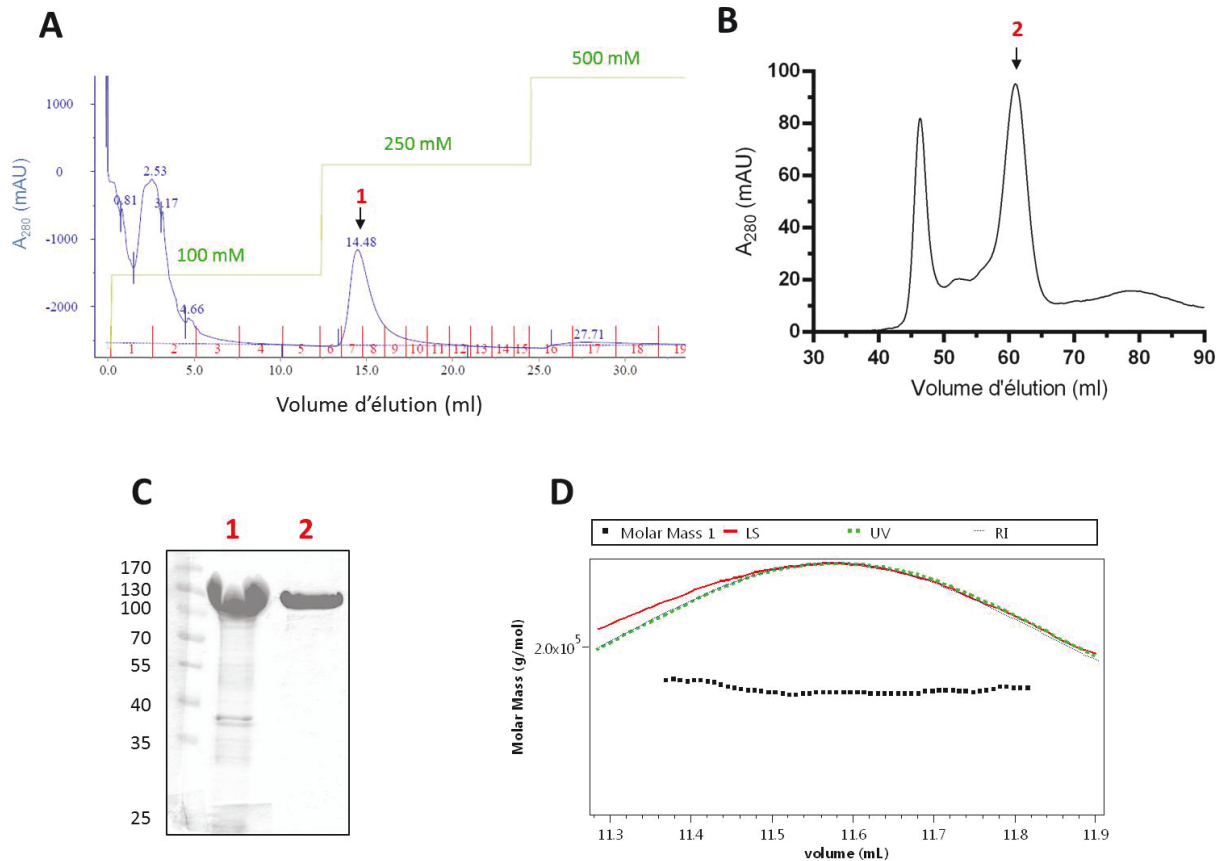


## 2. Résultats

### 2.1. Purification de la PfECT entière

Le clonage, l'expression et la purification de la PfECT entière ont fait l'objet d'une partie des travaux de thèse de Sweta Maheshwari (Maheshwari 2012). La protéine est exprimée chez *E.coli* BL21 (DE3) puis purifiée en deux étapes de chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA puis filtration sur gel (Figure 46A et 46B). A l'issue de ce protocole, la protéine a une pureté supérieure à 95 % d'après analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie (Figure 46C). Elle peut être conservée à 4 °C pendant une semaine sans perte d'activité

enzymatique mais ne peut pas être congelée. La masse moléculaire théorique de la *PfECT* entière (+ étiquette poly-His) monomérique est de 68 kDa. Expérimentalement, les données de gel filtration indiquent une masse moléculaire de  $\approx 185$  kDa, soit l'équivalent de 2,7 monomères.



**Figure 46. Purification de la *PfECT* recombinante.**

**A.** Profil d'élution de la *PfECT* sur colonne d'affinité Ni-NTA en fonction du volume d'élution et de la concentration en imidazole (vert). **B.** Profil d'élution sur colonne de filtration sur gel S200 en fonction du volume d'élution. Le pic d'élution de la *PfECT* est indiqué (↓). **C.** Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE 12% acrylamide) montrant la *PfECT* après chaque étape de purification. La piste 1 correspond au pic d'élution de la protéine à 250 mM d'imidazole concentré avant injection sur la colonne de filtration sur gel. La piste 2 correspond à la fraction la plus concentrée du pic d'élution de la protéine après filtration sur gel. **D.** Analyse par filtration sur gel couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angle (SEC-MALS). LS : diffusion de la lumière, RI : réfractométrie différentielle.

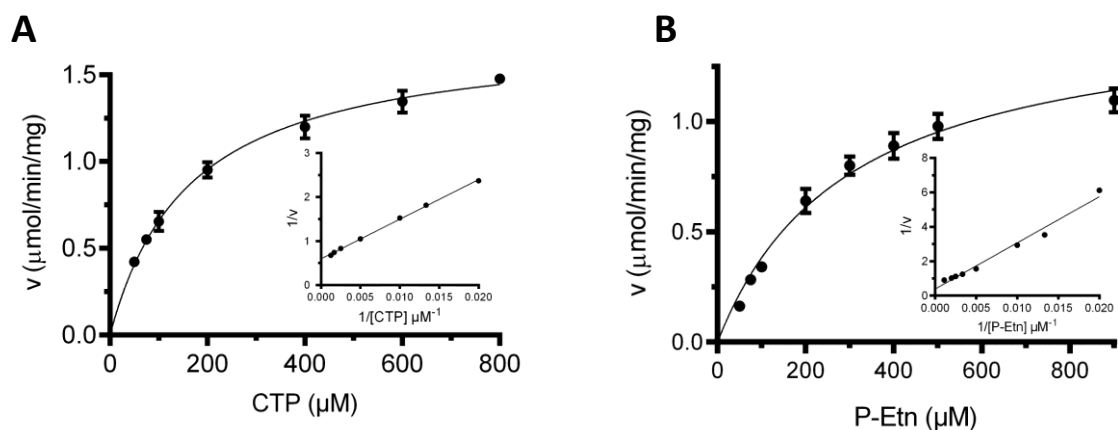
Néanmoins, ce type d'analyse par filtration sur gel peut être relativement imprécis du fait notamment de la qualité de la calibration par des standards de poids moléculaire connus et/ou de la forme de la protéine. Nous avons donc réalisé une analyse par SEC-MALS (filtration sur gel couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multiangles) qui permet la détermination



de la masse moléculaire absolue en s'affranchissant de la calibration de la colonne et de la forme de la protéine (Figure 46D). La masse moléculaire de la *PfECT* ainsi calculée par SEC-MALS est de 164 kDa, soit 2,4 monomères. Ces données semblent indiquer que la *PfECT* recombinante existe majoritairement sous forme de dimère.

## 2.2. Mise au point d'un test colorimétrique pour l'étude de la *PfECT*

Notre objectif était de mettre au point un test enzymatique à plus haut débit et moins contraignant que le test radiomarqué précédemment utilisé. Nous avons ainsi optimisé, pour la détection de l'activité de la *PfECT*, un test colorimétrique utilisant le vert de malachite et réalisable en plaque 96 puits. Afin de valider l'utilisation de ce test, nous avons tout d'abord comparé les paramètres cinétiques déterminés dans ces conditions à ceux évalués précédemment par le test radiomarqué direct à la [<sup>14</sup>C]P-Etn (Maheshwari et al. 2013). Les valeurs  $K_m$  et  $k_{cat}$  ont été déterminées vis-à-vis du CTP et la P-Etn en incubant l'enzyme avec des concentrations croissantes d'un des substrats tout en maintenant à 800  $\mu\text{M}$  la concentration du substrat constant. Comme il a été précédemment montré par l'utilisation du test radiomarqué, l'activité enzymatique de la *PfECT* suit une cinétique michaelienne vis-à-vis de ses deux substrats (Figure 47).



**Figure 47. Paramètres cinétiques de la *PfECT* recombinante déterminés par le test colorimétrique au vert de malachite.**

Courbes de Michaelis-Menten (représentations en double-inverse de Lineweaver-Burk en insertion) représentant l'activité de la *PfECT* recombinante en fonction de la concentration en substrat CTP (A) et P-Etn (B). Courbes représentatives de 3 expériences réalisées indépendamment en triplicata. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois mesures.

Les valeurs de  $K_m$  déterminées par le test colorimétrique sont de 285  $\mu\text{M}$  pour le CTP et de 266  $\mu\text{M}$  pour la P-Etn. La valeur de  $k_{cat}$  a été évaluée à 2.4-2.5  $\text{s}^{-1}$ . Ces paramètres cinétiques sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés en utilisant le test radiomarqué (Tableau 7) et valident l'utilisation du test colorimétrique pour des études cinétiques plus approfondies.

**Tableau 7. Paramètres cinétiques de la PfECT entière déterminés par le test colorimétrique au vert de malachite** (et par test radioactif utilisant la  $[^{14}\text{C}]$  P-Etn). Valeurs moyennes ( $\pm\text{SD}$ ) de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata

<i>Enzyme</i>	<i>Substrat</i>	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
PfECT	P-Etn	266 $\pm$ 73 (452 $\pm$ 86 <sup>†</sup> )	2,5 $\pm$ 0,2 (3,4 $\pm$ 0,3 <sup>†</sup> )
	CTP	285 $\pm$ 36 (465 $\pm$ 70 <sup>†</sup> )	2,4 $\pm$ 0,3

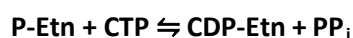
<sup>†</sup>(Maheshwari et al. 2013)

### 2.3. Mécanisme catalytique de la PfECT

Pour rappel, deux grands types de mécanismes peuvent être distingués dans les cinétiques enzymatiques à deux substrats : **i.** Les mécanismes à complexe ternaire (ou « Bi-Bi »), dans lesquels les deux substrats se lient à l'enzyme avant la libération des produits et **ii.** les mécanismes à enzyme modifiée (ou « Ping-Pong ») caractérisés par le relargage d'un des produits avant la fixation du second substrat ainsi que par le passage obligatoire par une forme intermédiaire modifiée de l'enzyme.

#### 2.3.1. Etudes des vitesses initiales

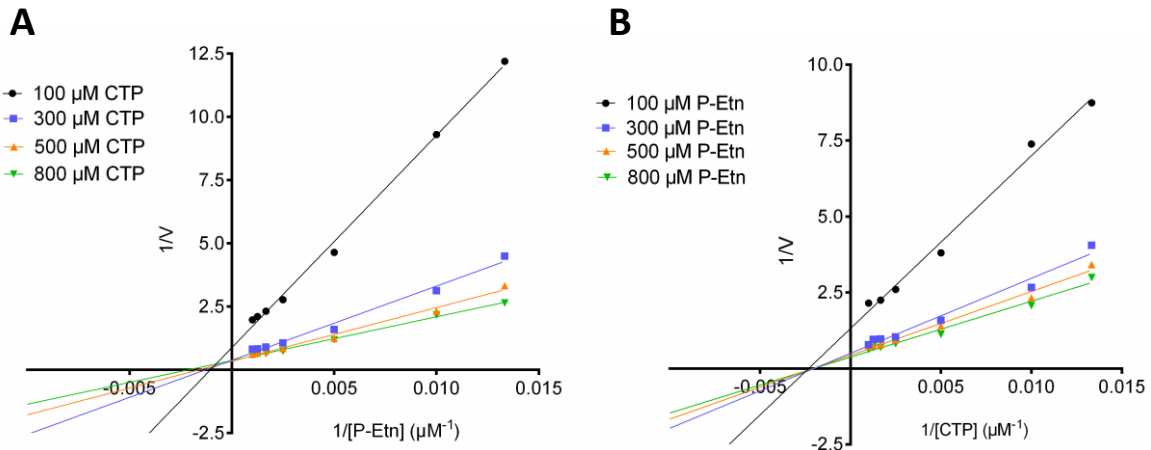
*Réaction catalysée par la PfECT*



Les deux types de mécanismes décrits précédemment peuvent être facilement distingués en déterminant les paramètres apparents de Michaelis-Menten en faisant varier les concentrations des deux substrats.

La représentation en double-inverse des données de vitesse initiale obtenues avec la P-Etn comme substrat variable et ce, pour différentes concentrations constantes de CTP, donne un ensemble de droites convergeant en un seul point à gauche de l'axe  $1/v$  (Figure 48A). Le même profil est obtenu lorsque les vitesses initiales sont cette fois-ci déterminées avec le CTP comme substrat variable et la P-Etn comme substrat constant (Figure 48B). Ce type de profil indique que la *PfECT* suit un mécanisme à complexe ternaire. En effet, un mécanisme à enzyme modifiée serait alors indiqué par un ensemble de droites parallèles.

Toutefois, l'étude des vitesses initiales seule ne permet pas de faire la distinction entre un mécanisme à addition aléatoire ou ordonnée des substrats et nécessite la réalisation d'expériences complémentaires.

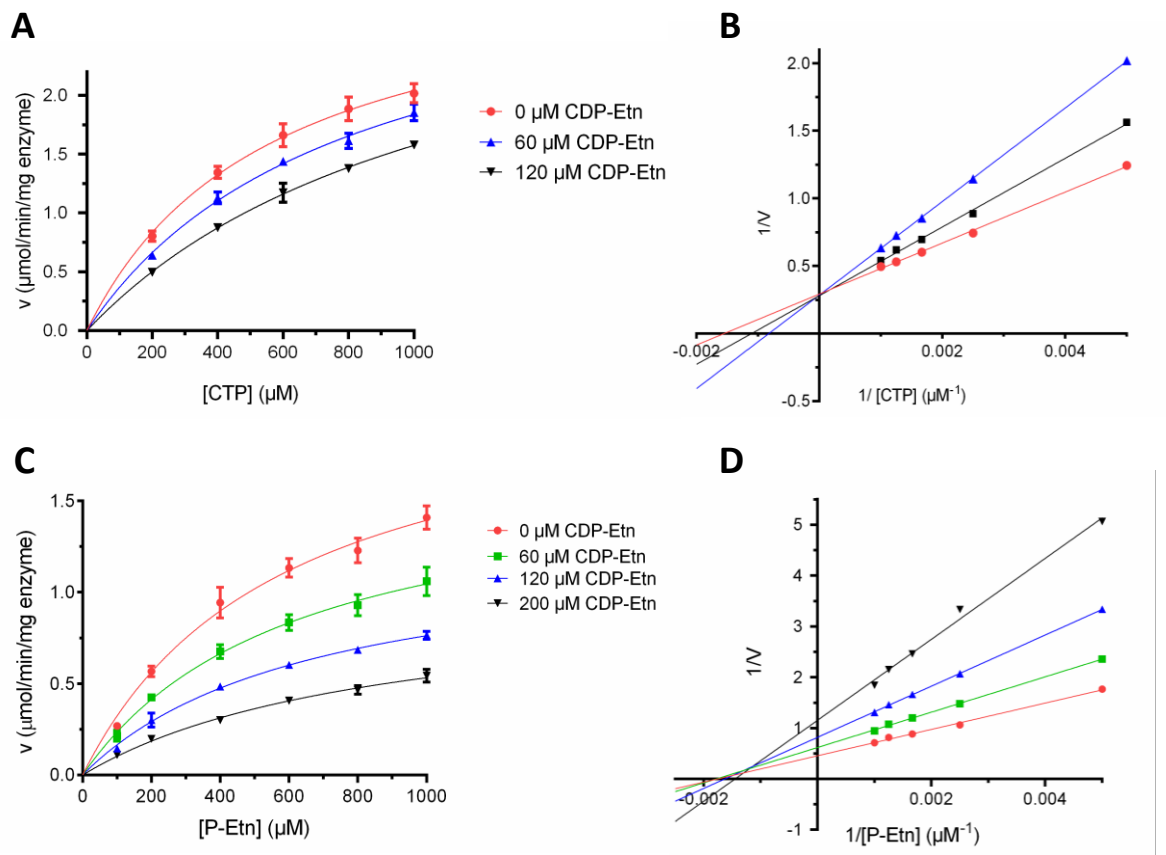


**Figure 48. Représentation en double inverse des données de vitesse initiale pour différentes concentrations de substrat constant.**

**A.** Mesure des vitesses initiales en fonction de la concentration en P-Etn pour des concentrations constantes en CTP de 100, 300, 500 et 800 μM. **B.** Mesure des vitesses initiales en fonction de la concentration en CTP pour des concentrations constantes en P-Etn de 100, 300, 500 et 800 μM.

### 2.3.2. Etudes d'inhibition par le produit

Afin de faire la distinction entre une liaison aléatoire ou ordonnée des deux substrats, nous avons réalisé une étude cinétique basée sur l'inhibition par le produit CDP-Etn. La vitesse initiale de réaction a été mesurée en fonction de chaque substrat alors que la concentration en second substrat et en CDP-Etn était maintenue constante (Figure 49A et 49B).



**Figure 49. Type d'inhibition du produit CDP-Etn vis à vis du CTP et de la P-Etn**

**A.** Courbes de Michaelis-Menten de l'activité de la PfECT en fonction de la concentration de CTP en absence ou présence de 60  $\mu\text{M}$  et 120  $\mu\text{M}$  de CDP-Etn. **B.** Représentations en double-inverse de Lineweaver-Burk des données cinétiques en fonction du CTP. **C.** Courbes de Michaelis-Menten de l'activité de la PfECT en fonction de la concentration de P-Etn en absence ou présence de 60  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$  de CDP-Etn. **D.** Représentations en double-inverse de Lineweaver-Burk des données cinétiques en fonction de la P-Etn. Les courbes présentées sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les valeurs indiquées sont la moyenne  $\pm$  SEM de 3 mesures.

La CDP-Etn donne un profil d'inhibition de type compétitif vis-à-vis du CTP comme indiqué par une série de lignes droites convergeant sur l'axe  $1/v$  en représentation en double inverse (Figure 49B). Ces données signifient que la CDP-Etn et le CTP se lient à la même

forme de l'enzyme. A l'inverse, une inhibition de type non-compétitive est retrouvée pour la P-Etn avec une diminution de la  $V_{max}$  apparente et un  $K_m$  inchangé pour la P-Etn, comme indiqué par l'intersection des courbes sur l'axe  $1/[P-Etn]$  en représentation en double inverse (Figure 49D). Les constantes d'inhibition  $K_i$  de la CDP-Etn ont été estimées à 120  $\mu\text{M}$  pour le CTP et 170  $\mu\text{M}$  pour la P-Etn. En conclusion, ce type de profil d'inhibition vis-à-vis des deux substrats suggère que la *PfECT* opère par un mécanisme catalytique à complexe ternaire ordonné, où le CTP est le premier substrat à se lier et la CDP-Etn le dernier produit libéré.

## 2.4. Caractérisation biophysique des interactions entre la *PfECT* et ses ligands

### 2.4.1. Substrats et produits

Afin d'examiner en détail l'interaction entre la *PfECT* et ses ligands naturels, nous avons réalisé des études biophysiques alliant les approches par ITC et SPR. Alors que ces deux techniques permettent la détermination du  $K_D$  en condition d'équilibre, elles fournissent également différentes informations concernant les paramètres thermodynamiques et cinétiques et représentent donc des approches complémentaires pour l'étude des interactions protéine-ligand. Les études par ITC ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Stéphane Betzi à l'Institut de Recherche en Cancérologie de Marseille. Les études par SPR ont quant à elles été réalisées à la plateforme de Protéomique Imagerie et Interaction Moléculaire (PP2I) de Montpellier avec le Dr. Martine Pugnère et Corinne Henriquet.

Le domaine CT-2 de la *PfECT* étant catalytiquement inactif, nous avons voulu déterminer si ce domaine avait conservé sa capacité à lier les substrats et/ou les produits. Les données de titration obtenues par ITC indiquent une stoechiométrie de liaison à la *PfECT* proche de 1:1 pour le CTP et la CDP-Etn, impliquant que seul le domaine CT-1 est capable de lier ces deux ligands dans nos conditions expérimentales (Tableau 8, Figure 50A et 50C). Nos données ne mettent pas en évidence l'existence de deux sites d'affinités différentes et suggèrent que, si ces deux ligands peuvent se lier au domaine CT-2, leur affinité est très faible, de l'ordre du mM.

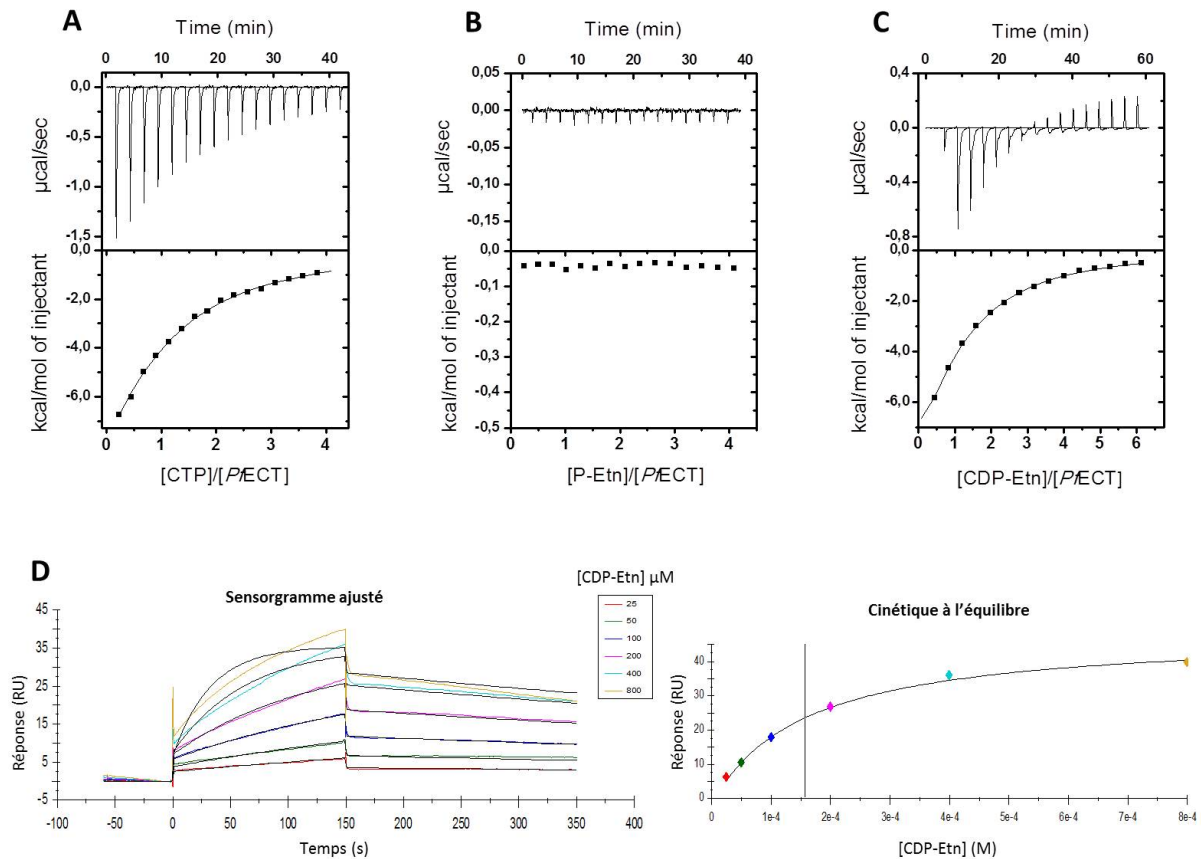
**Tableau 8. Paramètres thermodynamiques de la liaison des substrats et produits à la PfECT déterminés par titration calorimétrique isotherme (ITC) et résonance plasmonique de surface (SPR) à 20 °C.** Valeurs moyennes ( $\pm$ SD) de 3 expériences indépendantes.

Ligand	ITC				SPR	
	<i>N</i>	<i>K<sub>D</sub></i> ( $\mu$ M)	$\Delta H$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	<i>K<sub>D</sub></i> ( $\mu$ M)	<i>k<sub>off</sub></i> (s <sup>-1</sup> )
CTP	0,68 $\pm$ 0,04	116,6 $\pm$ 14,1	-9,5 $\pm$ 3,5	-14,5 $\pm$ 11,7	157 (n=1)	n.a
CDP-Etn	0,79 $\pm$ 0,02	106,7 $\pm$ 4,6	-20,8 $\pm$ 0,3	-52,6 $\pm$ 1,2	194 $\pm$ 65	10 <sup>-3</sup>

*n.a* : non applicable.

Les valeurs de  $K_D$  déterminées pour le CTP et la CDP-Etn par ITC et SPR à l'équilibre donnent des résultats similaires (Tableau 8). Les valeurs de  $K_D$  mesurées pour le CTP sont respectivement de 116,6  $\mu$ M et 157  $\mu$ M, par ITC et SPR. Pour la CDP-Etn, les valeurs de  $K_D$  sont respectivement de 106,7  $\mu$ M et 194  $\mu$ M. Les paramètres thermodynamiques déterminés par ITC indiquent que le CTP et la CDP-Etn possèdent une enthalpie et une entropie de liaison négative. Ceci signifie un mode d'interaction avec l'enzyme favorable d'un point de vue enthalpique (formation de liaison hydrogènes, notamment) et défavorable d'un point de vue entropique (perte de désordre, perte de degrés de liberté).

Toutefois, bien que ces deux ligands partagent les mêmes constantes de liaison à l'équilibre et des paramètres thermodynamiques similaires, leur liaison à l'enzyme semble être sensiblement différente lorsque l'on considère la dynamique des interactions par SPR. En effet, le CTP présente une rapide constante cinétique de dissociation ( $k_{off}$ ), non quantifiable et généralement retrouvée pour les petites molécules chimiques. A l'inverse, l'interaction entre la PfECT et la CDP-Etn semble présenter une plus forte stabilité avec un  $k_{off}$  quantifiable de l'ordre de 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> (Figure 50D, Tableau 8). Ces données sont cependant préliminaires et nécessitent d'être confirmées. L'apparente stabilité du complexe enzyme:produit pourrait alors représenter un des paramètres contribuant au caractère limitant de la PfECT dans la voie de synthèse *de novo* de la PE.



**Figure 50. Interactions entre la *PfECT* et ses ligands naturels mesurées par ITC et SPR**

**A.** Titration calorimétrique isotherme de 70  $\mu\text{M}$  de *PfECT* par 1,4 mM de CTP à 20  $^{\circ}\text{C}$ . **B.** Titration calorimétrique isotherme de 70  $\mu\text{M}$  de *PfECT* par 1,4 mM de P-Etn à 20  $^{\circ}\text{C}$ . **C.** Titration calorimétrique isotherme de 66  $\mu\text{M}$  de *PfECT* par 2 mM de CDP-Etn à 20  $^{\circ}\text{C}$ . Pour **A**, **B** et **C**, le cadre supérieur présente les données brutes correspondant à la puissance en  $\mu\text{cal/sec}$  appliquée par le système pour maintenir une température constante de 20  $^{\circ}\text{C}$  dans la cellule de mesure à chaque injection de ligand. Le cadre inférieur indique la chaleur dégagée en  $\text{kcal/mol}$  par la liaison du ligand à la *PfECT* en fonction du ratio [ligand]/[*PfECT*]. Les courbes présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes. **D.** Sensorgrammes et réponses à l'équilibre enregistrés lors de l'interaction entre la *PfECT* et la CDP-Etn. Les différentes concentrations correspondant à chaque courbe d'interaction sont indiquées sur la Figure. L'interaction entre la protéine et la CDP-Etn est exprimée en RU (response unit), une unité arbitraire. Les courbes présentées sont représentatives des données obtenues sur trois canaux de mesure.

La titration de la *PfECT* par la P-Etn (jusqu'à 2,7 mM, soit 10 fois plus que la valeur du  $K_m$  pour ce substrat) n'a pas produit de signal calorimétrique à 20  $^{\circ}\text{C}$  par ITC. Ce résultat peut signifier que la P-Etn ne peut pas se lier à la forme libre de l'enzyme, ou que son mode de liaison possède une très faible contribution enthalpique. La première hypothèse serait alors en accord avec le mécanisme catalytique déterminé par nos études cinétiques. Néanmoins, des résultats similaires ont été obtenus lors de la titration de la *PfCCT* par la P-Cho, pour laquelle un mécanisme impliquant la liaison aléatoire des substrats a été proposé (Nagy et al. 2013). Les interactions protéine-ligand comprenant une faible contribution enthalpique peuvent être

détectées par ITC en modifiant la température à laquelle est réalisée la titration. Toutefois, la titration de la *PfECT* réalisée à 30 °C n'a pas permis de détecter de signal calorimétrique pour la liaison de la P-Etn. De même, aucune interaction entre la P-Etn et la protéine n'a pu être détectée par SPR. Ces résultats permettent d'appuyer l'hypothèse d'un mécanisme catalytique impliquant la liaison du CTP avant celle de la P-Etn.

Enfin, nous n'avons pas non plus pu mettre en évidence l'interaction entre le  $PP_i$  et l'enzyme par SPR, suggérant que cette interaction est soit très faible, soit que le  $PP_i$  ne peut pas se lier à l'apoenzyme. Cette dernière hypothèse serait également en accord avec un mécanisme catalytique dans lequel la CDP-Etn est le dernier produit de la réaction libéré. Le modèle du mécanisme enzymatique de la *PfECT* est proposé ci-dessous (Figure 51).

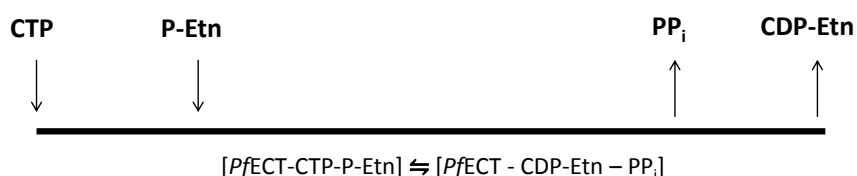


Figure 51. Mécanisme réactionnel séquentiel ordonné proposé pour la *PfECT*

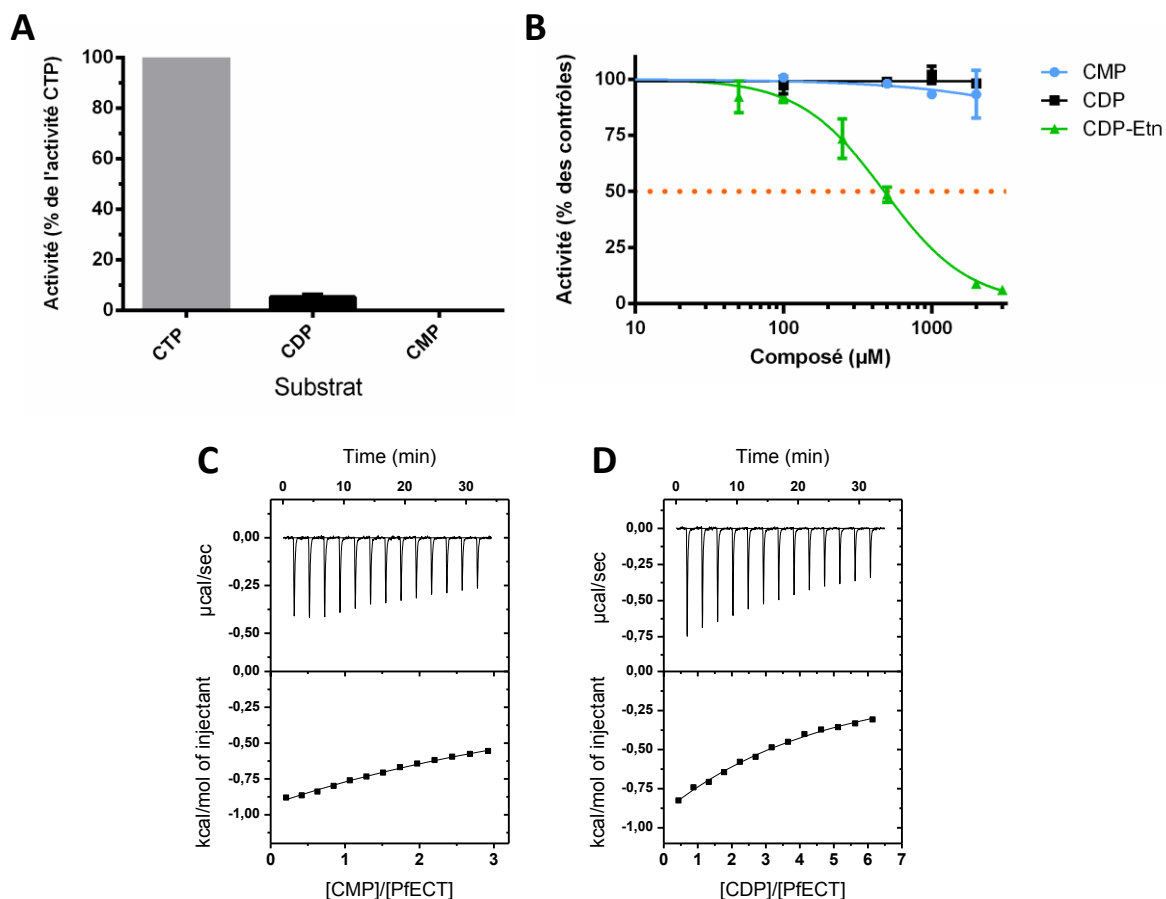
#### 2.4.2. CMP-CDP

Des essais d'activité ECT ont été réalisés avec les deux analogues de CTP, le CMP et le CDP, comme substrat. Alors qu'aucune activité n'a été observée avec le CMP, une très faible activité a été détectée avec le CDP. Toutefois cette dernière représente moins de 10 % de l'activité de l'enzyme obtenue avec son substrat naturel, le CTP (Figure 52A).

L'analyse de la seule structure cristallographique de ECT (*HsECT*, PDB 3ELB) révèle la présence surprenante du ligand CMP uniquement dans la poche « catalytique » du domaine CT-2. Il a été montré que le domaine CT-2 de la ECT humaine est, comme celui de la *PfECT*, catalytiquement inactif (Tian et al. 2014). Cette observation permet de faire l'hypothèse que le CMP, ou le CDP, puissent être impliqués dans la régulation de l'activité catalytique des ECT, en temps qu'activateur ou inhibiteur. Afin de tester cette possibilité, nous avons déterminé si



ces deux analogues de CTP ont une influence sur l'activité de la *Pf*ECT. L'addition de concentration allant de 100  $\mu$ M à 2 mM de CMP et de CDP n'a montré aucun effet significatif sur l'activité de la *Pf*ECT (Figure 52B).



**Figure 52.** Evaluation de l'effet du CMP et du CDP sur l'activité enzymatique de la *Pf*ECT et analyse de leur interaction avec l'enzyme par ITC.

**A.** Activité de la *Pf*ECT avec le CTP ou ses dérivés CDP et CMP comme substrat. L'activité de l'enzyme a été quantifiée en présence de 800  $\mu$ M de P-Etn et 800  $\mu$ M de CTP, CDP ou CMP. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport à l'activité de l'enzyme en présence de CTP comme substrat. **B.** Effet de l'addition de CMP, CDP et CDP-Etn sur l'activité enzymatique de la *Pf*ECT, évaluée par l'utilisation du test radiomarqué à la [ $^{14}$ C]P-Etn. Les composés ont été ajoutés au mix réactionnel à différentes concentrations variant de 50  $\mu$ M à 3 mM pour la CDP-Etn et de 100  $\mu$ M à 2 mM pour le CMP et la CDP-Etn. Les résultats sont présentés en pourcentage d'activité par rapport au contrôle sans ajout de composé. Les courbes présentées sont représentatives de 2 expériences indépendantes. Les données représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  SEM. **C.** Titration calorimétrique isotherme de 150  $\mu$ M de *Pf*ECT par 2 mM de CMP à 20 °C. **D.** Titration calorimétrique isotherme de 100  $\mu$ M de *Pf*ECT par 3 mM de CDP à 20 °C. Le cadre supérieur présente les données brutes correspondant à la puissance en  $\mu$ cal/sec appliquée par le système pour maintenir une température constante de 20 °C dans la cellule de mesure à chaque injection de ligand. Le cadre inférieur indique la chaleur dégagée en kcal/mol par la liaison du ligand à la *Pf*ECT en fonction du ratio [ligand]/[*Pf*ECT]. Les courbes présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Nous avons également évalué l'interaction entre la *PfECT* et le CMP ou le CDP par ITC. Un signal calorimétrique très faible et non saturable est obtenu lors de la titration de l'enzyme par ces deux dérivés de CTP jusqu'à 2 mM (Figure 52C et D). Ces données indiquent que le CMP et le CDP peuvent se lier à l'enzyme, probablement avec une faible affinité de l'ordre du mM.

Il est intéressant de noter la différence de comportement de ces molécules, et plus particulièrement du CDP, avec le CTP. L'absence d'un phosphate entre le CDP et le CTP provoque une drastique diminution de l'affinité pour le ligand et de l'activité indique une grande spécificité de l'enzyme vis-à-vis du CTP.

## 2.5. Analyses structurales

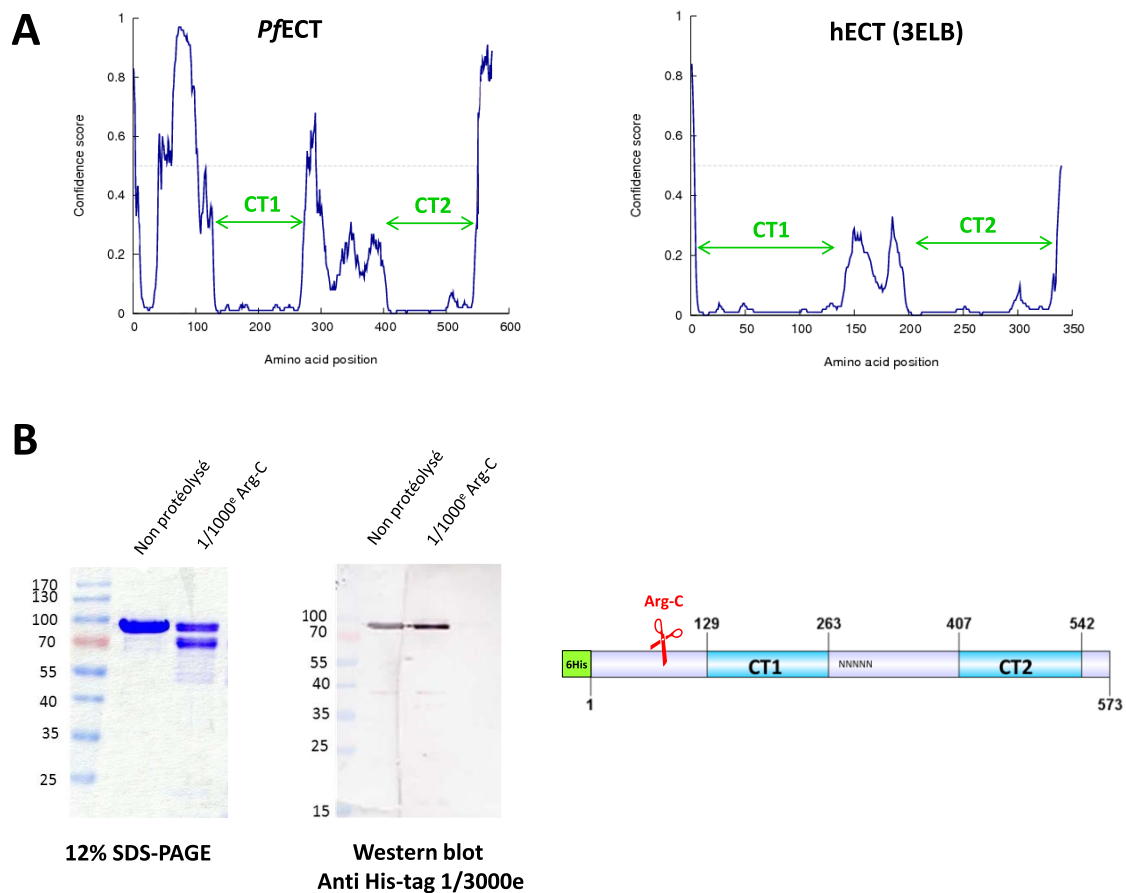
### 2.5.1. Essais de cristallisation de la *PfECT*

L'obtention de la structure cristallographique de la *PfECT* représenterait une aide précieuse pour la compréhension des mécanismes de catalyse et de régulation de la protéine, mais également pour le développement d'inhibiteurs par des approches basées sur la structure. Les essais de cristallisation de la *PfECT* ont été réalisés en collaboration avec le Dr. François Hoh à la plateforme de cristallographie du Centre de Biochimie Structurale à Montpellier. Nous avons tout d'abord essayé de cristalliser la *PfECT* entière. Ces essais se sont cependant avérés non concluants malgré le test robotisé de plus de 1000 conditions de cristallogenèse différentes.

La présence de parties non structurées et flexibles représente généralement un problème important pour la cristallisation des protéines car elles limitent la formation de contacts cristallins. Les prédictions des structures secondaires (Figure 53) et de désordre (Figure 54A) indiquent la présence de deux parties non structurées dans la séquence de la *PfECT*. Ces régions correspondent à la totalité de la région de liaison et à la majorité de l'extension N-terminale de la protéine. Étonnamment, l'extrémité N-terminale de la protéine est prédite comme structurée avec la présence d'au moins une hélice  $\alpha$  d'une dizaine de résidus selon les programmes de prédictions utilisés (résidus 16 à 28, Figure 53). Cette portion de la séquence



Afin de confirmer les prédictions réalisées *in silico*, nous avons réalisé une expérience de protéolyse ménagée permettant d'identifier les parties non structurées de la protéine car celles-ci sont généralement accessibles aux protéases. La PfECT a été incubée séparément avec 12 protéases dont les sites de clivage sont connus, puis analysée par SDS-PAGE. Parmi les protéases testées, nous avons obtenu un profil intéressant avec l'Arg-C (clostripaine) qui clive la liaison peptidique en C-ter des arginines. Le profil obtenu par SDS-PAGE indique la présence d'un fragment stable de la protéine d'environ 10 kDa de moins que la protéine PfECT entière (Figure 54B).



**Figure 54. Analyses *in silico* et biochimique de la PfECT en vue de l'optimisation de la protéine pour les essais de cristallisation.**

**A.** Prédictions des régions désordonnées pour la séquence de la PfECT (gauche) et pour la séquence de la ECT humaine ayant été cristallisée (PDB 3ELB) (droite) réalisées à l'aide du serveur Disopred. Les parties de la séquence correspondantes aux domaines CT sont indiquées par des doubles flèches vertes. **B.** Analyse par protéolyse ménagée à l'Arg-C (clostripaine). La PfECT incubée en absence ou en présence d'Arg-C (1:1000 mol/mol) est analysée par SDS-PAGE (12%) (gauche) et par Western blot en utilisant un anticorps primaire dirigé contre l'étiquette poly-His. Le site de clivage prédit de l'Arg-C est indiqué sur la séquence de la PfECT (droite). NNNNN : répétitions d'Asn dans la région de liaison.

La détection par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette poly-His localisée en N-ter de la protéine, montre que seule la protéine entière est détectée. Ceci suggère que le site de clivage de l'Arg-C est situé à l'extrémité N-ter de la *PfECT*. (Figure 54B). La détermination précise du site de clivage est néanmoins rendue difficile du fait de la présence de plusieurs Arg dans cette partie de la séquence et, plus particulièrement, de la migration aberrante de la *PfECT* sur gel de polyacrylamide (Maheshwari et al. 2013). Il est à noter qu'aucun site de clivage n'est présent dans la région de liaison entre les deux domaines CT en raison de l'absence d'arginine.

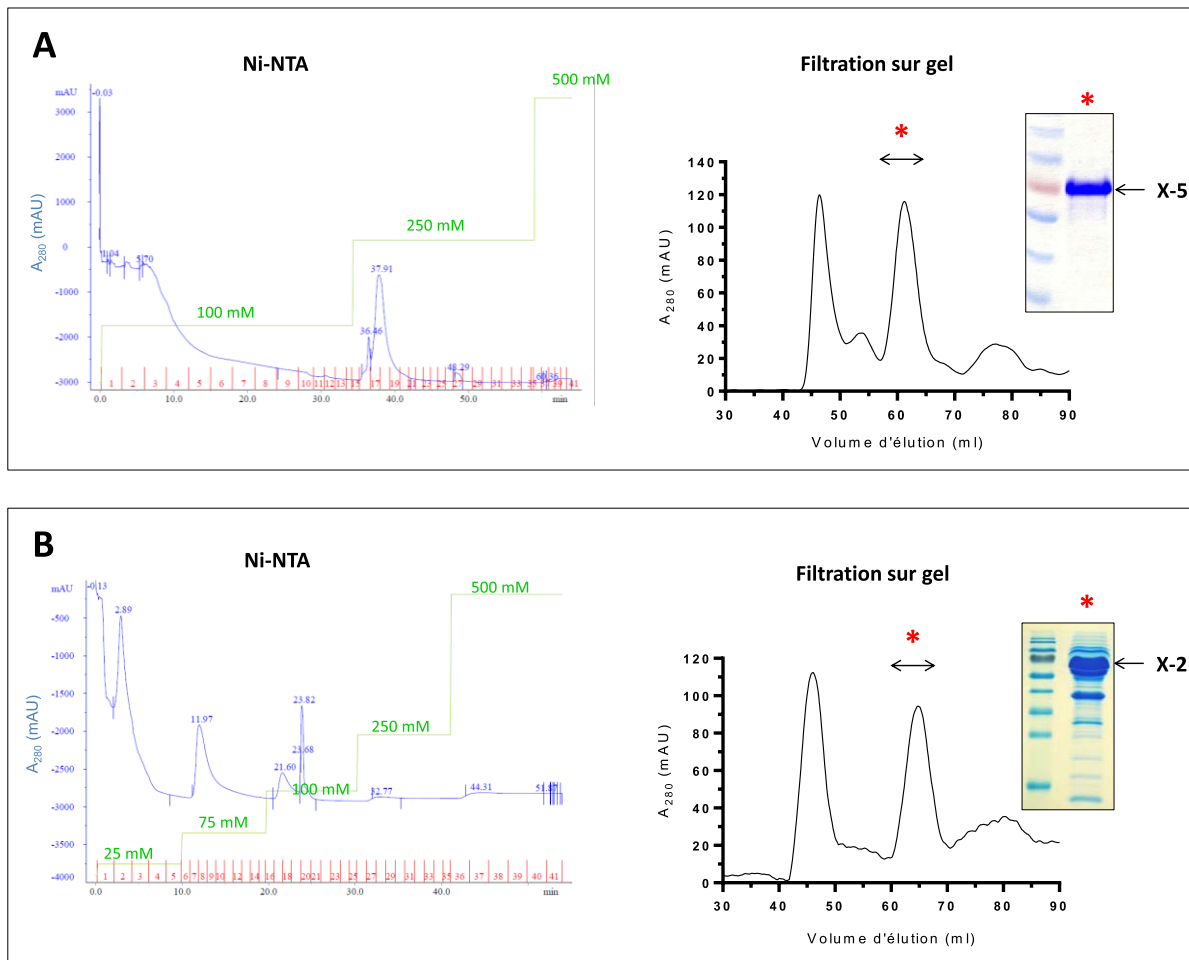
Basées sur les prédictions réalisées *in silico* et sur l'expérience de protéolyse ménagée, nous avons réalisé 5 nouvelles constructions de la *PfECT* pour lesquelles l'extrémité N-ter et/ou la région de liaison ont été tronquées (Figure 55). Ces constructions ont dans un premier temps été clonées dans un vecteur pET15b TEV possédant une étiquette poly-His en N-ter de la protéine ainsi qu'un site de clivage par la TEV afin de pouvoir éliminer l'étiquette poly-His après purification. Les protéines ont ensuite été exprimées dans la souche *E. coli* BL21 (DE3) selon un protocole identique à celui utilisé pour la *PfECT* entière. Les tests d'expression ont montré que les trois constructions possédant une région de liaison tronquée (constructions X-1, X-3 et X-4) sont retrouvées à près de 95% dans la fraction bactérienne insoluble. La région de liaison apparaît donc comme nécessaire pour la solubilité de la protéine. Les deux constructions X-2 et X-5 possédant uniquement une délétion de l'extension N-terminale sont obtenues sous forme soluble, indiquant que l'extrémité N-ter qui est prédite comme étant structurée est dispensable pour la solubilité de la *PfECT*.

<i>PfECT</i>				Poly-His N-ter	Poly-His C-ter
Construction		PM	Solubilité	Purification	Purification
<b>X-1</b>		45 kDa	✗		
<b>X-2</b>		55 kDa	✓	✗	≈
<b>X-3</b>		50 kDa	✗		
<b>X-4</b>		44 kDa	✗		
<b>X-5</b>		60 kDa	✓	✓	✓

**Figure 55. Constructions réalisées pour la cristallisation de la *PfECT***

NNNNN : répétitions d'asparagines dans la région de liaison. Pour chaque construction sont indiquées la solubilité chez *E.coli* BL21 (DE3) ainsi que l'efficacité de la purification par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA en fonction de la position de l'étiquette poly-His dans la construction (✗ : mauvaise, ≈ : correcte, ✓ : bonne)

La construction X-5 ([70-573], 60 kDa) a ensuite pu être purifiée selon le protocole optimisé pour la *PfECT* entière (Figure 56A). Lors de l'étape de filtration sur gel sur colonne S200, la protéine est éluée à un volume correspondant à une masse moléculaire apparente de  $\approx 175$  kDa (2,9 monomères). A l'issue des deux étapes de purification, la *PfECT* X-5 est obtenue avec une pureté  $> 95$  % d'après analyse par SDS-PAGE. La quantité de protéine obtenue par l'utilisation de ce protocole optimisé est d'environ 2 mg par litre de culture bactérienne. L'activité de la protéine a été vérifiée et celle-ci est similaire à la *PfECT* entière. Sept kits de cristallisation (soit 672 conditions) ont été testés avec cette construction à une concentration de 7 mg/ml, en absence de ligand ou en présence de CTP ou de CDP-Etn. Malheureusement, aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir un cristal. Il semblerait donc que cette construction ne soit pas encore optimale pour la cristallogénèse, peut-être parce qu'elle n'est pas assez compacte.



**Figure 56. Purification des *PfECT X-5* et *PfECT X-2*.**

**A.** Purification de la *PfECT X-5*. **B.** Purification de la *PfECT X-2*. Les profils d'éluion Ni-NTA et de gel filtration sont présentés pour chaque protéine. Le pic correspondant à la forme apparente dimérique est indiqué par une double flèche. En insertion, SDS-PAGE (12%) du profil de filtration sur gel.

La construction X-2 ([114-573], 55 kDa) possède une extension N-terminale plus courte que la *PfECT X-5* et pourrait donc présenter un meilleur profil pour la cristallogénèse. Des problèmes d'accessibilité de l'étiquette poly-His (N-ter) ont néanmoins été rencontrés lors de l'étape de purification par affinité sur colonne de Ni-NTA. Cette construction a donc été clonée dans un vecteur pET24b permettant cette fois-ci l'ajout d'une étiquette poly-His en C-ter de la protéine. Cette modification a permis d'améliorer en partie l'accrochage de la protéine sur la colonne Ni-NTA mais elle reste éluée relativement tôt, à 75 mM et 100 mM d'imidazole (Figure 56B). De fait, la pureté obtenue après filtration sur gel est assez faible ( $\approx 70\%$ ). La masse moléculaire de la protéine évaluée à partir du profil d'éluion de la filtration sur gel est d'environ 125 kDa (2,2 monomères). Le rendement de purification de la *PfECT X-2*

est d'environ 1 mg/l de culture bactérienne. Tout comme pour la *PfECT* X-5, l'activité enzymatique de la protéine a été vérifiée et la délétion des 114 résidus en N-terminal de la *PfECT* n'affecte pas l'activité de la protéine. L'optimisation des conditions de purification et de cristallisation est en cours pour cette construction.

### 2.5.2. Modélisation par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

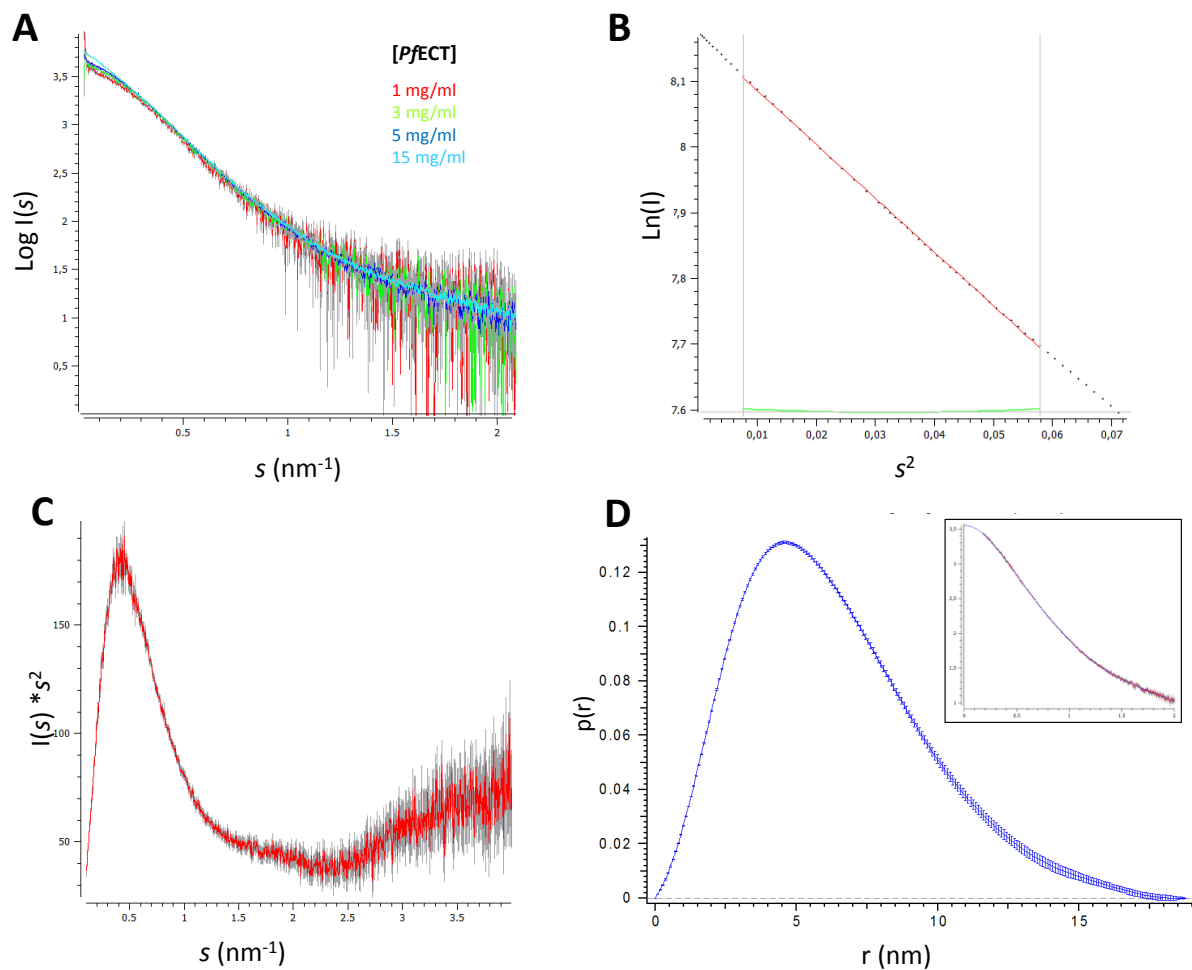
#### *Analyse des données brutes :*

Les différentes prédictions de structures secondaires et de régions désordonnées semblent indiquer que la *PfECT* est en partie non structurée. La diffusion des rayons X aux petits angles (ou SAXS) est une technique intéressante pour l'étude de ce type de protéine car elle est réalisée en solution et ne nécessite donc pas l'étape critique de cristallisation. Le SAXS donne des informations de basse résolution (15-10 Å) mais peut renseigner sur le niveau de désordre ainsi que sur la présence de changements conformationnels de la protéine. Lorsque les données sont d'assez bonne qualité, une reconstruction de la forme globale de la protéine peut également être réalisée.

Les études par SAXS ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Pau Bernadó au Centre de Biochimie Structurale à Montpellier. Nous avons collecté des données pour 4 concentrations différentes de *PfECT* (1, 3, 5 et 15 mg/ml). La superposition des données brutes pour les 4 concentrations indique l'absence de phénomène d'oligomérisation dépendant de la concentration (Figure 57A). Il est à noter que le décalage des courbes pour les très petits angles (gauche de la courbe) est dû à un effet d'interaction inter-particules plus important pour les hautes concentrations en protéine. Nous avons ensuite réalisé une courbe chimère par fusion des données obtenues pour les 4 échantillons, permettant ainsi une meilleure précision des données pour les analyses ultérieures. La représentation des données  $\text{LnI}(s)$  en fonction de  $s^2$  (Représentation de Guinier) nous a permis d'évaluer le rayon de giration ( $R_g$ ) de la protéine à 49,7 Å (Figure 57B). Les données brutes indiquent également un état d'oligomérisation dimérique de la protéine et l'absence d'agrégation des échantillons analysés. Le  $R_g$  permet d'évaluer la dimension globale de la protéine. Dans le cas de la *PfECT* dimérique, ce rayon de giration n'est pas compatible avec une forme totalement



globulaire attendue pour une protéine de 136 kDa ( $R_g$  théorique de  $\approx 34 \text{ \AA}$ ) ni totalement non structurée ( $R_g$  théorique de  $\approx 100 \text{ \AA}$ ). La représentation de Kratky des données indique cependant un profil globalement compact pour la *PfECT*, avec la présence d'un seul domaine (Figure 57C). Enfin la fonction de distribution des distances,  $p(r)$ , générée à partir des données et représentant l'ensemble des distances entre deux atomes au sein de la protéine, permet d'évaluer la taille maximale,  $D_{max}$ , de la *PfECT* à  $180 \text{ \AA}$  (Figure 57D).



**Figure 57. Traitement des données brutes obtenues pour l'analyse de la *PfECT* entière par SAXS**

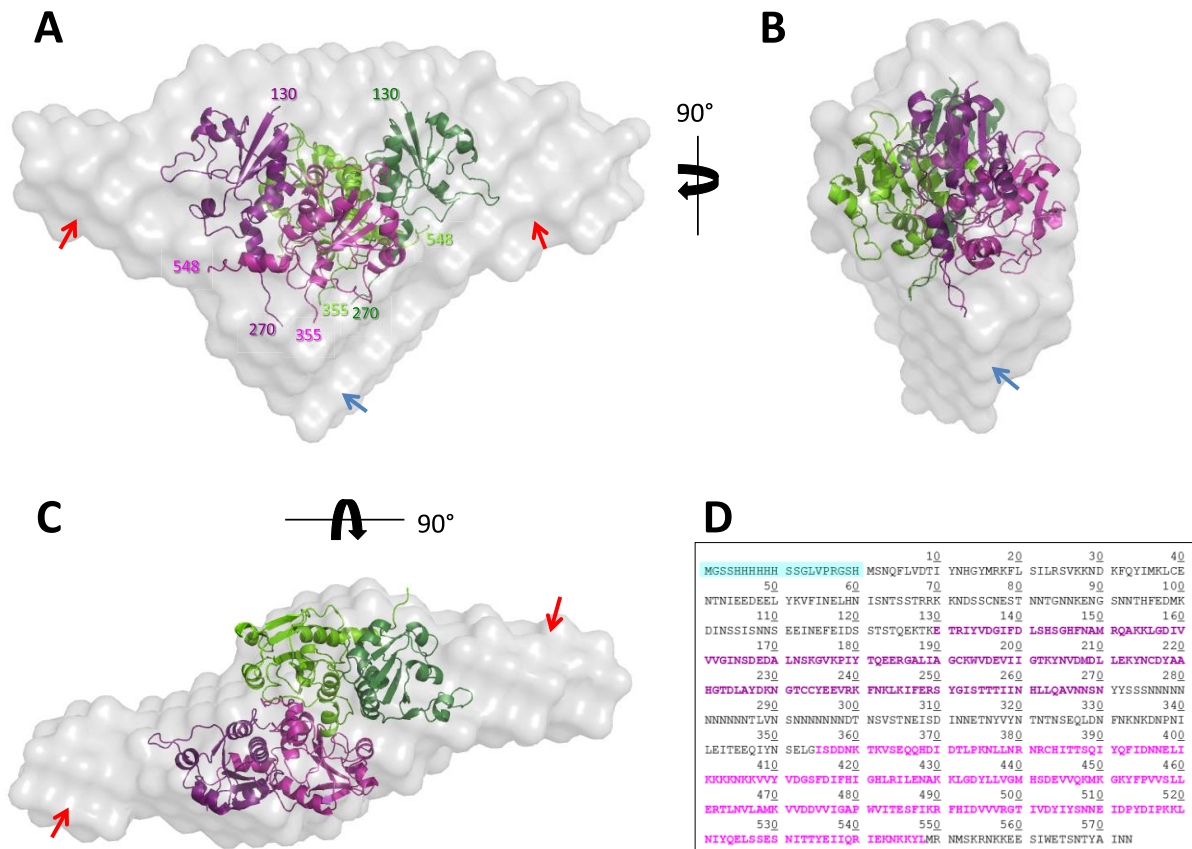
**A.** Superposition des données brutes moins le signal du tampon, obtenues pour 4 échantillons de de *PfECT* (1, 3, 5 et 15 mg/ml). Les données sont exprimées en intensité du signal ( $\text{Log} I(s)$ ) en fonction du vecteur de diffusion ( $s$ ). **B.** Représentation de Guinier ( $\text{Ln}(I)$  en fonction de  $s^2$ ) et ajustement des données permettant la détermination du rayon de giration  $R_g$ . **C.** Représentation de Kratky ( $I(s) \cdot s^2$  en fonction de  $s$ ) obtenue pour la fusion des 4 courbes présentées dans la Figure A. **D.** Fonction de distribution des distances,  $p(r)$ , représentant l'ensemble des distances entre deux atomes et permettant la détermination de la distance maximale interatomique.  $r$  est le vecteur de distance en nm.

*Modélisation de la forme de la PfECT ab initio :*

Il est directement possible de réaliser un modèle *ab initio* de la forme tridimensionnelle de la protéine à partir de la fonction de distribution des distances générée précédemment. Nous avons réalisé ce modèle en utilisant le serveur DAMMIF (Franke 2009) à partir des données ajustées présentées dans la Figure 57D. DAMMIF construit les modèles en remplissant un volume initial par des billes et affine ensuite l'arrangement des billes jusqu'à ce que le volume soit en adéquation avec les données expérimentales. 10 modèles ont ainsi été générés en fixant une contrainte de symétrie C2 présente dans la forme dimérique de la PfECT. La compatibilité de chaque modèle avec les données expérimentales est évaluée par la valeur de  $\chi^2$ . La valeur de  $\chi^2$  des 10 modèles générés pour la PfECT varie de 0,784 à 0.865, signifiant une adéquation correcte entre les prédictions et les données réelles. Un modèle moyen a ensuite été généré à partir des 10 modèles initiaux. Nous avons enfin replacé le modèle comparatif dimérique des domaines CT de la PfECT, construit à partir de la structure cristallographique de la ECT humaine (Maheshwari et al. 2013), dans le modèle *ab initio* (Figure 58).

L'intégration des domaines CT dans l'enveloppe se fait relativement bien. L'hélice  $\alpha$  impliquée dans la dimérisation de la HsECT est retrouvée dans le modèle de la PfECT. Il est alors possible que cette hélice ait le même rôle dans l'oligomérisation de la PfECT (Figure 58C). Le modèle par homologie de la PfECT ne contient ni les 149 résidus en N-ter du domaine CT-1, ni les 84 résidus de la région de liaison qui doivent donc être intégrés à l'espace laissé vide dans l'enveloppe de la protéine (Figure 58D).

Dans ce modèle *ab initio*, les deux régions de liaisons semblent être à proximité et il paraît difficilement envisageable qu'elles soient totalement déstructurées malgré l'absence de structures secondaires prédites *in silico* (Figure 58, flèches bleues). Il est alors concevable que les deux régions de liaisons du dimère soient en contact et participent à la dimérisation de la protéine. Il faut garder à l'esprit que ce modèle reste incomplet du fait de l'absence de données structurales concernant notamment l'extension N-terminale



**Figure 58. Modèle *ab initio* de la PfECT entière obtenu à partir des données de SAXS.**

**A, B et C.** Différentes vues du modèle *ab initio* de la PfECT entière représentant la forme de la protéine en solution (surface grise). Le modèle 3D du dimère de la PfECT est positionné dans l'enveloppe. Les monomères 1 et 2 sont respectivement représentés en violet et vert. Les domaines CT-1 sont de couleur foncée et les domaines CT-2 de couleur claire. Le numéro des premier et dernier résidus de chaque chaîne est indiqué dans la Figure A. Les positions théoriques des extensions N-terminales et des régions de liaisons sont respectivement indiquées les flèches rouges et bleues. **D.** Séquence de la PfECT entière (étiquette poly-His en N-ter) indiquant les résidus présents dans le modèle comparatif des domaines CT sont en violet (CT-1) et rose (CT-2).

### 3. Conclusions

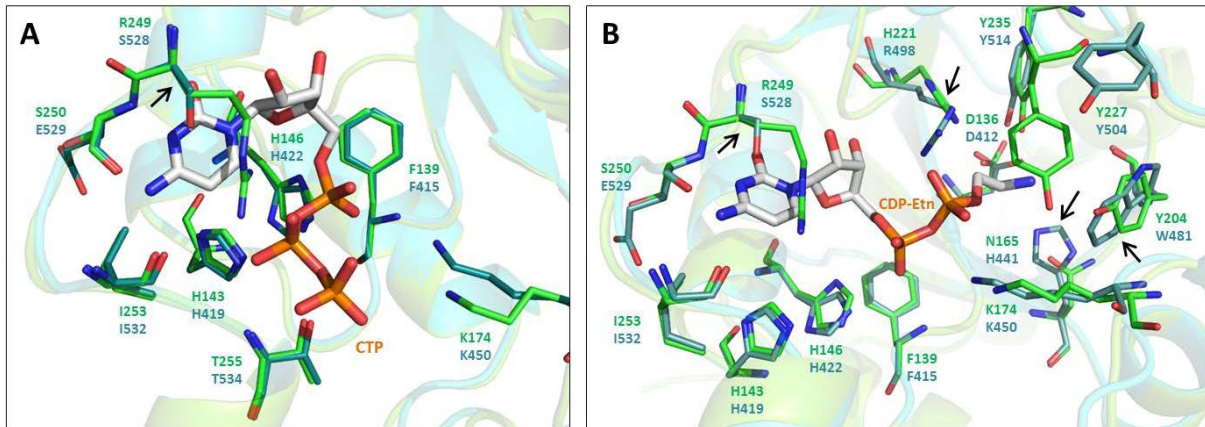
Nous avons caractérisé la PfECT en combinant des approches d'enzymologie, d'interactions protéine-ligand et des études structurales à basse résolution. Les données bibliographiques concernant le mécanisme catalytique des cytidyllyltransférases semblent indiquer des différences notables entre les CCT et ECT. Jusqu'alors, la seule étude mécanistique réalisée pour les ECT suggérait un ordre d'addition des substrats chez la ECT du rat (Sundler 1975), ce qui ne semble pas être le cas chez les CCT de *P. falciparum* (Nagy

et al. 2013) ou du rat (Mages et al. 1988). Pour la *Pf*ECT, nos études enzymatiques et biophysiques montrent l'existence d'un mécanisme à complexe ternaire avec addition ordonnée des deux substrats, la liaison du CTP précédant celle de la P-Etn. Ces résultats sont donc similaires à ceux décrits pour la ECT du rat et semblent confirmer l'existence de différences dans le processus de catalyse entre les ECT et les CCT.

Nous avons précédemment montré la présence d'un seul domaine catalytiquement actif (CT1) chez la *Pf*ECT (Maheshwari et al. 2013) et des résultats similaires ont récemment été retrouvés chez la *Hs*ECT (Tian et al. 2014). Les études par ITC et SPR réalisées pendant cette thèse ont permis de montrer que le domaine inactif (CT-2) a perdu sa capacité de liaison des substrats et produits. De même, nos données biophysiques et enzymatiques suggèrent l'absence de régulation de la *Pf*ECT *via* la liaison des dérivés de CTP (CMP-CDP) dans le domaine CT-2. La structure de la *Hs*ECT indique que la dimérisation de l'enzyme se fait par l'intermédiaire des deux domaines CT-2 *via* une hélice  $\alpha$  retrouvée dans le modèle de la *Pf*ECT. Le domaine CT-2 pourrait alors avoir un rôle essentiellement structural afin de permettre et de maintenir la dimérisation de la protéine. Il est possible que ce domaine soit également impliqué dans une régulation allostérique de l'enzyme par la liaison d'autres molécules chez le parasite. Néanmoins, l'identification de tels régulateurs apparaît pour le moment difficile. Enfin, il paraît peu probable que ce domaine ait évolué vers une autre fonction de catalyse en l'absence de motif signature d'autres familles d'enzymes dans la séquence du domaine CT 2.

Un modèle comparatif des domaines CT de la *Pf*ECT avait été précédemment réalisé en utilisant la structure cristallographique de la ECT humaine comme référence (Maheshwari et al. 2013). Afin de préciser le positionnement des acides aminés dans la poche catalytique, nous avons construit deux nouveaux modèles comparatifs à partir des structures cristallographiques de la *Bs*GCT (PDB:1COZ) en complexe avec le CTP (Weber et al. 1999) et de la CCT de rat en complexe avec la CDP-Cho (PDB:3HL4) (Lee et al. 2009), en conservant les ligands présents dans la structure afin d'améliorer la qualité du modèle. Les pourcentages d'identité de séquence entre la *Bs*GCT [1-126] et les domaines CT-1[130-270] et CT-2[412-648] de la *Pf*ECT sont respectivement de 33% et 40%. La CCT de rat [40-215] partage quant à elle 35% d'identité de séquence avec les deux domaines CT de la *Pf*ECT. Grâce aux structures cristallographiques des ligands CTP et CDP-Cho dans les sites

catalytiques respectifs de la *Bs*GCT et de CCT de rat, nous avons réalisé un amarrage comparatif du CTP et de la CDP-Etn dans le modèle de la *Pf*ECT (Figure 59).



**Figure 59. Amarrage comparatif du CTP et de la CDP-Etn dans les sites catalytiques des domaines CT-1 et CT-2 de la *Pf*ECT**

**A.** Superposition des domaines CT de la *Pf*ECT (vert CT-1 et bleu CT-2) et positionnement du CTP. Les résidus des sites actifs sont représentés en bâton. **B.** Superposition des domaines CT de la *Pf*ECT et positionnement de la CDP-Etn. Le code couleur est similaire à la Figure A.

L'analyse du mode de liaison du CTP dans la poche catalytique des domaines CT-1 et CT-2 indique une différence majeure entre les deux sites avec la présence d'une sérine (S528) dans le domaine CT-2 à la place d'une arginine (R249) dans le domaine CT-1 (Figure 59A). Ce résidu est important pour la liaison du CTP à la *Bs*GCT car il stabilise à la fois le groupement cytidyl par empilement  $\pi$  et le phosphate  $\beta$  par liaisons hydrogène (Weber et al. 1999). Chez *Pf*ECT, le résidu Ser en position équivalente à l'Arg dans le domaine CT-2 ne peut pas interagir avec le groupement cytidyl. Ceci pourrait expliquer la perte d'affinité du domaine CT-2 pour le CTP. L'arginine 249 du domaine CT-1 pourrait interagir de la même manière avec le groupement cytidyl de la CDP-Etn (Figure 59B). Trois différences importantes entre les domaines CT-1 et CT-2 sont également retrouvées dans le sous-site de liaison du groupement éthanolamine. La tyrosine 204 pouvant établir une liaison hydrogène avec l'éthanolamine dans le site CT-1 est remplacée par un tryptophane (W481) dans le site CT-2. Ceci impliquerait la perte de cette interaction dans le domaine CT-2. La substitution d'une asparagine (N165) par une histidine (H441) dans le site CT-2 pourrait également représenter une contrainte pour la liaison de l'éthanolamine. Enfin, une autre différence importante existe entre ces deux sites avec la substitution d'une histidine (H221) dans le site

CT-1 par une Arg (R498) dans le site CT-2. Selon le positionnement des chaînes latérales, l'Arg498 pourrait éventuellement provoquer une contrainte stérique pour le positionnement du motif P-Etn dans le site CT-2. Ces quatre différences entre les poches catalytiques des domaines CT-1 et CT-2 pourraient être conjointement responsables de la perte d'affinité pour la CDP-Etn. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que ces deux modèles structuraux de la *PfECT* restent prédictifs et, en l'absence d'une structure cristallographique à haute résolution de la *PfECT* en complexe avec ces deux ligands, il est difficile de réaliser une comparaison plus précise entre les domaines CT-1 et CT-2 de l'enzyme.

Dans le but d'obtenir des informations sur l'organisation tridimensionnelle de la *PfECT*, nous avons réalisé une étude par SAXS. Les résultats obtenus montrent que la protéine possède sans doute moins de régions flexibles qu'indiqué par l'analyse *in silico* de la séquence primaire de la protéine. A ce titre, nos essais pour modéliser la structure de la protéine en utilisant une méthode adaptée à l'étude des protéines possédant des parties non structurées ont échoué en raison d'une trop forte compaction de la protéine (Ensemble Optimization Method, (Bernado et al. 2007)). Les données de SAXS confirment une architecture dimérique de la *PfECT*, comme décrite précédemment pour les ECT mammifères (Sundler 1975; Tie and Bakovic 2007). A partir des données de SAXS, nous avons pu reconstruire un modèle *ab initio* de la forme globale de la protéine qui suggère que l'extension N-terminale et, plus étonnamment, la région de liaison puissent être en partie structurées. Afin d'affiner ce modèle, il apparaît nécessaire de réaliser une étude similaire sur une des constructions possédant une extension N-terminale tronquée et de confronter le modèle obtenu à celui de la *PfECT* entière. De même, il serait intéressant de réaliser des constructions ne comprenant que l'extension N-terminale ou la région de liaison et d'évaluer leur niveau de structuration. Ceci pourrait être réalisé dans un premier temps par dichroïsme circulaire. Si ces deux régions de la protéine apparaissent comme structurées, la résolution de leur structure tridimensionnelle pourrait alors être envisagée par RMN.

Enfin, l'obtention de la structure tridimensionnelle de la *PfECT* à haute résolution par cristallographie constitue une étape importante pour la suite de ce projet. Les essais de cristallogénèse seront poursuivis avec la construction *PfECT-X2*, débutant au premier domaine CT-1. Cette construction a montré une meilleure stabilité que la *PfECT* entière et pourrait être prometteuse.

## Chapitre III. Identification et caractérisation du motif de liaison de la choline chez la *PfCK* et la *PfCCT*

Ce projet a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Beáta Vértessy à l'Institut d'Enzymologie de Budapest (Hongrie). Notre contribution à ce travail a été l'étude du motif de liaison de la choline chez la *PfCK*, dont l'expression sous forme recombinante et la caractérisation enzymatique avait déjà fait l'objet d'études au laboratoire (Alberge 2009; Alberge et al. 2010). Ce travail a donc été réalisé en parallèle du projet de thèse ciblé sur les cytidylyltransférases de *P. falciparum*. C'est pourquoi nous avons choisi de le présenter brièvement ci-dessous et d'y joindre la publication qui y est associée. La *PfCK* et la *PfCCT* catalysent successivement la phosphorylation de la choline (Cho) et le transfert d'un groupement CDP sur la phosphocholine (P-Cho) dans la voie de synthèse *de novo* de la phosphatidylcholine (PC) (Figure 60).

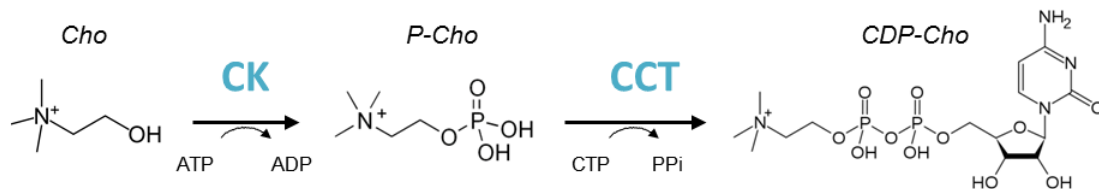


Figure 60. Réactions catalysées par la *PfCK* et la *PfCCT*

La choline est un ammonium quaternaire (AQ) dont la distribution diffuse de la charge positive la rend fortement polarisable. Cette caractéristique permet à la choline d'établir des interactions cation- $\pi$  avec des résidus aromatiques (Dougherty 2013) essentiels pour la reconnaissance dans le cas particulier des récepteurs (Salonen et al. 2011).

Une analyse exhaustive des structures cristallographiques de protéines accommodant des AQ a mis en évidence l'existence de différences structurales importantes dans le mode de

reconnaissance de ces ligands par les enzymes d'une part et les récepteurs d'autre part. En effet, alors que ces derniers possèdent trois ou quatre résidus aromatiques formant une cage autour du motif AQ (également appelée « aromatic box »), le site catalytique des enzymes ne contient en général qu'un ou deux résidus aromatiques complétés par deux ou trois résidus polaires ou chargés. Afin de comprendre les raisons de telles différences structurales entre ces deux catégories de protéines, nous avons choisi comme cas d'étude la *PfCK* et la *PfCCT*. Nous avons réalisé des mutants ponctuels de chacun des résidus impliqués dans la liaison de la choline pour ces deux enzymes et avons analysé leur implication aussi bien dans l'activité catalytique que dans la liaison du motif choline.

Nos résultats confirment le rôle essentiel joué par les résidus aromatiques dans la liaison de la choline. L'abolition du caractère aromatique provoque en effet une diminution drastique de l'affinité des enzymes pour les ligands Cho, P-Cho et CDP-Cho comme indiqué par une augmentation ( $\times 10$ ) des valeurs de  $K_m$  et de  $K_D$  pour ces substrats ou produits. La perte d'affinité pour la Cho et la P-Cho se traduit également par une diminution importante de la vitesse de réaction. A titre d'exemple, la mutation en alanine du tryptophane 392 de la *PfCK* induit une augmentation d'un facteur 30 de la valeur du  $K_m$  pour la choline et une diminution d'un facteur 3 de la  $V_{max}$  de la réaction. De manière similaire la mutation W692A de la *PfCCT* provoque une modification radicale des paramètres thermodynamiques de la liaison de la CDP-Cho. L'interaction entre le produit et l'enzyme est majoritairement gouvernée par un caractère enthalpique pour la *PfCCT* sauvage ou entropique pour la *PfCCT* mutée W692A.

La suppression du caractère polaire ou chargé des acides aminés de la cage provoque quand à elle des perturbations beaucoup plus variées. Les résidus chargés font partie intégrante du mécanisme de liaison du motif choline. La mutation du glutamate 324 en alanine de la *PfCK* induit une forte diminution de l'affinité pour la choline, la constante d'affinité  $K_m$  passant de 0,24 mM à 15,9 mM. De même, la mutation de l'aspartate 623 en asparagine chez la *PfCCT* altère fortement la liaison de la CDP-Cho et provoque, au même titre que la mutation W692A, une augmentation du caractère entropique de la liaison de la CDP-Cho. Les résidus polaires et non chargés semblent contribuer de manière beaucoup plus limitée à la liaison du motif AQ, à l'exception de la Tyr 741 de la *PfCCT*. La mutation Y741F induit une augmentation d'un facteur 20 du  $K_D$  de la CDP-Cho. Le rôle des résidus polaires



semble également moins prépondérant d'un point de vue de l'efficacité de catalyse, les différents mutants Y→A réalisés chez la *PfCK* conservant une  $V_{max}$  similaire à celle de l'enzyme sauvage.

Ces travaux ont montré que la fonction enzymatique de la *PfCK* et de la *PfCCT* est soutenue par la combinaison d'interactions de type cation- $\pi$  et électrostatiques. Ce type d'architecture a été nommé « composite aromatic box » et semble être une caractéristique largement retrouvée chez les enzymes accommodant un motif de type AQ. La « composite aromatic box » a été identifiée dans 86 des 92 structures cristallographiques analysées au cours de cette étude.

Le mode de reconnaissance des AQ chez les enzymes apparaît donc sensiblement différent de celui des récepteurs. Cette différence en termes de paramètres cinétiques et thermodynamiques est sans doute reliée aux spécificités fonctionnelles de ces deux types de protéines. Dans le cas des récepteurs, l'existence d'une liaison hautement spécifique et de forte affinité est capitale. La présence d'une cage formée uniquement de résidus aromatiques permettrait, de par sa rigidité et la force des liaisons mises en jeu, d'accomplir un tel rôle. En revanche, le site catalytique des enzymes doit non seulement accommoder les substrats mais également posséder une importante dynamique conformationnelle pour l'étape de catalyse et le relargage des produits. La présence de résidus polaires et chargés, permettrait alors de diminuer le caractère hydrophobe du motif de liaison et pourrait contribuer à augmenter la dynamique conformationnelle locale du site actif.

# Composite Aromatic Boxes for Enzymatic Transformations of Quaternary Ammonium Substrates\*\*

Gergely N. Nagy,\* Livia Marton, Alicia Contet, Olivér Ozohanics, Laura-Mihaela Ardelean, Ágnes Révész, Károly Vékey, Florin Dan Irimie, Henri Vial, Rachel Cerdan, and Beáta G. Vértessy\*

**Abstract:** Cation– $\pi$  interactions to cognate ligands in enzymes have key roles in ligand binding and enzymatic catalysis. We have deciphered the key functional role of both charged and aromatic residues within the choline binding subsite of CTP:phosphocholine cytidyltransferase and choline kinase from *Plasmodium falciparum*. Comparison of quaternary ammonium binding site structures revealed a general composite aromatic box pattern of enzyme recognition sites, well distinguished from the aromatic box recognition site of receptors.

Cation– $\pi$  interactions with electrostatic ion–quadrupole and ion-induced dipole character are frequent key elements of molecular recognition.<sup>[1]</sup> Trimethyl ammonium moieties are of peculiar interest as diffuse distribution of their charge renders them highly polarizable.<sup>[2]</sup> For their accommodation, a sterically restricted protein environment has evolved, in which desolvation of the charged moiety enables its efficient binding through cation– $\pi$  interactions from aromatic residues (receptor function), as reviewed recently.<sup>[3]</sup> Beyond binding and transporting such ligands, numerous enzymes catalyze their chemical transformation, involved in key cellular functions. We introduce a clear general framework that governs the architecture of the active sites of these enzymes. Our experimental results together with a full range protein data bank query establish a novel common structural epitope for enzymes, termed as “composite aromatic box”, distinct

from the previously described aromatic box/cage of receptor proteins.

As a case study, we choose a model system to decipher key elements of ligand binding and mechanism of action of two enzymes, catalyzing consecutive steps in the phospholipid biosynthetic process of *Plasmodium falciparum*. Choline kinase (*Pf*CK, E.C. 2.7.1.32) phosphorylates Cho (choline) to ChoP (choline-phosphate) using ATP, CTP:phosphocholine cytidyltransferase (*Pf*CCT, E.C.2.7.7.15) catalyzes the CTP + ChoP (choline-phosphate) → CDPCho (CDP-choline) + PP<sub>i</sub> (pyrophosphate) reaction. These enzymes are targets for recently developed highly potent choline analogue antimalarial agents;<sup>[4,5]</sup> however, current structural and mechanistic insights still fail to fully explain how the aromatic/hydrophobic interactions at the choline subsite contribute to ligand binding and catalysis.

The choline binding cleft of *Pf*CCT is a partially hydrophobic pocket that accommodates quaternary ammonium moieties of ChoP and CDPCho (Figure 1A). This subsite consists of strictly conserved residues of either charged or aromatic character, the latter providing cation– $\pi$  interaction to the choline moiety of cognate ligands.<sup>[6]</sup> To investigate the role of these residues in ligand binding and enzyme action, we designed a series of point mutants conservative for structure in a construct encompassing the catalytic domain of *Pf*CCT (*Pf*CCT  $\Delta$ K<sup>[6]</sup>) by modulating the character of charged (D623N, Y741F) as well as aromatic (W692F, W692Y, Y714F) residues. The introduced mutations do not perturb the overall

[\*] G. N. Nagy, B. G. Vértessy  
 Department of Applied Biotechnology and Food Science  
 Budapest University of Technology and Economics  
 1111 Budapest (Hungary)

L. Marton  
 Doctoral School of Multidisciplinary Medical Science  
 University of Szeged, 6720 Szeged, (Hungary)

G. N. Nagy, L. Marton, B. G. Vértessy  
 Institute of Enzymology, Research Centre of National Sciences, HAS  
 1117 Budapest (Hungary)  
 E-mail: nagy.gergely@ttk.mta.hu  
 vertessy@mail.bme.hu

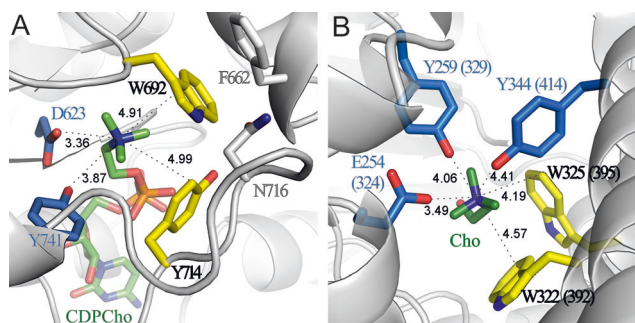
L.-M. Ardelean, Prof. F. D. Irimie  
 Faculty of Chemistry and Chemical Engineering  
 Babes-Bolyai University  
 400028 Cluj-Napoca (Romania)  
 Dr. O. Ozohanics, Dr. Á. Révész, Prof. K. Vékey  
 Institute of Organic Chemistry  
 Research Centre of National Sciences, HAS  
 1117 Budapest (Hungary)

A. Contet, Dr. H. Vial, Dr. R. Cerdan  
 Laboratoire Dynamique des Interactions Membranaires Normales et  
 Pathologiques, UMR5235, CNRS, University Montpellier 2  
 34095 Montpellier (France)

[\*\*] This work was supported the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA NK 84008, OTKA K109486), the Baross program of the New Hungary Development Plan (3DSTRUCT, OMF02-00266/2010 REG-KM-09-1-2009-0050), the Hungarian Academy of Sciences (TTK IF-28/2012 and MedinProt) and the European Commission FP7 BioStruct-X project (contract No. 283570), to BGV, in addition, “Agence Nationale de la Recherche” (NKTH ADD-MAL, ANR-09-BLAN-0397), EU FP7/EviMalar NoE 242095). G.N.N. was supported by the Pro Progressio Foundation and Zsuzsa Szabo Foundation. M.L. is a fellow of the Multidisciplinary Medical Science PhD program, University of Szeged. This work was supported by a grant of the Romanian National Authority for Scientific Research, CNCS-UEFISCDI, project number PN-II-ID-PCE-2011-3-0775.



Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201408246>.



**Figure 1.** Coordination of the choline moiety at the active site of *PfCCT* and *PfCK*. A) Active site close-up of *PfCCT* MΔK (PMDb ID: PM0078719). B) Active site close-up of choline kinase from *Plasmodium knowlesi*, a close homolog of *PfCK* (PDB ID: 3C5I). Corresponding residue numbers of *PfCK* are given in parenthesis. Structures are shown as a grey cartoon model, with the bound ligand shown as stick model, atomic coloring with green carbon. Side chains of charged and cation- $\pi$  interactor residues within 5 Å and 6 Å of the quaternary nitrogen atom are displayed as sticks in atomic coloring with carbon is either blue or yellow for charged and aromatic interactions, respectively; O, red; N, blue; P, orange, with interaction distances indicated in Ångströms. Note the coordination partners of W692 in Figure 1A, displayed as sticks, colored in atomic coloring, grey carbon.

quaternary structure of the enzyme (compare Figure S5 and Table S4 in the Supporting Information, SI). We performed enzyme kinetic investigations as well as a thermodynamic analysis of CDPCho binding by isothermal titration calorimetry as described in the SI.

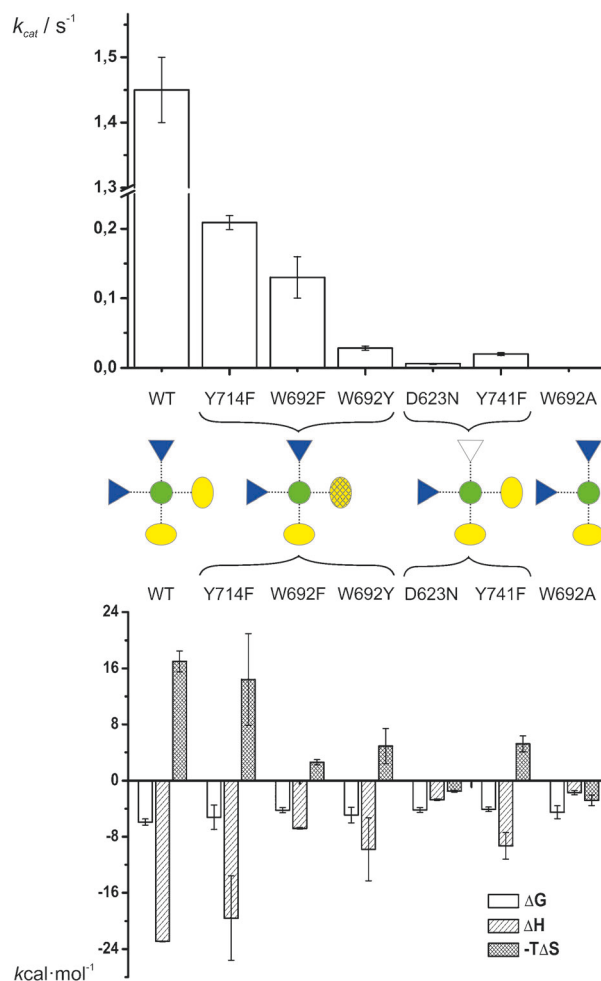
Results indicate on one hand that the substitution of charged to noncharged residues yielded profound perturbation effects on catalytic efficiency (Figure 2, Table 1). This is mostly due to an altered choline coordination, as deduced from both  $K_{M,ChoP}$  and the impaired CDPCho binding

**Table 1:** Kinetic characterization of *PfCCT* MΔK mutants.

Enzyme	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_{M,CTP}$ [μM]	$K_{M,ChoP}$ [mM]	rel. $k_{cat}/$ $K_{M,CTP}$	rel. $k_{cat}/$ $K_{M,ChoP}$
MΔK <sup>[a]</sup>	1.45 ± 0.05	168 ± 17	1.8 ± 1.1	1	1
MΔK <sup>Y714F</sup>	0.21 ± 0.01	580 ± 60	10.2 ± 1.1	0.042	0.026
MΔK <sup>W692F</sup>	0.13 ± 0.03	890 ± 380	7.5 ± 2.4	0.018	0.022
MΔK <sup>W692Y</sup>	0.03 ± 0.003	191 ± 64	1.3 ± 0.2	0.017	0.029
MΔK <sup>D623N</sup>	0.006 ± 0.001	460 ± 190	13.1 ± 3.1	0.0015	0.00057
MΔK <sup>Y741F</sup>	0.019 ± 0.002	790 ± 180	8.5 ± 2.0	0.0028	0.0028
MΔK <sup>W692A</sup>	6 × 10 <sup>-4</sup>	ND <sup>[b]</sup>	ND <sup>[b]</sup>	ND <sup>[b]</sup>	ND <sup>[b]</sup>

[a] Values reported previously.<sup>[6]</sup> [b] Values cannot be determined as seriously impaired ligand binding rendered results of Michaelis–Menten fit inaccurate.

capability, characterized with diminished enthalpy of binding (Figure 2, Table 2, and Figure S7). On the other hand, partial conservation of the aromatic residues involved in cation- $\pi$  interactions by tuning electrostatics, ring size, and quadrupole moment of the aromatic ring is still somewhat compatible with ligand binding and catalysis. The observed diverse performance of the mutants argue for the valid distinction of their charged versus cation- $\pi$  interaction nature, and for



**Figure 2.** Effect of mutations on *PfCCT* MΔK enzyme activity and ligand binding capability. Catalytic turnover and thermodynamic parameters of CDPCho binding (binding free enthalpy ( $\Delta G$ ), enthalpy ( $\Delta H$ ), and entropy ( $\Delta S$ )) of *PfCCT* MΔK and its point mutants are shown in top and bottom panels, respectively. The cartoon illustrates the quaternary ammonium binding site of *PfCCT* with charged and aromatic interaction residues depicted as dark gray triangles and light gray ellipses, respectively. The functional effect of point mutation on a residue is indicated: altered aromatic character is depicted with a grid; exchange of charged to noncharged residue is marked by the empty triangle whereas alanine mutation of a given residue is depicted by deleting the respective symbol. Note the break on the y axis on the top panel.

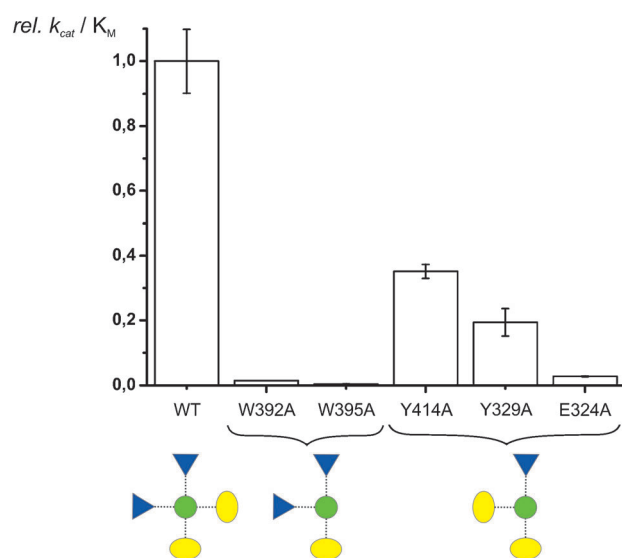
**Table 2:** Thermodynamic analysis of CDPCho binding to *PfCCT* MΔK mutants by ITC at 20°C.

Enzyme	$K_d$ [μM]	$\Delta H$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S$ [cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]
MΔK <sup>[a]</sup>	44.4 ± 3.3	-22.9 ± 1.0	-58.1 ± 5.0
MΔK <sup>Y714F</sup>	140 ± 50	-19.6 ± 6.0	-49.1 ± 22.3
MΔK <sup>W692F</sup>	680 ± 60	-6.8 ± 0.8	-8.9 ± 1.3
MΔK <sup>W692Y</sup>	220 ± 50	-9.8 ± 4.5	-16.8 ± 8.6
MΔK <sup>D623N</sup>	790 ± 60	-2.7 ± 0.1	5.1 ± 0.5
MΔK <sup>Y741F</sup>	1000 ± 80	-9.3 ± 1.9	-17.8 ± 3.9
MΔK <sup>W692A</sup>	460 ± 100	-1.7 ± 0.3	9.6 ± 2.6

[a] Values reported previously.<sup>[6]</sup>

the key role of residues forming charged interactions with the choline moiety.

To assess the full contribution of interacting residues present at quaternary ammonium binding sites to enzyme action, we used alanine mutagenesis as an alternative investigation approach. Kinetic characterization was applied to the respective mutants of choline kinase from *Plasmodium falciparum*, a further example of an enzyme harboring a quaternary ammonium recognition site (Figure 1B). Here, among the cognate charged interactors, as hypothesized based on the inspection of the CK crystal structure of *P. knowlesi*, a considerable role in enzyme action was only confirmed experimentally for E324, the equivalent of E254 of *P. knowlesi* CK (cf. Figure 3). In contrast, detrimental effects



**Figure 3.** Kinetic parameters of wild-type *PfCK* and its mutants. Relative catalytic efficiency of *PfCK* mutants, compared to the wild type (WT) enzyme. The cartoon illustrates interaction types at the quaternary ammonium binding site of *PfCK*; for the color code, see Figure 2. For the alanine mutation of a given residue, the respective symbol is deleted.

on enzyme action were also observed with the elimination of aromatic side chains (W392 and W395), which is mainly due to impaired ligand binding as indicated by  $K_M$  values. (Figure 3, Table 3, and Figure S8).

The significance of cation- $\pi$  interactions to quaternary ammonium ligands, clearly demonstrated by these experi-

**Table 3:** Kinetic characterization of *PfCK* mutants.<sup>[a]</sup>

Enzyme	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_{\text{M,ChoP}}$ [mM]	rel. $k_{\text{cat}}/K_{\text{M,ChoP}}$
<i>PfCK</i> <sup>WT</sup>	$23.6 \pm 1.0$	$0.24 \pm 0.01$	$1.0 \pm 0.1$
<i>PfCK</i> <sup>W392A</sup>	$7.0 \pm 0.1$	$6.8 \pm 0.2$	0.01
<i>PfCK</i> <sup>W395A</sup>	ND <sup>[a]</sup>	ND <sup>[a]</sup>	ND <sup>[a]</sup>
<i>PfCK</i> <sup>Y414A</sup>	$25.9 \pm 1.1$	$0.94 \pm 0.05$	0.26
<i>PfCK</i> <sup>Y329A</sup>	$58.1 \pm 1.2$	$3.3 \pm 0.1$	0.18
<i>PfCK</i> <sup>E324A</sup>	$35.5 \pm 4.7$	$15.9 \pm 2.3$	$0.028 \pm 0.002$

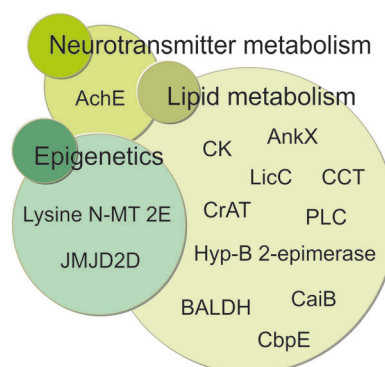
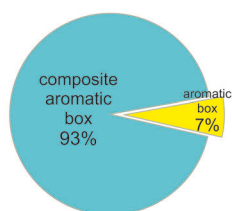
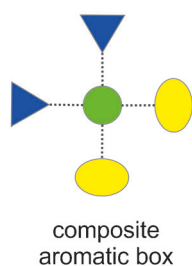
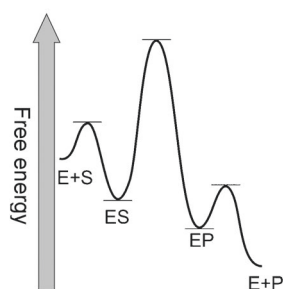
[a] Values cannot be determined precisely as seriously impaired ligand binding rendered results of Michaelis–Menten fit inaccurate.

ments with *PfCCT* and *PfCK*, is further underlined by the investigation of a *PfCCT* M $\Delta$ K mutant with fully abolished aromatic character, W692A. Elimination of the aromatic character at position 692 leads to a drastic disruption of catalytic function and also strongly perturbs the thermodynamics of CDPCho binding. Importantly, in this case the binding of CDPCho in the W692A mutant is now entropy-, rather than enthalpy-governed, which is in sharp contrast to its binding to other M $\Delta$ K mutants, except for D623N (Figure 2, Table 2, and Figure S7). Such a thermodynamic pattern indicates that binding is accomplished in a much less directed and tight manner. Considering the 3D structural model of the CCT:CDPCho complex, we suggest that the W692 residue may have an additional role, beyond a catalytically competent accommodation of the substrate, in maintaining local structural integrity as well, by forming  $\pi$ - $\pi$  interaction with the F662 and coordinating N716 (see Figure 1).

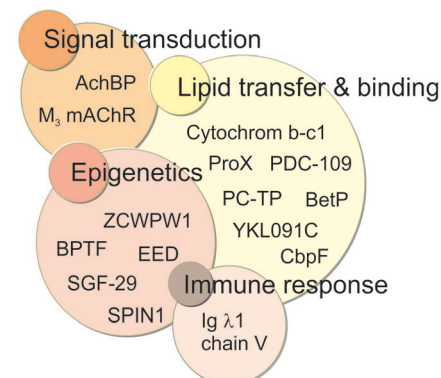
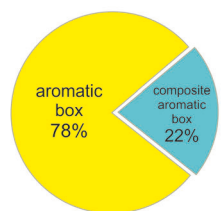
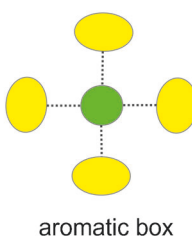
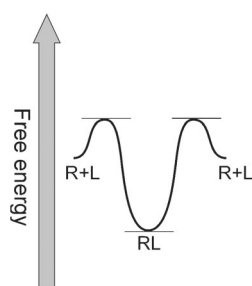
Our study showed that during catalysis performed by *PfCK* and *PfCCT*, enzyme function is governed by a combination of cation- $\pi$  and charged interactions to the quaternary ammonium moiety. We extended our investigations to all other enzymes harboring such site, by performing a comprehensive search in the protein data bank for structures containing quaternary ammonium ligands using Relibase<sup>[7]</sup> and analyzing the accommodation patterns in each case, as detailed in the SI. We found quaternary ammonium ligands in enzymes and also in receptors without enzymatic function (Table S5). In overwhelming majority of enzyme:ligand complex structures, the quaternary ammonium ligand was coordinated by both aromatic and charged or polar interactions (86 hits, i.e., 93%).

In these structures, only one or two aromatic rings coordinated the respective substrate or product, whereas further coordination was accomplished by polar or negatively charged residues (Scheme 1, Figure 4, and Figure S9). The respective aromatic residues in several instances were shown to have key contribution to ligand binding<sup>[8]</sup> and catalysis.<sup>[9–15]</sup> Noteworthy, this general architecture appears in a great number of protein families, belonging to 15 protein family clans thus providing another spectacular example for the concept of convergent evolution. Importantly, these enzymes are involved in neurotransmission, epigenetics, and lipid metabolism. We propose here the term “composite aromatic box” for this universal enzyme binding geometry. The idea that the biological recognition of quaternary ammonium ligands is accomplished by the involvement of hydrophobic and cation- $\pi$  interactions instead of a fully anionic site was proposed as early as 1990.<sup>[16]</sup> Later, this concept was confirmed for acetylcholinesterase, the most well-discussed representative enzyme in which the aromatic ring of a tryptophan facing the positively charged ligand moiety in the active site can provide a suitable environment by means of cation- $\pi$  interactions.<sup>[17]</sup> The energetic contribution of such interactions to ligand binding was estimated to be comparable to a hydrogen bond or an ion pair.<sup>[18]</sup> Nevertheless, the herein defined universal composite aromatic box recognition pattern is clearly distinct from the well-known aromatic box or aromatic cage architecture, abundantly found at receptor

## Enzyme



## Receptor



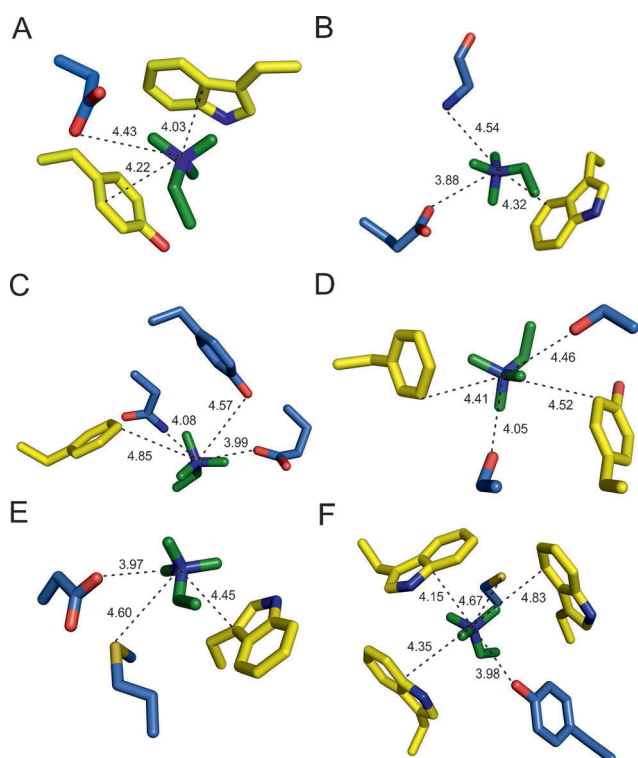
**Scheme 1.** Model of widespread structural solutions for quaternary ammonium binding sites in enzymes (composite aromatic box) and in receptors (aromatic box). General quaternary ammonium recognition site pattern of enzymes (E, left) differs from that of receptors (R, right). The different types of interactions are represented schematically; for the color code, see Figure 2. Representatives of enzymes and receptors with quaternary ammonium ligands are listed (for more detailed information see Tables S6 and S7 in the SI). Their distinct biological functions are illustrated by free energy profiles showing substrate (S) to product (P) interconversion, catalyzed by enzymes, and ligand (L) binding by receptors.

proteins (78% of relevant receptor hits; Figure S10) in which three or four aromatic rings are positioned to face the bound charged moiety of the quaternary ammonium ligand (Scheme 1), with an additional accompanying acidic residue for charge compensation (Figure 4, panel F).

The multiple aromatic rings in the aromatic box recognition site are positioned to face the bound charged moiety of the ligand and thus provide an optimal geometric fit.<sup>[19]</sup> This geometry can ensure a tight ligand binding due to the multivalence effect.<sup>[20]</sup> Accordingly, deletion of aromatic residues was shown to produce severe effects on ligand binding affinity as described in several studies.<sup>[21–24]</sup> Trimethyllysine recognition by histones is a peculiar event, which in some cases is accomplished by two aromatic side chains as well as charged residues, referred to as “half aromatic cage” site.<sup>[25]</sup> However, in this specific interaction type, found in 20 of 30 composite aromatic box-like receptor hits (see Table S5), the efficient ligand binding is further stabilized by additional peptide–peptide interactions.

Why are binding sites for quaternary ammonium ligand characteristically different in enzyme versus receptor proteins? We suggest that these differences are tuned to the different kinetic and thermodynamic requirements of enzymes and receptors. On the one hand, the physiological function of a receptor without enzymatic function is to provide specific high affinity binding in which both fast

association and slow dissociation of the ligand is required. An aromatic box with its sterically restricted and in many cases rigid environment seems to be optimally suited to perform such a role.<sup>[26]</sup> Receptor proteins possessing aromatic boxes are associated with widespread physiological function from signaling to ligand binding or transfer and cellular defense mechanisms (Scheme 1). On the other hand, enzymatic functions have distinct requirements. The active site of an enzyme is of course responsible for ligand accommodation, but a sufficiently high conformational dynamics is needed to assist activation, chemical transformation, and release of the transformed ligand(s). For efficient catalysis, the ability of fast ligand binding and release is an absolute requirement; for example, in G-proteins, GTP hydrolysis is limited by slow dissociation of the GDP product, rendering these enzymes to be inefficient catalysts on their own.<sup>[27]</sup> We propose that the presence of charged or polar residues within the composite aromatic boxes of enzymes allow a less hydrophobic character for the quaternary ammonium binding cleft, leading to reduced desolvation of the bound ligand moiety. This in some cases may also contribute to increased local conformational dynamics, for instance, as shown in reference [28]. The increased conformational dynamics required for enzymatic function may also be provided by the pronounced flexibility of aromatic side chains with a partially polar character (e.g., tyrosine). Actually, for betaine aldehyde dehydrogenase,



**Figure 4.** Quaternary ammonium recognition sites in enzymes (panels A–E) versus receptors (panel F). Selected examples show the characteristic composite aromatic box-type ligand binding site in enzymes. A) LicC bacterial CTP:phosphocholine cytidyltransferase, PDB ID: 1JYL; B) Acetylcholinesterase (AChE), PDB ID: 2A3; C) Phospholipase C (PLC), PDB ID: 1P6D; D) Carnitine *O*-acetyltransferase (1S5O); E) histone lysine *N*-methyltransferase, PDB ID: 4I58; F) Glycine betaine-binding protein (proX), PDB ID: 1R9L, is shown as illustration of the aromatic box structure present in receptors. Only the quaternary ammonium moiety is shown from the ligand structure as well as the side chain of residues. Charged and cation- $\pi$  interactors are displayed within 5 Å and 6 Å of the quaternary nitrogen atom, respectively. Residues are shown as sticks, with atomic coloring based on the type of interaction in that they are involved (cation- $\pi$ : yellow carbon; polar or charged: blue carbon; quaternary ammonium ligand, green carbon; O, red; N, blue; P, orange). For other examples of enzyme and receptor recognition, see the SI, Figures S9 and S10 and Tables S6 and S7.

computational studies proposed an accommodation of the quaternary ammonium ligand within the active site by four aromatic residues with significant static and dynamic disorder.<sup>[29]</sup> To gain in-depth insight in how residues of the composite aromatic box epitope site play their role in enzyme action, further thorough kinetic and structural analyses are clearly needed for each individual enzyme utilizing a quaternary ammonium.

In conclusion, we identified a potentially general architecture element termed as composite aromatic box within the active site of enzymes catalyzing the conversion of quaternary ammonium substrates. Harboring only one or two, instead of the three to four aromatic residues for cation- $\pi$  interactions as seen in the aromatic box or cage, the composite aromatic box is proposed to be advantageous for assisting multiple steps of enzyme action. We hypothesize that the necessary

conformational changes during the catalytic cycle may be poorly compatible with a fully hydrophobic rigid environment of an aromatic box. In a case study involving *Pf*CK and *Pf*CCT enzymes, we revealed the role of both charged/polar and aromatic residues within a composite aromatic box in ligand binding and catalysis. Together with literature data, our study points toward a general view of composite aromatic box sites in enzymes. This may lead to further pharmacological consequences, because many enzymes with quaternary ammonium ligands play important roles either in severe infectious diseases<sup>[30]</sup> or in diverse metabolic processes as lipid biosynthesis, epigenetics, or neurotransmitter metabolism. Their deficiencies lead to serious adverse phenotype effects in humans and therefore they themselves are well established drug targets.<sup>[31–34]</sup> The present study also contributes to a better understanding of the action of two malaria parasite enzymes, *Pf*CK and *Pf*CCT, that constitute potential antimalarial drug targets and may help in the ongoing structure-based pharmacophore design and validation.

Received: August 14, 2014

Published online: ■■■ ■■■, ■■■■■

**Keywords:** cation- $\pi$  interactions · enzyme catalysis · molecular recognition · quaternary ammonium · structural biology

- [1] A. S. Mahadevi, G. N. Sastry, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2100–2138.
- [2] D. A. Dougherty, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 885–893.
- [3] L. M. Salonen, M. Ellermann, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4808–4842; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4908–4944.
- [4] H. J. Vial, S. Wein, C. Farenc, C. Kocken, O. Nicolas, M. L. Ancelin, F. Bressolle, A. Thomas, M. Calas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15458–15463.
- [5] S. Wein, M. Maynadier, Y. Bordat, J. Perez, S. Maheshwari, P. Bette-Bobillo, C. Tran Van Ba, D. Penarete-Vargas, L. Fraisse, R. Cerdan, et al., *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 2263–2276.
- [6] G. N. Nagy, L. Marton, B. Krámos, J. Oláh, Á. Révész, K. Vékey, F. Delsuc, É. Hunyadi-Gulyás, K. F. Medzihradský, M. Lavigne, et al., *FEBS J.* **2013**, *280*, 3132–3148.
- [7] M. Hendlich, A. Bergner, J. Günther, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 607–620.
- [8] J. Lee, J. Johnson, Z. Ding, M. Paetzel, R. B. Cornell, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33535–33548.
- [9] B.-Y. Kwak, Y.-M. Zhang, M. Yun, R. J. Heath, C. O. Rock, S. Jackowski, H.-W. Park, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4343–4350.
- [10] C. Yuan, C. Kent, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17801–17809.
- [11] A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, N. Ariel, Y. Segall, B. Velan, A. Shafferman, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2082–2091.
- [12] S. F. Martin, B. C. Follows, P. J. Hergenrother, B. K. Trotter, *Biochemistry* **2000**, *39*, 3410–3415.
- [13] G. Jogl, L. Tong, *Cell* **2003**, *112*, 113–122.
- [14] K. D. Green, V. R. Porter, Y. Zhang, S. Garneau-Tsodikova, *Biochemistry* **2010**, *49*, 6219–6227.
- [15] V. Campanacci, S. Mukherjee, C. R. Roy, J. Cherfils, *EMBO J.* **2013**, *32*, 1469–1477.
- [16] D. A. Dougherty, D. A. Stauffer, *Science* **1990**, *250*, 1558–1560.
- [17] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **1991**, *253*, 872–879.
- [18] N. Zacharias, D. A. Dougherty, *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 281–287.
- [19] K. Schärer, M. Morgenthaler, R. Paulini, U. Obst-Sander, D. W. Banner, D. Schlatter, J. Benz, M. Stihle, F. Diederich, *Angew.*

- Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4400–4404; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4474–4479.
- [20] H.-J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3924–3977; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3982–4036.
- [21] A. Schiefner, J. Breed, L. Bösser, S. Kneip, J. Gade, G. Holtmann, K. Diederichs, W. Welte, E. Bremer, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5588–5596.
- [22] S. Ressler, A. C. Terwisscha van Scheltinga, C. Vornrhein, V. Ott, C. Ziegler, *Nature* **2009**, *458*, 47–52.
- [23] A. C. Kruse, J. Hu, A. C. Pan, D. H. Arlow, D. M. Rosenbaum, E. Rosemond, H. F. Green, T. Liu, P. S. Chae, R. O. Dror, et al., *Nature* **2012**, *482*, 552–556.
- [24] J. A. Olsen, T. Balle, M. Gajhede, P. K. Ahring, J. S. Kastrop, *PLoS One* **2014**, *9*, e91232.
- [25] M. Yun, J. Wu, J. L. Workman, B. Li, *Nat. Publ. Gr.* **2011**, *21*, 564–578.
- [26] K. Haga, A. C. Kruse, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W. I. Weis, T. Okada, B. K. Kobilka, T. Haga, et al., *Nature* **2012**, *482*, 547–551.
- [27] R. D. Vale, *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 291–302.
- [28] B. Sanson, J.-P. Colletier, Y. Xu, P. T. Lang, H. Jiang, I. Silman, J. L. Sussman, M. Weik, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1114–1118.
- [29] Á. G. Díaz-Sánchez, L. González-Segura, C. Mújica-Jiménez, E. Rudiño-Piñera, C. Montiel, L. P. Martínez-Castilla, R. A. Muñoz-Clares, *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 1570–1582.
- [30] J. A. Hermoso, L. Lagartera, A. González, M. Stelter, P. García, M. Martínez-Ripoll, J. L. García, M. Menéndez, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 533–538.
- [31] T. A. Lagace, N. D. Ridgway, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 2499–2510.
- [32] I. Anghelescu, I. Heuser, *MMW Fortschr. Med.* **2007**, *149 Suppl*, 76–78.
- [33] D. Tousoulis, C. Bakogiannis, A. Briasoulis, N. Papageorgiou, E. Androulakis, G. Siasos, G. Latsios, A.-M. Kampoli, M. Charakida, K. Toutouzas, et al., *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 1587–1592.
- [34] C. Biancotto, G. Frigè, S. Minucci, *Adv. Genet.* **2010**, *70*, 341–386.

## ***Discussion générale et perspectives***





Ces travaux de thèse ont principalement été focalisés sur la caractérisation biochimique et biophysique de la *PfCCT* et la *PfECT* qui sont les enzymes clés des voies de biosynthèse *de novo* de la PC et de la PE chez *P. falciparum*, ainsi que sur la caractérisation de molécules inhibitrices de la *PfCCT* identifiées par criblage virtuel. Des études précédemment réalisées au laboratoire ont largement validé la synthèse de la PC comme cible thérapeutique chez *P. falciparum* avec le développement d'analogues de choline, dont le composé leader albitiazolium a fait l'objet d'études cliniques (Wein et al. 2012). Dans ce contexte, les cytidyltransférases apparaissent comme d'éventuelles nouvelles cibles thérapeutiques chez *P. falciparum*. C'est pourquoi la caractérisation approfondie de leur mécanisme d'action et de régulation chez le parasite constitue une étape fondamentale.

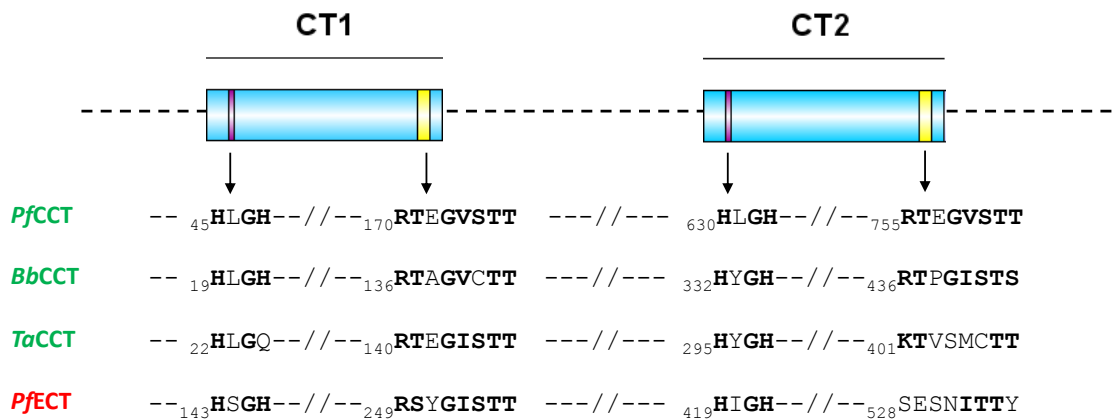
## 1. Aspects biochimiques et structuraux des cytidyltransférases

### 1.1. Duplication des domaines CT

L'analyse de la séquence des CCT de *Plasmodium* a indiqué la présence d'une duplication atypique du domaine CT, non retrouvée chez les autres eucaryotes à l'exception des deux parasites apicomplexes *Babesia* et *Theileria*. Ces travaux de thèse ont permis de montrer que les deux domaines CT de la *PfCCT* sont actifs, à l'inverse de la *PfECT*, et partagent des paramètres cinétiques similaires. Les analyses phylogénétiques réalisées chez les CCT des apicomplexes suggèrent que la duplication des domaines CT chez ces trois parasites provient de deux événements indépendants de duplication génique, l'un commun à *Babesia* et *Theileria*, l'autre spécifique à *Plasmodium* (Nagy et al. 2013). Pourquoi ces trois parasites, et non *Toxoplasma* ou *Cryptosporidium*, possèdent une CCT dupliquée demeure toutefois une question entière à l'heure actuelle. Néanmoins, *Plasmodium*, *Babesia* et *Theileria* ont tous comme point commun d'infecter des cellules sanguines durant leur cycle de vie, ce qui n'est ni le cas de *Toxoplasma* ni de *Cryptosporidium*.

Un autre paramètre remarquable concerne le faible taux de conservation entre les deux domaines CT des CCT de *Babesia* (41% d'identité de séquence chez la CCT de *B. bovis*) et de *Theileria* (35% d'identité de séquence chez CCT *T. annulata*). L'analyse de la séquence primaire de la *TaCCT* indique la conservation partielle des motifs HxGH dans le domaine

CT-1 et de la signature des cytidyltransférases dans le domaine CT-2 au même titre que chez la *PfECT* (Figure 61). Ces observations soulèvent alors la question de l'activité de la *TaCCT*.



**Figure 61. Conservation des motifs HxGH et RTxGxST(T/S) chez les CCT de *B. bovis* et *T. annulata* et chez les CCT et ECT de *P. falciparum***

Pour tester cette hypothèse, nous avons cloné et exprimé sous forme recombinante les deux domaines CT de la *TaCCT*. La protéine n'a toutefois pu être obtenue qu'en très faible quantité. Étonnamment, une activité CCT a été détectée pour le domaine CT-1 de la *TaCCT* malgré le remplacement de la seconde histidine du motif HxGH par une glutamine. Au contraire, aucune activité n'a été observée pour le domaine CT-2. Ces données sont préliminaires et nécessitent la réalisation d'expériences complémentaires. Néanmoins, si ces résultats se confirment, la *TaCCT* serait alors la première CCT identifiée possédant un domaine CT catalytiquement inactif. On peut alors se demander si la *PfCCT* perdra également la fonction catalytique de son deuxième domaine au cours de l'évolution.

## 1.2. Mécanisme catalytique

Les études mécanistiques réalisées sur la *PfECT* suggèrent l'existence d'un mécanisme catalytique de type complexe ternaire ordonné dans lequel le CTP est le premier substrat à se

lier à l'enzyme et la CDP-Etn le dernier produit à être libéré. Ce mécanisme est similaire à celui précédemment décrit pour la ECT du rat (Sundler 1975). Il suggère que la P-Etn reconnaît seulement le complexe *Pf*ECT-CTP et diffère significativement de celui décrit chez les CCT où l'addition des substrats semble aléatoire (Nagy et al. 2013). Il existerait donc des mécanismes catalytiques divers parmi la famille des cytidylyltransférases. Bien que les CCT et ECT possèdent un site conservé pour la liaison du CTP, les propriétés chimiques des têtes polaires choline et éthanolamine impliquent des différences importantes dans le mode de reconnaissance du substrat phosphomonoester. En effet, nous avons montré que la liaison du motif choline chez la *Pf*CCT s'opère par la combinaison d'interactions cation- $\pi$  et électrostatiques et semble être une caractéristique générale des enzymes accommodant un motif ammonium quaternaire (Nagy et al. 2014). En revanche, la reconnaissance du motif éthanolamine chez la *Pf*ECT semble être effectuée *via* l'établissement de liaisons hydrogènes et électrostatiques. Ces spécificités du mode d'interaction avec la P-Cho ou la P-Etn pourraient engendrer la différence entre les mécanismes catalytiques des CCT et ECT.

### 1.3. Régulation

De par leur rôle clé dans la biogenèse des membranes chez *P. falciparum*, l'activité des cytidylyltransférases se doit d'être finement régulée afin d'adapter la production de CDP-Cho et de CDP-Etn aux besoins du parasite au cours de son cycle de vie. Un premier échelon de régulation existe au niveau transcriptionnel où les gènes codants pour la *Pf*CCT et la *Pf*ECT présentent des profils d'expression très divers au cours des différents stades de développement du parasite, chez le moustique et chez l'homme. La détermination du profil de transcription des gènes codants pour les cytidylyltransférases au cours du stade intra-érythrocytaire a été réalisée au laboratoire par qRT-PCR, en quantifiant leur expression toutes les 6 h sur l'ensemble du cycle (L. Sollelis et L. Berry-Sterkers, communication personnelle). Les résultats obtenus indiquent une transcription stable du gène codant pour la *Pf*CCT durant les stades anneau et trophozoïte, suivie par une brusque augmentation d'un facteur 10 de la quantité de transcrits pour atteindre un pic à la fin du stade schizonte. Ces données corréleront bien avec le fait que la protéine n'ait pu être détectée qu'au stade schizonte par microscopie à fluorescence. Concernant la *Pf*ECT, la transcription de son gène présente un profil

sensiblement différent avec l'existence de deux pics correspondant au début du stade anneau et, comme pour la *PfCCT*, à la fin du stade schizonte. Des études réalisées par Western blot sur parasites synchronisés indiquent toutefois que la *PfECT* est particulièrement exprimée lors des stades matures et peu lors du stade anneau (Maheshwari et al. 2013). L'ensemble de ces résultats semble indiquer une surexpression des cytidyltransférases lors des stades matures du cycle intra-érythrocytaire, au même titre que l'ensemble des enzymes des voies de Kennedy. Cette différence de niveau d'expression correspond aux besoins accrus en membranes pour la biogenèse des organites et des membranes des futurs mérozoïtes.

La régulation des CCT au niveau protéique est quant à elle bien caractérisée. De nombreuses études ont en effet démontré le rôle crucial joué par les lipides pour l'activation de l'enzyme, corroborées par la mise en évidence d'une forme inactive soluble et d'une forme active liée aux membranes. La mise en évidence d'une double localisation cytosolique et membranaire de la *PfCCT*, associée à l'activation de l'enzyme par les lipides (Yeo et al. 1997), indiquent la présence d'un mécanisme de régulation similaire chez *P. falciparum*.

Il a également été montré que la régulation de la  $CCT\alpha$  chez les mammifères implique un domaine riche en résidus phosphorylables (domaine P) situé dans la région C-terminale de la protéine. Sa délétion chez la *RnCCT $\alpha$*  induit une augmentation de l'activation de l'enzyme par les lipides, suggérant que la phosphorylation de ce domaine interfère avec la translocation de la *RnCCT $\alpha$*  à la membrane (Yang and Jackowski 1995). Le domaine P n'est pas conservé chez la *PfCCT*. Cependant, les données de protéomique disponibles dans la base données PlasmoDB (Aurrecochea et al. 2009) indiquent que des résidus localisés dans la région de liaison entre les deux domaines catalytiques peuvent être phosphorylés. Au contraire, la régulation des ECT demeure encore aujourd'hui méconnue. L'absence de domaine de liaison aux membranes chez ces enzymes implique l'existence d'autres mécanismes de régulation. L'identification récente de la ECT comme substrat de la protéine kinase C (PKC) chez les mammifères soulève la question de la régulation des ECT également par phosphorylation (Pavlovic et al. 2014b). Bien que *Plasmodium* ne possède pas d'homologue de la PKC et que les sites de phosphorylations identifiés chez la ECT du rat ne soient pas conservés chez la *PfECT*, il est tout à fait concevable que cette dernière soit également régulée grâce à des phosphorylations par d'autres kinases du parasite. Dans ce contexte, il serait particulièrement

intéressant de pouvoir identifier les sites de phosphorylation de la *PfCCT* et de *PfECT* et d'étudier l'effet des phosphorylations sur l'activité de l'enzyme.

Pour finir, l'organisation dimérique de la *PfECT* due aux interactions entre les deux domaines catalytiquement inactifs de la protéine pourrait permettre la présence de mécanismes de régulation allostérique. La présence de CMP dans le domaine CT2 de la structure de la *HsECT* nous a menés à évaluer le potentiel rôle régulateur de dérivés de CTP. Toutefois, ni le CMP ni le CDP n'ont présenté un tel rôle chez la *PfECT* et il est probable que la liaison du CMP dans la structure de la *HsECT* n'ait pas de signification biologique. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que d'autres molécules puissent avoir un effet régulateur de l'activité de la *PfECT*, et des ECT plus généralement. L'existence d'une régulation allostérique chez les ECT n'a jamais été démontrée mais si le domaine CT2 peut agir en tant que domaine régulateur, ce dernier pourrait alors représenter une cible pour l'identification de molécules inhibitrices.

## 2. Cibler les cytidyltransférases pour le développement de nouveaux antipaludiques

### 2.1. Caractère essentiel des cytidyltransférases chez *P. falciparum*

Les critères définissant une « bonne » cible thérapeutique sont nombreux et, dans le cas des pathologies infectieuses, impliquent notamment que la protéine cible ait une fonction biologique déterminante pour la survie et/ou la virulence de l'agent pathogène. Le caractère essentiel de la CCT et de la ECT pour la survie du parasite a été mis en évidence chez *P. berghei* (Dechamps et al. 2010c). Néanmoins, il semble important de pouvoir valider le caractère essentiel de ces deux enzymes également chez *P. falciparum*. La manipulation génétique de *P. falciparum* a longtemps été rendue difficile en raison de l'absence d'outils de génétique efficaces. Toutefois, le développement récent du système CRISPR-Cas9 chez le parasite pourrait permettre de réaliser beaucoup plus rapidement et beaucoup plus facilement la délétion des gènes codant pour la ECT et la CCT chez *P. falciparum* (Ghorbal et al. 2014). Au vu des données obtenues chez *P. berghei*, il semble probable que la CCT et la ECT soient également essentielles chez *P. falciparum*. L'obtention de parasites transgéniques par délétion

des gènes correspondant pourrait donc s'avérer impossible. Si tel est le cas, il pourrait également être envisagé de réaliser une délétion inductible des gènes, notamment par un système utilisant la Cre recombinase et récemment mis au point pour les stades asexués de *P. falciparum* (Collins et al. 2013).

## 2.2. Caractère limitant dans les voies de biosynthèse *de novo* de la PC et de la PE

Généralement, les étapes catalytiques limitantes sont les plus lentes et les moins efficaces au sein des voies métaboliques. Elles ralentissent le flux et s'apparentent à un goulot d'étranglement. Leur inhibition doit alors pouvoir se faire en utilisant un minimum d'effecteur pharmacologique c'est pourquoi elles représentent des cibles thérapeutiques de choix. Les CCT et ECT catalysent l'étape limitante des voies de Kennedy chez les mammifères (Sundler and Akesson 1975b). Chez *P. knowlesi*, l'augmentation de la concentration en choline chez le parasite induit une augmentation de la concentration de P-Cho, substrat de la CCT, alors que celle de la CDP-Cho, produit de l'enzyme, demeure constante (Ancelin and Vial 1989). Une étude similaire réalisée chez *P. falciparum*, concernant cette fois-ci la voie de la PE, a également montré une augmentation de la concentration en P-Etn alors que celle de la CDP-Etn demeure inchangée (Maheshwari et al. 2013). Ces résultats sont corroborés par des expériences de métabolomique sur des érythrocytes infectés. Les données montrent que les concentrations de P-Cho et de P-Etn sont respectivement 15 fois et 10 fois plus élevées que celle de CDP-Cho et de CDP-Etn dans le parasite au stade schizonte (Vo Duy et al. 2012).

**Tableau 9. Paramètres cinétiques des enzymes endogènes des voies de Kennedy**

<i>Enzyme endogène</i>	<i>Substrat</i>	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (pmol/min/10 <sup>7</sup> parasites)
<i>Pf</i> CK	Cho	31,2 ± 4,1 <sup>*</sup>	63,3 ± 11,6 <sup>*</sup>
<i>Pf</i> CCT	P-Cho	511,0 ± 24,8 <sup>*</sup>	5,2 ± 1,4 <sup>*</sup>
<i>Pf</i> CEPT	CDP-Cho	13,2 ± 0,7 <sup>*</sup>	17,0 ± 1,5 <sup>*</sup>
<i>Pf</i> EK	Etn	71,3 ± 4,6 <sup>#</sup>	39,6 ± 0,1 <sup>#</sup>
<i>Pf</i> ECT	P-Etn	373 ± 123 <sup>§</sup>	4,0 ± 0,3 <sup>§</sup>
<i>Pk</i> CEPT	CDP-Etn	18 ± 3 <sup>†</sup>	12,6 ± 5 <sup>†</sup>

\* (Wein et al. 2012) # (Alberge 2009) § (Maheshwari et al. 2013) † (Vial et al. 1984)

D'autre part, les différents paramètres cinétiques des enzymes endogènes montrent que la *PfCCT* et la *PfECT* possèdent les plus faibles efficacités catalytiques parmi les trois enzymes des voies de Kennedy (Tableau 9). En conclusion, l'ensemble des données expérimentales convergent pour désigner les deux cytidylyltransférases de *P. falciparum* comme deux étapes limitantes des voies de Kennedy chez *Plasmodium*.

### 2.3. Cibler les domaines catalytiques des cytidylyltransférases ?

L'un des objectifs de cette thèse a été d'estimer le potentiel de la *PfCCT* comme cible antipaludique en caractérisant l'effet de composés inhibiteurs sélectionnés par criblage virtuel. Nous avons ainsi pu identifier un composé capable d'inhiber l'enzyme recombinante *in vitro* ainsi que la synthèse de PC et la croissance parasitaire. Néanmoins, le composé C12 identifié par cette stratégie inhibe modestement l'activité CCT *in vitro* et la recherche de molécules analogues basées sur le mode d'interaction prédit du composé avec l'enzyme n'ont pour le moment pas permis d'améliorer son efficacité. Pour envisager toute étape d'optimisation future, il paraît maintenant indispensable d'obtenir la co-structure de l'enzyme avec C12.

En l'absence de test enzymatique permettant une approche de criblage haut débit, le choix de réaliser un criblage de molécules *in silico* préalablement aux tests expérimentaux s'avérait une approche pertinente pour cibler la *PfCCT*. Le produit de la réaction, et non un des substrats, a été choisi comme molécule de référence lors de la première étape de criblage en raison de ses paramètres thermodynamiques de liaison à la cible. Le CTP a une affinité pour l'enzyme similaire à celle de la CDP-Cho. Cependant, la sélection d'analogues de CTP présentait une contrainte majeure en termes de spécificité étant donné le nombre élevé d'enzymes utilisant ce substrat, aussi bien chez le parasite que chez l'hôte. De son côté, la P-Cho apparaissait comme un mauvais candidat en raison de sa très faible affinité pour l'enzyme (Nagy et al. 2013). Toutefois, l'approche par criblage virtuel basé sur la structure a ses propres limites. L'une des limites les plus évidentes du criblage virtuel est sans doute l'utilisation d'une structure rigide, qui par conséquent ne tient pas compte de la dynamique conformationnelle de l'enzyme nécessaire pour l'accommodation du ligand. Plus particulièrement, le site catalytique de la *PfCCT* est en partie formé par des boucles dont la position varie sans doute entre la forme apo- et holoenzyme et au cours de la catalyse. Il est



virtuellement possible de modéliser ce paramètre en réalisant un amarrage flexible de la molécule (« flexible docking vs rigid docking »). Toutefois, cette approche est très lourde en terme de temps et de capacité de calcul (Chen 2015). Dans le cas de la *PfCCT*, l'amarrage a été effectué sur une structure rigide en permettant néanmoins la flexibilité du ligand (Pihan 2013). Il est possible que ce facteur joue sur l'efficacité de l'amarrage en ne tenant pas compte des réarrangements structuraux ayant lieu dans le site actif. Un autre paramètre limitant est la qualité de la structure tridimensionnelle de la cible. L'absence de structure cristallographique de la *PfCCT* nous a amenés à utiliser un modèle comparatif pour le criblage virtuel. L'utilisation d'un tel modèle par rapport à une structure cristallographique à haute résolution rend le processus de criblage moins précis en raison de la difficulté de modéliser la position exacte des chaînes latérales.

D'un point de vue expérimental, le test enzymatique radioactif employé pour l'évaluation des composés limite le nombre de molécules testées. La mise au point récente du test colorimétrique au vert de malachite pour la détection de l'activité enzymatique de la *PfCCT* et de la *PfECT* représente donc une avancée importante pour la recherche de molécules inhibitrices de ces enzymes. A titre d'exemple, le test colorimétrique en plaque 96 puits prend environ 2 heures contre 3 jours pour le test radiomarqué utilisé dans nos études sur la *PfCCT*. Comme mentionné en introduction de ce manuscrit, une collection de 400 molécules inhibant la croissance de *P. falciparum in vitro* (au nM), identifiées par criblage phénotypique haut débit (« Malaria Box »), est gratuitement mise à la disposition de la communauté scientifique pour l'identification et la caractérisation de leur(s) cible(s) chez le parasite. Nous envisageons à présent de tester ces molécules sur les activités de la *PfCCT* et de la *PfECT*.

Enfin, un projet développé actuellement dans l'équipe vise à déterminer la structure 3D des sites catalytiques de la *PfCCT* par cristallographie et à identifier des inhibiteurs grâce à une approche par fragments (fragment based drug design, FBDD). Le FBDD consiste dans un premier temps en un criblage par différentes techniques biochimiques, biophysiques ou virtuelles, de petites molécules de masse moléculaire inférieure à 300 Da et de faible affinité, capables d'interagir avec la protéine-cible. La liaison des fragments à la cible est ensuite caractérisée par RMN ou par cristallographie aux rayons X. Dans une dernière étape, les fragments sont liés entre eux par synthèse chimique puis optimisés afin de créer des composés de haute affinité (nM) (Figure 62).

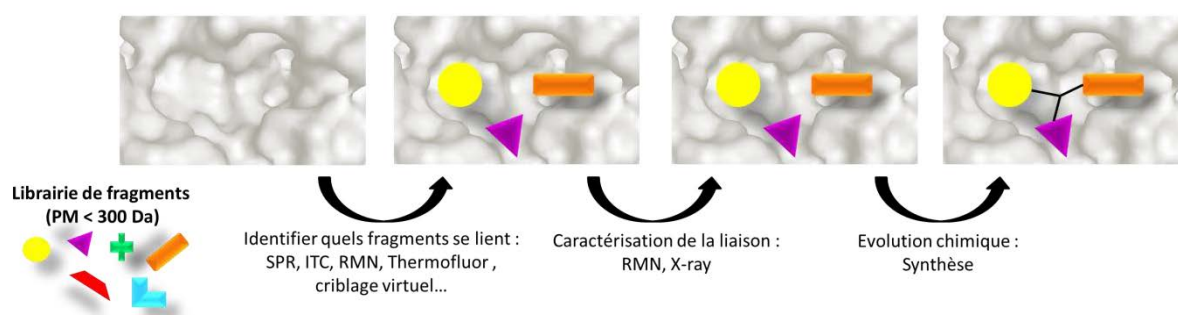
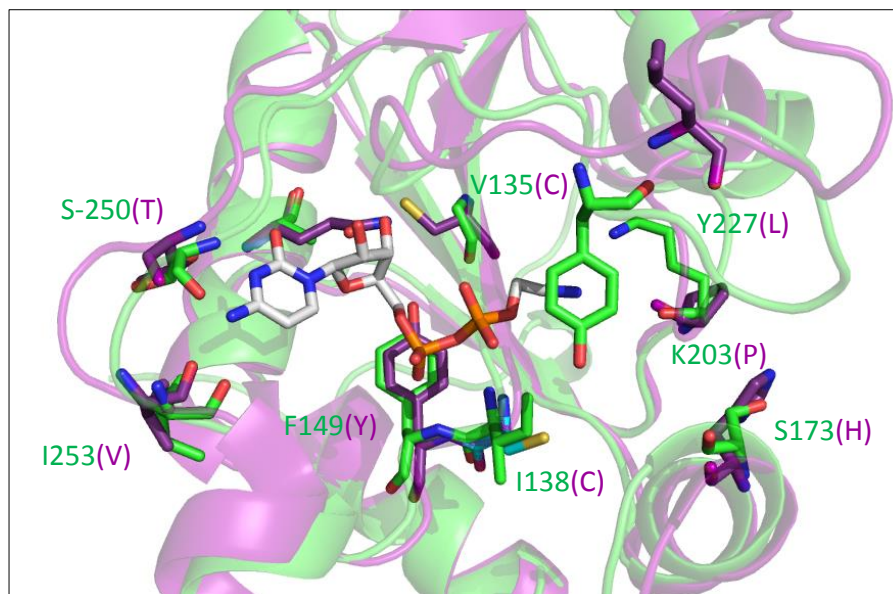


Figure 62. Principe de l'approche par fragments et techniques utilisées

## 2.4. La question de la spécificité

La spécificité des composés inhibiteurs est un des paramètres essentiels pour le développement de stratégies thérapeutiques. Dans le cas de la *PfCCT* et de la *PfECT*, cette question est d'autant plus cruciale que ces cibles existent également chez l'hôte. La comparaison des sites catalytiques de la *PfCCT* et de la *HsCCT* (identique à celui de la *RnCCT*) indique une différence majeure entre ces deux enzymes avec la présence d'une glutamine (Gln51) à la place d'une alanine chez la hCCT. Durant le processus d'optimisation des futurs composés inhibiteurs, il sera donc important d'exploiter cette différence en créant des interactions avec la Gln51 afin d'établir une spécificité vis-à-vis de la CCT de *P. falciparum*. Dans le cas de la *PfECT*, la comparaison de son site catalytique avec celui de la *HsECT* suggère un nombre plus important de différences entre l'enzyme du parasite et celle de l'hôte (Figure 63). L'établissement d'interactions spécifiques à la *PfECT* pourrait donc s'avérer plus facile que pour la *PfCCT*.



**Figure 63. Différences structurales entre les sites actifs des ECT de *P. falciparum* et humaine**

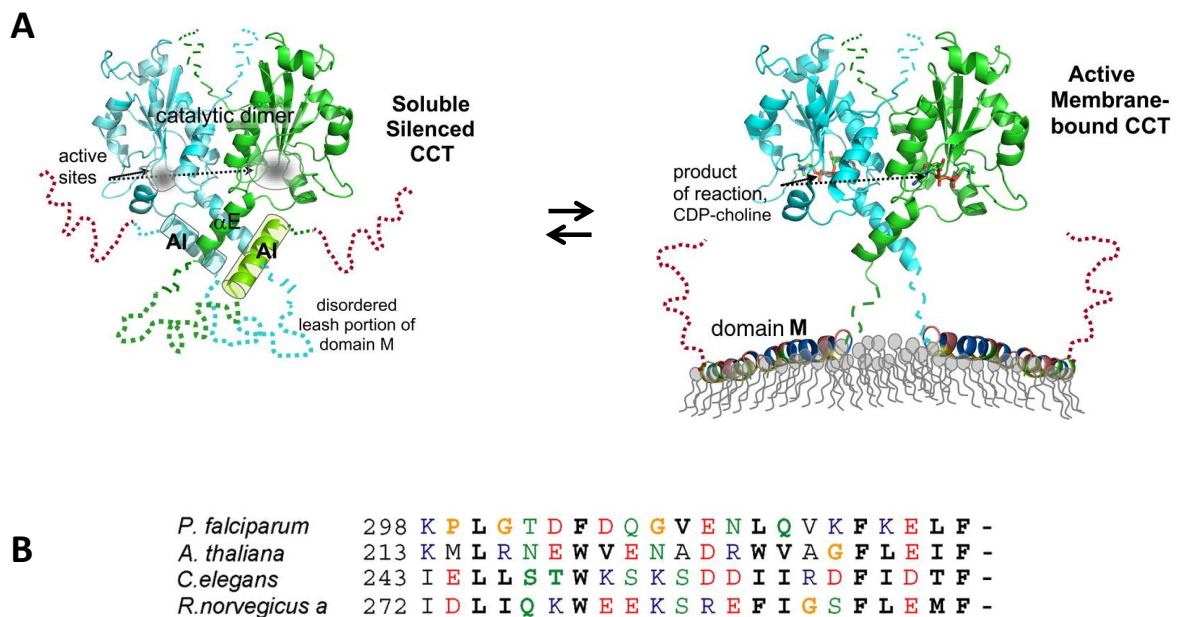
Zoom du site actif de la structure cristallographique de la HsECT (colorée en violet) et du modèle par homologie de la PfECT (colorée en vert) en complexe avec la CDP-Etn. Les résidus non conservés entre la PfECT et la HsECT sont indiqués et représentés en bâton

Au-delà de la spécificité vis-à-vis du site catalytique de la cible, l'aspect pharmacocinétique est également un paramètre capital pour l'optimisation de futurs inhibiteurs. Leur distribution dans l'organisme ainsi que leur accumulation potentielle dans le compartiment érythrocytaire sont des facteurs permettant d'établir une spécificité vis-à-vis de *Plasmodium in vivo*. La chloroquine (Hawley et al. 1998) ainsi que l'analogue de choline albitiazolium (Wein et al. 2014) sont deux exemples de molécules antipaludiques ayant la particularité de s'accumuler dans l'érythrocyte infecté, leur permettant d'atteindre des concentrations particulièrement élevées dans certains compartiments du parasite. Néanmoins, ce type de paramètre n'est pas modélisable *in silico* et nécessite la réalisation d'études chez l'animal ou certaines études biochimiques approfondies.

## 2.5. Cibler les autres domaines de la PfCCT et de la PfECT ?

Nos études se sont jusqu'à présent concentrées sur les domaines catalytiques des deux cytidyltransférases. Cependant, il est établi que l'activité des CCT est régulée par leur

liaison à la membrane. Les CCT sont des enzymes amphitropiques opérant une conversion entre une forme inactive soluble et une forme active liée à la membrane. Chez la CCT du rat, il a été montré qu'une séquence de 22 résidus (domaine AI, Figure 64B) du domaine membranaire (domaine M), localisé en C-terminal du domaine catalytique, joue le rôle de répresseur lorsque l'enzyme est sous forme soluble et d'activateur lorsqu'il est lié à la membrane (Ding et al. 2012; Huang et al. 2013; Lee et al. 2014) (Figure 64).



**Figure 64. Translocation de la CCT du rat à la membrane.**

**A.** Schéma de la translocation de la *RnCCT* à la membrane. AI : domaine d'autoinhibition. **B.** Domaines d'auto-inhibition de la *RnCCT* et proposés pour les CCT de *P. falciparum*, *A. thaliana* et *C. elegans*. D'après Ding et al. 2012.

Le domaine AI de la *PfCCT* a été proposé sur la base de la présence d'un motif FLEMF (*RnCCT*) partiellement conservé, également chez *A. thaliana* et *C. elegans* (Figure 64B). Dans la forme inactive de la CCT, le domaine AI interagit avec le domaine catalytique. Il peut alors être envisagé de contraindre l'enzyme dans cette conformation afin d'empêcher son interaction avec la membrane. Une autre stratégie d'inhibition de cette enzyme pourrait donc être de bloquer sa translocation à la membrane. De même, il serait également envisageable d'inhiber l'enzyme *via* une approche peptidique mimant le domaine AI. Ces

deux stratégies pourrait présenter l'avantage de permettre une plus grande spécificité d'inhibition vis-à-vis de la *PfCCT* car le domaine AI, et plus généralement le domaine M, sont beaucoup moins conservés que le domaine CT parmi les CCT.

L'ensemble de ce travail a permis d'approfondir la compréhension du fonctionnement des deux enzymes clés du métabolisme des phospholipides chez *P. falciparum* que sont les CTP:phosphocholine et CTP:phosphoéthanolamine cytidylyltransférases. Ces deux enzymes au rôle fondamental dans la multiplication du parasite, ont dévoilé leur importance et leurs spécificités tant d'un point de vue phylogénique, mécanistique que structural.

Ce travail s'inscrit plus généralement dans le contexte de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques chez le parasite afin de développer de nouvelles stratégies d'intervention présentant un mode d'action original pour faire face aux nombreuses résistances développées par le parasite. De par leur rôle biologique fondamental chez le parasite et leur caractère limitant dans leur voie de biosynthèse respective, les cytidylyltransférases sont des enzymes de choix pour le développement de molécules antipaludiques. Nous avons pu montrer qu'il est possible de cibler l'une d'entre elles, la *PfCCT*, ouvrant ainsi la voie à l'identification et au développement de nouvelles molécules.

## *Références*



## -A-

- Abkarian, M., G. Massiera, L. Berry, M. Roques and C. Braun-Breton (2011). "A novel mechanism for egress of malarial parasites from red blood cells." Blood **117**(15): 4118-4124.
- Abu Bakar, N., N. Klonis, E. Hanssen, C. Chan and L. Tilley (2010). "Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*." J Cell Sci **123**(Pt 3): 441-450.
- Achan, J., A. O. Talisuna, A. Erhart, A. Yeka, J. K. Tibenderana, F. N. Baliraine, P. J. Rosenthal and U. D'Alessandro (2011). "Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria." Malar J **10**: 144.
- Alano, P. (2007). "*Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life." Mol Microbiol **66**(2): 291-302.
- Alberge, B. (2009). Choline et éthanolamine kinases chez *P. falciparum* : Caractérisation biochimique et cellulaire des enzymes et de leur activité, Thèse de l'Université Montpellier 1.
- Alberge, B., L. Gannoun-Zaki, C. Bascunana, C. Tran van Ba, H. Vial and R. Cerdan (2010). "Comparison of the cellular and biochemical properties of *Plasmodium falciparum* choline and ethanalamine kinases." Biochem J **425**(1): 149-158.
- Ancelin, M. L., M. Calas, V. Vidal-Sailhan, S. Herbute, P. Ringwald and H. J. Vial (2003). "Potent inhibitors of *Plasmodium* phospholipid metabolism with a broad spectrum of in vitro antimalarial activities." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2590-2597.
- Ancelin, M. L., M. Parant, M. J. Thuet, J. R. Philippot and H. J. Vial (1991). "Increased permeability to choline in simian erythrocytes after *Plasmodium knowlesi* infection." Biochem J **273** ( Pt 3): 701-709.
- Ancelin, M. L. and H. J. Vial (1986). "Several lines of evidence demonstrating that *Plasmodium falciparum*, a parasitic organism, has distinct enzymes for the phosphorylation of choline and ethanalamine." FEBS Lett **202**(2): 217-223.
- Ancelin, M. L. and H. J. Vial (1989). "Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium*-infected erythrocytes." Biochim Biophys Acta **1001**(1): 82-89.
- Arama, C. and M. Troye-Blomberg (2014). "The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives." J Intern Med **275**(5): 456-466.
- Ariey, F., B. Witkowski, C. Amaratunga, J. Beghain, A. C. Langlois, N. Khim, S. Kim, V. Duru, C. Bouchier, L. Ma, P. Lim, R. Leang, S. Duong, S. Sreng, S. Suon, C. M. Chuor, D. M. Bout, S. Menard, W. O. Rogers, B. Genton, T. Fandeur, O. Miotto, P. Ringwald, J. Le Bras, A. Berry, J. C. Barale, R. M. Fairhurst, F. Benoit-Vical, O. Mercereau-Puijalon and D. Menard (2014). "A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria." Nature **505**(7481): 50-55.
- Arnold, R. S. and R. B. Cornell (1996). "Lipid regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase: electrostatic, hydrophobic, and synergistic interactions of anionic phospholipids and diacylglycerol." Biochemistry **35**(30): 9917-9924.
- Ashley, E. A., M. Dhorda, R. M. Fairhurst, C. Amaratunga, P. Lim, S. Suon, S. Sreng, J. M. Anderson, S. Mao, B. Sam, C. Sopha, C. M. Chuor, C. Nguon, S. Sovannaroth, S. Pukrittayakamee, P. Jittamala, K. Chotivanich, K. Chutasmit, C. Suchatsoonthorn, R. Runcharoen, T. T. Hien, N. T. Thuy-Nhien, N. V. Thanh, N. H. Phu, Y. Htut, K. T. Han, K. H. Aye, O. A. Mokuolu, R. R. Olaosebikan, O. O. Folaranmi, M. Mayxay, M. Khanthavong, B. Hongvanthong, P. N. Newton, M. A. Onyamboko, C. I. Fanello, A. K. Tshefu, N. Mishra, N. Valecha, A. P. Phyto, F. Nosten, P. Yi, R. Tripura, S.



- Borrmann, M. Bashraheil, J. Peshu, M. A. Faiz, A. Ghose, M. A. Hossain, R. Samad, M. R. Rahman, M. M. Hasan, A. Islam, O. Miotto, R. Amato, B. MacInnis, J. Stalker, D. P. Kwiatkowski, Z. Bozdech, A. Jeeyapant, P. Y. Cheah, T. Sakulthaew, J. Chalk, B. Intharabut, K. Silamut, S. J. Lee, B. Vihokhern, C. Kunasol, M. Imwong, J. Tarning, W. J. Taylor, S. Yeung, C. J. Woodrow, J. A. Flegg, D. Das, J. Smith, M. Venkatesan, C. V. Plowe, K. Stepniewska, P. J. Guerin, A. M. Dondorp, N. P. Day and N. J. White (2014a). "Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria." N Engl J Med **371**(5): 411-423.
- Ashley, E. A., J. Recht and N. J. White (2014b). "Primaquine: the risks and the benefits." Malar J **13**: 418.
- Aurrecochea, C., J. Brestelli, B. P. Brunk, J. Dommer, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, A. Gingle, G. Grant, O. S. Harb, M. Heiges, F. Innamorato, J. Iodice, J. C. Kissinger, E. Kraemer, W. Li, J. A. Miller, V. Nayak, C. Pennington, D. F. Pinney, D. S. Roos, C. Ross, C. J. Stoeckert, Jr., C. Treatman and H. Wang (2009). "PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D539-543.
- B-
- Badurina, D. S., M. Zolli-Juran and E. D. Brown (2003). "CTP:glycerol 3-phosphate cytidyltransferase (TarD) from *Staphylococcus aureus* catalyzes the cytidyl transfer via an ordered Bi-Bi reaction mechanism with micromolar K(m) values." Biochim Biophys Acta **1646**(1-2): 196-206.
- Baker, D. A. (2010). "Malaria gametocytogenesis." Mol Biochem Parasitol **172**(2): 57-65.
- Bannister, L. and G. Mitchell (2003). "The ins, outs and roundabouts of malaria." Trends Parasitol **19**(5): 209-213.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna and G. H. Mitchell (2000a). "A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages." Parasitol Today **16**(10): 427-433.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna and G. H. Mitchell (2000b). "Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts." Parasitology **121** ( Pt 3): 273-287.
- Baunaure, F., P. Eldin, A. M. Cathiard and H. Vial (2004). "Characterization of a non-mitochondrial type I phosphatidylserine decarboxylase in *Plasmodium falciparum*." Mol Microbiol **51**(1): 33-46.
- Baykov, A. A., O. A. Evtushenko and S. M. Avaeva (1988). "A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay." Anal Biochem **171**(2): 266-270.
- Bernado, P., E. Mylonas, M. V. Petoukhov, M. Blackledge and D. I. Svergun (2007). "Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering." J Am Chem Soc **129**(17): 5656-5664.
- Bernal, C., C. Palacin, A. Boronat and S. Imperial (2005). "A colorimetric assay for the determination of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase activity." Anal Biochem **337**(1): 55-61.
- Biagini, G. A., E. M. Pasini, R. Hughes, H. P. De Koning, H. J. Vial, P. M. O'Neill, S. A. Ward and P. G. Bray (2004). "Characterization of the choline carrier of *Plasmodium falciparum*: a route for the selective delivery of novel antimalarial drugs." Blood **104**(10): 3372-3377.

- Biagini, G. A., E. Richier, P. G. Bray, M. Calas, H. Vial and S. A. Ward (2003). "Heme binding contributes to antimalarial activity of bis-quaternary ammoniums." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2584-2589.
- Blackman, M. J. and V. B. Carruthers (2013). "Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill." Curr Opin Microbiol **16**(4): 459-464.
- Bobenchik, A. M., W. H. Witola, Y. Augagneur, L. Nic Lochlainn, A. Garg, N. Pachikara, J. Y. Choi, Y. O. Zhao, S. Usmani-Brown, A. Lee, S. H. Adjalley, S. Samanta, D. A. Fidock, D. R. Voelker, E. Fikrig and C. Ben Mamoun (2013). "*Plasmodium falciparum* phosphoethanolamine methyltransferase is essential for malaria transmission." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(45): 18262-18267.
- Botte, C. Y., Y. Yamaryo-Botte, T. W. Rupasinghe, K. A. Mullin, J. I. MacRae, T. P. Spurck, M. Kalanon, M. J. Shears, R. L. Coppel, P. K. Crellin, E. Marechal, M. J. McConville and G. I. McFadden (2013). "Atypical lipid composition in the purified relict plastid (apicoplast) of malaria parasites." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(18): 7506-7511.
- Braker, J. D., K. J. Hodel, D. R. Mullins and J. A. Friesen (2009). "Identification of hydrophobic amino acids required for lipid activation of *C. elegans* CTP:phosphocholine cytidylyltransferase." Arch Biochem Biophys **492**(1-2): 10-16.

## -C-

- Carter, R. and K. N. Mendis (2002). "Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria." Clin Microbiol Rev **15**(4): 564-594.
- Channe Gowda, D. (2002). "Structure and activity of glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*." Microbes Infect **4**(9): 983-990.
- Charman, S. A., S. Arbe-Barnes, I. C. Bathurst, R. Brun, M. Campbell, W. N. Charman, F. C. Chiu, J. Chollet, J. C. Craft, D. J. Creek, Y. Dong, H. Matile, M. Maurer, J. Morizzi, T. Nguyen, P. Papastogiannidis, C. Scheurer, D. M. Shackelford, K. Sriraghavan, L. Stingelin, Y. Tang, H. Urwyler, X. Wang, K. L. White, S. Wittlin, L. Zhou and J. L. Vennerstrom (2011). "Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(11): 4400-4405.
- Chen, Y. C. (2015). "Beware of docking!" Trends Pharmacol Sci **36**(2): 78-95.
- Chitnis, C. E. and M. J. Blackman (2000). "Host cell invasion by malaria parasites." Parasitol Today **16**(10): 411-415.
- Choi, S. B., K. W. Lee and S. H. Cho (1997). "Cloning of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase cDNA from *Arabidopsis thaliana*." Mol Cells **7**(1): 58-63.
- Choubey, V., M. Guha, P. Maity, S. Kumar, R. Raghunandan, P. R. Maulik, K. Mitra, U. C. Halder and U. Bandyopadhyay (2006). "Molecular characterization and localization of *Plasmodium falciparum* choline kinase." Biochim Biophys Acta **1760**(7): 1027-1038.
- Clyde, D. F., V. C. McCarthy, R. M. Miller and R. B. Hornick (1973). "Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria." Am J Med Sci **266**(6): 398-403.
- Collins, C. R., S. Das, E. H. Wong, N. Andenmatten, R. Stallmach, F. Hackett, J. P. Herman, S. Muller, M. Meissner and M. J. Blackman (2013). "Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle." Mol Microbiol **88**(4): 687-701.

- Coppens, I. (2013). "Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies." Nat Rev Microbiol **11**(12): 823-835.
- Cornell, R. B. (1998). "How cytidylyltransferase uses an amphipathic helix to sense membrane phospholipid composition." Biochem Soc Trans **26**(3): 539-544.
- Cornell, R. B., G. B. Kalmar, R. J. Kay, M. A. Johnson, J. S. Sanghera and S. L. Pelech (1995). "Functions of the C-terminal domain of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase. Effects of C-terminal deletions on enzyme activity, intracellular localization and phosphorylation potential." Biochem J **310** ( Pt 2): 699-708.
- Cornish-Bowden, A., M. Jamin and V. A. Saks (2005). Cinétique enzymatique. Collection Grenoble sciences. Les Ullis, EDP Science,: 1 online resource (1 v.).
- Coronado, L. M., C. T. Nadovich and C. Spadafora (2014). "Malarial hemozoin: from target to tool." Biochim Biophys Acta **1840**(6): 2032-2041.
- Coteron, J. M., M. Marco, J. Esquivias, X. Deng, K. L. White, J. White, M. Koltun, F. El Mazouni, S. Kokkonda, K. Katneni, R. Bhamidipati, D. M. Shackelford, I. Angulo-Barturen, S. B. Ferrer, M. B. Jimenez-Diaz, F. J. Gamo, E. J. Goldsmith, W. N. Charman, I. Bathurst, D. Floyd, D. Matthews, J. N. Burrows, P. K. Rathod, S. A. Charman and M. A. Phillips (2011). "Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential." J Med Chem **54**(15): 5540-5561.
- Cowman, A. F., D. Berry and J. Baum (2012). "The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell." J Cell Biol **198**(6): 961-971.
- Cox-Singh, J., T. M. Davis, K. S. Lee, S. S. Shamsul, A. Matusop, S. Ratnam, H. A. Rahman, D. J. Conway and B. Singh (2008). "*Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening." Clin Infect Dis **46**(2): 165-171.
- Craig, L., J. E. Johnson and R. B. Cornell (1994). "Identification of the membrane-binding domain of rat liver CTP:phosphocholine cytidylyltransferase using chymotrypsin proteolysis." J Biol Chem **269**(5): 3311-3317.

## -D-

- Dahl, E. L. and P. J. Rosenthal (2008). "Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics." Trends Parasitol **24**(6): 279-284.
- Dechamps, S., M. Maynadier, S. Wein, L. Gannoun-Zaki, E. Marechal and H. J. Vial (2010a). "Rodent and nonrodent malaria parasites differ in their phospholipid metabolic pathways." J Lipid Res **51**(1): 81-96.
- Dechamps, S., S. Shastri, K. Wengelnik and H. J. Vial (2010b). "Glycerophospholipid acquisition in *Plasmodium* - a puzzling assembly of biosynthetic pathways." Int J Parasitol **40**(12): 1347-1365.
- Dechamps, S., K. Wengelnik, L. Berry-Sterkers, R. Cerdan, H. J. Vial and L. Gannoun-Zaki (2010c). "The Kennedy phospholipid biosynthesis pathways are refractory to genetic disruption in *Plasmodium berghei* and therefore appear essential in blood stages." Mol Biochem Parasitol **173**(2): 69-80.
- Dechy-Cabaret, O. and F. Benoit-Vical (2012). "Effects of antimalarial molecules on the gametocyte stage of *Plasmodium falciparum*: the debate." J Med Chem **55**(23): 10328-10344.

- Dennis, M. K., S. G. Taneva and R. B. Cornell (2011). "The intrinsically disordered nuclear localization signal and phosphorylation segments distinguish the membrane affinity of two cytidyltransferase isoforms." J Biol Chem **286**(14): 12349-12360.
- Desjardins, R. E., C. J. Canfield, J. D. Haynes and J. D. Chulay (1979). "Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique." Antimicrob Agents Chemother **16**(6): 710-718.
- Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." Nature **443**(7112): 651-657.
- Ding, Z., S. G. Taneva, H. K. Huang, S. A. Campbell, L. Semenc, N. Chen and R. B. Cornell (2012). "A 22-mer segment in the structurally pliable regulatory domain of metazoan CTP: phosphocholine cytidyltransferase facilitates both silencing and activating functions." J Biol Chem **287**(46): 38980-38991.
- Dive, D. and C. Biot (2008). "Ferrocene conjugates of chloroquine and other antimalarials: the development of ferroquine, a new antimalarial." ChemMedChem **3**(3): 383-391.
- Dixon, M. W., M. K. Dearnley, E. Hanssen, T. Gilberger and L. Tilley (2012). "Shape-shifting gametocytes: how and why does *P. falciparum* go banana-shaped?" Trends Parasitol **28**(11): 471-478.
- Dixon, M. W., J. Thompson, D. L. Gardiner and K. R. Trenholme (2008). "Sex in *Plasmodium*: a sign of commitment." Trends Parasitol **24**(4): 168-175.
- Dodge, J. T. and G. B. Phillips (1967). "Composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids and aldehydes in human red cells." J Lipid Res **8**(6): 667-675.
- Dougherty, D. A. (2013). "The cation-pi interaction." Acc Chem Res **46**(4): 885-893.
- Dubremetz, J. F., N. Garcia-Reguet, V. Conseil and M. N. Fourmaux (1998). "Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa." Int J Parasitol **28**(7): 1007-1013.
- Dunne, S. J., R. B. Cornell, J. E. Johnson, N. R. Glover and A. S. Tracey (1996). "Structure of the membrane binding domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase." Biochemistry **35**(37): 11975-11984.

## -E-

- Eastman, R. T. and D. A. Fidock (2009). "Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria." Nat Rev Microbiol **7**(12): 864-874.
- Elabbadi, N., M. L. Ancelin and H. J. Vial (1994). "Characterization of phosphatidylinositol synthase and evidence of a polyphosphoinositide cycle in *Plasmodium*-infected erythrocytes." Mol Biochem Parasitol **63**(2): 179-192.
- Elabbadi, N., M. L. Ancelin and H. J. Vial (1997). "Phospholipid metabolism of serine in *Plasmodium*-infected erythrocytes involves phosphatidylserine and direct serine decarboxylation." Biochem J **324** ( Pt 2): 435-445.
- Elsworth, B., B. S. Crabb and P. R. Gilson (2014). "Protein export in malaria parasites: an update." Cell Microbiol **16**(3): 355-363.

## -F-

- Fiscus, W. G. and W. C. Schneider (1966). "The role of phospholipids in stimulating phosphorylcholine cytidyltransferase activity." J Biol Chem **241**(14): 3324-3330.
- Flannery, E. L., A. K. Chatterjee and E. A. Winzeler (2013). "Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines." Nat Rev Microbiol **11**(12): 849-862.

- Francia, M. E. and B. Striepen (2014). "Cell division in apicomplexan parasites." Nat Rev Microbiol **12**(2): 125-136.
- Franke, D. S., D.I. (2009). "DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering." J. Appl. Cryst.(42): 342-346.
- Frenal, K. and D. Soldati-Favre (2013). "The glideosome, a unique machinery that assists the Apicomplexa in gliding into host cells." Med Sci (Paris) **29**(5): 515-522.
- Friesen, J. A., H. A. Campbell and C. Kent (1999). "Enzymatic and cellular characterization of a catalytic fragment of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha." J Biol Chem **274**(19): 13384-13389.
- Friesen, J. A., M. F. Liu and C. Kent (2001a). "Cloning and characterization of a lipid-activated CTP:phosphocholine cytidyltransferase from *Caenorhabditis elegans*: identification of a 21-residue segment critical for lipid activation." Biochim Biophys Acta **1533**(2): 86-98.
- Friesen, J. A., Y. S. Park and C. Kent (2001b). "Purification and kinetic characterization of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*." Protein Expr Purif **21**(1): 141-148.

## -G-

- Gamo, F. J. (2014). "Antimalarial drug resistance: new treatments options for *Plasmodium*." Drug Discov Today Technol **11**: 81-88.
- Gardner, M. J., N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M. S. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Perte, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. A. Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser and B. Barrell (2002). "Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Nature **419**(6906): 498-511.
- Ghorbal, M., M. Gorman, C. R. Macpherson, R. M. Martins, A. Scherf and J. J. Lopez-Rubio (2014). "Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system." Nat Biotechnol **32**(8): 819-821.
- Gibellini, F., W. N. Hunter and T. K. Smith (2009). "The ethanolamine branch of the Kennedy pathway is essential in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol **73**(5): 826-843.
- Gibellini, F. and T. K. Smith (2010). "The Kennedy pathway. De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine." IUBMB Life **62**(6): 414-428.
- Goldberg, D. E. (2005). "Hemoglobin degradation." Curr Top Microbiol Immunol **295**: 275-291.
- Gorka, A. P., A. de Dios and P. D. Roepe (2013). "Quinoline drug-heme interactions and implications for antimalarial cytostatic versus cytotoxic activities." J Med Chem **56**(13): 5231-5246.
- Grellier, P., D. Rigomier, V. Clavey, J. C. Fruchart and J. Schrevel (1991). "Lipid traffic between high density lipoproteins and *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells." J Cell Biol **112**(2): 267-277.

## -H-

- Hamard-Peron, E. and D. Muriaux (2011). "Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction." Retrovirology **8**: 15.
- Hanssen, E., P. Carlton, S. Deed, N. Klonis, J. Sedat, J. DeRisi and L. Tilley (2010). "Whole cell imaging reveals novel modular features of the exomembrane system of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*." Int J Parasitol **40**(1): 123-134.
- Harvey, K. L., A. Yap, P. R. Gilson, A. F. Cowman and B. S. Crabb (2014). "Insights and controversies into the role of the key apicomplexan invasion ligand, Apical Membrane Antigen 1." Int J Parasitol **44**(12): 853-857.
- Hawley, S. R., P. G. Bray, M. Mungthin, J. D. Atkinson, P. M. O'Neill and S. A. Ward (1998). "Relationship between antimalarial drug activity, accumulation, and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium falciparum* in vitro." Antimicrob Agents Chemother **42**(3): 682-686.
- Haynes, R. K., K. W. Cheu, D. N'Da, P. Coghi and D. Monti (2013). "Considerations on the mechanism of action of artemisinin antimalarials: part 1--the 'carbon radical' and 'heme' hypotheses." Infect Disord Drug Targets **13**(4): 217-277.
- Helmink, B. A., J. D. Braker, C. Kent and J. A. Friesen (2003). "Identification of lysine 122 and arginine 196 as important functional residues of rat CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha." Biochemistry **42**(17): 5043-5051.
- Helmink, B. A. and J. A. Friesen (2004). "Characterization of a lipid activated CTP:phosphocholine cytidyltransferase from *Drosophila melanogaster*." Biochim Biophys Acta **1683**(1-3): 78-88.
- Heppner, D. G. (2013). "The malaria vaccine-status quo 2013." Travel Med Infect Dis **11**(1): 2-7.
- Holthuis, J. C. and A. K. Menon (2014). "Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis." Nature **510**(7503): 48-57.
- Huang, H. K., S. G. Taneva, J. Lee, L. P. Silva, D. C. Schriemer and R. B. Cornell (2013). "The membrane-binding domain of an amphitropic enzyme suppresses catalysis by contact with an amphipathic helix flanking its active site." J Mol Biol **425**(9): 1546-1564.

## -I-

- Itoe, M. A., J. L. Sampaio, G. G. Cabal, E. Real, V. Zuzarte-Luis, S. March, S. N. Bhatia, F. Frischknecht, C. Thiele, A. Shevchenko and M. M. Mota (2014). "Host Cell Phosphatidylcholine Is a Key Mediator of Malaria Parasite Survival during Liver Stage Infection." Cell Host Microbe **16**(6): 778-786.

## -J-

- Jones, R. M., J. A. Chichester, V. Mett, J. Jaje, S. Tottey, S. Manceva, L. J. Casta, S. K. Gibbs, K. Musiychuk, M. Shamloul, J. Norikane, S. J. Streatfield, M. van de Vegte-Bolmer, W. Roeffen, R. W. Sauerwein and V. Yusibov (2013). "A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against *Plasmodium falciparum* in immunized mice." PLoS One **8**(11): e79538.

## -K-

- Kafsack, B. F., N. Rovira-Graells, T. G. Clark, C. Bancells, V. M. Crowley, S. G. Campino, A. E. Williams, L. G. Drought, D. P. Kwiatkowski, D. A. Baker, A. Cortes and M. Llinas (2014). "A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites." Nature **507**(7491): 248-252.
- Karim, M., P. Jackson and S. Jackowski (2003). "Gene structure, expression and identification of a new CTP:phosphocholine cytidyltransferase beta isoform." Biochim Biophys Acta **1633**(1): 1-12.
- Kennedy, E. P. (1956). "The biological synthesis of phospholipids." Can J Biochem Physiol **34**(2): 334-348.
- Kennedy, E. P., S. W. Smith and S. B. Weiss (1956). "New synthesis of lecithin in an isolated enzyme system." Nature **178**(4533): 594-595.
- Kent, C. (1997). "CTP:phosphocholine cytidyltransferase." Biochim Biophys Acta **1348**(1-2): 79-90.
- 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): 3339-3347.
- Kirk, K. and K. J. Saliba (2007). "Targeting nutrient uptake mechanisms in *Plasmodium*." Curr Drug Targets **8**(1): 75-88.
- Kirk, K., H. Y. Wong, B. C. Elford, C. I. Newbold and J. C. Ellory (1991). "Enhanced choline and Rb<sup>+</sup> transport in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Biochem J **278** ( Pt 2): 521-525.
- Kiss, Z. (1997). "Expression of protein kinase C-beta promotes the stimulatory effect of phorbol ester on phosphatidylethanolamine synthesis." Arch Biochem Biophys **347**(1): 37-44.
- Krahmer, N., Y. Guo, F. Wilfling, M. Hilger, S. Lingrell, K. Heger, H. W. Newman, M. Schmidt-Supprian, D. E. Vance, M. Mann, R. V. Farese, Jr. and T. C. Walther (2011). "Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase." Cell Metab **14**(4): 504-515.
- Kumar, S., N. M. Gowda, X. Wu, R. N. Gowda and D. C. Gowda (2012). "CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells." Parasite Immunol **34**(7): 372-382.

## -L-

- Lamarque, M., S. Besteiro, J. Papoin, M. Roques, B. Vulliez-Le Normand, J. Morlon-Guyot, J. F. Dubremetz, S. Fauquenoy, S. Tomavo, B. W. Faber, C. H. Kocken, A. W. Thomas, M. J. Boulanger, G. A. Bentley and M. Lebrun (2011). "The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites." PLoS Pathog **7**(2): e1001276.
- Lambros, C. and J. P. Vanderberg (1979). "Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture." J Parasitol **65**(3): 418-420.
- Larvor, M. P., R. Cerdan, C. Gumila, L. Maurin, P. Seta, C. Roustan and H. Vial (2003). "Characterization of the lipid-binding domain of the *Plasmodium falciparum* CTP:phosphocholine cytidyltransferase through synthetic-peptide studies." Biochem J **375**(Pt 3): 653-661.

- Leatherbarrow, R. J., A. R. Fersht and G. Winter (1985). "Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7840-7844.
- Lee, J., J. Johnson, Z. Ding, M. Paetzel and R. B. Cornell (2009). "Crystal structure of a mammalian CTP: phosphocholine cytidyltransferase catalytic domain reveals novel active site residues within a highly conserved nucleotidyltransferase fold." J Biol Chem **284**(48): 33535-33548.
- Lee, J., S. G. Taneva, B. W. Holland, D. P. Tieleman and R. B. Cornell (2014). "Structural basis for autoinhibition of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT), the regulatory enzyme in phosphatidylcholine synthesis, by its membrane-binding amphipathic helix." J Biol Chem **289**(3): 1742-1755.
- Lemmon, M. A. (2008). "Membrane recognition by phospholipid-binding domains." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 99-111.
- Leventis, P. A. and S. Grinstein (2010). "The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes." Annu Rev Biophys **39**: 407-427.
- Lindner, S. E., M. J. Sartain, K. Hayes, A. Harupa, R. L. Moritz, S. H. Kappe and A. M. Vaughan (2014). "Enzymes involved in plastid-targeted phosphatidic acid synthesis are essential for *Plasmodium yoelii* liver-stage development." Mol Microbiol **91**(4): 679-693.
- Lindner, S. E., K. E. Swearingen, A. Harupa, A. M. Vaughan, P. Sinnis, R. L. Moritz and S. H. Kappe (2013). "Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites." Mol Cell Proteomics **12**(5): 1127-1143.
- Lykidis, A. (2007). "Comparative genomics and evolution of eukaryotic phospholipid biosynthesis." Prog Lipid Res **46**(3-4): 171-199.
- Lykidis, A., I. Baburina and S. Jackowski (1999). "Distribution of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT) isoforms. Identification of a new CCTbeta splice variant." J Biol Chem **274**(38): 26992-27001.

## -M-

- Macrae, J. I., S. Lopaticki, A. G. Maier, T. Rupasinghe, A. Nahid, A. F. Cowman and M. J. McConville (2014). "*Plasmodium falciparum* is dependent on de novo myo-inositol biosynthesis for assembly of GPI glycolipids and infectivity." Mol Microbiol **91**(4): 762-776.
- Mages, F., C. Rey, P. Fonlupt and H. Pacheco (1988). "Kinetic and biochemical properties of CTP:choline-phosphate cytidyltransferase from the rat brain." Eur J Biochem **178**(2): 367-372.
- Maheshwari, S. (2012). Caractérisation biochimique et cellulaire des enzymes clés du métabolisme des phospholipides chez *Plasmodium falciparum*., Thèse de l'Université Montpellier 2.
- Maheshwari, S., M. Lavigne, A. Contet, B. Alberge, E. Pihan, C. Kocken, K. Wengelnik, D. Douguet, H. Vial and R. Cerdan (2013). "Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase shows that only one of the two cytidyltransferase domains is active." Biochem J **450**(1): 159-167.
- Markus, M. B. (2011). "The hypnozoite concept, with particular reference to malaria." Parasitol Res **108**(1): 247-252.



- Martin, D., L. Gannoun-Zaki, S. Bonnefoy, P. Eldin, K. Wengelnik and H. Vial (2000). "Characterization of *Plasmodium falciparum* CDP-diacylglycerol synthase, a proteolytically cleaved enzyme." Mol Biochem Parasitol **110**(1): 93-105.
- Matuschewski, K. (2006). "Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the Anopheles vector." Cell Microbiol **8**(10): 1547-1556.
- McNamara, C. W., M. C. Lee, C. S. Lim, S. H. Lim, J. Roland, A. Nagle, O. Simon, B. K. Yeung, A. K. Chatterjee, S. L. McCormack, M. J. Manary, A. M. Zeeman, K. J. Dechering, T. R. Kumar, P. P. Henrich, K. Gagaring, M. Ibanez, N. Kato, K. L. Kuhlen, C. Fischli, M. Rottmann, D. M. Plouffe, B. Bursulaya, S. Meister, L. Rameh, J. Trappe, D. Haasen, M. Timmerman, R. W. Sauerwein, R. Suwanarusk, B. Russell, L. Renia, F. Nosten, D. C. Tully, C. H. Kocken, R. J. Glynn, C. Bodenreider, D. A. Fidock, T. T. Diagana and E. A. Winzeler (2013). "Targeting *Plasmodium* PI(4)K to eliminate malaria." Nature **504**(7479): 248-253.
- Menard, R., J. Tavares, I. Cockburn, M. Markus, F. Zavala and R. Amino (2013). "Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity." Nat Rev Microbiol **11**(10): 701-712.
- Miller, L. H., H. C. Ackerman, X. Z. Su and T. E. Wellems (2013). "Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments." Nat Med **19**(2): 156-167.
- Min-Seok, R., Y. Kawamata, H. Nakamura, A. Ohta and M. Takagi (1996). "Isolation and characterization of ECT1 gene encoding CTP: phosphoethanolamine cytidyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biochem **120**(5): 1040-1047.
- Mizoi, J., M. Nakamura and I. Nishida (2006). "Defects in CTP:Phosphorylethanolamine cytidyltransferase affect embryonic and postembryonic development in *Arabidopsis*." Plant Cell **18**(12): 3370-3385.
- Mizushima, N. and M. H. Sahani (2014). "ATG8 localization in apicomplexan parasites: apicoplast and more?" Autophagy **10**(9): 1487-1494.
- MMV. (2014). "the global malaria portfolio, classified by therapeutic type, 4Q 2014." from <http://www.mmv.org/research-development/rd-portfolio>.
- Moll, G. N., H. J. Vial, M. L. Ancelin, J. A. Op den Kamp, B. Roelofsen and L. L. van Deenen (1988). "Phospholipid uptake by *Plasmodium knowlesi* infected erythrocytes." FEBS Lett **232**(2): 341-346.
- Muller, I. B. and J. E. Hyde (2013). "Folate metabolism in human malaria parasites--75 years on." Mol Biochem Parasitol **188**(1): 63-77.
- Mundwiler-Pachlatko, E. and H. P. Beck (2013). "Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(50): 19987-19994.

-N-

- Nagy, G. N., L. Marton, A. Contet, O. Ozohanics, L. M. Ardelean, A. Revesz, K. Vekey, F. D. Irimie, H. Vial, R. Cerdan and B. G. Vertessy (2014). "Composite Aromatic Boxes for Enzymatic Transformations of Quaternary Ammonium Substrates." Angew Chem Int Ed Engl.
- Nagy, G. N., L. Marton, B. Kramos, J. Olah, A. Revesz, K. Vekey, F. Delsuc, E. Hunyadi-Gulyas, K. F. Medzihradzky, M. Lavigne, H. Vial, R. Cerdan and B. G. Vertessy (2013). "Evolutionary and mechanistic insights into substrate and product accommodation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from *Plasmodium falciparum*." FEBS J **280**(13): 3132-3148.

- Naidoo, K. and T. L. Coetzer (2013). "Reduced glycerol incorporation into phospholipids contributes to impaired intra-erythrocytic growth of glycerol kinase knockout *Plasmodium falciparum* parasites." Biochim Biophys Acta **1830**(11): 5326-5334.
- Nerlich, A. G., B. Schraut, S. Dittrich, T. Jelinek and A. R. Zink (2008). "*Plasmodium falciparum* in ancient Egypt." Emerg Infect Dis **14**(8): 1317-1319.
- Nixon, G. L., D. M. Moss, A. E. Shone, D. G. Lalloo, N. Fisher, P. M. O'Neill, S. A. Ward and G. A. Biagini (2013). "Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone." J Antimicrob Chemother **68**(5): 977-985.

## -P-

- Park, Y. S., P. Gee, S. Sanker, E. J. Schurter, E. R. Zuiderweg and C. Kent (1997). "Identification of functional conserved residues of CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase. Role of histidines in the conserved HXGH in catalysis." J Biol Chem **272**(24): 15161-15166.
- Park, Y. S., T. D. Sweitzer, J. E. Dixon and C. Kent (1993). "Expression, purification, and characterization of CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase from *Bacillus subtilis*." J Biol Chem **268**(22): 16648-16654.
- Patridge, K. A., C. H. Weber, J. A. Friesen, S. Sanker, C. Kent and M. L. Ludwig (2003). "Glycerol-3-phosphate cytidyltransferase. Structural changes induced by binding of CDP-glycerol and the role of lysine residues in catalysis." J Biol Chem **278**(51): 51863-51871.
- Pavlovic, Z., R. K. Singh and M. Bakovic (2014a). "A novel murine CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase splice variant is a post-translational repressor and an indicator that both cytidyltransferase domains are required for activity." Gene **543**(1): 58-68.
- Pavlovic, Z., L. Zhu, L. Pereira, R. K. Singh, R. B. Cornell and M. Bakovic (2014b). "Isoform-specific and protein kinase C-mediated regulation of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase phosphorylation." J Biol Chem **289**(13): 9053-9064.
- Pease, B. N., E. L. Huttlin, M. P. Jedrychowski, E. Talevich, J. Harmon, T. Dillman, N. Kannan, C. Doerig, R. Chakrabarti, S. P. Gygi and D. Chakrabarti (2013). "Global analysis of protein expression and phosphorylation of three stages of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development." J Proteome Res **12**(9): 4028-4045.
- Pelech, S. L., H. W. Cook, H. B. Paddon and D. E. Vance (1984). "Membrane-bound CTP:phosphocholine cytidyltransferase regulates the rate of phosphatidylcholine synthesis in HeLa cells treated with unsaturated fatty acids." Biochim Biophys Acta **795**(3): 433-440.
- Pessi, G., J. Y. Choi, J. M. Reynolds, D. R. Voelker and C. B. Mamoun (2005). "In vivo evidence for the specificity of *Plasmodium falciparum* phosphoethanolamine methyltransferase and its coupling to the Kennedy pathway." J Biol Chem **280**(13): 12461-12466.
- Pessi, G., G. Kociubinski and C. B. Mamoun (2004). "A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6206-6211.
- Pihan, E. (2013). Recherche de nouveaux antipaludiques par bioinformatique structurale et chémoinformatique. Application à deux cibles: *PfAMA1* et *PfCCT*, Thèse de l'Université de Nice-Sophia Antipolis.

- Pilly, E. (2012). Maladies infectieuses et tropicales, 22e édition, Alinéa Plus.
- Price, R. N. and F. Nosten (2014). "Single-dose radical cure of *Plasmodium vivax*: a step closer." Lancet **383**(9922): 1020-1021.

## -R-

- Ramakrishnan, S., M. Serricchio, B. Striepen and P. Butikofer (2013). "Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans." Prog Lipid Res **52**(4): 488-512.
- Richier, E., G. A. Biagini, S. Wein, F. Boudou, P. G. Bray, S. A. Ward, E. Precigout, M. Calas, J. F. Dubremetz and H. J. Vial (2006). "Potent antihematozoan activity of novel bisthiazolium drug T16: evidence for inhibition of phosphatidylcholine metabolism in erythrocytes infected with *Babesia* and *Plasmodium spp.*" Antimicrob Agents Chemother **50**(10): 3381-3388.
- Rontein, D., I. Nishida, G. Tashiro, K. Yoshioka, W. I. Wu, D. R. Voelker, G. Basset and A. D. Hanson (2001). "Plants synthesize ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme." J Biol Chem **276**(38): 35523-35529.
- Ross, R. (1897). "On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood." Br Med J **2**(1929): 1786-1788.
- Rowe, J. A., A. Claessens, R. A. Corrigan and M. Arman (2009). "Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications." Expert Rev Mol Med **11**: e16.

## -S-

- Salonen, L. M., M. Ellermann and F. Diederich (2011). "Aromatic rings in chemical and biological recognition: energetics and structures." Angew Chem Int Ed Engl **50**(21): 4808-4842.
- Samuel, B. U., N. Mohandas, T. Harrison, H. McManus, W. Rosse, M. Reid and K. Haldar (2001). "The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection." J Biol Chem **276**(31): 29319-29329.
- Santiago, T. C., R. Zufferey, R. S. Mehra, R. A. Coleman and C. B. Mamoun (2004). "The *Plasmodium falciparum* PfGatp is an endoplasmic reticulum membrane protein important for the initial step of malarial glycerolipid synthesis." J Biol Chem **279**(10): 9222-9232.
- Schlitzer, M. (2008). "Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline." Arch Pharm (Weinheim) **341**(3): 149-163.
- Seder, R. A., L. J. Chang, M. E. Enama, K. L. Zephir, U. N. Sarwar, I. J. Gordon, L. A. Holman, E. R. James, P. F. Billingsley, A. Gunasekera, A. Richman, S. Chakravarty, A. Manoj, S. Velmurugan, M. Li, A. J. Ruben, T. Li, A. G. Eappen, R. E. Stafford, S. H. Plummer, C. S. Hendel, L. Novik, P. J. Costner, F. H. Mendoza, J. G. Saunders, M. C. Nason, J. H. Richardson, J. Murphy, S. A. Davidson, T. L. Richie, M. Sedegah, A. Sutamihardja, G. A. Fahle, K. E. Lyke, M. B. Laurens, M. Roederer, K. Tewari, J. E. Epstein, B. K. Sim, J. E. Ledgerwood, B. S. Graham and S. L. Hoffman (2013). "Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine." Science **341**(6152): 1359-1365.

- Shastri, S., A. M. Zeeman, L. Berry, R. J. Verburgh, C. Braun-Breton, A. W. Thomas, L. Gannoun-Zaki, C. H. Kocken and H. J. Vial (2010). "*Plasmodium* CDP-DAG synthase: an atypical gene with an essential N-terminal extension." Int J Parasitol **40**(11): 1257-1268.
- Shimp, R. L., Jr., C. Rowe, K. Reiter, B. Chen, V. Nguyen, J. Aebig, K. M. Rausch, K. Kumar, Y. Wu, A. J. Jin, D. S. Jones and D. L. Narum (2013). "Development of a Pfs25-EPA malaria transmission blocking vaccine as a chemically conjugated nanoparticle." Vaccine **31**(28): 2954-2962.
- Shortt, H. E. and P. C. Garnham (1948). "Pre-erythrocytic stage in mammalian malaria parasites." Nature **161**(4082): 126.
- Silvestrini, F., E. Lasonder, A. Olivieri, G. Camarda, B. van Schaijk, M. Sanchez, S. Younis Younis, R. Sauerwein and P. Alano (2010). "Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Mol Cell Proteomics **9**(7): 1437-1448.
- Sinha, A., K. R. Hughes, K. K. Modrzynska, T. D. Otto, C. Pfander, N. J. Dickens, A. A. Religa, E. Bushell, A. L. Graham, R. Cameron, B. F. Kafsack, A. E. Williams, M. Llinas, M. Berriman, O. Billker and A. P. Waters (2014). "A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*." Nature **507**(7491): 253-257.
- Sonda, S. and A. B. Hehl (2006). "Lipid biology of Apicomplexa: perspectives for new drug targets, particularly for *Toxoplasma gondii*." Trends Parasitol **22**(1): 41-47.
- Spangenberg, T., J. N. Burrows, P. Kowalczyk, S. McDonald, T. N. Wells and P. Willis (2013). "The open access malaria box: a drug discovery catalyst for neglected diseases." PLoS One **8**(6): e62906.
- Spillman, N. J., R. J. Allen, C. W. McNamara, B. K. Yeung, E. A. Winzeler, T. T. Diagana and K. Kirk (2013). "Na(+) regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* involves the cation ATPase PfATP4 and is a target of the spiroindolone antimalarials." Cell Host Microbe **13**(2): 227-237.
- Staines, H. M. and K. Kirk (1998). "Increased choline transport in erythrocytes from mice infected with the malaria parasite *Plasmodium vinckei*." Biochem J **334** ( Pt 3): 525-530.
- Stern, W., C. Kovac and P. A. Weinhold (1976). "Activity and properties of CTP: cholinephosphate cytidyltransferase in adult and fetal rat lung." Biochim Biophys Acta **441**(2): 280-293.
- Striepen, B., C. N. Jordan, S. Reiff and G. G. van Dooren (2007). "Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa." PLoS Pathog **3**(6): e78.
- Sturm, A., R. Amino, C. van de Sand, T. Regen, S. Retzlaff, A. Rennenberg, A. Krueger, J. M. Pollok, R. Menard and V. T. Heussler (2006). "Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids." Science **313**(5791): 1287-1290.
- Suetsugu, S., S. Kurisu and T. Takenawa (2014). "Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins." Physiol Rev **94**(4): 1219-1248.
- Sundler, R. (1975). "Ethanolaminephosphate cytidyltransferase. Purification and characterization of the enzyme from rat liver." J Biol Chem **250**(22): 8585-8590.
- Sundler, R. and B. Akesson (1975a). "Biosynthesis of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines from ethanolamine and choline in rat liver." Biochem J **146**(2): 309-315.

- Sundler, R. and B. Akesson (1975b). "Regulation of phospholipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. Effect of different substrates." J Biol Chem **250**(9): 3359-3367.
- Sweitzer, T. D. and C. Kent (1994). "Expression of wild-type and mutant rat liver CTP:phosphocholine cytidyltransferase in a cytidyltransferase-deficient Chinese hamster ovary cell line." Arch Biochem Biophys **311**(1): 107-116.

## -T-

- Taneva, S., J. E. Johnson and R. B. Cornell (2003). "Lipid-induced conformational switch in the membrane binding domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase: a circular dichroism study." Biochemistry **42**(40): 11768-11776.
- Tang, F. and T. S. Moore Jr (1997). "Enzymes of the primary phosphatidylethanolamine biosynthetic pathway in postgermination castor bean endosperm (Developmental profiles and partial purification of the mitochondrial CTP:ethanolaminephosphate cytidyltransferase)." Plant Physiol **115**(4): 1589-1597.
- Tarun, A. S., X. Peng, R. F. Dumpit, Y. Ogata, H. Silva-Rivera, N. Camargo, T. M. Daly, L. W. Bergman and S. H. Kappe (2008). "A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(1): 305-310.
- Tham, W. H., J. Healer and A. F. Cowman (2012). "Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*." Trends Parasitol **28**(1): 23-30.
- The RTS,S Clinical Trials Partnership (2014). "Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites." PLoS Med **11**(7): e1001685.
- Thome, R., S. C. Lopes, F. T. Costa and L. Verinaud (2013). "Chloroquine: modes of action of an undervalued drug." Immunol Lett **153**(1-2): 50-57.
- Tian, S., J. Ohtsuka, S. Wang, K. Nagata, M. Tanokura, A. Ohta, H. Horiuchi and R. Fukuda (2014). "Human CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase: enzymatic properties and unequal catalytic roles of CTP-binding motifs in two cytidyltransferase domains." Biochem Biophys Res Commun **449**(1): 26-31.
- Tie, A. and M. Bakovic (2007). "Alternative splicing of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase produces two isoforms that differ in catalytic properties." J Lipid Res **48**(10): 2172-2181.
- Tijburg, L. B., M. Houweling, J. H. Geelen and L. M. van Golde (1987). "Stimulation of phosphatidylethanolamine synthesis in isolated rat hepatocytes by phorbol 12-myristate 13-acetate." Biochim Biophys Acta **922**(2): 184-190.
- Tilley, D. M., C. R. Evans, T. M. Larson, K. A. Edwards and J. A. Friesen (2008). "Identification and characterization of the nuclear isoform of *Drosophila melanogaster* CTP:phosphocholine cytidyltransferase." Biochemistry **47**(45): 11838-11846.
- Tilley, L., M. W. Dixon and K. Kirk (2011). "The *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell." Int J Biochem Cell Biol **43**(6): 839-842.
- Trager, W. and J. B. Jensen (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." Science **193**(4254): 673-675.
- Trecek, M., J. L. Sanders, J. E. Elias and J. C. Boothroyd (2011). "The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries." Cell Host Microbe **10**(4): 410-419.

Tronchere, H., M. Record, F. Terce and H. Chap (1994). "Phosphatidylcholine cycle and regulation of phosphatidylcholine biosynthesis by enzyme translocation." Biochim Biophys Acta **1212**(2): 137-151.

-V-

Vale, N., R. Moreira and P. Gomes (2009). "Primaquine revisited six decades after its discovery." Eur J Med Chem **44**(3): 937-953.

Van Deenen, L. L. D. G., J. (1974). Lipids of the red cell membrane, Academic Press Inc.

van Hellemond, J. J., J. W. Slot, M. J. Geelen, L. M. van Golde and P. S. Vermeulen (1994). "Ultrastructural localization of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase in rat liver." J Biol Chem **269**(22): 15415-15418.

van Schaijk, B. C., T. R. Kumar, M. W. Vos, A. Richman, G. J. van Gemert, T. Li, A. G. Eappen, K. C. Williamson, B. J. Morahan, M. Fishbaugher, M. Kennedy, N. Camargo, S. M. Khan, C. J. Janse, K. L. Sim, S. L. Hoffman, S. H. Kappe, R. W. Sauerwein, D. A. Fidock and A. M. Vaughan (2014). "Type II fatty acid biosynthesis is essential for *Plasmodium falciparum* sporozoite development in the midgut of *Anopheles* mosquitoes." Eukaryot Cell **13**(5): 550-559.

Vance, J. E. (2008). "Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids." J Lipid Res **49**(7): 1377-1387.

Vance, J. E. and G. Tasseva (2013). "Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1831**(3): 543-554.

Vanderberg, J. P. (2009). "Reflections on early malaria vaccine studies, the first successful human malaria vaccination, and beyond." Vaccine **27**(1): 2-9.

Vaughan, A. M., M. T. O'Neill, A. S. Tarun, N. Camargo, T. M. Phuong, A. S. Aly, A. F. Cowman and S. H. Kappe (2009). "Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development." Cell Microbiol **11**(3): 506-520.

Veitch, D. P. and R. B. Cornell (1996). "Substitution of serine for glycine-91 in the HXGH motif of CTP:phosphocholine cytidyltransferase implicates this motif in CTP binding." Biochemistry **35**(33): 10743-10750.

Veitch, D. P., D. Gilham and R. B. Cornell (1998). "The role of histidine residues in the HXGH site of CTP:phosphocholine cytidyltransferase in CTP binding and catalysis." Eur J Biochem **255**(1): 227-234.

Venkatesan, M., M. Alifrangis, C. Roper and C. V. Plowe (2013). "Monitoring antifolate resistance in intermittent preventive therapy for malaria." Trends Parasitol **29**(10): 497-504.

Vermeulen, P. S., M. J. Geelen and L. M. van Golde (1994). "Substrate specificity of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase purified from rat liver." Biochim Biophys Acta **1211**(3): 343-349.

Vermeulen, P. S., L. B. Tijburg, M. J. Geelen and L. M. van Golde (1993). "Immunological characterization, lipid dependence, and subcellular localization of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase purified from rat liver. Comparison with CTP:phosphocholine cytidyltransferase." J Biol Chem **268**(10): 7458-7464.

Vial, H. J. and M. L. Ancelin (1992). "Malarial lipids. An overview." Subcell Biochem **18**: 259-306.

- Vial, H. J., M. J. Thuet and J. R. Philippet (1982). "Inhibition of the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* by D vitamins and vitamin D-3 derivatives." Mol Biochem Parasitol **5**(3): 189-198.
- Vial, H. J., M. J. Thuet and J. R. Philippet (1984). "Cholinephosphotransferase and ethanolaminephosphotransferase activities in *Plasmodium knowlesi*-infected erythrocytes. Their use as parasite-specific markers." Biochim Biophys Acta **795**(2): 372-383.
- Vo Duy, S., S. Besteiro, L. Berry, C. Perigaud, F. Bressolle, H. J. Vial and I. Lefebvre-Tournier (2012). "A quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry method for metabolomic analysis of *Plasmodium falciparum* lipid related metabolites." Anal Chim Acta **739**: 47-55.

## -W-

- Wang, X. and T. S. Moore (1990). "Phosphatidylcholine biosynthesis in castor bean endosperm : purification and properties of cytidine 5'-triphosphate:choline-phosphate cytidyltransferase." Plant Physiol **93**(1): 250-255.
- Wang, Y. and C. Kent (1995a). "Effects of altered phosphorylation sites on the properties of CTP:phosphocholine cytidyltransferase." J Biol Chem **270**(30): 17843-17849.
- Wang, Y. and C. Kent (1995b). "Identification of an inhibitory domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase." J Biol Chem **270**(32): 18948-18952.
- Wang, Y., J. I. MacDonald and C. Kent (1995). "Identification of the nuclear localization signal of rat liver CTP:phosphocholine cytidyltransferase." J Biol Chem **270**(1): 354-360.
- Wang, Y., T. D. Sweitzer, P. A. Weinhold and C. Kent (1993). "Nuclear localization of soluble CTP:phosphocholine cytidyltransferase." J Biol Chem **268**(8): 5899-5904.
- Watkins, J. D. and C. Kent (1991). "Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity and subcellular location by phosphorylation in Chinese hamster ovary cells. The effect of phospholipase C treatment." J Biol Chem **266**(31): 21113-21117.
- Weber, C. H., Y. S. Park, S. Sanker, C. Kent and M. L. Ludwig (1999). "A prototypical cytidyltransferase: CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase from *Bacillus subtilis*." Structure **7**(9): 1113-1124.
- Wein, S. (2012). Propriétés et mécanismes d'action des analogues de choline, une nouvelle classe d'antipaludiques. Etude de l'albitiazolium, candidat clinique, Université Montpellier 2.
- Wein, S., M. Maynadier, Y. Bordat, J. Perez, S. Maheshwari, P. Bette-Bobillo, C. Tran Van Ba, D. Penarete-Vargas, L. Fraisse, R. Cerdan and H. Vial (2012). "Transport and pharmacodynamics of albitiazolium, an antimalarial drug candidate." Br J Pharmacol **166**(8): 2263-2276.
- Wein, S., C. Tran Van Ba, M. Maynadier, Y. Bordat, J. Perez, S. Peyrottes, L. Fraisse and H. J. Vial (2014). "New insight into the mechanism of accumulation and intraerythrocytic compartmentation of albitiazolium, a new type of antimalarial." Antimicrob Agents Chemother **58**(9): 5519-5527.
- Weinhold, P. A., L. Charles and D. A. Feldman (1994). "Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase in HepG2 cells: effect of choline depletion on phosphorylation, translocation and phosphatidylcholine levels." Biochim Biophys Acta **1210**(3): 335-347.

- Wells, T. N., J. N. Burrows and J. K. Baird (2010). "Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination." Trends Parasitol **26**(3): 145-151.
- Wengelnik, K. and H. J. Vial (2007). "Characterisation of the phosphatidylinositol synthase gene of *Plasmodium* species." Res Microbiol **158**(1): 51-59.
- Wengelnik, K., V. Vidal, M. L. Ancelin, A. M. Cathiard, J. L. Morgat, C. H. Kocken, M. Calas, S. Herrera, A. W. Thomas and H. J. Vial (2002). "A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes." Science **295**(5558): 1311-1314.
- White, N. J., S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. A. Mokuolu and A. M. Dondorp (2014). "Malaria." Lancet **383**(9918): 723-735.
- WHO (2000). "Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **94 Suppl 1**: S1-90.
- WHO (2006). Paludisme : Lutte antivectorielle et protection individuelle. Série de Rapports techniques, World Health Organization. **936**.
- WHO (2010). Guidelines for the treatment of malaria, 2nd edition. World Health Organization
- WHO. (2012). "Country antimalarial drug policies: by region." from [http://www.who.int/malaria/am\\_drug\\_policies\\_by\\_region\\_afro/en/](http://www.who.int/malaria/am_drug_policies_by_region_afro/en/). World Health Organization
- WHO. (2014a). "Global malaria vaccine pipeline ", from [http://www.who.int/vaccine\\_research/links/Rainbow/en/index.html](http://www.who.int/vaccine_research/links/Rainbow/en/index.html) World Health Organization
- WHO (2014b). World Malaria Report 2014, World Health Organization.
- Wieder, T., C. C. Geilen, M. Wieprecht, A. Becker and C. E. Orfanos (1994). "Identification of a putative membrane-interacting domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from rat liver." FEBS Lett **345**(2-3): 207-210.
- Witola, W. H., K. El Bissati, G. Pessi, C. Xie, P. D. Roepe and C. B. Mamoun (2008). "Disruption of the *Plasmodium falciparum* PfPMT gene results in a complete loss of phosphatidylcholine biosynthesis via the serine-decarboxylase-phosphoethanolamine-methyltransferase pathway and severe growth and survival defects." J Biol Chem **283**(41): 27636-27643.
- Woodrow, C. K., S. (2005). Glycolysis in asexual-stage parasites, ASM Press.
- Wright, G. J. and J. C. Rayner (2014). "*Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: combining function with immune evasion." PLoS Pathog **10**(3): e1003943.
- Wunderlich, F., S. Fiebig, H. Vial and H. Kleinig (1991). "Distinct lipid compositions of parasite and host cell plasma membranes from *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes." Mol Biochem Parasitol **44**(2): 271-277.

-Y-

- Yam, X. Y., C. Birago, F. Fratini, F. Di Girolamo, C. Raggi, M. Sargiacomo, A. Bachi, L. Berry, G. Fall, C. Curra, E. Pizzi, C. B. Breton and M. Ponzi (2013). "Proteomic analysis of detergent-resistant membrane microdomains in trophozoite blood stage of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Mol Cell Proteomics **12**(12): 3948-3961.



- Yang, W. and S. Jackowski (1995). "Lipid activation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase is regulated by the phosphorylated carboxyl-terminal domain." J Biol Chem **270**(28): 16503-16506.
- Yang, W., C. B. Mason, S. V. Pollock, T. Lavezzi, J. V. Moroney and T. S. Moore (2004). "Membrane lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: expression and characterization of CTP:phosphoethanolamine cytidylyltransferase." Biochem J **382**(Pt 1): 51-57.
- Yeo, H. J., M. P. Larvor, M. L. Ancelin and H. J. Vial (1997). "Plasmodium falciparum CTP:phosphocholine cytidylyltransferase expressed in *Escherichia coli*: purification, characterization and lipid regulation." Biochem J **324 ( Pt 3)**: 903-910.
- Yeo, H. J., J. Sri Widada, O. Mercereau-Puijalon and H. J. Vial (1995). "Molecular cloning of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase from *Plasmodium falciparum*." Eur J Biochem **233**(1): 62-72.

-Z-

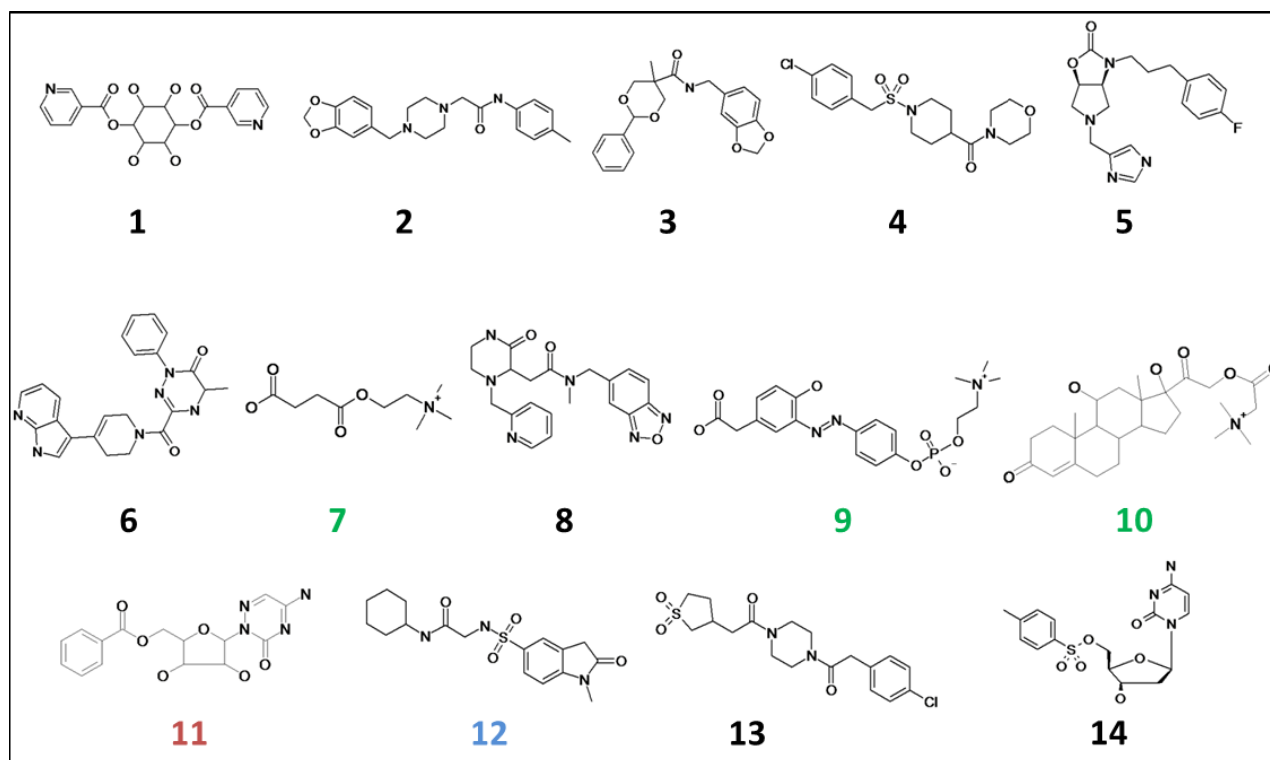
- Zhu, L. and M. Bakovic (2012). "Breast cancer cells adapt to metabolic stress by increasing ethanolamine phospholipid synthesis and CTP:ethanolaminephosphate cytidylyltransferase-Pcyt2 activity." Biochem Cell Biol **90**(2): 188-199.

# *Annexes*

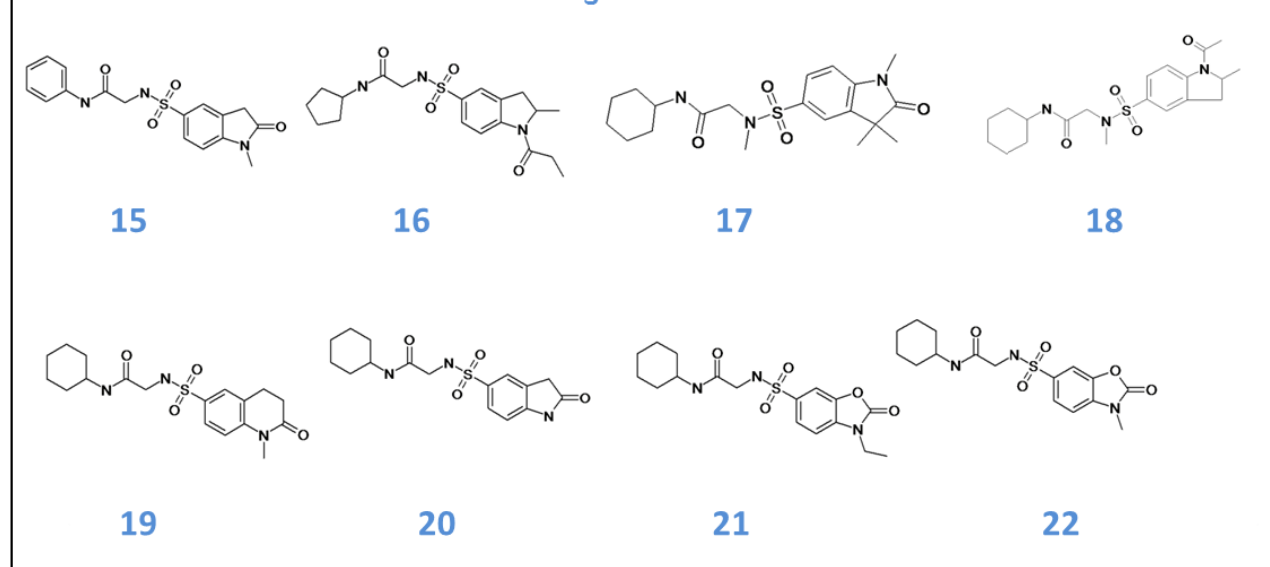
- Structures des molécules issues du criblage virtuel sur la structure de la *PfCCT*.
- Liste des amorces utilisées pour les différentes constructions présentées dans ce manuscrit (*PfCCT*, *PfECT* et *PfCK*)
- Article 1. ***Plasmodium falciparum* CTP:phosphocholine cytidyltransferase possesses two functional catalytic domains and is inhibited by a CDP-choline analog selected from a virtual screening.** Article accepté pour publication dans FEBS Letters (Mars 2015)
- Article 2. **Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase shows that only one of the two cytidyltransferase domains is active.** Article publié dans Biochemical Journal, 2013.
- Article 3, données additionnelles. **Composite Aromatic Boxes for Enzymatic Transformations of Quaternary Ammonium Substrates.** Article publié dans Angewandte Chemie International Edition, 2014.



## Structures des molécules issues du criblage virtuel sur la *PfCCT*



### Analogues de C12



Liste des amorces utilisées pour les différentes constructions présentées dans ce manuscrit (*PfCCT*, *PfECT* et *PfCK*)

**pET15b *PfCCT*<sub>(1-210)</sub>**

sens 5' TTACATATGATCATCAAAGTGAACAGC 3'  
 anti-sens 5' ATAGGATCCCTTATTTGGTAACGCCAATGTTC 3'  
 6His *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> C-ter sens 5' CATTGGCGTTACCAAACATCATCATCATCATCATTAAGGATCCGGCTGC 3'  
 6His *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> C-ter anti-sens 5' GCAGCCGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGTTTGGTAACGCCAAT G 3'

**pET15b *PfCCT*<sub>(528-795)</sub>**

sens 5' CATATGGATAGCAGCAACTACTTCC 3'  
 anti-sens 5' GGATCCCTTATTCGTCACACCGATATTCAG 3'

**pET15b *PfECT X-1*<sub>(124-548 Δ267-318)</sub>**

sens 5' TTACATATGACCCAGGAAAAAACGAAAG 3'  
 anti-sens 5' ATTGGATCCCTTACAGGTATTTTTTGTTCCTTTTCG 3'  
 Mutagenèse Δ267-318 sens 5' CATCTGCTGCAAGCGGTGAACACCAACACGAACTCT 3'  
 Mutagenèse Δ267-318 anti-sens 5' AGAGTTCGTGTTGGTGTTCACCGCTTGCAGCAGATG 3'

**pET15b *PfECT X-2*<sub>(114-573)</sub>**

sens 5' TTACATATGAACGAATTCGAAATCGATAG 3'  
 anti-sens 5' GGATCCCTTAATTGTTAATCGCATAG 3'

**pET24b *PfECT X2*<sub>(114-573)</sub>**

sens 5' TTACATATGAACGAATTCGAAATCGATAG 3'  
 anti-sens 5' AGCAACTCGAGATTGTTAATCGCATAGGTATTGC 3'

**pET15b *PfECT X-3*<sub>(114-573 Δ270-312)</sub>**

114-269 sens 5' TTACATATGAACGAATTCGAAATCGATAG 3'  
 114-269 anti-sens 5' GTACACGTAGTTCGTTTCGTTTCGAGTTGTTTCACCGCTTGC 3'  
 313-573 sens 5' GCAAGCGGTGAACAACCTCGAACGAAACGAACTACGTGTAC 3'  
 313-573 anti-sens 5' GGATCCCTTAATTGTTAATCGCATAG 3'

**pET15b *PfECT X-4*<sub>(114-573 Δ270-365)</sub>**

114-269 sens 5' TTACATATGAACGAATTCGAAATCGATAG 3'  
 114-269 anti-sens 5' GGTGTCAATATCGTGTGCTGCGAGTTGTTTCACCGCTTGC 3'  
 366-573 sens 5' GCAAGCGGTGAACAACCTCGCAGCAACACGATATTGACACC 3'  
 366-573 anti-sens 5' GGATCCCTTAATTGTTAATCGCATAG 3'

**pET15b *PfECT X-5*<sub>(70-573)</sub>**

sens 5' TTACATATGAAGAAAAACGACAGCTCTTG 3'  
 anti-sens 5' GGATCCCTTAATTGTTAATCGCATAG 3'

**Mutants *PfCK***

E324A sens 5' GCAAACCTCTTTATAGCGACAACAATCGATTATTC 3'

E324A anti-sens	5' GAATAATCGATTGTTGTC <u>CGCT</u> TATAAAGAAGTTTGC 3'
Y329A sens	5' GAAACAACAATCGAT <u>GCGT</u> CATATAACGCATATCC 3'
Y329A anti-sens	5' GGATATGCGTTATATGAC <u>CGC</u> ATCGATTGTTGTTTC 3'
W392A sens	5' GGTTTACATCTAATAG <u>CGGC</u> ATTCTGGTCTATC 3'
W392A anti-sens	5' GATAGACCAGAATG <u>CCGCT</u> ATTAGATGTAAACC 3'
W395A sens	5' CATCTAATATGGGCATT <u>CGCT</u> CTATCATAAGAGG 3'
W395A anti-sens	5'CCTCTTATGATAGAC <u>CGC</u> GAATGCCCATATTAGATG 3'
Y414A sens	5' GTTATAATGAATTTGATTTCTTCTTAG <u>CGG</u> CAAAGGAAAGACTTAAAATG 3'
Y414A anti-sens	5' CATTTTAAGTCTTTCCTTTG <u>CCGCT</u> AAGAAGAAATCAAATTCATTATAAC 3'



## *Plasmodium falciparum* CTP:phosphocholine cytidyltransferase possesses two functional catalytic domains and is inhibited by a CDP-choline analog selected from a virtual screening

Alicia Contet<sup>a,1</sup>, Emilie Pihan<sup>b,1,2</sup>, Marina Lavigne<sup>a</sup>, Kai Wengelnik<sup>a</sup>, Sweta Maheshwari<sup>a,3</sup>, Henri Vial<sup>a</sup>, Dominique Douguet<sup>b,1,\*</sup>, Rachel Cerdan<sup>a,1,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Montpellier, CNRS, Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, UMR 5235, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

<sup>b</sup> CNRS, Université Nice Sophia-Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, 660, route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 February 2015

Accepted 3 March 2015

Available online 13 March 2015

Edited by Peter Brzezinski

#### Keywords:

Malaria  
Phosphatidylcholine  
CTP:phosphocholine cytidyltransferase  
(EC 2.7.7.15)  
Kinetic parameter  
Drug target  
Structure-based virtual screening  
Inhibitor

### ABSTRACT

Phosphatidylcholine is the major lipid component of the malaria parasite membranes and is required for parasite multiplication in human erythrocytes. *Plasmodium falciparum* CTP:phosphocholine cytidyltransferase (PfCCT) is the rate-limiting enzyme of the phosphatidylcholine biosynthesis pathway and thus considered as a potential antimalarial target. In contrast to its mammalian orthologs, PfCCT contains a duplicated catalytic domain. Here, we show that both domains are catalytically active with similar kinetic parameters. A virtual screening strategy allowed the identification of a drug-size molecule competitively inhibiting the enzyme. This compound also prevented phosphatidylcholine biosynthesis in parasites and exerted an antimalarial effect. This study constitutes the first step towards a rationalized design of future new antimalarial agents targeting PfCCT.

© 2015 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Malaria is a major global health problem with an estimated annual 207 million cases and 627 000 deaths, most of them children under the age of 5 [1]. *Plasmodium falciparum* is the most

**Abbreviations:** CCT, CTP:phosphocholine cytidyltransferase; CDP-choline, cytidine-di-phosphate choline; P-choline, phosphocholine; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; Pf, *Plasmodium falciparum*; PL, phospholipid

**Author contributions:** AC and ML performed the *in vitro* and *in vivo* experiments. EP generated the homology models and carried out ligand- and structure-based virtual screenings. SM performed the immunofluorescence experiments. DD designed computational experiments. RC, KW and HV designed the experiments. AC, KW, DD and RC wrote the manuscript.

\* Corresponding authors.

**E-mail addresses:** [douguet@ipmc.cnrs.fr](mailto:douguet@ipmc.cnrs.fr) (D. Douguet), [rachel.cerdan@univ-montp2.fr](mailto:rachel.cerdan@univ-montp2.fr) (R. Cerdan).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Present address: ICOA, UMR7311, Université d'Orléans, rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 2, France.

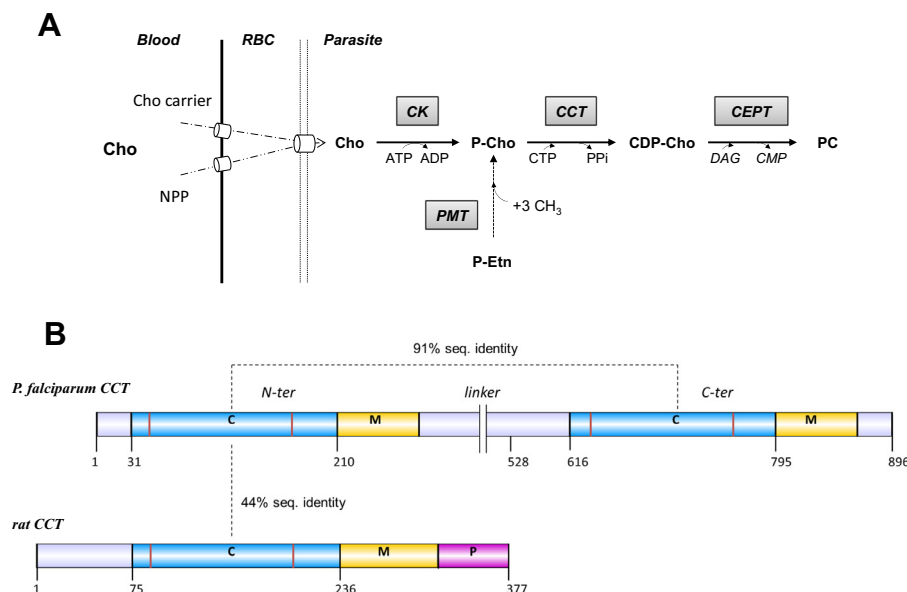
<sup>3</sup> Present address: Department of Biophysics and Biophysical Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.03.003>

0014-5793/© 2015 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

deadly human malaria parasite. No efficient vaccine is currently available and resistance to all available treatments has now been observed [2]. Thus, the need for new antimalarial strategies involving novel targets and new mechanisms of action remains a priority.

During its intra-erythrocytic life cycle, *P. falciparum* relies on phospholipids (PL) to build the membranes necessary for daughter cell development. The parasite possesses its own enzymatic machinery to produce its main PL, phosphatidylcholine (PC) [3] (Fig. 1A). We previously showed that choline analogs blocking the entry of choline and the synthesis of PC in *P. falciparum* led to parasite death [4,5]. Targeting PC synthesis in malaria parasite is therefore a proven strategy. In *P. falciparum*, PC is mostly synthesized by the Kennedy pathway and partially via the conversion of phosphoethanolamine into phosphocholine (P-choline) by a phosphoethanolamine N-methyltransferase, an essential enzyme for malaria transmission [6–9] (Fig. 1A). In both cases, the CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT) [EC 2.7.7.15] is the rate-limiting enzyme. Generally, CCTs carry a single catalytic domain followed by a membrane binding domain and a region with phosphorylatable residues (Fig. 1B). The catalytic domains of cytidyltransferases are characterized



**Fig. 1.** Phosphatidylcholine biosynthesis pathways in *Plasmodium falciparum*. (A) The precursor choline (Cho) is taken up from the host plasma by a choline carrier and the new permeation pathways (NPP), both located in the red blood cell (RBC) membrane and by a parasite choline carrier that has not yet been identified. Choline is phosphorylated by choline kinase (CK), phosphocholine (P-choline) is then activated by CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT) in presence of CTP. Finally, CDP-choline is converted to phosphatidylcholine (PC) by the choline/ethanolamine-phosphotransferase (CEPT) in presence of di-acyl glycerol (DAG). In *P. falciparum*, PC can also be obtained through a triple methylation of phosphoethanolamine (P-Etn) by phosphoethanolamine-methyltransferase (PMT). Enzymes are boxed in grey. (B) Comparison of *PfCCT* and rat CCT domains. Both enzymes contain a catalytic domain (C) and a membrane binding domain (M). The positions of the CTP-binding motif HxGH and of the cytidyltransferase motif R(T/S)xG(V/I)STT are indicated by red horizontal bars in the domains C. In rat CCT, the membrane binding domain is followed by a region containing phosphorylatable residues (P).

by the CTP-binding motif HxGH and the signature of the cytidyltransferase superfamily R(T/S)xG(V/I)STT (Figs. 1B and S1). They associate to form homodimers through a conserved dimerization motif R(Y/W)VD [10–12]. CCTs are amphitropic proteins, operating a conversion between an inactive soluble state and an active membrane-bound state [13,14]. The membrane binding domain plays the role of a silencer in the soluble form and of an activator in the membrane-bound form [10,15]. Removal of the membrane binding segment from CCT proteins results in constitutively active enzymes [16].

*P. falciparum* CCT is a 896 amino-acid protein with the unusual feature of duplicated catalytic- and membrane-binding domains (Fig. 1B). This duplication is found in three apicomplexan parasites, *Plasmodium*, *Babesia* and *Theileria* but not in other eukaryotes [17]. The CTP-binding motif and the superfamily signature are conserved in each *PfCCT* domain (Fig. S1). The N-terminal and C-terminal catalytic domains of *PfCCT* share 91% sequence identity over 180 amino-acids and 44% of sequence identity with the human (and rat) CCT catalytic domain (Figs. 1B and S1). The dimerization motif RWVD is also present in both *PfCCT* domains (residues 96–99 and 681–684). We recently reported that the C-terminal catalytic domain of the recombinant *PfCCT*<sub>(528–795)</sub> forms a dimer [17]. In the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*, the gene coding for the CCT has been shown to be essential for parasite survival [18]. So far, the enzymatic activity has been quantified in the parasite [5] and only the C-terminal domain of *PfCCT* could be expressed and characterized in vitro [17,19]. In the present work, we biochemically characterized individually both *PfCCT* catalytic domains and revealed that the two domains are active with similar kinetic parameters. We investigated *PfCCT* druggability by modeling its three-dimensional structure and identified one drug-sized molecule from a structure-based virtual screening. This compound is the first to function as a competitive inhibitor of the recombinant

enzyme, to prevent PC biosynthesis and to exert an antimalarial effect.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cloning, expression and purification of recombinant *PfCCT*<sub>(1–210)</sub> and *PfCCT*<sub>(528–795)</sub>

The *PfCCT* cDNA sequence (PlasmoDB: PF3D7\_1316600) was codon-optimized for expression in *Escherichia coli* (GenScript). DNA sequences coding for *PfCCT*<sub>(1–210)</sub> and *PfCCT*<sub>(528–795)</sub> were cloned in a pET15b expression vector (Novagen). Protein expression in *E. coli* BL21(DE3) was induced with 0.5 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranose for ~24 h at 16 °C in Luria–Bertani medium. Bacteria were harvested by centrifugation at 6000g for 15 min at 4 °C and stored at –80 °C. Thawed cells were resuspended in 50 mM HEPES/NaOH pH 7, 400 mM NaCl for *PfCCT*<sub>(1–210)</sub> or 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl for *PfCCT*<sub>(528–795)</sub>, 2 mM β-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 1 mg/ml lysozyme and an EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche). Bacteria were lysed using a high-pressure homogenizer (French press) and the homogenate was clarified by centrifugation at 40000g for 50 min. The supernatant was applied onto a HisTrap HP column (GE Healthcare) previously equilibrated with the corresponding above mentioned buffers without Triton, lysozyme and EDTA. Both *PfCCT* constructs were eluted with 500 mM imidazole after gradient steps of 100 mM and 250 mM imidazole in the equilibration buffer. The proteins fractions were concentrated with Amicon centrifugal filters and further purified by gel-filtration chromatography using a HiLoad 16/60 Superdex 200 pg column (GE Healthcare) (Fig. S2). Protein samples were eluted in 50 mM HEPES/NaOH pH 7, 400 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol for *PfCCT*<sub>(1–210)</sub> or 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol



for PfCCT<sub>(528–795)</sub>. For each protein, two peaks of elution corresponding to dimer and tetramer oligomerization states were detected on the size-exclusion chromatography profiles (Fig. S2). The fractions of the major peaks (dimers) were collected for further characterization. The concentration of purified protein samples was determined by absorbance measurements at 280 nm using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoScientific).

## 2.2. Western blot and immunofluorescence assays for subcellular localization

To immunolocalize PfCCT in infected erythrocytes, parasites cultures were fixed for 4 h at room temperature in 4% paraformaldehyde in PBS and incubated sequentially with an anti-PfCCT antibody (1:200) obtained by immunization of mice with PfCCT<sub>(617–769)</sub> and with secondary anti-(mouse IgG) Alexa Fluor Red 594 antibodies (Fig. S3). Cells were mounted on slides using Vectashield mounting medium containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Vector Laboratories). Parasites were observed with a Zeiss Axioimager epifluorescence microscope equipped with Apotome (Carl Zeiss).

## 2.3. Steady-state and inhibition kinetic assays on recombinant enzyme

CCT activity of recombinant proteins was measured by following the formation of CDP-choline from radiolabeled substrate [<sup>14</sup>C]P-choline (American Radiolabeled Chemicals). Assays were performed under optimal conditions in a final volume of 50 µl containing 100 mM HEPES/NaOH pH 7 for PfCCT<sub>(1–210)</sub> or 100 mM Tris/HCl pH 8 for PfCCT<sub>(528–795)</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, from 75 µM to 10 mM CTP, from 50 µM to 5 mM P-choline (0.4–40 µCi/µmol [<sup>14</sup>C]-choline) and 0.5 µg of purified protein. Reactions were carried out at 37 °C for 10 min and were stopped by heating the mix at 99 °C for 5 min. A sample of 20 µl was spotted onto a thin layer chromatography silica-gel plate (Merck) pre-activated at 100 °C for 1 h and separated using 98% ethanol/0.5% NaCl/30% ammonia (50:50:1, v/v/v). Radioactive spots corresponding to CDP-choline were visualized by Phosphorimager then scraped and quantified by liquid scintillation spectrometry. Inhibition assays were performed with substrate concentrations at their *K<sub>m</sub>* value and by varying the compound concentration. Compounds were dissolved in DMSO (final DMSO < 1% v/v).

Kinetic data were fitted with the Michaelis–Menten Eq. (1) where *v* is the reaction rate (µM s<sup>-1</sup>), *V<sub>max</sub>* is the maximum velocity of the reaction (µM s<sup>-1</sup>), [*S*] is the substrate concentration (µM) and *K<sub>m</sub>* is the substrate concentration at which the reaction rate is half of the maximum velocity. Inhibitor-dependent curves were fitted according to the competitive inhibition Eq. (2). The inhibition constants *K<sub>i</sub>* were determined from the global fit of the data at varying concentrations of inhibitor [*i*]:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2)$$

Inhibition effect was expressed as the compound concentration inhibiting 50% of the enzyme activity (IC<sub>50</sub>). Substrate and inhibitor dependent curves were analyzed with GraphPad Prism6®.

## 2.4. Sequence alignment, model building and validation

Primary sequences of cytidylyltransferases were aligned using MUSCLE [20] (Fig. S1). The structural models of the PfCCT N-ter<sub>(8–189)</sub> and C-ter<sub>(581–779)</sub> domains were generated based on

the experimental structure of the catalytic domain of rat CCT (PDB: 3HL4, residues 40–215) [21]. Modeller 9v8 was used to perform the comparative modeling of the intramolecular dimer form [22]. Two lysine-rich regions corresponding to residues (132–149) and (717–734), the linker (190–580) and the C-terminal (780–896) regions were truncated as no reliable coordinates were available for these parts. The product CDP-choline co-crystallized with rat CCT was used as a constraint in Modeller to leave the catalytic pocket open and to improve the accuracy of the model.

## 2.5. Virtual screening

A collection of about 8 million commercial compounds was used for the virtual screening. The filtering procedure was performed by ligand-based followed by structure-based steps (see Method S1 for details). Briefly, a total of 117 148 molecules were selected by three ligand-based methods: 163 structural analogs of CDP-choline retrieved for the similarity of their topological extended connectivity fingerprints with the CDP-choline template [23]; 16307 molecules matching a pharmacophore model generated from the crystallized conformation of CDP-choline [24] and 100678 compounds fitting the 3D shape and volume of the template [25]. A docking secondary filter (structure-based step) using the N-ter PfCCT 3D comparative model as target protein was performed with the selected molecules. This structure-based screening reduced the number of candidates to 22072 molecules. Finally, combining an automated selection based on defined protein–ligand interactions (program LIGPLOT [26]) and careful visual inspection, ten candidate compounds were selected (Figs. 4 and S4). In parallel, one cytidyl- and three choline analogs were selected by substructure similarity searching. The PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC) was used for all molecular visualizations and image rendering.

## 2.6. Assays for antimalarial activity

*P. falciparum* parasites (3D7 strain MRA102 from Malaria Research and Reference Reagent Resource Center) were cultured in O<sup>+</sup> human red blood cells obtained from the local blood bank. Antiplasmodial activity was routinely determined in microtiter plates at 1.5% final hematocrit and 0.6% parasitemia according to a modified Desjardins test [27,28] based on [<sup>3</sup>H]hypoxanthine incorporation into parasite nucleic acids after 48 h of incubation in presence of the compound. [<sup>3</sup>H] hypoxanthine (0.6 µCi/well) in 30 µl of complete medium was added to each well of 200 µl of parasite suspension and incubation was pursued for 18 h before plates were frozen at –80 °C. Cells were lysed by thawing and the parasite DNA was recovered by harvesting the lysate on glass-fiber filter plates (Unifilter 96 GF/C; Perkin-Elmer) using a FilterMate cell harvester (Packard Instruments). The antimalarial activity of compounds was expressed as IC<sub>50</sub> corresponding to compound concentration leading to 50% inhibition of parasite growth.

## 2.7. Inhibition of *P. falciparum* phosphatidylcholine biosynthesis

The inhibition of parasite PC and phosphatidylethanolamine (PE) biosynthesis was evaluated in microtiter plates by measuring the incorporation of radiolabeled [<sup>3</sup>H]choline (20 µM, 0.5 Ci/mmol) or [<sup>3</sup>H]ethanolamine (2 µM, 4.2 Ci/mmol) into PC or PE. Infected erythrocyte suspensions (2% hematocrit and 5% parasitemia) were incubated in 150 µl of modified RPMI 1640 without choline and supplemented with 25 mM HEPES/NaOH, pH 7.4 with or without compound. After 30 min at 37 °C, radiolabeled precursor (50 µl) were added for a 3 h short incubation time to avoid toxic effects.

Incorporations were stopped by freezing the plates at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Radiolabeled lipids were recovered and quantified as described in Wein et al., [5]. The result expressed as  $\text{IC}_{50}(\text{PC})$  corresponded to the compound concentration reducing the amount of synthesized PC by 50%.

### 3. Results

#### 3.1. Biochemical characterization and localization of *PfCCT*

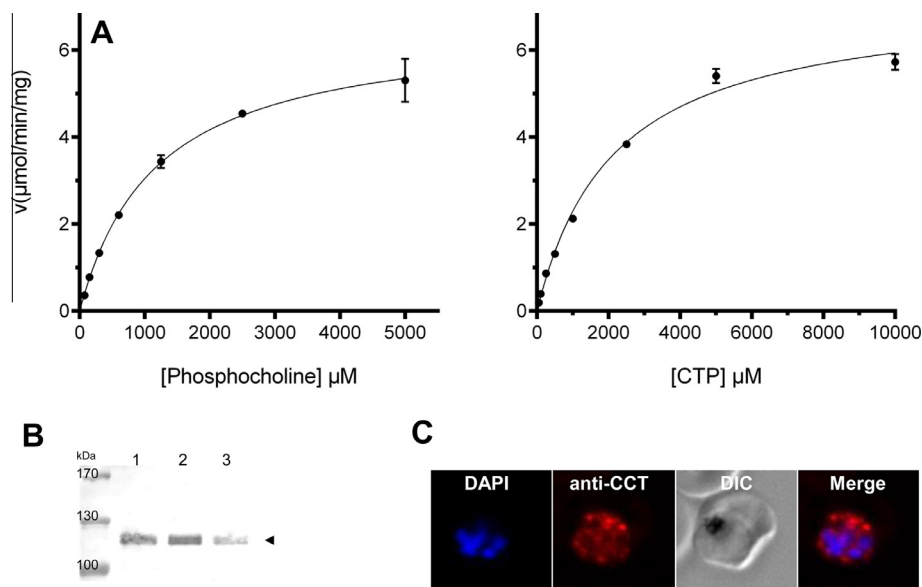
*PfCCT* is atypical in having two catalytic domains resulting from an ancestral duplication event. So far, the kinetic parameters have only been determined for the C-terminal domain in a construct encompassing the catalytic domain *PfCCT*<sub>(528–795)</sub> lacking a lysine-rich region (residues 720–737) [17] and in a longer construct comprising the membrane-binding domain *PfCCT*<sub>(528–896)</sub> [19]. To comparatively investigate the enzymatic activity of both domains, we designed two new *PfCCT* constructs for the N-ter and C-ter catalytic domains, residues 1–210 and residues 528–795, respectively. Each construct was expressed as recombinant protein in *E. coli* and purified in a two-step protocol consisting of  $\text{Ni}^{2+}$ -affinity chromatography followed by gel filtration chromatography (Fig. S2). Purified *PfCCT*<sub>(1–210)</sub> and *PfCCT*<sub>(528–795)</sub> proteins were obtained at final concentrations of 0.6 mg/ml and 0.8 mg/ml, respectively. Enzymatic activities of both constructs followed Michaelis–Menten kinetics with respect to both substrates

(Fig. 2A). Comparable kinetic parameters were found for the N-ter<sub>(1–210)</sub> and C-ter<sub>(528–795)</sub> domains with similar  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  values and  $k_{\text{cat}}$  values of  $2.96 \pm 0.12 \text{ s}^{-1}$  and  $2.45 \pm 0.38 \text{ s}^{-1}$ , respectively (Table 1).

To better characterize the enzyme in the parasite, we raised antibodies against the recombinant C-ter domain of *PfCCT* (Fig. S3). Western blot analysis revealed a unique protein band at the expected size in the lysate of *Plasmodium* infected red blood cells (Fig. 2B). Upon sub-cellular fractionation, *PfCCT* was recovered in both the cytosol and membrane fractions (Fig. 2B). Immunofluorescence assays showed the presence of the endogenous *PfCCT* as a diffuse and dotted pattern (Fig. 2C). This suggested that *PfCCT* is localized in the cytoplasm with possibly some regions of higher concentration.

#### 3.2. Comparative 3D model of *PfCCT*

In order to perform a structure-based screening on *PfCCT* and in absence of an experimental 3D structure for this enzyme, we built a comparative model of the *PfCCT* catalytic domains. The model was based on the X-ray structure of the rat CCT crystallized in presence of CDP-choline (PBD: 3HL4). The 3D structural model of *PfCCT* adopted an  $\alpha/\beta$  fold and each catalytic domain formed a Rossmann fold commonly found in nucleotide binding proteins (Fig. 3A). The model suggested that the enzyme folded as an intramolecular dimer, both catalytic domains being in contact (Fig. 3A). The

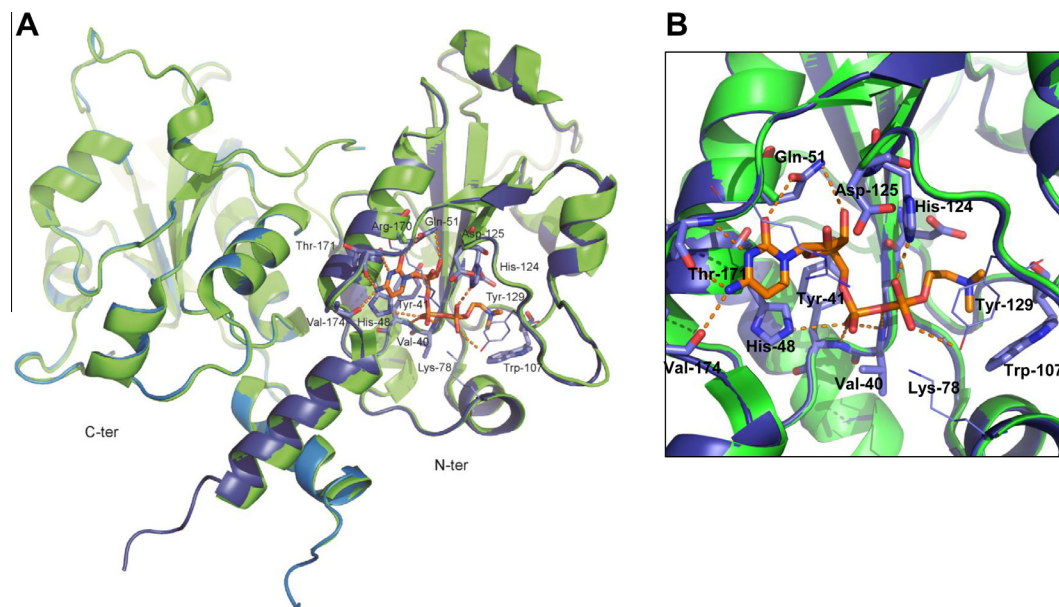


**Fig. 2.** Activity of recombinant *PfCCT*<sub>(1–210)</sub> and cellular localization in blood stage *P. falciparum* parasites. (A) Activity of recombinant *PfCCT*<sub>(1–210)</sub> catalytic domain. Representative Michaelis–Menten plots are shown with increasing concentration of phosphocholine (left panel) or CTP (right panel) while keeping constant the other substrate concentration. One representative experiment out of four is displayed in each case. Enzymatic parameters for both catalytic domains *PfCCT*<sub>(1–210)</sub> and *PfCCT*<sub>(528–795)</sub> are given in Table 1. (B) Western blot analysis of subcellular fractions of *P. falciparum*. Distribution of the endogenous *PfCCT* in the soluble and insoluble fractions of parasite lysates was analyzed from synchronized parasites at the schizont stage. Lane 1, total parasite extract ( $5 \times 10^6$  cells); lane 2, soluble fraction (parasite cytosol); lane 3, insoluble fraction (membranes). (C) Immunofluorescence assays were performed on *P. falciparum* infected red blood cells at the schizont stage and revealed by an anti-*PfCCT* antibody (red). Nuclei were stained in blue with DAPI.

**Table 1**

Kinetic parameters of the N-ter and C-ter *PfCCT* catalytic domains and of endogenous *PfCCT*. Values are the mean ( $\pm$ S.E.M.) of at least 3 independent experiments.

Enzyme	Substrate	$K_m$ (mM)	$V_{\text{max}}$	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
<i>PfCCT</i> <sub>(1–210)</sub>	Phosphocholine	$1.10 \pm 0.12$	$6.59 \pm 0.27$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	$2.96 \pm 0.12$
	CTP	$2.53 \pm 0.62$		
<i>PfCCT</i> <sub>(528–795)</sub>	Phosphocholine	$2.47 \pm 0.33$	$4.46 \pm 0.70$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	$2.45 \pm 0.38$
	CTP	$5.74 \pm 0.37$		



**Fig. 3.** Comparative model of *PfCCT*. (A) The backbone of *PfCCT*-N-ter and -C-ter (in blue) is superposed to the crystallographic structure of the rat CCT (PDB code 3HL4) backbone (in green). The product CDP-choline (orange) has been docked in the N-ter *PfCCT* catalytic domain. (B) Close-view of the active site of the *PfCCT*-N-ter catalytic domain. The hydrogen bonds between CDP-choline and the residues of the active site are shown in orange dashes. This 3D structure lacked the coordinates of the linker region between the N-terminal and C-terminal catalytic domains.

evaluation of the resulting model confirmed its good quality when compared with template values (Table S1). All the residues involved in the CDP-choline binding were conserved between the N-ter and C-ter domains (Fig. 3B) and the superimposition of both domains showed an identical overall fold (root-mean-square deviation of 0.262 Å over 182 residues).

### 3.3. Selection of candidate inhibitors by virtual screening

Thermodynamic data used to assess the binding of substrates and product of *PfCCT*<sub>(528–795)</sub> indicated that CDP-choline exhibited a 3-fold higher affinity for the enzyme than CTP while P-choline binding could not be detected by isothermal titration calorimetry [17]. Based on these data and in order to test *PfCCT* druggability, we first chose to select compounds mimicking CDP-choline by virtual screening. A hierarchical screening strategy was adopted to retrieve candidate inhibitors from a collection of about eight million commercial compounds (Fig. 4). The screening collection was first filtered according to the volume of the CCT active site pocket (maximum volume of 700 Å<sup>3</sup>). Then three ligand-based methods (molecular fingerprints, pharmacophore searching and 3D shape similarity) were implemented based on the similarity with the conformation of CDP-choline obtained from the rat CCT-(CDP-choline) complex structure. Retained compounds were further docked against the *PfCCT*-N-ter structural model. Ten candidates were selected from the ligand-based and the structure-based virtual screenings (Figs. 4 and S4). In addition, a substrate similarity search of each substrate selected one cytidyl- and three choline analogs (Fig. S4).

### 3.4. Inhibition of recombinant *PfCCT* activity in vitro

The 14 compounds identified above were tested experimentally for inhibition of CCT activity of both recombinant enzymes. Four compounds were eliminated because of lack of stability or low solubility in aqueous solution (Table S2). None of the substrate analogs inhibited CCT activity up to 2 mM. The most efficient hit was compound 12 (C12), a product analog obtained by 3D shape similarity searching. Its effect on *PfCCT* activity was comparable

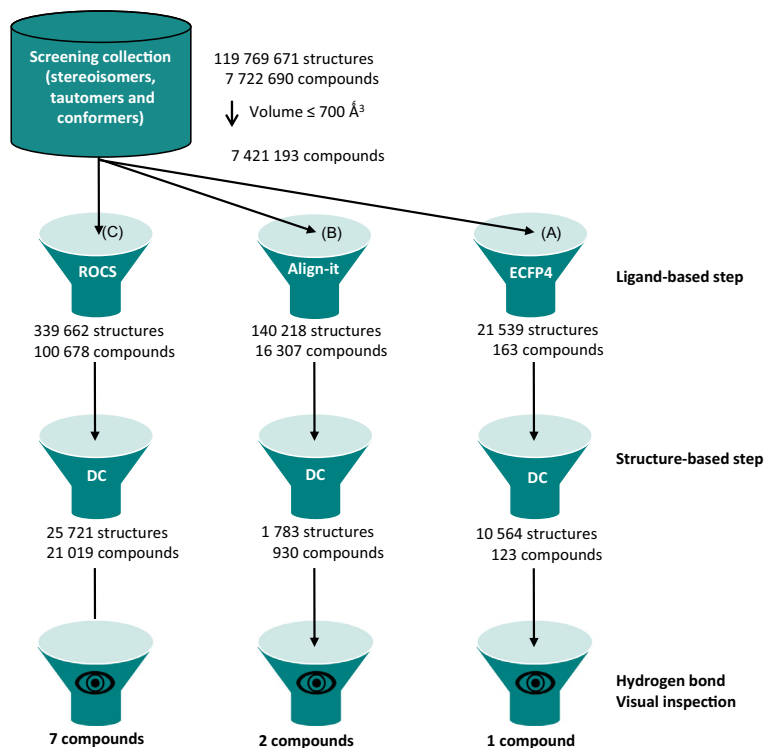
for both the N-ter and the C-ter catalytic domains with IC<sub>50</sub> of 641 μM and 820 μM, respectively (Fig. 5A). C12 was chosen for further biochemical characterization. Complete inhibition could be achieved in about one log scale concentration in a dose-dependent manner (Fig. 5A). In comparison, the IC<sub>50</sub> value of CDP-choline was found to be 1.55 mM on the N-ter *PfCCT* domain (Fig. 5A and Table S2). In order to decipher the mode of action of C12, we determined the type of inhibition. The double reciprocal representations [ $1/V = f(1/[\text{substrate}])$ ], where  $V$  is the velocity] showed that all lines intersected on the  $1/V$  axis indicating that C12 acted as a competitive inhibitor of P-choline and CTP (Fig. 5B). Inhibition constants  $K_i$ , obtained from non-linear regression of the Michaelis–Menten equation, were found to be 870 μM and 423 μM with respect to P-choline and CTP, respectively. These values are in the same range as the IC<sub>50</sub> values (determined at substrate concentrations equivalent to  $K_m$  values) and corroborated the competitive mode of inhibition.

### 3.5. Antimalarial activity

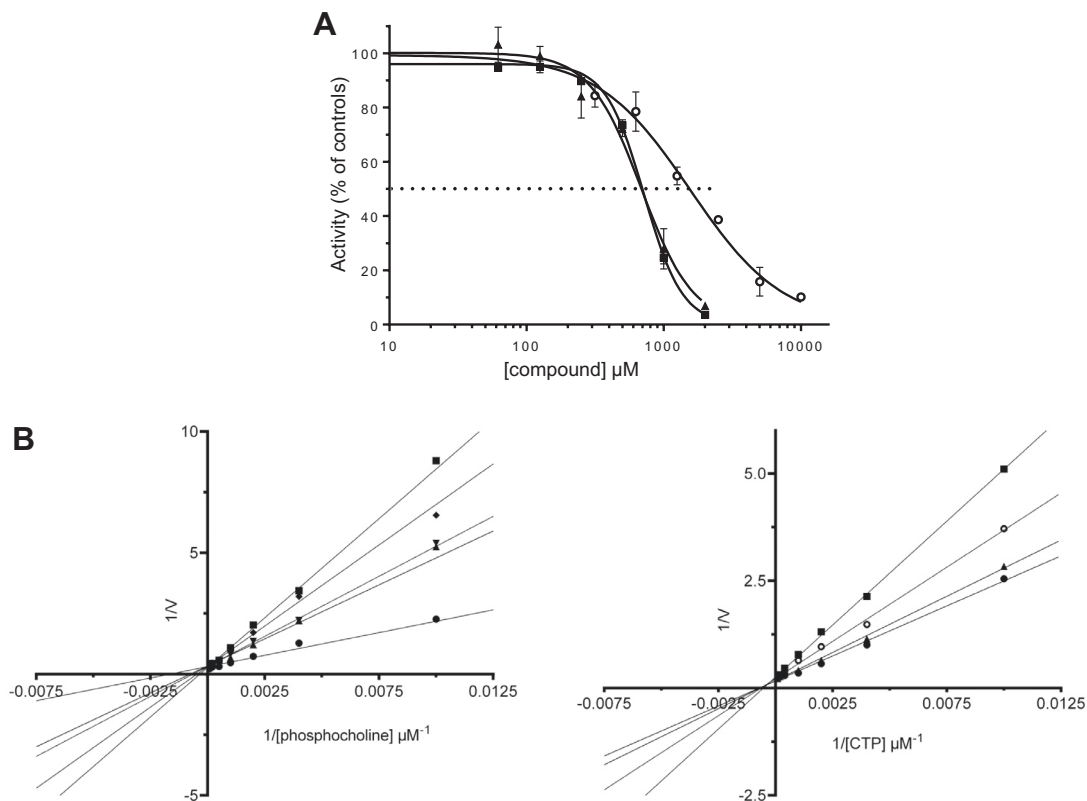
In a second time, the compounds were evaluated for their effect on parasite survival (Table S2). Again, C12 was the most efficient compound with an IC<sub>50</sub> value of 42 μM (Fig. 6A and Table S2). The inhibition of parasite growth thus occurred at substantial lower concentration than the inhibition of the recombinant enzyme activity. This discrepancy prompted us to investigate the impact and the specificity of C12 on PC biosynthesis in *P. falciparum*.

### 3.6. Effect of C12 on phosphatidylcholine biosynthesis in *P. falciparum*

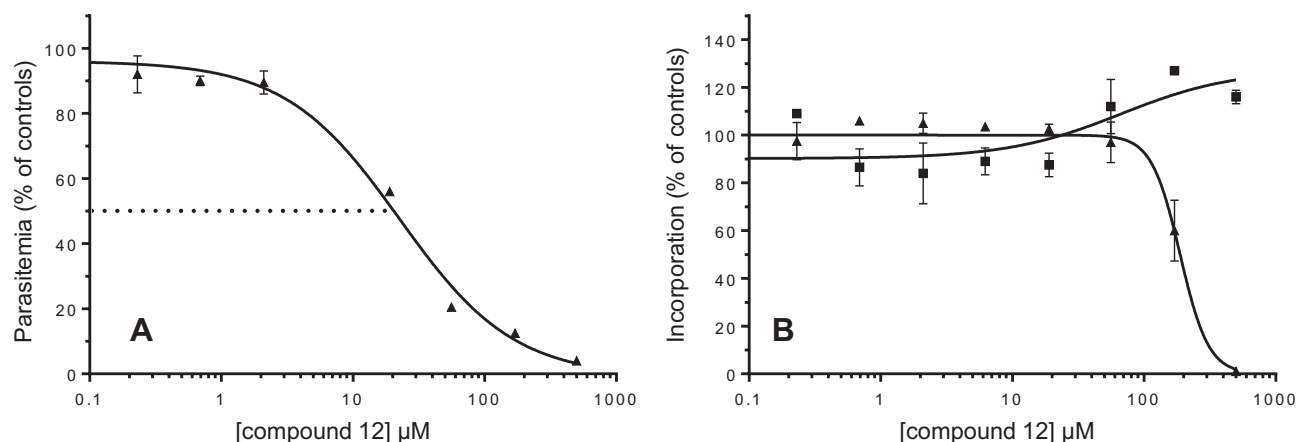
We monitored newly synthesized PC and PE of *P. falciparum*-infected erythrocytes by measuring the incorporation rate of radiolabeled precursors. C12 had a complete and dose-dependent inhibitory effect on cellular PC biosynthesis with an IC<sub>50</sub>(PC) value of 187 μM (Fig. 6B). On the other hand, incorporation of ethanolamine into PE was not significantly affected up to 500 μM of C12 (Fig. 6B). Our results clearly showed that PC biosynthesis was affected prior to PE biosynthesis.



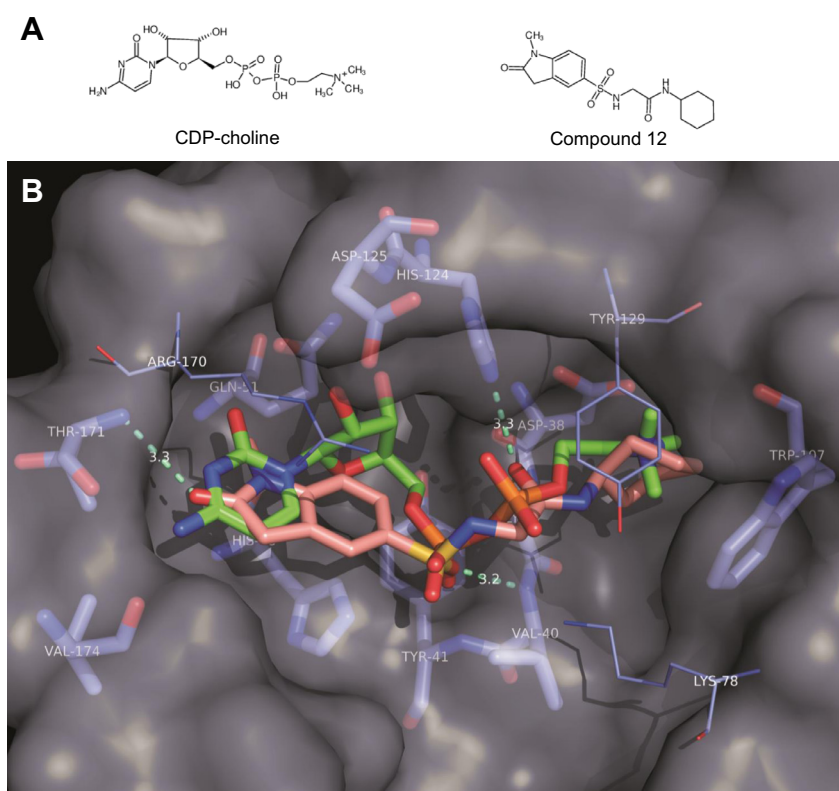
**Fig. 4.** Schematic representation of the workflow of the ligand- and structure-based virtual screening. Compounds from 8 sources were expanded through generation of representative structures (stereoisomers, tautomers and conformers) as described in [Method S1](#), leading to a final sum of over 119 million structures which have been filtered out using the workflow.



**Fig. 5.** Inhibition of *PfCCT* activity. (A) *PfCCT*<sub>(1–210)</sub> (■) and *PfCCT*<sub>(528–795)</sub> (▲) inhibition by C12 and *PfCCT*<sub>(528–795)</sub> (○) inhibition by CDP-choline. Activities are expressed as the percentage of controls without inhibitor. (B) The Lineweaver–Burk plots at increasing inhibitor concentrations determined the type of inhibition with respect to both substrates, phosphocholine (left) and CTP (right). *PfCCT*<sub>(528–795)</sub> activity was assessed in absence (●) or in presence of C12 at 0.4 mM (▲), 0.7 mM (○), 0.8 mM (▼), 0.9 mM (◆) and 1 mM (■). Data (±S.E.M.) are from one typical experiment of three, each performed in triplicates.



**Fig. 6.** Antiplasmodial activity and effect on phospholipid biosynthesis of C12. (A) Antiplasmodial activity of C12 ( $\blacktriangle$ ). (B) The effect of C12 on the incorporation of radioactive choline ( $\blacktriangle$ ) and ethanolamine ( $\blacksquare$ ) into PC and PE, respectively were measured in presence of increasing concentrations of C12. Parasitemia and incorporations are expressed as the percentage of controls without inhibitor. Results ( $\pm$ S.D.) are from one representative experiment of three performed in duplicate.



**Fig. 7.** Predicted binding pose of C12. (A) Chemical structures of CDP-choline and C12. (B) Predicted binding mode of C12 (carbon atoms in peach) in the comparative model of PfCCT-N-ter (grey surface and blue side-chains). Hydrogen bonds are shown as green dashes. The docked pose superimposes well with the binding mode of CDP-choline (green carbon atoms).

#### 4. Discussion

As the rate-limiting enzyme of the PC biosynthesis pathway, PfCCT represents an attractive antimalarial target. The present study revealed that both domains of PfCCT are catalytically active in contrast to PfCCT, the counterpart cytidyltransferase of the PE pathway that also possesses two cytidyltransferase domains but only the N-terminal one is active [29]. To our knowledge, PfCCT is the first studied enzyme of the cytidyltransferase family to bear two active domains. Other analyzed eukaryotic CCTs have a

single catalytic domain and fold as dimers. In the case of PfCCT, our comparative 3D model suggested that the enzyme folds as an intramolecular dimer. Studying the endogenous enzyme showed that PfCCT was found in both the membrane and the soluble fractions. This dual localization is consistent with the conversion that CCT enzymes operate through their membrane binding domain from an inactive soluble form and an active membrane-bound form.

Due to the limited number of compounds that could be tested in radiolabeled activity assay, a stringent computational screening of

commercial molecules mimicking CDP-choline was performed. It has already been shown that CDP-choline acts as a competitive inhibitor of the two substrates, CTP and P-choline [17]. The screening resulted in the selection of a molecule (C12) able to inhibit the enzyme. C12 also exerted competitive inhibition with respect to both substrates. This suggested that C12 occupied both substrate sub-sites. Remarkably, the concentration needed to inhibit parasite growth ( $IC_{50} = 42 \mu\text{M}$ ) was about 15 times lower than the one to inhibit *PfCCT* activity *in vitro* raising the question of a possible off-target effect of C12 *in vivo*. Therefore, we investigated the effect of C12 on *de novo* PC biosynthesis and showed that the compound was capable to reduce PC production from choline with an  $IC_{50}(\text{PC})$  of  $187 \mu\text{M}$  while not affecting the synthesis of the other major phospholipid PE. The 4-fold higher concentrations of C12 needed to selectively inhibit PC synthesis with respect to the antimalarial effect might possibly be explained by the differences in the time of contact with the compound that is far shorter in the case of PC biosynthesis (3 h) than in the case of the antimalarial assay (48 h). Hypothetically, C12 might be accumulating in *P. falciparum* like certain antimalarial drugs allowing the compound to reach an inhibitory concentration for *PfCCT* [30–32]. Nevertheless, at this point an off-target effect of C12 *in vivo* cannot be excluded. It's also conceivable that the following enzyme of the pathway, choline/ethanolamine phosphotransferase is inhibited by C12 mimicking its substrate. This hypothesis will have to be tested and if confirmed would allow a synergistic effect of C12 on two enzymes of the PC pathway. Ability to affect more than one target can be particularly important in delaying the emergence of drug resistance. C12 is chemically tractable making it a good starting hit. The binding mode of C12 in the catalytic pocket of the target has been predicted (Fig. 7) and could be used to direct a rational conception of more potent *PfCCT* inhibitors. Three hydrogen bonds that would involve Val-40, His-124 and Thr-171 were found to be analogous to the binding of CDP-choline to rat CCT [21] (Fig. 7). But in comparison to CDP-choline, C12 would lack hydrogen bonds with Val-174, Lys-78, Tyr-129, Tyr-41, Asp-125 or His-48, opening the route to improve hydrogen bond capability of future analogs. Generating specificity of the compounds to *PfCCT* versus human CCT will obviously be an important point for further development. In this respect, a specific interaction with Gln51 (which is an Ala in human CCT) in the binding site could be exploited (Fig. S1). Finally, we anticipate that more positive hits will be found once a high-resolution crystal structure of *PfCCT* will be available and a medium throughput non-radioactive enzyme assay has been developed.

## Acknowledgments

A.C is funded by a fellowship from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. S.M. was the recipient of the FP7-funded Marie Curie ITN InterMal (PITN-GA-2008-215281). This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-BLAN-0397), the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013, Grant agreement number 242095 – EVIMalaR) and the Laboratoire d'Excellence (LabEx) (ParaFrap ANR-11-LABX-0024). We thank Dr. Sharon Wein for helpful discussions on kinetic data, Marjorie Maynadier and Damien Barbier for technical support.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.03.003>.

## References

- [1] WHO, World Health Organization in World Malaria Report 2012, 2013.
- [2] Bright, A.T. and Winzeler, E.A. (2013) Epidemiology: resistance mapping in malaria. *Nature* 498, 446–447.
- [3] Dechamps, S., Shastri, S., Wengelnik, K. and Vial, H.J. (2010) Glycerophospholipid acquisition in plasmodium – a puzzling assembly of biosynthetic pathways. *Int. J. Parasitol.* 40, 1347–1365.
- [4] Vial, H.J., Wein, S., Farenc, C., Kocken, C., Nicolas, O., Ancelin, M.L., Bressolle, F., Thomas, A. and Calas, M. (2004) Prodrugs of bisthiazolium salts are orally potent antimalarials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15458–15463.
- [5] Wein, S., Maynadier, M., Bordat, Y., Perez, J., Maheshwari, S., Bette-Bobillo, P., Tran Van Ba, C., Penarete-Vargas, D., Fraisse, L., Cerdan, R. and Vial, H. (2012) Transport and pharmacodynamics of albitiazolium, an antimalarial drug candidate. *Br. J. Pharmacol.* 166, 2263–2276.
- [6] Dechamps, S., Maynadier, M., Wein, S., Gannoun-Zaki, L., Marechal, E. and Vial, H.J. (2010) Rodent and nonrodent malaria parasites differ in their phospholipid metabolic pathways. *J. Lipid Res.* 51, 81–96.
- [7] Pessi, G., Kociubinski, G. and Mamoun, C.B. (2004) A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6206–6211.
- [8] Pessi, G., Choi, J.Y., Reynolds, J.M., Voelker, D.R. and Mamoun, C.B. (2005) In vivo evidence for the specificity of *Plasmodium falciparum* phosphoethanolamine methyltransferase and its coupling to the Kennedy pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 12461–12466.
- [9] Bobenchik, A.M., Witola, W.H., Augagneur, Y., Nic Lochlainn, L., Garg, A., Pachikara, N., Choi, J.Y., Zhao, Y.O., Usmani-Brown, S., Lee, A., Adjalley, S.H., Samanta, S., Fidock, D.A., Voelker, D.R., Fikrig, E. and Ben Mamoun, C. (2013) *Plasmodium falciparum* phosphoethanolamine methyltransferase is essential for malaria transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 18262–18267.
- [10] Lee, J., Taneva, S.G., Holland, B.W., Tieleman, D.P. and Cornell, R.B. (2014) Structural basis for autoinhibition of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT), the regulatory enzyme in phosphatidylcholine synthesis, by its membrane-binding amphipathic helix. *J. Biol. Chem.* 289, 1742–1755.
- [11] Weber, C.H., Park, Y.S., Sanker, S., Kent, C. and Ludwig, M.L. (1999) A prototypical cytidyltransferase: CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase from *Bacillus subtilis*. *Structure* 7, 1113–1124.
- [12] Fong, D.H., Yim, V.C., D'Elia, M.A., Brown, E.D. and Berghuis, A.M. (2006) Crystal structure of CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase from *Staphylococcus aureus*: examination of structural basis for kinetic mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 63–69.
- [13] Davies, S.M., Epan, R.M., Kraayenhof, R. and Cornell, R.B. (2001) Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity by the physical properties of lipid membranes: an important role for stored curvature strain energy. *Biochemistry* 40, 10522–10531.
- [14] Attard, G.S., Templer, R.H., Smith, W.S., Hunt, A.N. and Jackowski, S. (2000) Modulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by membrane curvature elastic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9032–9036.
- [15] Huang, H.K., Taneva, S.G., Lee, J., Silva, L.P., Schriemer, D.C. and Cornell, R.B. (2013) The membrane-binding domain of an amphitropic enzyme suppresses catalysis by contact with an amphipathic helix flanking its active site. *J. Mol. Biol.* 425, 1546–1564.
- [16] Friesen, J.A., Campbell, H.A. and Kent, C. (1999) Enzymatic and cellular characterization of a catalytic fragment of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha. *J. Biol. Chem.* 274, 13384–13389.
- [17] Nagy, G.N., Marton, L., Kramos, B., Olah, J., Revesz, A., Vekey, K., Delsuc, F., Hunyadi-Gulyas, E., Medzihradsky, K.F., Lavigne, M., Vial, H., Cerdan, R. and Vertessy, B.G. (2013) Evolutionary and mechanistic insights into substrate and product accommodation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from *Plasmodium falciparum*. *FEBS J.* 280, 3132–3148.
- [18] Dechamps, S., Wengelnik, K., Berry-Sterkers, L., Cerdan, R., Vial, H.J. and Gannoun-Zaki, L. (2010) The Kennedy phospholipid biosynthesis pathways are refractory to genetic disruption in *Plasmodium berghei* and therefore appear essential in blood stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* 173, 69–80.
- [19] Yeo, H.J., Larvor, M.P., Ancelin, M.L. and Vial, H.J. (1997) *Plasmodium falciparum* CTP:phosphocholine cytidyltransferase expressed in *Escherichia coli*: purification, characterization and lipid regulation. *Biochem. J.* 324 (Pt 3), 903–910.
- [20] Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- [21] Lee, J., Johnson, J., Ding, Z., Paetzel, M. and Cornell, R.B. (2009) Crystal structure of a mammalian CTP:phosphocholine cytidyltransferase catalytic domain reveals novel active site residues within a highly conserved nucleotidyltransferase fold. *J. Biol. Chem.* 284, 33535–33548.
- [22] Eswar, N., Eramian, D., Webb, B., Shen, M.Y. and Sali, A. (2008) Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol. Biol.* 426, 145–159.
- [23] Rogers, D. and Hahn, M. (2010) Extended-connectivity fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* 50, 742–754.
- [24] Taminau, J., Thijs, G. and De Winter, H. (2008) Pharao: pharmacophore alignment and optimization. *J. Mol. Graph. Model.* 27, 161–169.
- [25] McGaughey, G.B., Sheridan, R.P., Bayly, C.I., Culbertson, J.C., Kretsoulas, C., Lindsley, S., Maiorov, V., Truchon, J.F. and Cornell, W.D. (2007) Comparison of topological, shape, and docking methods in virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* 47, 1504–1519.

- [26] Wallace, A.C., Laskowski, R.A. and Thornton, J.M. (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein–ligand interactions. *Protein Eng.* 8, 127–134.
- [27] Ancelin, M.L., Calas, M., Bonhoure, A., Herbute, S. and Vial, H.J. (2003) In vivo antimalarial activities of mono- and bis quaternary ammonium salts interfering with *Plasmodium* phospholipid metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2598–2605.
- [28] Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. and Chulay, J.D. (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 710–718.
- [29] Maheshwari, S., Lavigne, M., Contet, A., Alberge, B., Pihan, E., Kocken, C., Wengelink, K., Douguet, D., Vial, H. and Cerdan, R. (2013) Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase shows that only one of the two cytidyltransferase domains is active. *Biochem. J.* 450, 159–167.
- [30] Pooley, S., Fatih, F.A., Krishna, S., Gerisch, M., Haynes, R.K., Wong, H.N. and Staines, H.M. (2011) Artemisone uptake in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 550–556.
- [31] Stead, A.M., Bray, P.G., Edwards, I.G., DeKoning, H.P., Elford, B.C., Stocks, P.A. and Ward, S.A. (2001) Diamidine compounds: selective uptake and targeting in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* 59, 1298–1306.
- [32] Petersen, I., Eastman, R. and Lanzer, M. (2011) Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett.* 585, 1551–1562.

## References for the Supporting Information

- [1] G. N. Nagy, L. Marton, B. Krámos, J. Oláh, Á. Révész, K. Vékey, F. Delsuc, É. Hunyadi-Gulyás, K. F. Medzihradzsky, M. Lavigne, et al., *FEBS J.* **2013**, *280*, 3132–48.
- [2] C. Aurrecochea, J. Brestelli, B. P. Brunk, J. Dommer, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, A. Gingle, G. Grant, O. S. Harb, et al., *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D539–43.
- [3] B. Alberge, L. Gannoun-zaki, C. T. V. A. N. Ba, H. Vial, **2010**, *158*, 149–158.
- [4] M. Hendlich, A. Bergner, J. Günther, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 607–20.
- [5] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9459–64.
- [6] C. Rapp, E. Goldberger, N. Tishbi, R. Kirshenbaum, *Proteins* **2014**, DOI 10.1002/prot.24519.
- [7] S. Kumar, R. Nussinov, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 1595–612.
- [8] M. L. Ancelin, H. J. Vial, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1001*, 82–9.
- [9] M. Punta, P. C. Coggill, R. Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Bournnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, et al., *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D290–301.
- [10] D. A. Dougherty, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 885–93.



## Supplementary material

*Plasmodium falciparum* CTP:phosphocholine cytidyltransferase possesses two functional catalytic domains and is inhibited by a CDP-choline analog selected from a virtual screening.

Alicia CONTET<sup>a,1</sup>, Emilie PIHAN<sup>b,1,2</sup>, Marina LAVIGNE<sup>a</sup>, Kai Wengel<sup>a</sup>, Sweta MAHESHWARI<sup>a,3</sup>, Henri VIAL<sup>a</sup>, Dominique DOUGUET<sup>b,1,\*</sup> and Rachel CERDAN<sup>a,1,\*</sup>

<sup>a</sup>CNRS, Université Montpellier 2, Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, UMR 5235, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

<sup>b</sup>CNRS, Université Nice Sophia-Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, 660, route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France

• Corresponding authors at: [rachel.cerdan@univ-montp2.fr](mailto:rachel.cerdan@univ-montp2.fr) or [douguet@ipmc.cnrs.fr](mailto:douguet@ipmc.cnrs.fr)

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Present address: ICOA, UMR7311, Université d'Orléans, rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 2, France

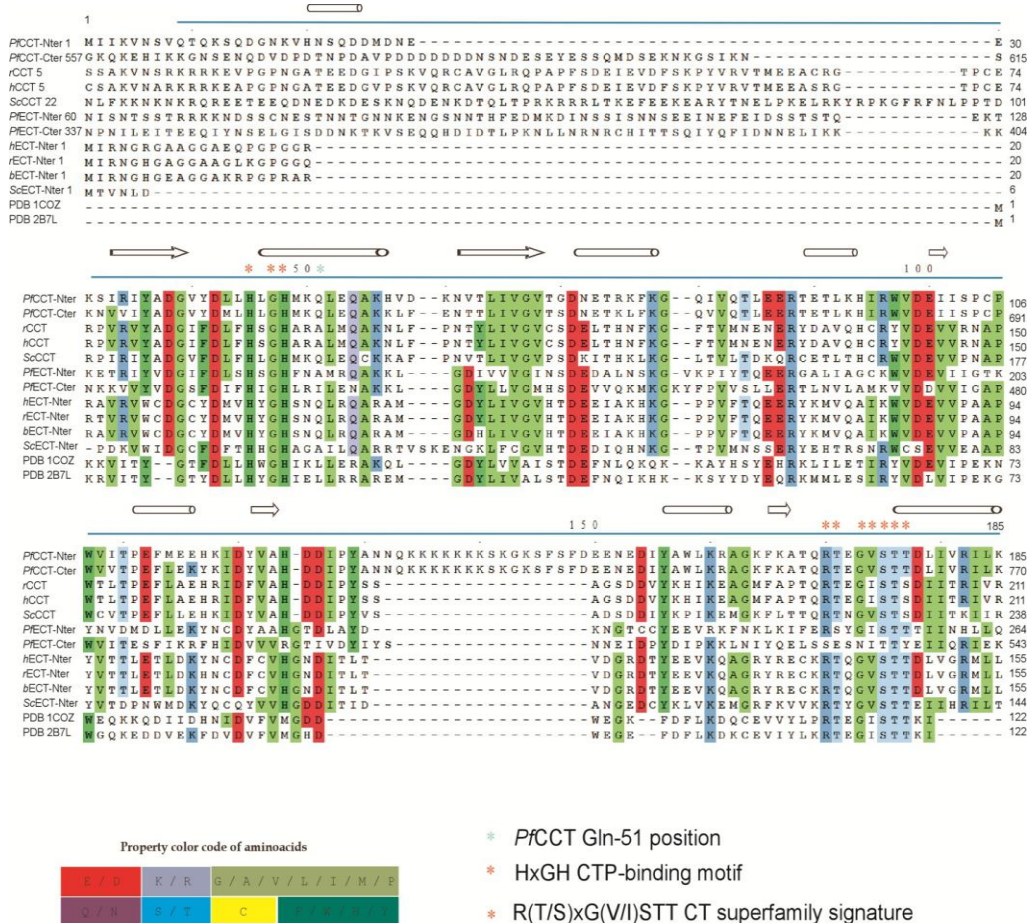
<sup>3</sup> Present address: Department of Biophysics and Biophysical Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine Baltimore, Maryland 21205 USA

### List of supplemental data:

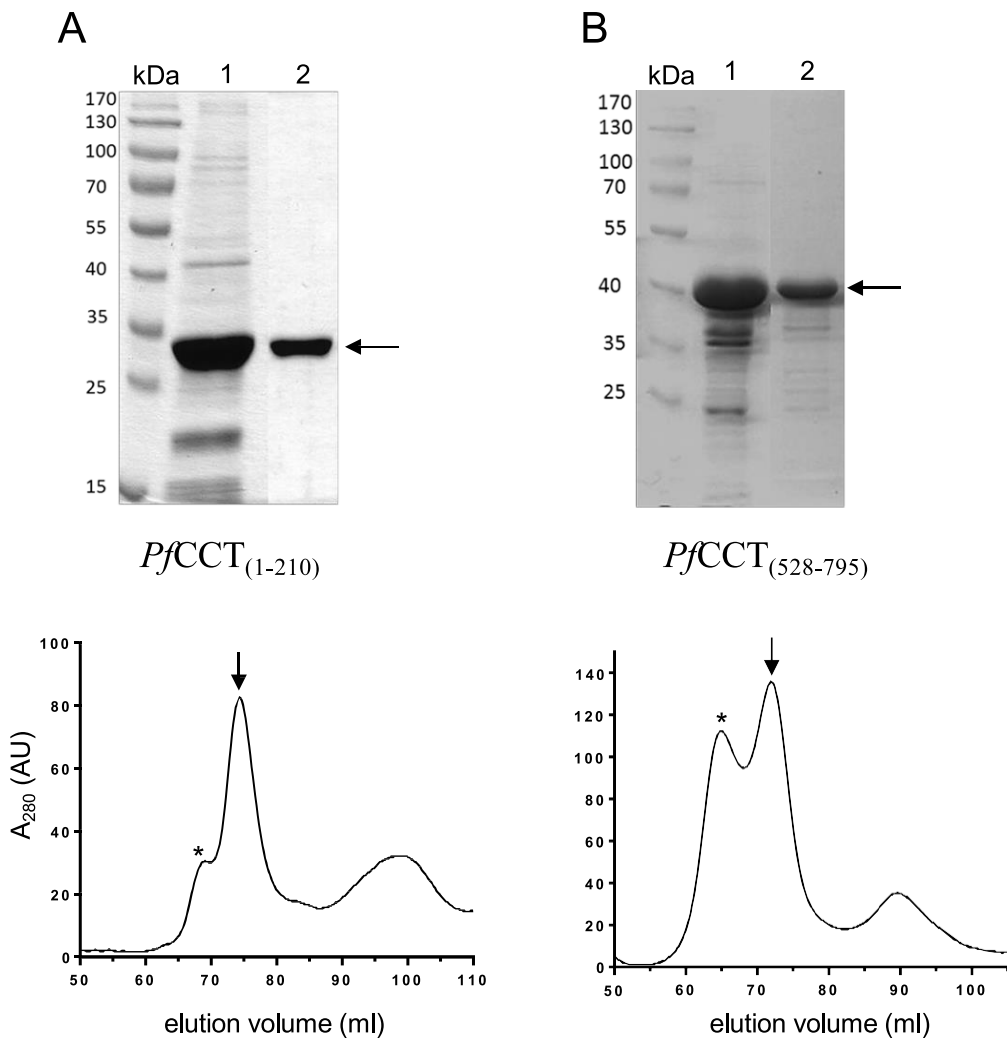
- Figure S1
- Figure S2
- Figure S3
- Figure S4
- Table S1
- Table S2
- Method S1

**Figure S1.** Primary sequences of CCT, CTP:phosphoethanolamine and CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferases, ECT and GCT, respectively, were used in the alignment [1]. The 13 aligned sequences of cytidyltransferase catalytic domains were in the following order: *Pf*CCT N-ter and C-ter (*Pf*CCT, UniProt Q8IEE9), rat CCT (rCCT, UniProt P19836; PDB code 3HL4), human CCT (hCCT, UniProt P49585), *Saccharomyces cerevisiae* CCT (*Sc*CCT, UniProt P13259), *Pf*ECT N-ter and C-ter (*Pf*ECT, UniProt Q8IDM2), human ECT N-ter (hECT, UniProt Q99447; PDB code 3ELB), rat ECT N-ter (rECT, UniProt O88637), bovine ECT N-ter (bECT, UniProt Q5EA75), *S. cerevisiae* ECT N-ter (ScECT, UniProt P33412), *Bacillus subtilis* GCT (UniProt P27623; PDB code 1COZ and 1N1D) and *Staphylococcus aureus* GCT (UniProt O05155; PDB code 2B7L). Columns are shaded by the aminoacid property color code if the sequence identity is  $\geq 70\%$  at the aligned position. The secondary structure prediction for *Pf*CCT catalytic domain is shown on the top. Helices are represented by tubes and  $\beta$ -strands are represented by arrows. HxGH CTP-binding motif and R(T/S)xG(V/I)STT cytidyltransferase superfamily signature are indicated by orange stars. Gln-51 position is indicated by a blue star \*.

1. Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-7.

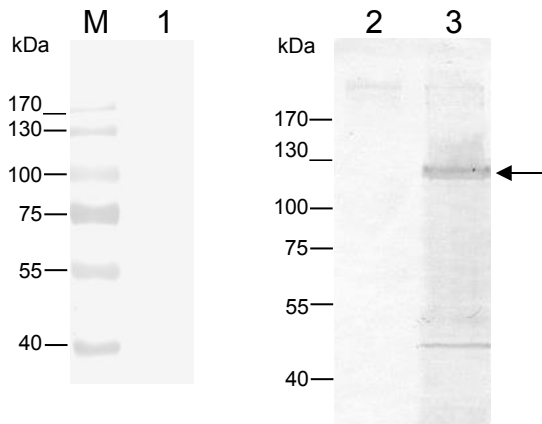


**Figure S2:** Purification of recombinant catalytic domains of *PfCCT*. Top: SDS-PAGE (12%) of the purification steps for (A) *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> and (B) *PfCCT*<sub>(528-795)</sub> after affinity column (Ni-NTA) (line 1) and after gel filtration purification (line 2). Arrows indicating the position of the purified enzymes. Bottom: Size-exclusion profiles for *PfCCT*<sub>(1-210)</sub> (A) and (B) *PfCCT*<sub>(528-795)</sub>. The arrow and the star indicate the elution of the dimer and tetramer forms of the enzyme, respectively.

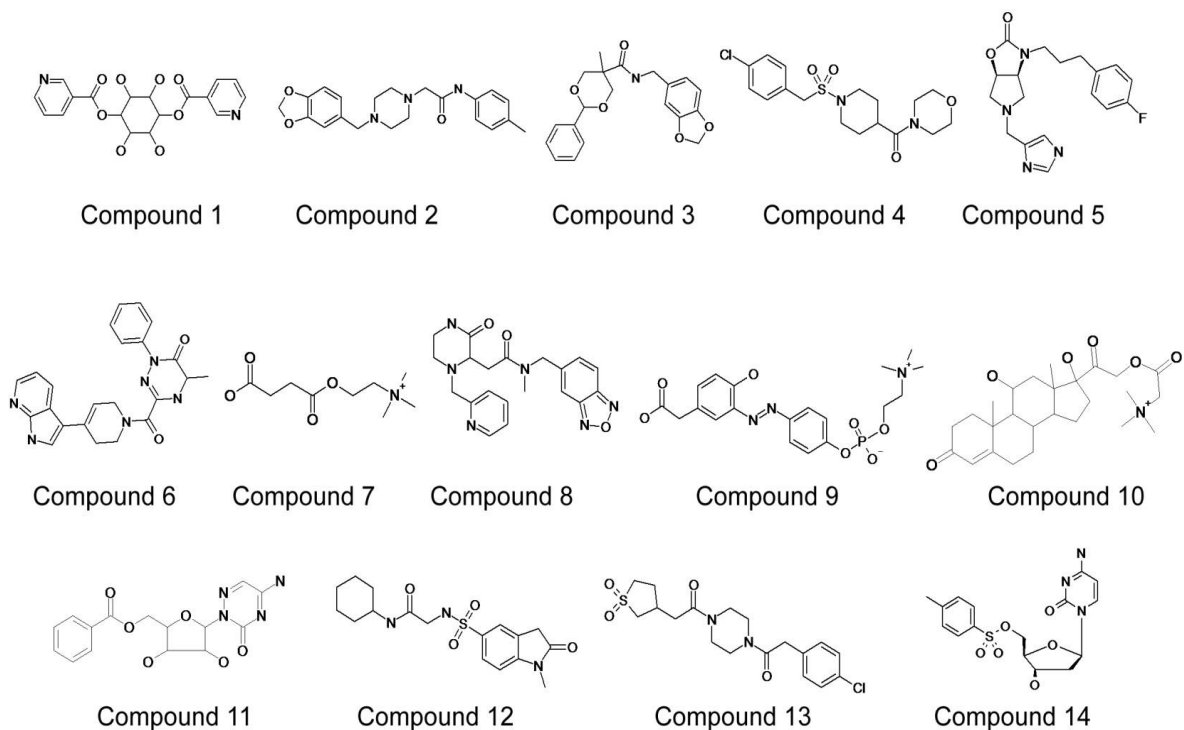


**Figure S3:** Characterization of polyclonal anti-*PfCCT*.

Antisera were collected after the third boost. Left-hand panel, infected red blood cells (1) with pre-immune serum; right-hand panel, uninfected (2) and infected (3) red blood cells with an anti-*PfCCT* antibody. *PfCCT* antisera were used at 1:400 dilution for all blots. *PfCCT* is indicated by an arrow. M, molecular mass marker (kDa)



**Figure S4:** Chemical structures of 14 compounds selected by virtual screening. Molecules 7, 9, 10 are choline analogs. Molecule 11 is a cytidyl analog.



**Table S1**

Evaluation parameters of the *Pf*CCT 3D model as compared to the crystal structure template.

<b>Structure Evaluation</b>	<b>Template</b> <b>PDB code 3HL4</b>	<b>Model <i>Pf</i>CCT</b>
Ramachandran (favored regions)	97.7 %	96.8 %
<u>ProQ</u> LGscore	5.128 (very good)	3.582 (good)
MaxSub	0.434 (correct)	0.342 (correct)
ProsaII Z-Score	Chain A -6.99	N-ter -5.71
	Chain B -7.09	C-ter -5.54

**Table S2:** *In silico* and experimental data of the 14 selected compounds. All biochemical experiments have been done at least twice. Values are the means ( $\pm$ SEM when 3 experiments were performed).

Compound	Ligand-based method	Vina score value (H bonds)	Plants score value (H bonds)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) CCT recomb.	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <i>P. falciparum</i>	Observation
CDP-choline		-9.2 (8)	-114.9 (8)	1557		Enzyme product
1	ROCS	-9.2 (6)	-97 (5)	1200		unstable
2	ROCS	-9.6 (2)	-99.1 (3)	>1000		low solubility
3	Align-it	-9.2 (2)	-90.6 (3)	>1000		
4	ROCS	-8.2 (4)	-90.3 (3)	734	48 $\pm$ 13	
5	ROCS	-8.6 (4)	-97.6 (5)	1420	64	
6	ROCS	-11 (4)	-95.8 (5)			insoluble
7	choline analog	-5.7 (2)	-73.2 (4)	>2000	>500	
8	ROCS	-9.1 (3)	-98.9 (3)	>2000	223	
9	choline analog	-8.3 (4)	-94.1 (4)	>2000	>>500	
10	choline analog	-9.1 (5)	-107.3 (5)			insoluble
11	cytidyl analog	-9.4 (7)	-91.9 (6)	>2000	263	
12	ROCS	-10.4 (6)	-99.7 (6)	641 $\pm$ 83	42 $\pm$ 10	competitive
13	Align-it	-9.8 (2)	-98.5 (2)	>2000	254	
14	ECP4	-9.9 (5)	-98.7 (5)	>2000	136	

'H bonds' is the number of hydrogen bonds mimicking the 8 observed ones between CDP-choline and *Pf*CCT of the 3D model and that are analogous to those observed in the crystal structure of the rat CCT - (CDP-choline) complex (PDB code 3HL4).

**Method S1****Screening procedure:**

The structure of available compounds from 8 sources (Ambinter (<http://www.ambinter.com/>), DrugBank (<http://www.drugbank.ca/downloads>), Chuprina's library (referred as DL for 'Drug Like') [1], ChemBridge's CombiLib and EXPRESS-Pick (<http://www.chembridge.com>), ChEMBL Malaria compounds (<https://www.ebi.ac.uk/chemblntd/download>), Chimiothèque Nationale (<http://chimiotheque-nationale.enscm.fr>) and e-Drug 3D

(<http://chemoinfo.ipmc.cnrs.fr/MOLDB/index.html>) were prepared individually.

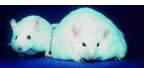
The library was converted into 3D (stereoisomers, tautomers and conformers), creating a collection of 130,000,000 three-dimensional structures in SDF format by using the following programs OMEGA version 2.4.3.: Filter, Flipper; Omega2 [2]; OpenQuacPac: tautomers (Eye Scientific Software, Santa Fe, NM., <http://www.eyesopen.com>); Corina (Molecular Networks GmbH, <http://www.molecular-networks.com/>)[3].

Ligand-based screens as initial filters. (A) *Molecular fingerprints*: extended connectivity fingerprints (ECFP) are circular fingerprints designed for molecular characterization and comparison [4]. ScreenMD (version 5.7.0, ChemAxon Ltd) was applied for the calculation of 2D Tanimoto based molecular similarity with template structure CDP-choline. 163 molecules were retrieved from the screening collection with 2D Tanimoto similarity above 0.6. (B) *Pharmacophore searching*: the conformation of CDP-choline (PDB code 3HL4) was taken to generate a ligand-based pharmacophore model by using Align-it (version 1.1.0 [5] <http://silicos-it.com/>). Candidate compounds were retrieved if they mapped at least 4 features with a Tversky score above 0.7, creating a final list of 16,307 molecules. (C) *3D shape similarity searching*: Rapid Overlay of Chemical Structures program (ROCS version 3.1.0; OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM., <http://www.eyesopen.com>) was used to calculate shape similarity scores between the conformation of CDP-choline (PDB code 3HL4) and screening collection [6]. Molecules were superposed by maximizing the volume overlap of the compared structures and the ShapeTanimoto score (> 0.6) was used to retrieve 339,662 structures (100,678 molecules). (D) *Substructure similarity searching*: Substructure searches were carried out to retrieve compounds containing choline or cytidyl fragments. Four molecules from Ambinter database were selected: three choline analogs (compounds 7, 9 and 10) and one cytidyl analog (compound 11) (Fig. S4).

Docking as secondary filter. 117,148 molecules were identified as matches in the A, B and C steps above. Secondary filters were utilized to further reduce the number of candidates. N-ter PfCCT homology model was used as the protein target structure in docking experiments. We aimed at filtering the docking poses using two programs in a consensus approach that automatically selected compounds possessing a Vina [7] score less than -8 kcal/mol and a PLANTS [8] score less than -90. Candidate compounds had at least one hydrogen bond with one amino acid from the list of those interacting with CDP-choline. These thresholds reduced the number of candidates to 22,072 molecules. Docking poses and possible interactions with the active site for all the remaining candidates were carefully inspected.

1. Chuprina, A., Lukin, O., Demoiseaux, R. Buzko, A. & Shivanyuk, A. (2010) Drug- and lead-likeness, target class, and molecular diversity analysis of 7.9 million commercially available organic compounds provided by 29 suppliers, *J Chem Inf Model*, 50, 470-7.
2. Hawkins, P.C., Skillman, A. G., Warren, G. L., Ellingson, B. A. & Stahl, M. T. (2010) Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database, *J Chem Inf Model*, 50, 572-84.
3. Gasteiger, J., Rudolph, C. & Sadowski, J. (1990) Automatic Generation of 3D-Atomic Coordinates for Organic Molecules, *Tetrahedron Comp. Method*, 3, 537-47
4. Rogers, D. & Hahn, M. (2010) Extended-connectivity fingerprints, *J Chem Inf Model*, 50, 742-54.
5. Taminau, J., Thijs, G. & De Winter, H. (2008) Pharao: pharmacophore alignment and optimization, *J Mol Graph Model*, 27, 161-9.
6. McGaughey, G. B., Sheridan, R. P., Bayly, C. I., Culberson, J. C., Kraitsoulas, C., Lindsley, S., Maiorov, V., Truchon, J. F. & Cornell, W. D. (2007) Comparison of topological, shape, and docking methods in virtual screening, *J Chem Inf Model*, 47, 1504-19.
7. Trott, O. & Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J Comput Chem*, 31, 455-61.
8. Korb, O., Stutzle, T. & Exner, T. E. (2009) Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS, *J Chem Inf Model*, 49, 84-96.





# Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase shows that only one of the two cytidyltransferase domains is active

Sweta MAHESHWARI\*, Marina LAVIGNE\*, Alicia CONTET\*, Blandine ALBERGE\*, Emilie PIHAN†, Clemens KOCKEN‡, Kai WENDELNIK\*, Dominique DOUGUET†, Henri VIAL\* and Rachel CERDAN\*<sup>1</sup>

\*Laboratoire Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques Université Montpellier 2, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5235, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France, †Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Nice Sophia-Antipolis, UMR7275, 660, Route des Lucioles 06560 Valbonne, France, and ‡Biomedical Primate Research Center, Department of Parasitology, P.O. Box 3306, Rijswijk/2280 GH, The Netherlands

The intra-erythrocytic proliferation of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* requires massive synthesis of PE (phosphatidylethanolamine) that together with phosphatidylcholine constitute the bulk of the malaria membrane lipids. PE is mainly synthesized *de novo* by the CDP:ethanolamine-dependent Kennedy pathway. We previously showed that inhibition of PE biosynthesis led to parasite death. In the present study we characterized PfECT [*P. falciparum* CTP:phosphoethanolamine CT (cytidyltransferase)], which we identified as the rate-limiting step of the PE metabolic pathway in the parasite. The cellular localization and expression of PfECT along the parasite life cycle were studied using polyclonal antibodies. Biochemical analyses showed that the enzyme activity follows Michaelis–Menten kinetics. PfECT is composed of two CT domains separated by a linker region. Activity assays on recombinant enzymes upon

site-directed mutagenesis revealed that the N-terminal CT domain was the only catalytically active domain of PfECT. Concordantly, three-dimensional homology modelling of PfECT showed critical amino acid differences between the substrate-binding sites of the two CT domains. PfECT was predicted to fold as an intramolecular dimer suggesting that the inactive C-terminal domain is important for dimer stabilization. Given the absence of PE synthesis in red blood cells, PfECT represents a potential antimalarial target opening the way for a rational conception of bioactive compounds.

Key words: CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (ECT), EC 2.7.7.14, malaria, phosphatidylethanolamine.

## INTRODUCTION

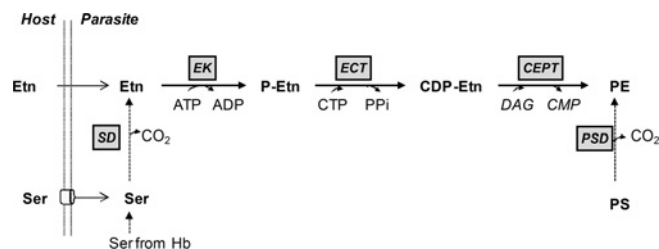
In eukaryotic cells PE (phosphatidylethanolamine) and PC (phosphatidylcholine) constitute the most abundant structural phospholipids. PE is synthesized by the *de novo* Kennedy pathway, also named CDP-ethanolamine pathway and by phosphatidylserine decarboxylase, which mediates the transformation of phosphatidylserine into PE (Figure 1). In the *de novo* Kennedy pathway, Etn (ethanolamine) is phosphorylated by an EK (Etn kinase) followed by a ECT [CTP:P-Etn (phospho-Etn CT (cytidyltransferase); EC 2.7.7.14], which transfers a cytidyl group from CTP to the newly formed P-Etn leading to CDP-Etn. The final step involves a transmembrane ethanolaminephosphotransferase, producing PE [1,2] (Figure 1). Within the Kennedy pathway, ECT is considered to be the rate-controlling step [3]. In mammalian cells, the rate of PE biosynthesis has been shown to be related to not only the supply of CDP-Etn, but also to the availability of diacylglycerol suggesting that the metabolic flux is governed by these two metabolites [4]. Genes coding for ECT have been identified in several eukaryotic organisms such as plants [5,6], yeast [7], the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* [8] and mammalian cells [9,10]. In the rat and human a single gene expresses two isoforms of ECT, Pcyt2 $\alpha$  and Pcyt2 $\beta$ , that differ significantly in their kinetic parameters

[1,11]. It has been suggested that ECT activity is regulated by the expression levels of the two distinct isoforms [12]. All known ECTs possess two CT domains of approximately 140 amino acids that probably result from an internal duplication. They are separated by a variable-sized linker region. Both CT domains of ECTs exhibit the characteristic CTP-binding motif HxGH. The second motif R(T/S)xG(V/I)STT, the signature of the CT superfamily, is less conserved in the C-terminal CT domain. Therefore the functionality of the C-terminal domain has often been questioned [1,13]. The X-ray three-dimensional structure of hECT (human ECT) has been solved by a Structural Genomics consortium and is available in the PDB (PDB code 3ELB).

In *Plasmodium falciparum*, the deadliest human malaria parasite, the synthesis of PE is of crucial importance since the parasite membranes are almost exclusively comprised of PE and PC with quasi-absence of other structural lipids such as cholesterol. PE is supplied by the parasitic machinery consisting of the *de novo* Kennedy pathway and, to a lesser extent, in phosphatidylserine decarboxylation [14], like in mammalian cells [15] (Figure 1). The production of membrane lipids is essential for the asexual intraerythrocytic proliferation of the parasite which corresponds to the symptomatic phase of the disease. Because of their critical role in *Plasmodium* development and proliferation, phospholipid biosynthetic pathways are potential

Abbreviations used: CCT, CTP:phosphocholine cytidyltransferase; CEPT, CDP-ethanolamine:1,2-diacyl-*sn*-glycerol ethanolamine-phosphotransferase; CT, cytidyltransferase; ECT, CTP:phosphoethanolamine CT; EK, ethanolamine kinase; Etn, ethanolamine; FBS, fetal bovine serum; GCT, CTP:glycerol-3-phosphate CT; hECT, human ECT; IPTG, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; P-Etn, phospho-Etn; PfAld, *P. falciparum* aldolase; PfECT, *P. falciparum* ECT; PFEK; *P. falciparum* EK; RBC, red blood cell; IRBC, infected RBC.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email rachel.cerdan@univ-montp2.fr).



**Figure 1** Phosphatidylethanolamine biosynthesis pathways in *P. falciparum*

The precursor Etn is taken up from the host or obtained from serine by serine decarboxylase (SD) [14] [EC 4.1.1] (corresponding gene has not been identified yet) and is phosphorylated by EK [EC 2.7.1.82, ATP:ethanolamine *O*-phosphotransferase]. P-Etn is transformed by ECT [EC 2.7.7.14] in presence of CTP to CDP-Etn. Finally, CEPT [EC 2.7.8.1], an enzyme shared with the counterpart Kennedy pathway synthesizing phosphatidylcholine, produces PE. In *Plasmodium*, PE is also obtained by an alternative route through phosphatidylserine (PS) decarboxylation by phosphatidylserine decarboxylase [EC 4.1.1.65, phosphatidyl-L-serine carboxy lyase]. Enzymes are boxed in grey.

pharmacological targets. An antimalarial strategy blocking the rate-limiting steps of PC biosynthesis by the CDP-choline-dependent pathway has been successfully developed through the use of choline analogues [16–18]. The choline analogue T3 (renamed Albitiazolium) [16] is currently in clinical development for the treatment of severe malaria by parenteral route. *De novo* PE synthesis also appears essential for the parasite. Etn structural analogues have a deleterious impact on *Plasmodium* growth at the blood stage [19,20]. The antimalarial activity of Etn analogues has been correlated with a specific inhibition of PE biosynthesis, whereas the synthesis of PC remained unaffected [20,21]. Genetic manipulations in the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* revealed that the *Ect* gene is necessary for parasite survival [22].

In the present study we identified and characterized the limiting enzymatic step of the CDP-Etn-dependent pathway in *P. falciparum*. Quantification of parasite metabolites and kinetic studies of enzymes involved within the pathway show that *P. falciparum* ECT plays a crucial role, as has been observed previously for its mammalian counterpart. Using polyclonal antibodies we show that *PfECT* is mostly localized within the malaria parasite cytoplasm and its expression profile along the parasite life cycle reveals an increase at the later stages. Taking advantage of various recombinant *PfECT* constructs, we demonstrate that, despite the presence of two CT domains, only the N-terminal one is catalytically active. Finally, the homology three-dimensional structural model of *PfECT* brings insight into the molecular basis of the different catalytic behaviours of CT domains.

## EXPERIMENTAL

### Parasite culture and preparation of parasite extracts

The *P. falciparum* 3D7 strain [MRA102 from MR4 (Malaria Research and Reference Reagent Resource Center)] was cultured in A<sup>+</sup> or O<sup>+</sup> human RBCs (red blood cells) obtained from the local blood bank (Etablissement Français du Sang, France) at 5% haematocrit in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 0.5% albumax I (Gibco), 10 µg/ml hypoxanthine (Sigma) and 50 µg/ml gentamycin (Gibco). Suspensions were incubated at 37°C in a culture gas chamber under a gaseous mixture of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. Parasites were synchronized with 5% sorbitol at two consecutive parasite life cycles [23]. For the enzymatic activity assays mature stage parasites were enriched from parasite cultures

by the gelatin floatation method using Plasmion® (Fresenius Kabi) [24]. The parasites were then lysed by adding an equal volume of water containing a cocktail of anti-proteases (Roche) prior to performing the activity assays.

### Analysis of PE pathway metabolites

Erythrocyte suspensions, either infected with *P. falciparum* or not, were washed twice in RPMI 1640. The erythrocytes were incubated at 20% haematocrit in 500 µl of RPMI 1640 containing 25 mM Hepes buffer (pH 7.4). Etn incorporation was measured with increasing concentrations of [<sup>14</sup>C]Etn (4.8 Ci/mol) (16–500 µM; American Radiolabeled Chemicals), either at 37°C or 4°C for 1 h. Reactions were stopped at 4°C and the cells were washed twice with ice-cold 0.9% NaCl solution. The cellular lipids were extracted according to the procedure of Folch et al. [25] modified by Rock [26]. The organic and aqueous phases of Folch extracts were evaporated and dissolved in 100 µl of chloroform/methanol [2:1 (v/v)] or ethanol/water [1:1 (v/v)] respectively. The organic phase was fractionated by silica gel TLC developed with chloroform/methanol/acetic acid/water [65:43:1:3 (v/v/v/v)] and water-soluble metabolites, from the aqueous supernatant, by TLC developed with methanol/0.5% NaCl/30% ammonia [50/50/1 (v/v/v)]. Radioactivity spots were revealed by autoradiography and identified by migration and revelation with iodine vapour and ninhydrin reagent of the appropriate standards. The radioactive spots were scraped and radioactivity was determined by scintillation counting. The amounts of [<sup>14</sup>C]Etn incorporated into water-soluble metabolites and lipids were determined on the basis of the incorporated radioactivity and specific activity of the precursor in the incubation medium and were expressed as nmol/10<sup>10</sup> IRBC (infected RBC)/h. The values for infected erythrocytes were corrected by subtraction of the activity of uninfected cells. Data were processed using a non-linear regression model as a function of increasing Etn concentrations. The relationships between the end-product PE (*x*) and the intermediate metabolites, P-Etn (*y*) and CDP-Etn (*z*), were established with linear regression models. The correlation coefficients (*r* or *r*<sup>2</sup>) and *P* values were calculated from statistical analyses. All analyses were performed with GraphPad Prism4® software. The values represent the mean of triplicates.

### Enzyme activity assays.

ECT activity from *P. falciparum* extracts or from recombinant *PfECT* was measured by following the formation of CDP-Etn from its radiolabelled substrate [<sup>14</sup>C]P-Etn (55 mCi/mmol) (American Radiolabeled Chemicals). EK activity from parasite extract was measured by following the formation of P-Etn from [<sup>14</sup>C]Etn (55 mCi/mmol) (American Radiolabeled Chemicals). The reaction mixtures contained the homogenous extract of 10<sup>7</sup> or 10<sup>8</sup> parasites for *PfEK* and *PfECT* activity assays respectively or 0.5 µg of purified recombinant *PfECT*. For ECT activity, the assays were carried out under optimal conditions in a final volume of 50 µl containing 100 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT (dithiothreitol), 2 mM P-Etn (0.1 µCi [<sup>14</sup>C]P-Etn) and 2 mM CTP. Endogenous EK activity was measured in the same final volume of 125 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 400 µM Etn (0.25 µCi [<sup>14</sup>C]Etn) and 10 mM ATP. The *K<sub>m</sub>* value for each substrate was calculated by varying the concentration of one substrate at a fixed saturating concentration of the other substrate. Reactions for the endogenous ECT, EK and for recombinant ECT activities were carried out at 37°C for 20, 35 and 10 min respectively and were stopped by heating the

mix at 100 °C for 5 min. For each assay, a sample of 20  $\mu$ l was spotted on to a TLC silica-gel plate pre-activated at 100 °C for 1 h. Radiolabelled products and substrates of *Pf*ECT and *Pf*EK were separated using as developing solvent ethanol/0.5 % NaCl/30 % ammonia [50:50:1 (v/v/v)] and ethanol/2 % ammonia [1:1 (v/v)] respectively. Radioactive spots corresponding to CDP-Etn or P-Etn were quantified as described above. All enzyme assays were conducted three times in duplicates. Kinetic data were fitted with the Michaelis–Menten equation and kinetic parameters were calculated from the obtained curves (GraphPad Prism4).

### Production of polyclonal antisera and Western blotting

Female BALB/c mice (8-week-old; Charles River Laboratories) were immunized by subcutaneous injections of 20–50  $\mu$ g of purified recombinant *Pf*ECT (residues 130–262) emulsified in Freund adjuvant. *Pf*ECT antisera were collected after the third boost, aliquoted and stored at –20 °C. Distribution of the endogenous *Pf*ECT enzyme in the soluble and insoluble fractions of parasite lysates was analysed from schizont stage parasites synchronized as mentioned above. Parasite cultures were treated with 0.01 % saponin for 4 min on ice to permeabilize RBCs and were centrifuged at 1800 *g* for 10 min. The pellet corresponding to the parasites and the IRBC membranes was washed three times with ice-cold RPMI 1640. Total parasite extracts thus correspond to parasites and the surrounding erythrocyte membranes. The insoluble (membranes) and soluble (parasite cytosol) fractions were obtained upon hypotonic lysis in water with an anti-protease cocktail (Roche) and centrifugation at 100000 *g* for 30 min at 4 °C. Uninfected RBC extracts were used as controls. For the three stages of the parasite life cycle, parasites were released from highly synchronized cultures. A total of 15  $\mu$ g of proteins were loaded per stage, separated by SDS/PAGE (12 % gel) and transferred on to nitrocellulose membrane (Protran, Whatman). *Pf*Ald (*P. falciparum* aldolase) was used as loading control. *Pf*ECT antisera were used at 1:300 dilution and anti-*Pf*Ald monoclonal IgG were used at a final concentration of 1  $\mu$ g/ml (Santa Cruz, Biotechnology). Secondary antibody was alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (1:6000 dilution; Promega). *Pf*ECT and *Pf*Ald bands were revealed by using a BCIP (5-bromo-4-chloroindol-3-yl phosphate)/NBT (Nitro Blue Tetrazolium) colour development substrate (Promega).

### Immunofluorescence assays for subcellular localization

To immunolocalize *Pf*ECT in IRBCs, non-synchronized cultures were fixed for 4 h at room temperature (20 °C) in 4 % paraformaldehyde in PBS followed by two washes with PBS. The cells were permeabilized in 0.1 % Triton X-100 in PBS for 10 min, blocked in 2 % FBS (fetal bovine serum) and incubated with *Pf*ECT antisera (1:400 dilution) in 2 % FBS for 1 h. After three washes, cells were then incubated with the secondary antibody anti-(mouse IgG) Alexa Fluor Red 594 (Invitrogen) (dilution 1:1000) in 2 % FBS for 1 h. Cells were again washed three times and then mounted on to slides using a Vectashield mounting medium containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Vector Laboratories). Parasites were observed with a Zeiss Axioimager epifluorescence microscope equipped with ApoTome (Carl Zeiss). Images were acquired using a 63 $\times$  oil-immersion objective lens and DIC (differential interference contrast) for transmitted light. Images were processed with Axiovision software (Carl Zeiss) and ImageJ (MacBiophotonics).

### Cloning, expression and purification of recombinant *Pf*ECTs

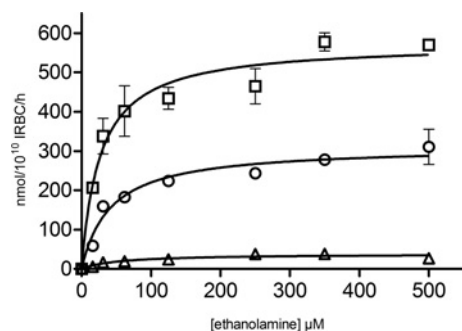
The *Pf*ECT cDNA sequence (PF3D7\_1347700) was codon-optimized for expression in *Escherichia coli* (GenScript) and cloned as a NdeI/BamHI fragment in pET-15b expression vector (Novagen) for production of the N-terminal His<sub>6</sub>-tagged protein. Site-directed mutagenesis (QuikChange, Stratagene) was performed to introduce mutations of histidine residues His<sup>146</sup> and His<sup>422</sup> replaced with alanine. *E. coli* strain BL21(DE3) cells carrying the plasmids with the *Pf*ECT constructs were grown at 37 °C to mid-log phase in LB (Luria–Bertani) medium and protein expression was induced with 0.5 mM IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; Invitrogen) for ~24 h at 16 °C. Bacteria were harvested by centrifugation at 6000 *g* for 15 min at 4 °C and resuspended in a buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 8), 400 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 % Triton X-100, 1 mg/ml lysozyme and a protease inhibitor cocktail (Roche). The cells were lysed by sonication at 50 % power for 5 min on ice (Digital Sonifier, Branson Ultrasonics). After centrifugation, the supernatant containing *Pf*ECTs was applied on to a HisTrap HP 5-ml column (GE Healthcare). *Pf*ECTs were eluted with 250 mM imidazole, 20 mM Tris/HCl (pH 8), 400 mM NaCl and 2 mM 2-mercaptoethanol. The protein fractions were concentrated to a minimum of 1 mg/ml with Amicon centrifugal filter and further purified by gel-filtration chromatography using HiLoad Superdex 200-pg column (GE Healthcare). Protein samples were eluted in 20 mM Tris/HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl and 2 mM 2-mercaptoethanol and were analysed by SDS/PAGE (12 % gel). The concentration of purified protein samples were determined by the Bradford method using BSA (Pierce) as a standard.

### CD analysis

Purified recombinant proteins (wild-type and mutated *Pf*ECTs) concentrated to 0.3 mg/ml were used for UV-CD analysis in a buffer containing 20 mM sodium phosphate (pH 7.4) and 2 mM 2-mercaptoethanol. CD spectra were recorded from 195 to 260 nm at 20 °C on a Chirascan CD Spectrophotometer (Applied Photophysics) with a 0.5 cm path-length quartz cell. Data were collected at 0.5-nm intervals and an accumulation time of 1 s. All protein spectra were measured three times and corrected by subtraction of respective buffer spectra. The *Pf*ECT spectra were analysed with CDNN CD Spectra Deconvolution Software (Applied Photophysics).

### Homology modelling

ECT sequences of *P. falciparum* (UniProtKB/Swiss-Prot accession number Q8IDM2), *Saccharomyces cerevisiae* (UniProtKB/Swiss-Prot accession number P33412), rat (UniProtKB/Swiss-Prot accession number O88637), bovine (UniProtKB/Swiss-Prot accession number Q5EA75) and human (UniProtKB/Swiss-Prot accession number Q99447) were aligned using MUSCLE [27]. The structural model for *Pf*ECT N- and C-terminal CT domains was generated on the basis of the structure of the hECT N-terminal and C-terminal CT domains sharing 38 % and 40 % sequence identity respectively. MODELLER 9v8 [28] was used to perform the homology modelling of the *Pf*ECT intramolecular dimeric complex using the hECT structure (PDB code 3ELB) as template. The linker region (amino acids 152–186) was removed to reflect the structurally characterized hECT intramolecular dimer. The hECT co-crystallized ligand CMP was used as a constraint in MODELLER to keep the binding site in an appropriate conformation. The final model was chosen based on its low



**Figure 2** Ethanolamine metabolism in *P. falciparum*-infected erythrocytes

Increasing concentrations of [ $^{14}$ C]Etn were added to parasite culture and the levels of radio-labelled P-Etn (○), CDP-Etn (△) and PE (□) were quantified after a 1 h incubation. Results are from one typical experiment of three performed in triplicate and are expressed as nmol/ $10^{10}$  IRBC/h  $\pm$  S.E.M.

value of the MODELLER objective function, Ramachandran plot (MolProbity) [29], ProQ [30] scores and visual inspection.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Dynamics of the *de novo* PE biosynthesis pathway in *P. falciparum*-infected erythrocytes

The disruption of the essential PE pathway through the use of a pharmacological agent produces an antimalarial effect [20,21]. In order to determine the most critical step of the pathway, we characterized its three enzymatic steps. The parasite obtains Etn from the plasma or from serine through decarboxylation [14] (Figure 1). To characterize the dynamics of the pathway, we quantified the incorporation of radiolabelled Etn in the intermediate metabolites P-Etn, CDP-Etn and the end-product PE at the initial linear phase. We incubated IRBCs with increasing Etn concentrations and subsequently measured the metabolite levels. The amounts of P-Etn, CDP-Etn and PE in the IRBCs increased before reaching a plateau at Etn concentrations above 200  $\mu$ M (Figure 2). The labelling of CDP-Etn was much lower than that of P-Etn and PE (Figure 2) and the maximal Etn incorporation in CDP-Etn was 8–15-fold lower as compared with P-Etn and PE. The statistical analysis of the correlation between P-Etn and the end-product PE revealed a strong positive relationship ( $r^2 = 0.96$ ,  $P < 0.0001$ ) indicating that the labelling of PE was related to the labelling of P-Etn. The levels of PE correlated to a lesser extent with CDP-Etn levels ( $r^2 = 0.82$ ,  $P = 0.0017$ ). The results suggested that P-Etn, the substrate of *Pf*EECT, accumulated and CDP-Etn, the product of *Pf*EECT, was rapidly transformed in the parasite. In other words, *Pf*EECT was not using the available substrate as quickly as *Pf*EK was producing it. This indicated that the enzymatic step catalysed by ECT in *Plasmodium*-infected erythrocytes was the rate-limiting one of the PE biosynthetic pathway.

### Characterization of parasite *Pf*EECT activity and comparison with *Pf*EK activity

The parasitic ECT enzymatic activity in *P. falciparum* extracts was measured by following the formation of CDP-Etn from radio-labelled P-Etn. The substrates and the product were separated by TLC. The rate of catalysis showed a characteristic Michaelis–Menten saturation curve with a  $K_m$  value of  $373 \pm 123 \mu$ M for P-Etn and a  $V_{max}$  value of  $4.3 \pm 0.3$  pmol/min/ $10^7$  parasites

**Table 1** Kinetic parameters for endogenous *Pf*EECT, *Pf*EK, *P. knowlesi* CEPT and recombinant *Pf*EECT

All experiments were performed three times in duplicate. Values are means  $\pm$  S.E.M. for at least three independent experiments. *Pk*CEPT, *P. knowlesi* CEPT; NA, not applicable; wt, wild-type.

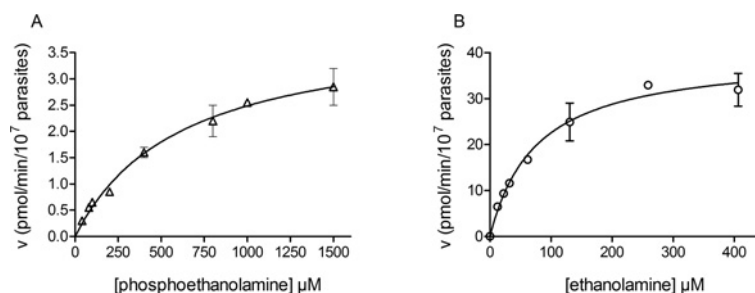
Enzyme	Substrate	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )
Endogenous enzyme				
<i>Pf</i> EECT	P-Etn	$373 \pm 123$	$4.0 \pm 0.3$ (pmol/min/ $10^7$ parasites)	
<i>Pf</i> EK*	Etn	$71 \pm 4$	$39.6 \pm 0.1$ (pmol/min/ $10^7$ parasites)	
<i>Pk</i> CEPT†	CDP-Etn	$18 \pm 3$	$12.6 \pm 5$ (pmol/min/ $10^7$ parasites)	
Recombinant enzyme				
wt- <i>Pf</i> EECT	P-Etn	$452 \pm 86$	$3.0 \pm 0.3$ ( $\mu$ mol/min/mg)	$3.4 \pm 0.3$
	CTP	$465 \pm 70$		
H422A- <i>Pf</i> EECT	P-Etn	$565 \pm 66$	$3.7 \pm 0.6$ ( $\mu$ mol/min/mg)	$4.1 \pm 0.6$
	CTP	$374 \pm 72$		
H146A- <i>Pf</i> EECT	P-Etn	NA	$<0.04$ ( $\mu$ mol/min/mg)	

\*[21].

†[32].

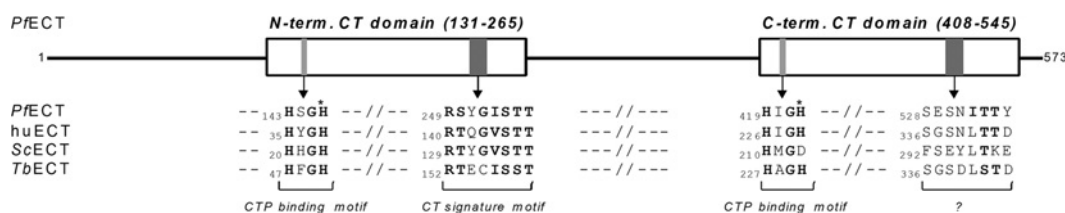
(Figure 3A). For comparative purpose, we characterized the endogenous phosphorylation of Etn into P-Etn performed by *Pf*EK which is the first step of the CDP-Etn-dependent pathway [21,31]. The affinity of *Pf*EK for its substrate Etn was  $71 \pm 4 \mu$ M and the specific activity ( $V_{max}$ ) was  $39.6 \pm 0.1$  pmol/min/ $10^7$  parasites (Figure 3B). The affinity of *Pf*EECT for P-Etn was thus approximately 5-fold lower than the affinity of *Pf*EK for Etn and under optimal conditions *Pf*EECT was  $\sim$ 4-fold less active than *Pf*EK (Table 1). The comparison of cellular catalytic activities of *Pf*EK, *Pf*EECT and *P. knowlesi* CEPT (choline/ethanolaminephosphotransferase 1) [32] revealed that *Pf*EECT exhibited the lowest affinity for its substrate and the lowest specific activity of the enzymes of *de novo* PE pathway under optimal conditions (Table 1). In other terms, the first and the last enzymatic reactions of the Kennedy pathway were more efficient than the cytidylation of P-Etn catalysed by *Pf*EECT. This finding is in agreement with a regulatory role of this enzyme within the pathway.

However, the availabilities within the parasite of the metabolites involved in the pathway have to be taken into consideration. The concentration of Etn in adult plasma has been described to be from 5 to 20  $\mu$ M [33,34]. In addition, in *Plasmodium* Etn can also be provided through decarboxylation of serine [14,35]. This latter pathway supplies less than 5% of the total pool of P-Etn in the parasite [35] and has therefore not been considered for the following calculation. We quantified the Etn metabolites in the same way as described for Figure 2, though this time using Etn at physiological concentrations (Supplementary Figure S1 at <http://www.biochemj.org/bj/450/bj4500159add.htm>). For an Etn concentration of 10  $\mu$ M, the observed P-Etn and CDP-Etn levels incorporated from Etn in the parasite were found to be  $\sim$ 55 nmol/ $10^{10}$  IRBCs and  $\sim$ 5 nmol/ $10^{10}$  IRBCs respectively (Supplementary Figure S1). Under these conditions and based on the volume of 50 fl for a mature parasite [36], the concentrations of P-Etn and CDP-Etn within the parasite were calculated to be  $\sim$ 100  $\mu$ M and  $\sim$ 10  $\mu$ M respectively. The P-Etn concentration was thus in the range of the  $K_m$  value of *Pf*EECT (373  $\mu$ M). For CTP, the second substrate of the



**Figure 3** Parasite *PfECT* and *PfEK* activities

Michaelis–Menten plots are shown for *PfECT* (A) and *PfEK* (B) enzymes. Activities were measured by the formation of CDP-ethanolamine (A) or P-Etn (B) with increasing substrate concentrations in extracts of  $10^8$  and  $10^7$  parasites respectively. Specific activities are expressed as nmol of product/ $10^7$  cells/min and are means  $\pm$  S.E.M. from three independent experiments each performed in duplicate.



**Figure 4** Schematic organization of *PfECT* and conserved motifs

The *PfECT* sequence is comprised of two CT domains of approximately 135 amino acids represented by the boxes in the schematic representation of *PfECT*. Below, the alignment of the conserved motifs of *PfECT* (NCBI Reference Sequence XP\_001350190.1), hECT (NCBI Reference Sequence NP\_002852.1; huECT), *S. cerevisiae* ECT (GenBank® accession number BAA09310.1; ScECT) and *T. brucei* ECT (GenBank® accession number EAN80358.1; TbECT) is displayed. Conserved amino acids of the consensus motifs are in bold. Both domains contain the CTP-binding motif HxGH. The signature motif R(S/T)xG(V/I)STT of the CT superfamily is less conserved in the C-terminal CT domain of *PfECT* and of other species. The mutated histidine amino acids are labelled with an asterisk.

enzyme, the parasite concentration is likely to be lower than the  $K_m$  value ( $465 \pm 70 \mu\text{M}$ ) of *PfECT* (see below). This suggests that the rate of *PfECT* activity in the parasite grown under standard conditions (without excess of Etn) is mainly limited by the availability of CTP, in addition to the intrinsic kinetic parameters of the enzyme. In mammalian cells, the amount of DAG (diacylglycerol) has also been found to be a limiting factor for PE biosynthesis suggesting that the regulation of the metabolic flux is a multi-factor-dependent process [4]. However, amongst the three enzymatic steps of the PE pathway, the preponderant role of *PfECT* in the metabolic flux as evidenced by the Etn incorporation data and kinetic parameters drove us to thoroughly characterize this enzyme.

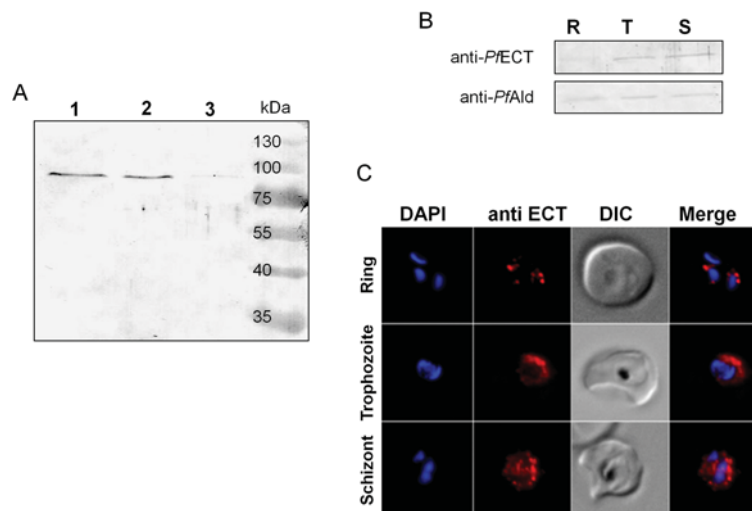
### Sequence analysis of *PfECT*

The *P. falciparum* genome database PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) [37] predicts the presence of one gene (PF3D7\_1347700) encoding a putative *PfECT*. Amino acid sequence alignment with human, *S. cerevisiae* and *Trypanosoma brucei* ECT sequences confirmed the presence of two CT domains in *PfECT* separated by a linker region (Figure 4 and Supplementary Figure S2 at <http://www.biochemj.org/bj/450/bj4500159add.htm>). The *PfECT* N-terminal and C-terminal CT domains (approximately 135 amino acids) share 34% sequence identity, whereas the sequences of the N-terminal CT domain of *PfECT* and of human ECT were found to be 38% identical. Two conserved motifs, the CTP-binding motif HxGH and the cytidylyltransferase signature motif R(S/T)xG(V/I)STT form the active site of the cytidylyltransferase superfamily. In *PfECT* and other aligned sequences, the CTP-binding motif is present in both CT domains whereas the C-terminal CT signature motif lacks some conserved residues of the R(S/T)xG(V/I)STT

consensus motif (Figure 4). The X-ray three-dimensional structure of hECT (PDB code 3ELB) shows that the protein contains one polypeptide chain, but folds as an intramolecular dimer. The N-terminal CT domain of human ECT interacts with the C-terminal one through the conserved dimerization motifs  $K^{84}WVDEVV^{90}$  and  $R^{279}YVSEVV^{285}$ . In *PfECT*, both sequences are present ( $K^{193}WVDEVI^{199}$  and  $K^{470}VVDVV^{476}$ ) (Supplementary Figure S2). The *PfECT* sequence exhibits two peculiarities: (i) a 130-amino acid N-terminal sequence and (ii) a non-conserved extended region of  $\sim 140$  amino acids linking the two CT cores (Supplementary Figure S2).

### Expression and purification of recombinant *PfECT*

The coding sequence of *PfECT* as annotated in PlasmoDB was confirmed by cDNA sequencing. A codon-optimized sequence was cloned into pET15b for expression as a N-terminal His<sub>6</sub>-tagged recombinant protein. The soluble protein fraction of the IPTG-induced bacterial culture showed a prominent band on the SDS/PAGE at  $\sim 90$  kDa. This molecular mass was higher than the expected one at 68 kDa (Supplementary Figure S2). The peculiar mobility of *PfECT* could result from a very high content of polar residues and/or the presence of a flexible linker containing atypical amino-acid compositions (stretches of aspartic acid and asparagine residues) [38,39] (Supplementary Figure S2). A two-step protocol consisting of Ni<sup>2+</sup>-affinity chromatography followed by gel-filtration chromatography was performed to obtain pure protein at a final concentration of 0.3 mg/ml (Supplementary Figure S3 at <http://www.biochemj.org/bj/450/bj4500159add.htm>). Recombinant purified *PfECT* was used for cellular and further kinetic characterizations.



**Figure 5** Cellular localization of ECT in *P. falciparum*

(A) Western blot analysis of subcellular fractions of *P. falciparum*. Distribution of the endogenous *PfECT* enzyme in the soluble and insoluble fractions of parasite lysates was analysed from synchronized parasites at the schizont stage. Lane 1, total parasite extract ( $5 \times 10^6$  cells) corresponds to parasites and IRBC membranes; lane 2, soluble fraction (parasite cytosol); and lane 3, insoluble fraction (membranes). Molecular mass is given on the right-hand side in kDa. (B) Western blots at the three parasite stages. Equal amounts ( $15 \mu\text{g}$  of proteins) were loaded. *PfAld* was used as a loading control. R, ring; S, schizont; T, trophozoite. (C) Immunofluorescence assays were done on human blood cells infected by *P. falciparum* 3D7 strain and revealed by an anti-*PfECT* antibody (red). Nuclei were stained in blue with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). DIC (differential interference contrast) images and merges are presented. Representative images of the different parasite stages are shown.

### Cellular localization and expression of *PfECT* along the *P. falciparum* blood stages

We raised antibodies against the recombinant *PfECT* protein by immunization of mice. Pre-immune serum did not show any detectable signal with infected erythrocytes by Western blot analysis (Supplementary Figure S4 at <http://www.biochemj.org/bj/450/bj4500159add.htm>). Immune sera revealed a band at an apparent molecular mass of approximately 90 kDa while this band was not visible with uninfected erythrocytes (Supplementary Figure S4). We thus observed the same aberrant migration of *PfECT* from parasite extract and from recombinant protein (see above). When infected erythrocytes were sub-fractionated using saponin treatment followed by differential centrifugation, the bulk of *PfECT* was recovered in the soluble cytosolic fraction of parasite extracts (Figure 5A). To analyse the expression of *PfECT* along the parasite life cycle immunodetections were performed on highly synchronized cultures. The enzyme appeared to be mainly expressed at the late stages (trophozoite and schizont) (Figure 5B). Similar expression profiles were found for *PfEK*, *PfCK* (*P. falciparum* choline kinase) [21] and *PfCCT* [*P. falciparum* CCT (CTP:phosphocholine CT); R. Cerdan, A. Contet and H. Vial, unpublished work] involved in the CDP-Etn and in its counterpart CDP-choline pathways. The increase of several enzymes of these biosynthetic pathways is probably connected to the need of phospholipids for membrane formation at the late stages of the parasite life cycle in order to produce up to 32 daughter cells which will subsequently invade new erythrocytes. Apart from its essential role in membrane formation, PE is also involved in other biological processes in eukaryotic cells. For example, PE is the donor of the P-Etn group in glycosyl-phosphatidylinositol anchors [8,40,41]. During autophagy, PE is conjugated to the ATG8 protein on autophagosomal membranes [42]. Although no direct evidence of such roles for PE in *Plasmodium* has been found so far, it cannot be excluded that a part of the synthesized PE could have other functions than the formation of membranes.

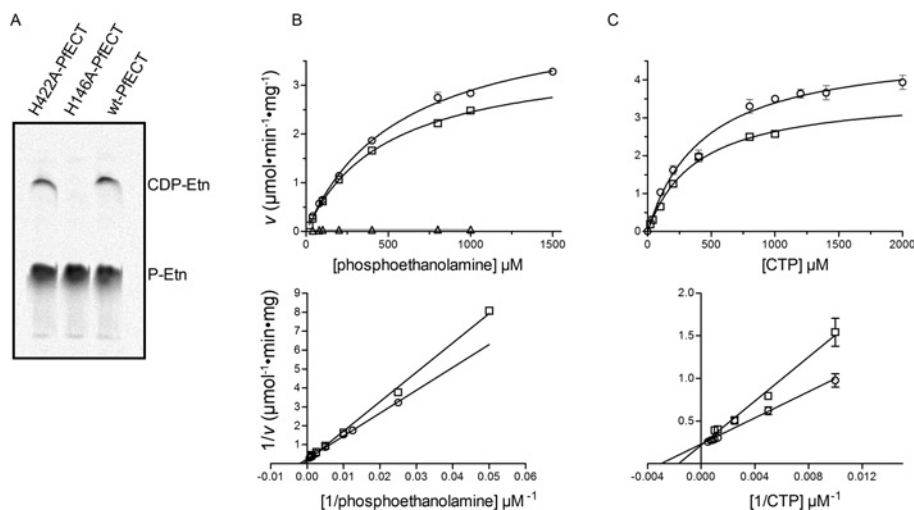
The subcellular localization of *PfECT* was also determined by immunofluorescence assays. The signal of the *PfECT* antisera was detected at all parasite stages showing a diffuse and dotted pattern (Figure 5C). These data suggested that *PfECT* is present in the cytoplasm. *PfECT* localization was in agreement with the localizations of rat [43] and *T. brucei* ECT [8]. The immunofluorescence analyses also revealed some regions of higher concentration for *PfECT*. We hypothesize that *PfECT* could be localized near the endoplasmic reticulum membrane in close proximity to the following enzyme within the Kennedy pathway, the transmembrane protein CEPT.

### Kinetic characterization of recombinant *PfECT*

Purified recombinant *PfECT* protein incubated with radio-labelled P-Etn and CTP showed a high CT activity which increased linearly with time for at least 20 min. *PfECT* was active over a broad pH range from 6 to 9 and the activity was optimal at pH 8 (Supplementary Figure S5 at <http://www.biochemj.org/bj/450/bj4500159add.htm>). The enzymatic activity followed Michaelis–Menten kinetics with respect to both substrates with an apparent  $K_m$  of  $452 \pm 86 \mu\text{M}$  for P-Etn and of  $465 \pm 70 \mu\text{M}$  for CTP. The maximal velocity of the enzyme reaction was found to be  $3.0 \pm 0.3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  of *PfECT* corresponding to a turnover rate ( $k_{\text{cat}}$ ) of  $3.4 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$  (Figure 6 and Table 1). When 2 mM of radioactive phosphocholine was added as a substrate instead of 2 mM P-Etn, CDP-choline could not be detected ( $<0.04 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) attesting that *PfECT* was specific for P-Etn.

### Only one CT domain of *PfECT* is catalytically active

All currently known ECT sequences possess two CT domains, but the R(S/T)xG(V/I)STT signature motif of their N- and C-terminal CT domain differ substantially (Figure 4). To our knowledge, although the lack of key residues in the C-terminal signature motif sequence has already been mentioned for hECT [13], no experimental data related to the enzymatic activity of the



**Figure 6** Activity of recombinant wild-type and mutated *PfECT*

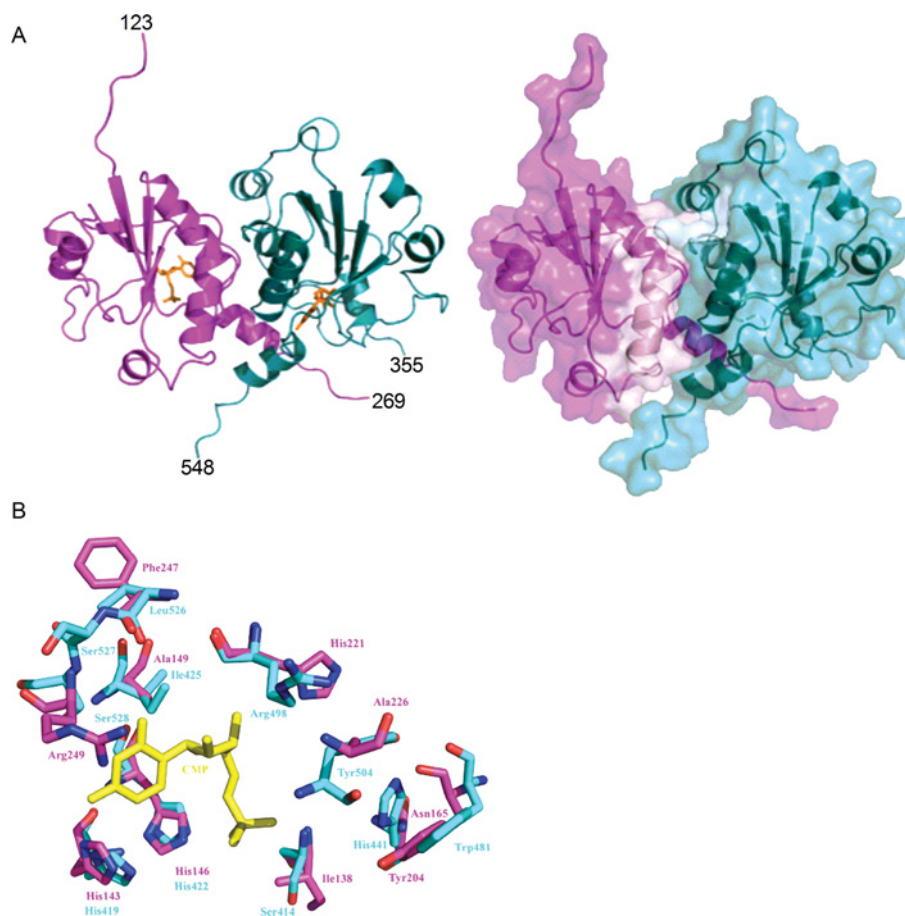
(A) The activity of purified recombinant wild-type and both H422A and H146A *PfECT*. Radiolabelled substrate (P-Etn) and product (CDP-Etn) were separated on TLC with 98% ethanol/0.5% NaCl/25% ammonia [50:50:1 (v/v/v)]. (B and C) Representative Michaelis–Menten plots of wild-type (□), H422A (○) and H146A (△) *PfECT* activities are shown with increasing concentration of P-Etn (B) or CTP (C). Lineweaver–Burk representations are displayed below to show the linearity of the data. Values are the means ± S.E.M. from three measurements. Activities of the purified recombinant *PfECT*s were measured by following the formation of CDP-Etn with varying concentration of one substrate, whereas the second substrate was fixed at 2 mM.

individual domains is available. To clarify the contribution of each CT domain to the enzymatic activity, various constructs encompassing either the N-terminal (residues 1–276 or 100–276) or the C-terminal (residues 385–573) domain were cloned in pET vector and expressed in *E. coli*. All attempts resulted in the production of insoluble protein fragments. We then opted for an alternative approach aiming at mutating the individual CT domains of the full-length recombinant *PfECT* enzyme. Several previous biochemical and structural studies indicated the crucial role of the histidine residues of the CTP-binding motif HxGH for the CT activity [13,44,45]. For example, for the *Bacillus subtilis* GCT (CTP:glycerol-3-phosphate CT), mutations of these histidine residues led to a dramatic loss in activity [46]. Therefore we mutated individually the second histidine residue of each *PfECT* CTP-binding motif HxGH to alanine, generating the mutated proteins H146A-*PfECT* and H422A-*PfECT*. CD analysis of both mutated and wild-type enzymes showed that the spectra were overlapping, reflecting the same composition in secondary structures and indicating that the overall folding of *PfECT* was likely to be maintained after the mutation of the histidine residues (Supplementary Figure S6 at <http://www.biochemj.org/bj/450/bj4500159add.htm>). ECT enzymatic activity was evaluated on both mutated and the wild-type enzymes under identical conditions. Noticeably, high activity was detected with H422A-*PfECT*, whereas H146A-*PfECT* didn't show any measurable activity up to 2 mM of P-Etn (Figure 6A). The H422A-*PfECT* activity was linear before reaching a saturation plateau as the substrate concentration increased (Figures 6B and 6C). The affinity ( $K_m$ ) of the H422A-*PfECT* was found to be  $565 \pm 60 \mu\text{M}$  for P-Etn and  $364 \pm 72 \mu\text{M}$  for CTP and the  $k_{\text{cat}}$  value was  $4.1 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$  (Table 1). The kinetic values of this mutated enzyme were thus similar to the ones of wild-type *PfECT* (Table 1) suggesting that *PfECT* relies solely on its N-terminal CT domain for its catalytic activity. Strikingly, all ECTs known to date possess two CT domains like *PfECT*, probably resulting from an early event of duplication during evolution. For all the analysed ECT sequences, the CTP-binding motif is conserved in both the N- and C-terminal domains unlike the CT signature motif (Figure 4). In the light of our results, it is

probable that the C-terminal domain of other eukaryotic ECTs is also catalytically inactive. Within the CT superfamily, bacterial GCT and eukaryotic CCT contain only one CT domain. The X-ray structure of *B. subtilis* and *Staphylococcus aureus* GCT [44,45,47] and rat CCT [13] revealed that the enzymes fold as homodimers. *PfECT*, and probably other ECTs bearing an active N-terminal domain and an inactive C-terminal domain, likely exhibit a unique mechanism for their catalytic function.

### Three-dimensional structural model of *PfECT*

The finding that the C-terminal CT domain was catalytically inactive prompted us to question the role of this domain in *PfECT* function. To this end, we built a homology model of the *PfECT* structure based on the X-ray structure of the hECT (residues 18–356), crystallized in presence of CMP (PDB code 3ELB). The hECT structure lacks the co-ordinates of the linker region between the N- and C-terminal CT domains. The three-dimensional structural model of *PfECT* showed a global folding similar to human ECT. The enzyme folded as an intramolecular dimer, both CT domains being in contact. The *PfECT* structure model adopted an  $\alpha/\beta$ -fold and each CT domain formed a Rossmann fold commonly found in nucleotide-binding proteins (Figure 7A). Our particular interest was to compare the substrate binding sites of the N- and C-terminal CT domains of *PfECT*. In depth examination of the substrate-binding site of the *PfECT* model revealed important amino acid variations between the N- and the C-terminal domains. Two examples are described here. The arginine residue (Arg<sup>249</sup>) of the N-terminal CT signature motif R(T/S)xG(V/I)STT probably mediates  $\pi$ -stacking interactions with the cytosine ring, like in the hECT crystal structure. The replacement of this arginine residue by a serine (Ser<sup>528</sup>) in the C-terminal CT domain might prevent CTP binding and stabilization (Figure 7B). Another important residue involved in  $\beta$ -phosphate binding is the histidine residue at position 221. This histidine residue is conserved in the N-terminal domains of all ECTs, but not in C-terminal domains (except for human). Instead in *PfECT*, the corresponding arginine (Arg<sup>498</sup>) probably differs in its position due to its important



**Figure 7 Homology model of *PfECT***

(A) A three-dimensional homology model of the intradimeric complex of *PfECT* (ribbon representation in the left-hand panel and molecular surface in the right-hand panel). N- and C-terminal CT domains are coloured in pink and aqua green respectively. (B) Close view of the superimposition of substrate-binding sites of the N- (pink) and C-terminal (aqua green) CT domain. Non-conserved residues occupying the binding site are highlighted and labelled. This includes Arg<sup>249</sup> that is replaced by a serine residue in the C-terminal domain and His<sup>221</sup> replaced by Arg<sup>498</sup>. The ligand CMP (yellow) has been transferred from the hECT template PDB code 3ELB.

length (Figure 7B). Critical residues for substrate binding differed between the N- and C-terminal site, whereas the amino acids at the dimerization interface were rather conserved in both domains. All available three-dimensional crystal structures of CTs show either homo- or pseudo-dimeric (for internal duplication of hECT) oligomerization states, highlighting the importance of dimerization for this superfamily. Thus the C-terminal CT domain of *PfECT* might allow the enzyme to dimerize by intramolecular contacts. The effect of disruption of the intramolecular dimerization will be interesting to evaluate for *PfECT* function.

In conclusion, the present study showed the essential role played by *PfECT* within the PE biosynthesis pathway of *P. falciparum* and revealed that only one of both CT domains of *PfECT* is catalytically active. As a follow-up to the present study, a new chemotherapeutic approach could be developed in order to impede the PE pathway by targeting its essential and rate-controlling enzyme. A compound screening might be a route to discover new biologically active molecules against this deadly disease.

#### AUTHOR CONTRIBUTION

Sweta Maheshwari, Marina Lavigne, Alicia Contet and Blandine Alberge performed the experimental work. Emilie Pihan and Dominique Douguet built the model structure and

performed the structure analysis. Rachel Cerdan, Clemens Kocken and Henri Vial planned the strategy. Rachel Cerdan and Henri Vial designed the experiments. Sweta Maheshwari, Kai Wengelnik and Rachel Cerdan analysed and interpreted the data. Rachel Cerdan and Kai Wengelnik wrote the paper.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to S. Wein and Dr L. Berry for technical assistance and to Dr F. Bressolle for help with statistical analysis.

#### FUNDING

This work was supported by the ANR (Agence Nationale de la Recherche) [grant number ANR-09-BLAN-0397] and by the European Community's Seventh Framework Programme [grant number 242095]. S.M. was funded by InterMalTraining FP7-Marie Curie ITN [grant number PITN-GA-2008-215281].

#### REFERENCES

- Bakovic, M., Fullerton, M. D. and Michel, V. (2007) Metabolic and molecular aspects of ethanolamine phospholipid biosynthesis: the role of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). *Biochem. Cell Biol.* **85**, 283–300
- Gibellini, F. and Smith, T. K. (2010) The Kennedy pathway: *de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* **62**, 414–428
- Sundler, R. and Akesson, B. (1975) Regulation of phospholipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. Effect of different substrates. *J. Biol. Chem.* **250**, 3359–3367



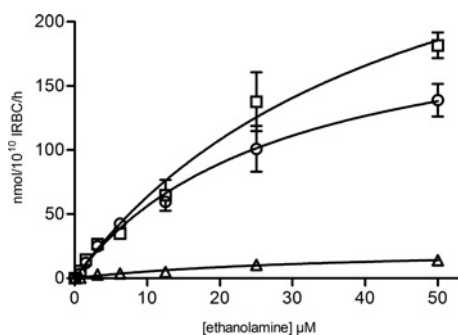
- 4 Bleijerveld, O. B., Klein, W., Vaandrager, A. B., Helms, J. B. and Houweling, M. (2004) Control of the CDPethanolamine pathway in mammalian cells: effect of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase overexpression and the amount of intracellular diacylglycerol. *Biochem. J.* **379**, 711–719
- 5 Mizoi, J., Nakamura, M. and Nishida, I. (2006) Defects in CTP:phosphorylethanolamine cytidyltransferase affect embryonic and postembryonic development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 3370–3385
- 6 Yang, W., Mason, C. B., Pollock, S. V., Lavezzi, T., Moroney, J. V. and Moore, T. S. (2004) Membrane lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: expression and characterization of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase. *Biochem. J.* **382**, 51–57
- 7 Min-Seok, R., Kawamata, Y., Nakamura, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1996) Isolation and characterization of ECT1 gene encoding CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* **120**, 1040–1047
- 8 Gibellini, F., Hunter, W. N. and Smith, T. K. (2009) The ethanolamine branch of the Kennedy pathway is essential in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* **73**, 826–843
- 9 Bladergroen, B. A., Houweling, M., Geelen, M. J. and van Golde, L. M. (1999) Cloning and expression of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase cDNA from rat liver. *Biochem. J.* **343**, 107–114
- 10 Nakashima, A., Hosaka, K. and Nikawa, J. (1997) Cloning of a human cDNA for CTP-phosphoethanolamine cytidyltransferase by complementation *in vivo* of a yeast mutant. *J. Biol. Chem.* **272**, 9567–9572
- 11 Poloumienko, A., Cote, A., Quee, A. T., Zhu, L. and Bakovic, M. (2004) Genomic organization and differential splicing of the mouse and human *Pcyt2* genes. *Gene* **325**, 145–155
- 12 Tie, A. and Bakovic, M. (2007) Alternative splicing of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase produces two isoforms that differ in catalytic properties. *J. Lipid Res.* **48**, 2172–2181
- 13 Lee, J., Johnson, J., Ding, Z., Paetzel, M. and Cornell, R. B. (2009) Crystal structure of a mammalian CTP: phosphocholine cytidyltransferase catalytic domain reveals novel active site residues within a highly conserved nucleotidyltransferase fold. *J. Biol. Chem.* **284**, 33535–33548
- 14 Elabbadi, N., Ancelin, M. L. and Vial, H. J. (1997) Phospholipid metabolism of serine in *Plasmodium*-infected erythrocytes involves phosphatidylserine and direct serine decarboxylation. *Biochem. J.* **324**, 435–445
- 15 Bleijerveld, O. B., Brouwers, J. F., Vaandrager, A. B., Helms, J. B. and Houweling, M. (2007) The CDP-ethanolamine pathway and phosphatidylserine decarboxylation generate different phosphatidylethanolamine molecular species. *J. Biol. Chem.* **282**, 28362–28372
- 16 Vial, H. J., Wein, S., Farenc, C., Kocken, C., Nicolas, O., Ancelin, M. L., Bressolle, F., Thomas, A. and Calas, M. (2004) Prodrugs of bishiazolium salts are orally potent antimalarials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 15458–15463
- 17 Wein, S., Maynadier, M., Bordat, Y., Perez, J., Maheshwari, S., Bette-Bobillo, P., Tran Van Ba, C., Penarete-Vargas, D., Fraisse, L., Cerdan, R. and Vial, H. (2012) Transport and pharmacodynamics of albitazolium, a candidate antimalarial drug. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 2263–2276
- 18 Peyrottes, S., Caldarelli, S., Wein, S., Perigaud, C., Pellet, A. and Vial, H. (2012) Choline analogues in malaria chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 3454–3466
- 19 Vial, H. J., Thuet, M. J., Ancelin, M. L., Philippot, J. R. and Chavis, C. (1984) Phospholipid metabolism as a new target for malaria chemotherapy: mechanism of action of D-2-amino-1-butanol. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2761–2770
- 20 Ancelin, M. L., Calas, M., Bompard, J., Cordina, G., Martin, D., Ben Bari, M., Jei, T., Druilhe, P. and Vial, H. J. (1998) Antimalarial activity of 77 phospholipid polar head analogs: close correlation between inhibition of phospholipid metabolism and *in vitro Plasmodium falciparum* growth. *Blood* **91**, 1426–1437
- 21 Alberge, B., Gannoun-Zaki, L., Bascunana, C., Tran van Ba, C., Vial, H. and Cerdan, R. (2009) Comparison of the cellular and biochemical properties of *Plasmodium falciparum* choline and ethanolamine kinases. *Biochem. J.* **425**, 149–158
- 22 Dechamps, S., Wengelink, K., Berry-Sterkers, L., Cerdan, R., Vial, H. J. and Gannoun-Zaki, L. (2010) The Kennedy phospholipid biosynthesis pathways are refractory to genetic disruption in *Plasmodium berghei* and therefore appear essential in blood stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* **173**, 69–80
- 23 Lambros, C. and Vanderberg, J. P. (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **65**, 418–420
- 24 Pasvol, G., Wilson, R. J., Smalley, M. E. and Brown, J. (1978) Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**, 87–88
- 25 Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509
- 26 Rock, R. C. (1971) Incorporation of 14 C-labelled fatty acids into lipids of rhesus erythrocytes and *Plasmodium knowlesi in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **40**, 893–906
- 27 Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797
- 28 Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U. and Sali, A. (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **5**, Unit 5.6
- 29 Chen, V. B., Arendall, III, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21
- 30 Wallner, B. and Elofsson, A. (2003) Can correct protein models be identified? *Protein Sci.* **12**, 1073–1086
- 31 Ancelin, M. L. and Vial, H. J. (1986) Several lines of evidence demonstrating that *Plasmodium falciparum*, a parasitic organism, has distinct enzymes for the phosphorylation of choline and ethanolamine. *FEBS Lett.* **202**, 217–223
- 32 Vial, H. J., Thuet, M. J. and Philippot, J. R. (1984) Cholinephosphotransferase and ethanolaminephosphotransferase activities in *Plasmodium knowlesi*-infected erythrocytes: their use as parasite-specific markers. *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 372–383
- 33 Perry, T. L., Hansen, S. and Christie, R. G. (1978) Amino compounds and organic acids in CSF, plasma, and urine of autistic children. *Biol. Psychiatry* **13**, 575–586
- 34 Baba, S., Watanabe, Y., Gejyo, F. and Arakawa, M. (1984) High-performance liquid chromatographic determination of serum aliphatic amines in chronic renal failure. *Clin. Chim. Acta* **136**, 49–56
- 35 Dechamps, S., Maynadier, M., Wein, S., Gannoun-Zaki, L., Marechal, E. and Vial, H. J. (2010) Rodent and nonrodent malaria parasites differ in their phospholipid metabolic pathways. *J. Lipid Res.* **51**, 81–96
- 36 Mauritz, J. M., Esposito, A., Ginsburg, H., Kaminski, C. F., Tiffert, T. and Lew, V. L. (2009) The homeostasis of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000339
- 37 Aurrecochea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S. et al. (2009) PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res.* **37**, D539–D543
- 38 Fontana, A., Zamboni, M., Polverino de Lauro, P., De Filippis, V., Clementi, A. and Scaramella, E. (1997) Probing the conformational state of apomyoglobin by limited proteolysis. *J. Mol. Biol.* **266**, 223–230
- 39 Iakoucheva, L. M., Kimzey, A. L., Masselon, C. D., Smith, R. D., Dunker, A. K. and Ackerman, E. J. (2001) Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA. *Protein Sci.* **10**, 1353–1362
- 40 Menon, A. K., Eppinger, M., Mayor, S. and Schwarz, R. T. (1993) Phosphatidylethanolamine is the donor of the terminal phosphoethanolamine group in trypanosome glycosylphosphatidylinositols. *EMBO J.* **12**, 1907–1914
- 41 Imhof, I., Canivenc-Gansel, E., Meyer, U. and Conzelmann, A. (2000) Phosphatidylethanolamine is the donor of the phosphorylethanolamine linked to the  $\alpha$ 1,4-linked mannose of yeast GPI structures. *Glycobiology* **10**, 1271–1275
- 42 Ohsumi, Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 211–216
- 43 Vermeulen, P. S., Tijburg, L. B., Geelen, M. J. and van Golde, L. M. (1993) Immunological characterization, lipid dependence, and subcellular localization of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase purified from rat liver. Comparison with CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* **268**, 7458–7464
- 44 Weber, C. H., Park, Y. S., Sanker, S., Kent, C. and Ludwig, M. L. (1999) A prototypical cytidyltransferase: CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase from *Bacillus subtilis*. *Structure* **7**, 1113–1124
- 45 Patridge, K. A., Weber, C. H., Friesen, J. A., Sanker, S., Kent, C. and Ludwig, M. L. (2003) Glycerol-3-phosphate cytidyltransferase. Structural changes induced by binding of CDP-glycerol and the role of lysine residues in catalysis. *J. Biol. Chem.* **278**, 51863–51871
- 46 Park, Y. S., Gee, P., Sanker, S., Schurter, E. J., Zuiderweg, E. R. and Kent, C. (1997) Identification of functional conserved residues of CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase. Role of histidines in the conserved HXGH in catalysis. *J. Biol. Chem.* **272**, 15161–15166
- 47 Fong, D. H., Yim, V. C., D'Elia, M. A., Brown, E. D. and Berghuis, A. M. (2006) Crystal structure of CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase from *Staphylococcus aureus*: examination of structural basis for kinetic mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 63–69

## SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

**Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* CTP:phosphoethanolamine cytidylyltransferase shows that only one of the two cytidylyltransferase domains is active**

Sweta MAHESHWARI\*, Marina LAVIGNE\*, Alicia CONTET\*, Blandine ALBERGE\*, Emilie PIHAN†, Clemens KOCKEN‡, Kai WENGELNIK\*, Dominique DOUGUET†, Henri VIAL\* and Rachel CERDAN\*<sup>1</sup>

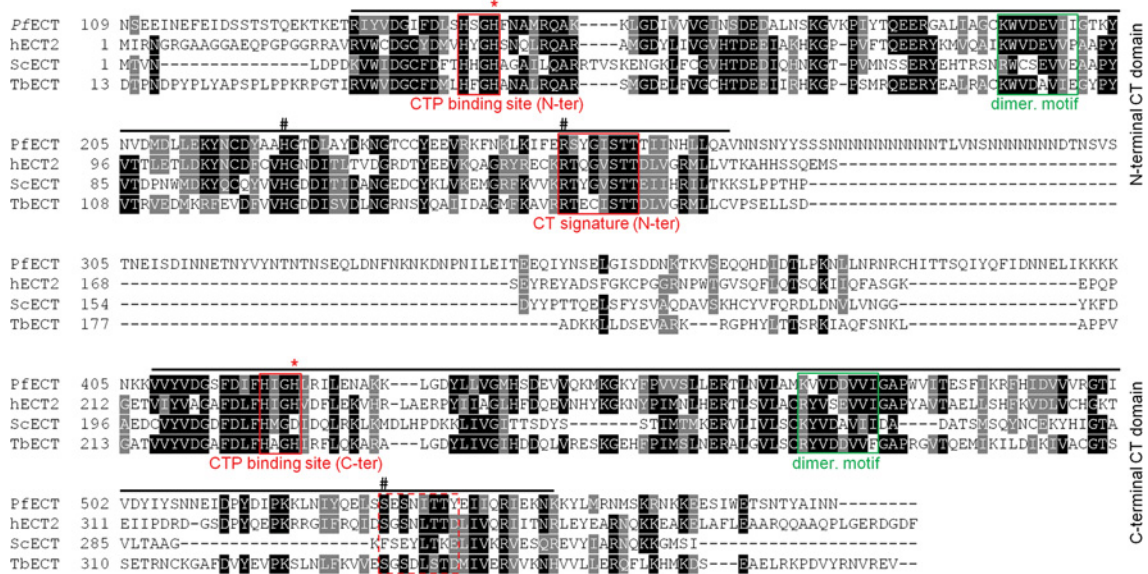
\*Laboratory Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques Université Montpellier 2, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5235, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France, †Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Nice Sophia-Antipolis, UMR7275, 660, Route des Lucioles 06560 Valbonne, France, and ‡Biomedical Primate Research Center, Department of Parasitology, P.O. Box 3306, Rijswijk/2280 GH, The Netherlands



**Figure S1** Etn metabolism in *P. falciparum*-infected erythrocytes

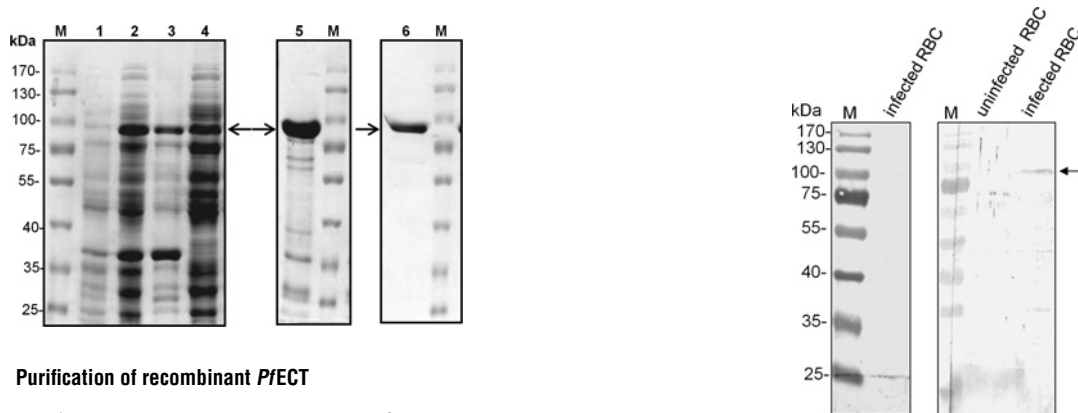
Etn incorporations in the intermediate metabolites and in the end product are reported for low Etn concentrations. Increasing concentrations of [<sup>14</sup>C]Etn were added to parasite culture and the levels of radio-labelled phospho-Etn (○), CDP-Etn (△) and PE(□) were quantified after a 1 h incubation. Results are from one typical experiment of three performed in triplicate and are expressed as nmol/10<sup>10</sup> IRBC/h  $\pm$  S.E.M.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email rachel.cerdan@univ-montp2.fr).



**Figure S2 Sequence alignments of ECT**

Primary sequences of *PfECT* (NCBI Reference Sequence XP\_001350190.1), *hECT* (NCBI Reference Sequence NP\_002852.1; huECT), *S. cerevisiae* ECT (GenBank® accession number BAA09310.1; *ScECT*) and *T. brucei* ECT (GenBank® accession number EAN80358.1; *TbECT*) were aligned with CLUSTAL W2. Identical and similar residues are shaded in black and in grey respectively using BOXSHADE 3.21. N- and C-terminal CT domains are indicated by thick bars. Both CTP-binding (HxGH) sites and CT signature [R(S/T)xG(I/V)STT] of the N-terminal domain are indicated and boxed in red. The localization of the non-conserved C-terminal CT signature motif is indicated by a dashed red box. The eight-residue dimerization motifs described in homologous GCT and CCT three-dimensional structures are boxed in green for both CT domains. The two mutated histidine residues are labelled with a red asterisk. His<sup>221</sup>, Arg<sup>249</sup> and Ser<sup>520</sup> referred to in the text are labelled with #.

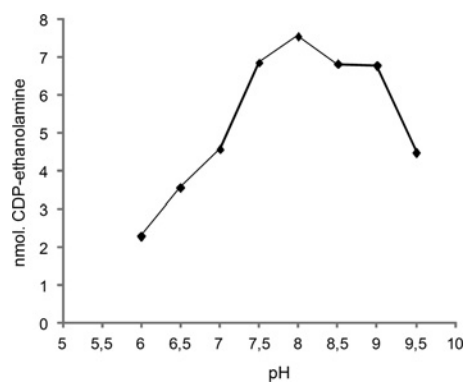


**Figure S3 Purification of recombinant *PfECT***

SDS/PAGE (12% gel). Lane 1, total extracts of bacteria before IPTG induction; lane 2, after IPTG induction; lane 3, pellet; lane 4, supernatant after bacteria lysis; lane 5, 250 mM Ni-NTA (Ni<sup>2+</sup> -nitrilotriacetate) elution; and lane 6, sample eluted after gel filtration G200 (GE Healthcare). M, molecular mass marker (in kDa). *PfECT* is indicated by the arrows.

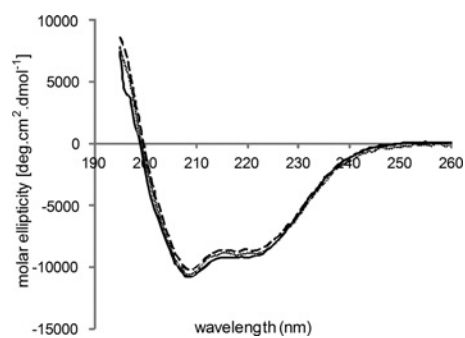
**Figure S4 Characterization of polyclonal anti-*PfECT***

Left-hand panel, IRBCs with pre-immune serum. Right-hand panel, uninfected RBCs and IRBCs revealed with an anti-*PfECT* antibody. *PfECT* is indicated by the arrow. M, molecular mass marker (in kDa).



**Figure S5 CT activity as a function of pH**

The assay medium contained the recombinant *PfECT* protein incubated with buffers at various pH values. The amount (nmol) of synthesized CDP-Etn is given as a function of the pH value.



**Figure S6 Characterization of wild-type and mutated *PfECT***

CD spectra of wild-type *PfECT* (solid line), H146A-*PfECT* (dotted line) and H422A-*PfECT* (dashed line).

Received 24 September 2012/22 November 2012; accepted 30 November 2012  
Published as BJ Immediate Publication 30 November 2012, doi:10.1042/BJ20121480



Supporting Information

© Wiley-VCH 2014

69451 Weinheim, Germany

**Composite Aromatic Boxes for Enzymatic Transformations of Quaternary Ammonium Substrates\*\***

*Gergely N. Nagy,\* Livia Marton, Alicia Contet, Olivér Ozohanics, Laura-Mihaela Ardelean, Ágnes Révész, Károly Vékey, Florin Dan Irimie, Henri Vial, Rachel Cerdan, and Beáta G. Vértessy\**

anie\_201408246\_sm\_miscellaneous\_information.pdf

Supporting Information

## Table of Contents

### Experimental Procedures

**Figure 5** Mass spectra of *PfCCT* MΔK mutant proteins under native electrospray conditions.

**Figure 6** Steady-state analysis of kinetics of *PfCCT* MΔK point mutants

**Figure 7** Isothermal Titration Calorimetry analysis of CDPCho binding to *PfCCT* MΔK mutant enzymes.

**Figure 8** Steady-state analysis of kinetics of *PfCK* point mutants

**Figure 9** Enzyme active sites displaying composite aromatic box character

**Figure 10** Ligand recognition sites of receptors displaying aromatic box character

**Table 4** Molecular masses of *PfCCT* constructs defined from ESI-MS spectra

**Table 5** Results of PDB search for structures with quaternary ammonium ligands

**Table 6** Architecture of quaternary ammonium binding sites in enzymes

**Table 7** Architecture of quaternary ammonium binding sites in receptors

**Supporting References**

## Experimental Procedures

### Materials

CTP, CDPCho (CDP-choline), inorganic pyrophosphatase, purine nucleoside phosphorylase, TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). ATP and Choline (Cho) hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (France). [methyl-<sup>14</sup>C]Choline was from Perkin-Elmer SAS (France). ChoP (choline-phosphate) was from TCI Europe N.V. MESH (2-amino-6-mercapto-7-methylpurine riboside) was obtained from Berry and Associates (Dexter, MI). All other chemicals were of analytical grade of the highest purity available.

### Mutagenesis, protein expression and purification

Site-directed mutagenesis to produce W692F, Y714F, D623N, Y741F and W692A mutant constructs of His-tagged *PfCCT MΔK*<sup>[1]</sup> (PlasmoDB accession number: PF3D7\_1316600)<sup>[2]</sup> were performed by the Quickchange method (Agilent). The following mutagenesis primers were used:

W692F 5'-3', catttctccgtgTCCgttcgtggtgacgccgg;  
 W692F 3'-5', cggcgtcaccacGAAcggacacggagaaaatg;  
 Y714F 5'-3', catgatgacatcccgTTTgctaacaatcagaaagaag;  
 Y714F 3'-5', cttctttctgattgttagcAAAacgggatgtcatcatg;  
 D623N 5'-3', cgtgggtgatttacgccAATgggttttacgacatgc;  
 D623N 3'-5', gcatgtcgtaaacaccATTggcgtaaatcaccacg;  
 Y741F 5'-3', caatcagaaagaagatattTTTgcttggctgaaac;  
 Y741F 3'-5', gtttcagccaagcAAAaatatcttcttctgattg;  
 W692A 5'-3', catttctccgtgtccgGCGgtggtgacgccg;  
 W692A 3'-5', cggcgtcaccacCGCcgacacggagaaaatg.

All constructs were verified by DNA sequencing. The constructs were expressed and purified as described previously.<sup>[1]</sup> Protein concentrations were determined by absorbance measurements carried out using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoScientific).

Site-directed mutagenesis to produce E324A, Y329A, W392A, W395A and Y414A mutant constructs of His-tagged *PfCK* (PlasmoDB accession number PF3D7\_1401800)<sup>[2]</sup> were performed by the Quickchange method (Agilent). The following mutagenesis primers were used:

E324A 5'-3', gcaaacttctttataGCGacaacaatcgattatc;  
 E324A 3'-5', cgttgaagaaatCGCgtgtgtagtaataag;  
 Y329A 5'-3', gaaacaacaatcgatGCGcatataacgcatatcc;  
 Y329A 3'-5', ctttgtttagtaCGCagtatattgcgtatagg;  
 W392A 5'-3', ggttacatctaataGCGgcattctggtctatc;

W392A 3'-5', ccaaatgtagattatCGCcgtaagaccagatag;  
 W395A 5'-3', catctaatatgggcattcGCGtctatcataagagg;  
 W395A 3'-5', gtagattatacccgtaagCGCagatagtattctcc;  
 Y414A 5'-3', gttataatgaatttgatttcttcttaGCGgcaaaggaaagacttaaaatg;  
 Y414A 3'-5, caatattacttaactaaagaagaatCGCcgtttcttctgaattttac.

All constructs were verified by DNA sequencing. The constructs pET24b-*PfCK* were expressed in BL21(DE3)-pRIL and purified as described previously.<sup>[3]</sup> Protein concentrations were determined by absorbance measurements carried out using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoScientific).

### Mass spectrometry

In the mass spectrometric study of protein complexes, a commercial Waters QTOF Premier instrument (Waters, Milford, MA, USA) equipped with electrospray ionization source (Waters, Milford, MA, USA) used in the positive ion mode. Mass spectra were obtained under native conditions: namely, the ions were generated from aqueous 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer solution (pH 7.15) containing the gel filtered *PfCCT* MΔK protein constructs at 0.4 μM monomer concentration. These conditions allow transfer of the native protein complex present in the solution into the gas phase. The capillary voltage was 3600 V, the sampling cone voltage was 125 V and the temperature of the source was kept at 80°C, collision cell pressure was 3.38\*10<sup>-3</sup> mbar and ion guide gas flow was 35.00 ml/min. Mass spectra were recorded using the software MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA) in the mass range 1000–5000m/z as no signals could be detected above 5000 m/z.

### Steady state activity

Steady-state activity measurements with *PfCCT* were performed as described previously<sup>[1]</sup> in 20 mM HEPES, pH 7.5 buffer, containing 100 mM NaCl using a continuous coupled pyrophosphatase enzyme assay, which employs MESG substrate for colorimetric phosphate detection. In case of low activity point mutants, longer assay times up to five hours, as well as higher mutant enzyme concentrations (up to 300 μM) were employed. Data were fitted with Michaelis-Menten equation using Origin 7.5 (OriginLab Corp., Northampton, MA).

Steady-state activity measurements with *PfCK* were performed as described previously<sup>[3]</sup> with some modifications, using a <sup>14</sup>C Choline assay in which enzymatic activity is measured by the formation of radiolabelled ChoP. Briefly, recombinant wild-type or mutants *PfCK* were incubated with [methyl-<sup>14</sup>C]Cho (specific activity of 55.2 μCi/μmol). For each assay, enzymatic reaction was carried out in a final volume of 100 μl with 125μM Tris/HCl pH 8.0

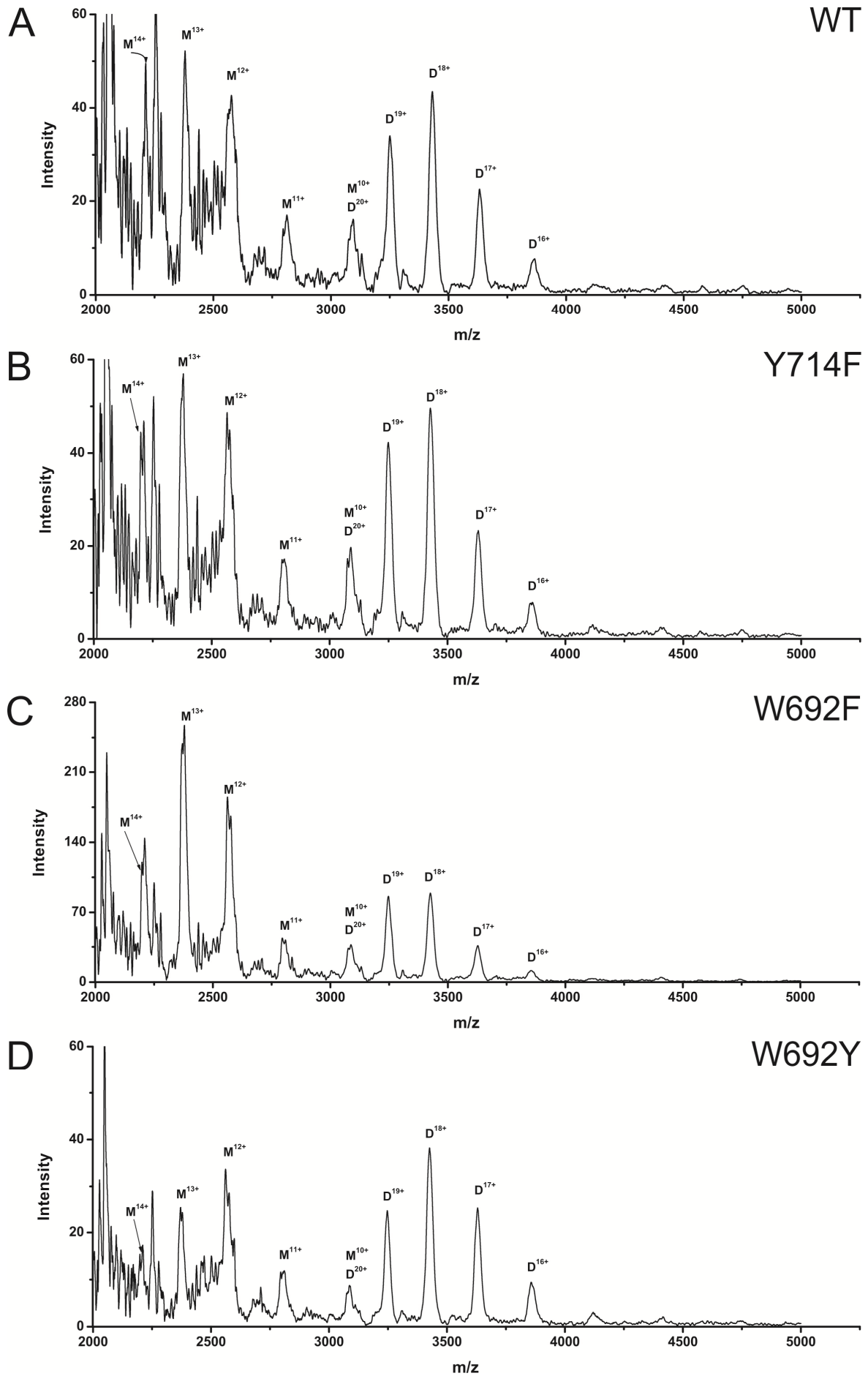


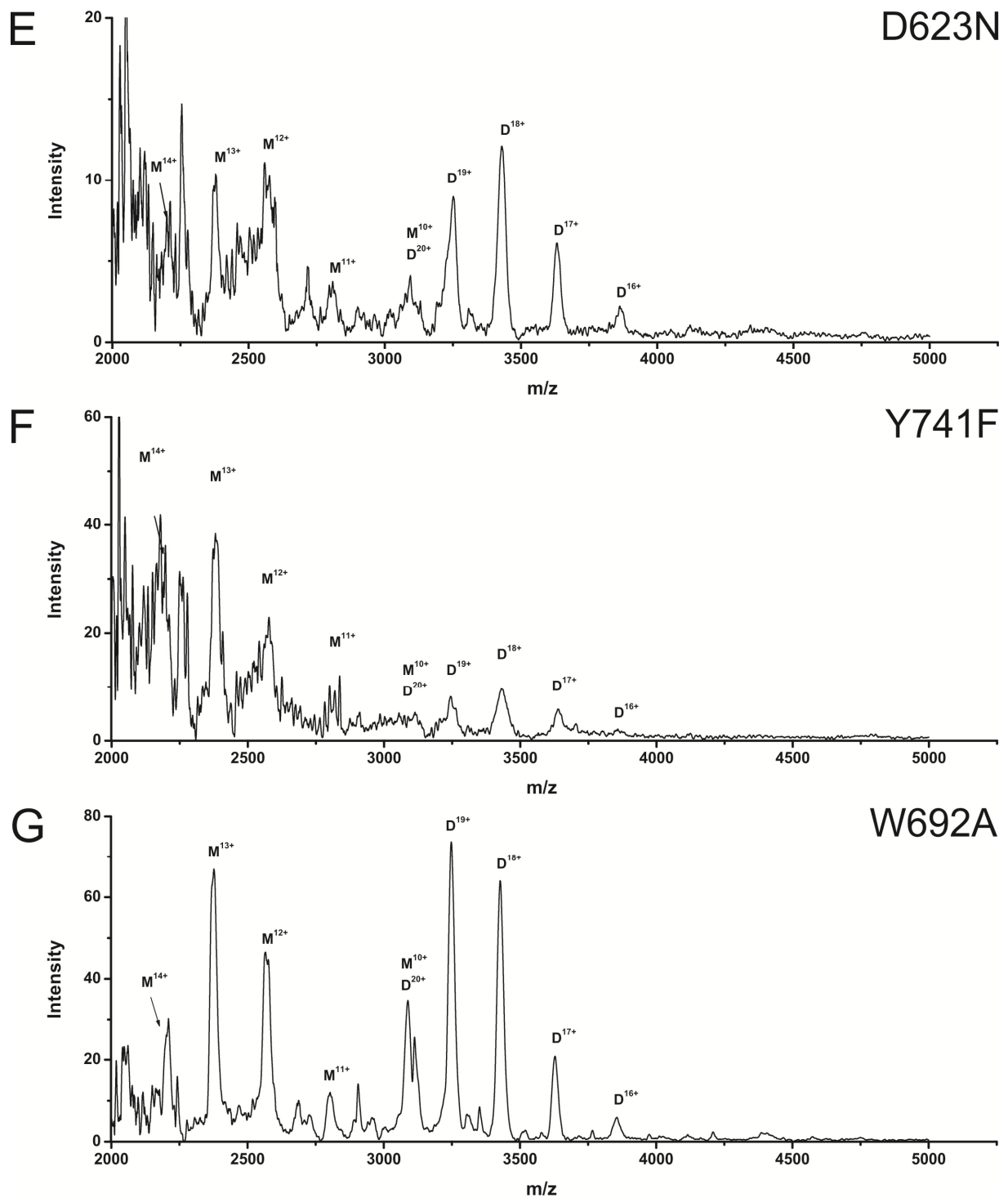
buffer, 10 mM ATP, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μCi of radiolabelled Cho and increasing concentrations of unlabeled Cho (from 50 μM to 10 mM final Cho concentration). Reaction was initiated with the addition of 0.2 μg of *Pf*CK wild type or 0.5 μg of *Pf*CK alanine mutants followed by a 5 min incubation at 37°C. Reaction was stopped by heating at 99 °C for 5 min. Radiolabelled product and substrate were then separated on thin layer chromatography and product formation was quantified as previously described.<sup>[3]</sup> Data were fitted with Michaelis-Menten equation using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc.). Experiments were done twice in triplicate.

**Isothermal Titration Calorimetry** measurements were performed as described previously.<sup>[1]</sup> Prior to titration, protein samples were dialyzed against buffer containing 20 mM Hepes, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP. Titration data were analyzed using MicroCal ORIGIN software following the directions of the manufacturer. Integrated heat data were corrected by subtracting heat data of ligand to buffer titration, performed under identical conditions.

#### **PDB search**

A full-range query of the Protein Data Bank (status 1<sup>st</sup> January 2014) was assessed for three dimensional structures (including NMR and crystal structures) containing tetraalkylammonium moiety compound up to 3.5 Å resolution using Relibase.<sup>[4]</sup> The initial hitlist was refined by visual inspection. Only such cavities were taken into account in which the cognate quaternary ammonium ligand was coordinated by at least two residues. In order to define relative ligand- residue positions, distance between N atom as the geometric centre of the cationic ligand and the nearest non-hydrogen atom of the neighboring residue was shown. The respective W/Y/F residues were classified as cation-π interaction partners when their aromatic plane faced the quaternary ammonium moiety within the distance of 6 Å, based on <sup>[5]</sup> and in accordance with the results described in <sup>[6]</sup>. Distance criteria for polar or charged interaction partners was set to 5 Å, according to <sup>[7]</sup>. Structures obtained with quaternary ammonium crystallization agents were excluded. Enzyme: ligand recognition was assumed only when the quaternary ammonium ligand that corresponds to the cognate substrate, product or analogue was accommodated to active site of the enzyme. Otherwise, receptor: ligand interaction was assumed. The hits were classified based on ligand binding geometry. We defined the composite aromatic box interaction pattern with the joint coordination of the quaternary ammonium moiety with one or two aromatic residue(s), and polar or charged residues.

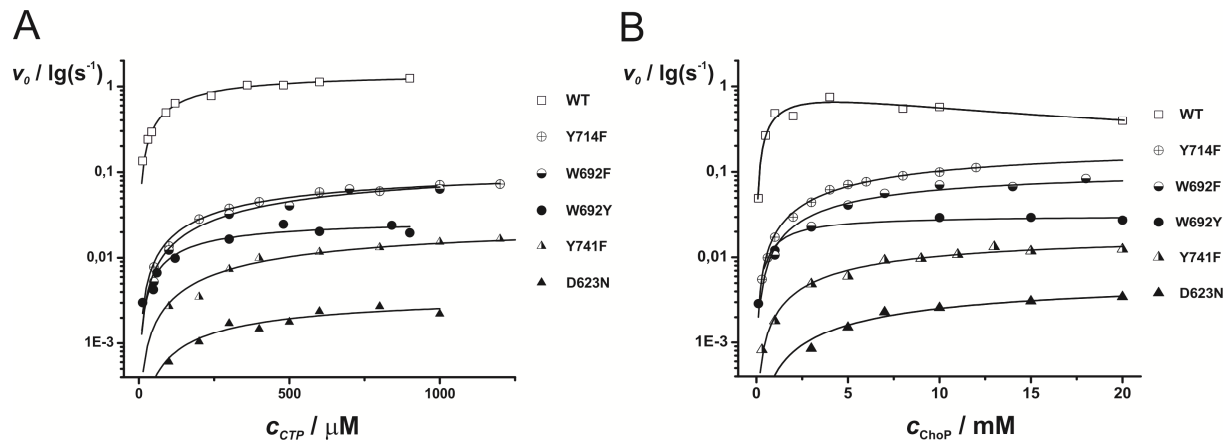




**Figure 5** Mass spectrum of *PfcCT* MΔK mutant proteins under native electrospray conditions.

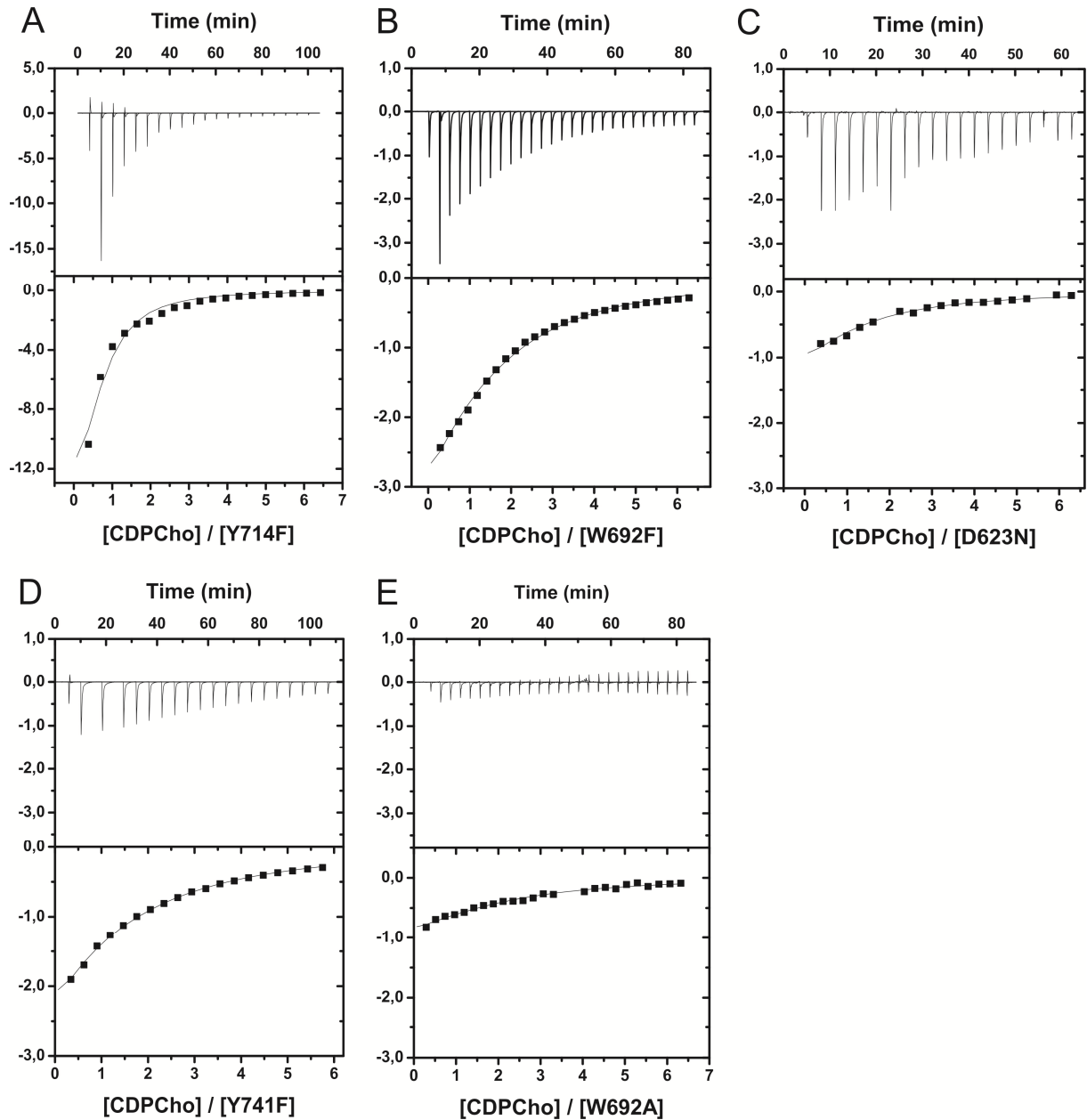
Mass spectra of the *PfcCT* MΔK protein and its point mutants under native electrospray conditions. M and D denote monomer and dimer signals, respectively; whereas numbers indicate the charge states. No signals were detected above 5000 m/z. Mass spectra for the mutants is analogous to that of the *PfcCT* MΔK, i.e., a dimer:monomer ratio of ca. 1:1 was found, and no higher oligomeric forms can be observed. Thus, the mutants also specifically

form a dimer structure, which corroborates that these mutations do not induce major global conformational changes. In case of *PfCCT MΔK<sup>Y741F</sup>*, the low resolution of monomer and dimer *m/z* peaks might correlate with decreased stability of the construct under the conditions of ESI-MS experiment. **A)** Mass spectrum of *PfCCT MΔK<sup>WT</sup>* **B)** Mass spectrum of *PfCCT MΔK<sup>Y714F</sup>* **C)** Mass spectrum of *PfCCT MΔK<sup>W692F</sup>* **D)** Mass spectrum of *PfCCT MΔK<sup>W692Y</sup>* **E)** Mass spectrum of *PfCCT MΔK<sup>D623N</sup>* **F)** Mass spectrum of *PfCCT MΔK<sup>Y741F</sup>* **G)** Mass spectrum of *PfCCT MΔK<sup>W692A</sup>*.



**Figure 6** Steady-state analysis of kinetics of *PfcCCT* MΔK point mutants.

Michaelis-Menten kinetic curves of *PfcCCT* MΔK enzyme point mutants. **A)** Initial rates of reaction measured at fixed 5 mM concentration of ChoP and at varying concentration of CTP. **B)** Initial rates of reaction measured at fixed  $c_{CTP}$  of 1 mM and at varying concentration of ChoP. Titration data of *PfcCCT* MΔK from <sup>[1]</sup> is shown for comparison. Data points corresponding to mutants of charged interactors are depicted as triangles whereas mutants of cation- $\pi$  interactors are depicted as circles. Note that for the WT *PfcCCT* MΔK, there is a slight inhibition exerted by the ChoP substrate, apparent at  $[\text{ChoP}] > 7 \text{ mM}$ <sup>[1]</sup>, considerably higher than the physiological ChoP concentration of  $30 \mu\text{M}$ <sup>[8]</sup>. In the case of its mutants, this inhibition was not observed.



**Figure 7 Isothermal Titration Calorimetry analysis of CDPCho binding to *PfCCT MΔK* mutant enzymes.**

Isothermal titration calorimetry curves of CDPCho binding to *PfCCT MΔK* mutants. Data gave best fit with the One set of binding sites model, as described by the manufacturer.

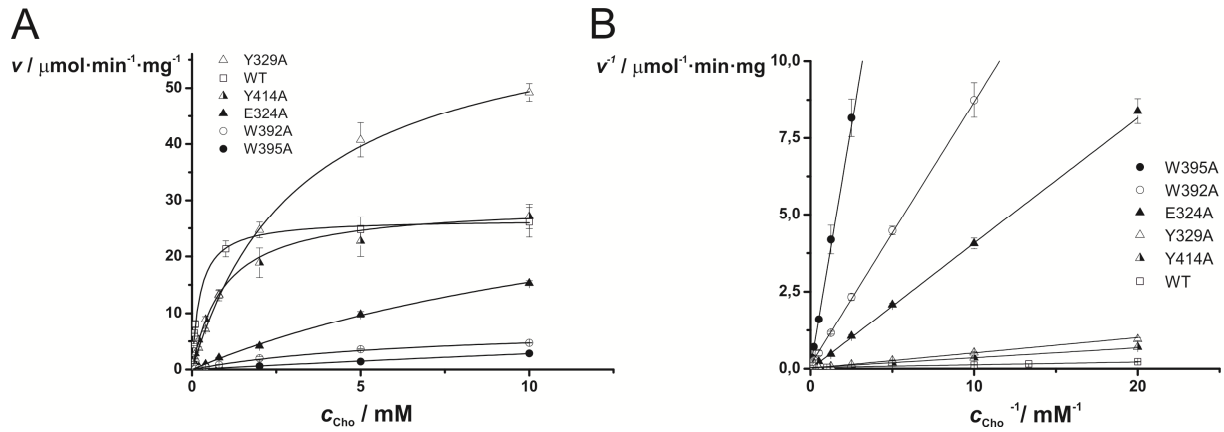
**A)** Titration of 319  $\mu\text{M}$  *PfCCT MΔK*<sup>Y714F</sup> (monomer concentration) with 10 mM CDPCho

**B)** Titration of 369  $\mu\text{M}$  *PfCCT MΔK*<sup>W692F</sup> (monomer concentration) with 11 mM CDPCho.

**C)** Titration of 430  $\mu\text{M}$  *PfCCT MΔK*<sup>D623N</sup> (monomer concentration) with 13 mM CDPCho

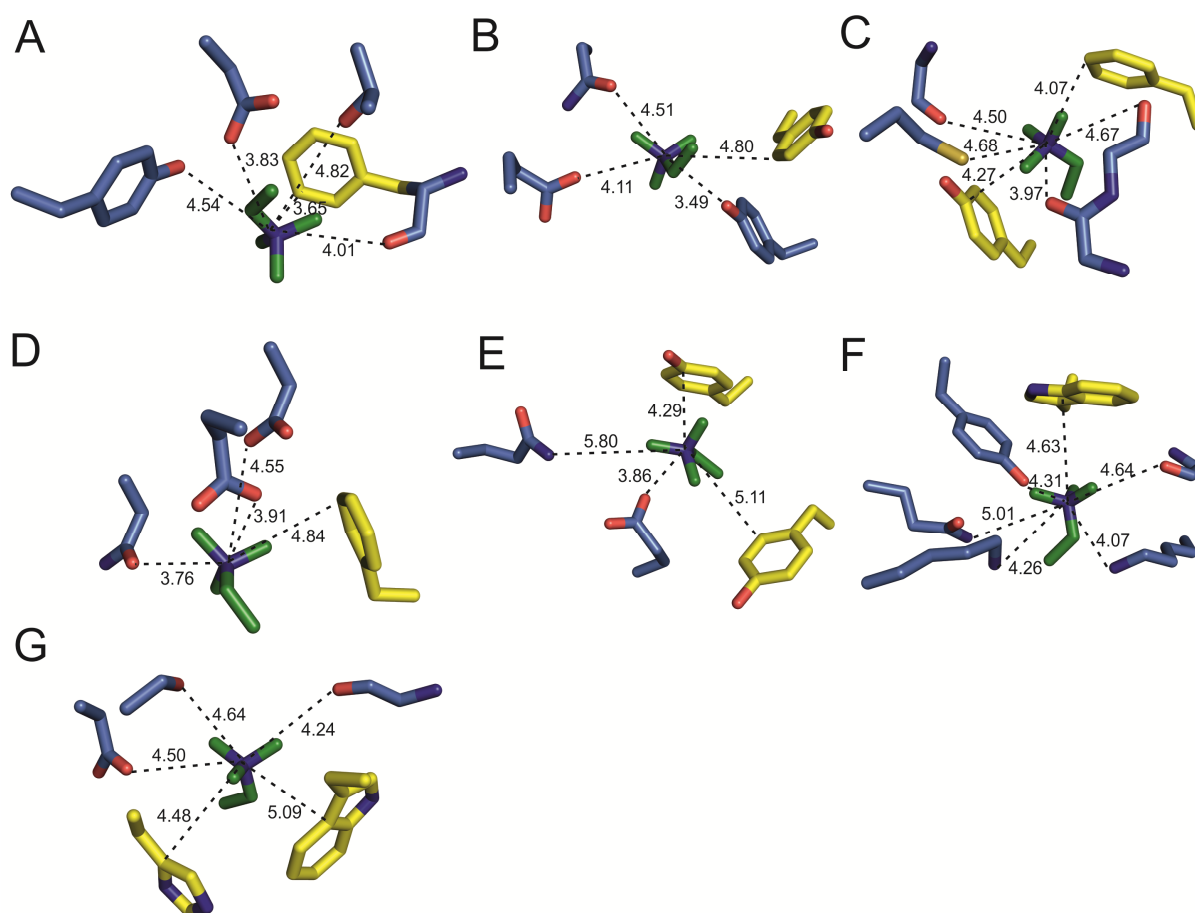
**D)** Titration of 357  $\mu\text{M}$  *PfCCT MΔK*<sup>Y741F</sup> (monomer concentration) with 10 mM CDPCho

**E)** Titration of 250  $\mu\text{M}$  *PfCCT MΔK*<sup>W692A</sup> (monomer concentration) with 7.5 mM CDPCho.



**Figure 8** Steady-state kinetic analysis of *PfCK* point mutants.

**A)** Michaelis-Menten kinetic curves of mutant *PfCK*. Initial rates of reaction measured at fixed concentrations of 10 mM ATP and at varying concentration of choline (Cho). **B)** Lineweaver-Burk plots. Results are presented as the mean  $\pm$ SD from three parallel measurements from one representative experiment.



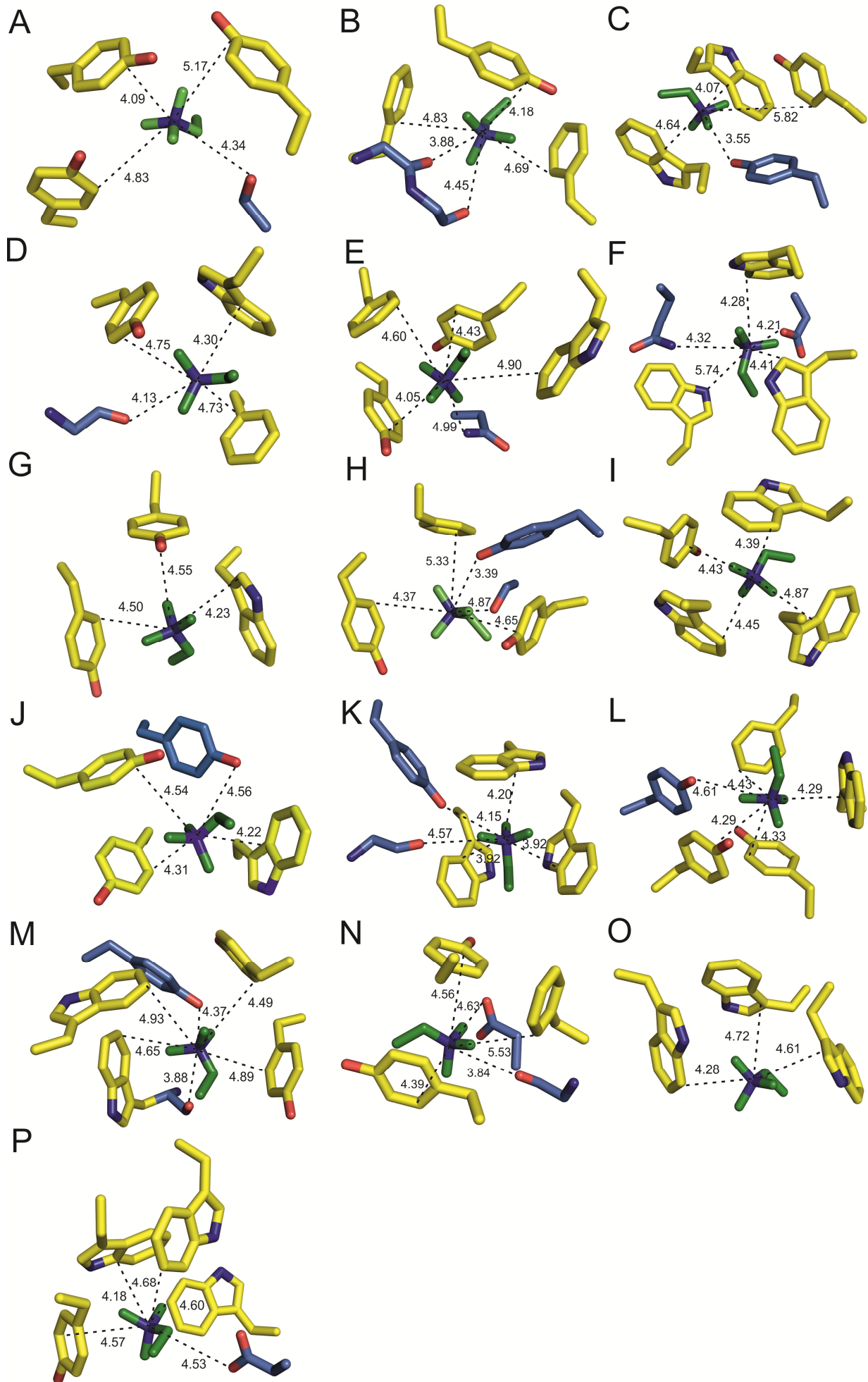
**Figure 9** Enzyme active sites displaying composite aromatic box character.

Additional examples show the widespread structural solution evolved for accommodation of quaternary ammonium enzyme ligands. A single representative was chosen from all protein family clans, based on Pfam annotations<sup>[9]</sup>, where a protein three dimensional structural hit was deposited in the Protein Data Bank with bound quaternary ammonium substrate or product. The structure with optimal resolution available was selected. Active site close-up of enzyme structures are shown with quaternary ammonium moiety of the bound ligand. For the sake of clarity, only the quaternary ammonium moiety of the respective ligand is displayed (stick model, atomic coloring with green carbon, blue nitrogen). Stick models of interacting residue side chains or main chains are in atomic coloring where carbon is either yellow or blue for cation- $\pi$  or charged interactions, respectively. For visualization of proximity, the distance of the closest residue atom from the quaternary ammonium N is displayed (even though the nitrogen atom itself is negatively charged<sup>[10]</sup>). **A)** Betaine aldehyde dehydrogenase, PDB ID: 1WNB; **B)** JMJD2D lysine demethylase, PDB ID: 4HON; **C)** RuBisCO LSMT PDB ID: 2H23; **D)** Phosphocholine transferase (AnkX), PDB ID: 4BES; **E)** Cronobetainyl-CoA:carnitine CoA transferase (CaiB), PDB ID: 1XVV; **F)** 4-hydroxyproline



### Article 3

betaine 2-epimerase, PDB ID: 4J1O; **G**) Teichoic acid phosphorylcholine esterase (CbpE), PDB ID: 2BIB.



### Article 3

#### **Figure 10 Ligand recognition sites of receptors displaying aromatic box character.**

Additional examples verify that the aromatic box is the widespread structural solution evolved for efficient accommodation of quaternary ammonium receptor ligands (Panels A-P). Each receptor is represented here by one of its ligand complex structure. Here we assign receptor function to such enzymes as well that binds cognate quaternary ammonium ligand allosterically. Ligand binding site close-up of the respective structures is depicted. For the sake of clarity, only the quaternary ammonium moiety of the respective ligand is shown (stick model, atomic coloring with green carbon, blue nitrogen). Residue side chains located at ca. 5 Å from the quaternary nitrogen atom are shown (stick models, atomic coloring where carbon is either yellow or blue for cation- $\pi$  or charged interactions, respectively; nitrogen is colored blue, oxygen, red). Tyrosines are depicted with orange carbon atomic coloring when both their aromatic ring and OH group is exposed to the quaternary ammonium moiety. Hydrophobic contacts of quaternary ammonium moiety, present in Panel T, are shown sticks, grey atomic coloring. **A)** M3 muscarinic acetylcholine receptor, PDB ID: 4DAJ; **B)** Cytochrome b-c1, PDB ID: 1SQP; **C)** Seminal plasma protein (PDC-109), PDB ID: 1H8P; **D)** Coagulation factor X (Factor X) PDB ID: 2JKH; **E)** Polycomb protein EED, PDB ID: 3K26; **F)** Transcriptional regulator, C7MT25, PDB ID: 4KWA; **G)** Nucleosome-remodeling factor subunit (BPTF), PDB ID: 2F6J; **H)** CRAL-TRIO domain-containing protein, PDB ID: 3B7Z; **I)** Choline-binding protein F (CbpF), PDB ID: 2V05; **J)** Phosphatidylcholine transfer protein (PC-TP), PDB ID: 1LN1; **K)** Glycine betaine transporter (BetP), PDB ID: 4AIN; **L)** Spindlin-1 (SPIN1), PDB ID: 4H75; **M)** Acetylcholine-binding protein (AchBP), PDB ID: 1UV6; **N)** SAGA-associated factor 29 homolog, (SGF-29), PDB ID: 3MEA; **O)** Zinc finger CW-type PWWP domain protein 1, PDB ID: 2RR4; **P)** Ig  $\lambda$ 1 chain V, PDB ID:1DL7.

**Table 4** Relative molecular mass ( $M_r$ ) of *Pf*CCT construct monomers determined by native ESI-MS

<b>Protein construct</b>	<b><math>M_r</math>, by ESI-MS (Da)</b>	<b><math>M_w</math>, theoretical<sub>[a]</sub> (Da)</b>
<i>Pf</i> CCT MΔK <sup>WT</sup>	30906 ± 50	30898
<i>Pf</i> CCT MΔK <sup>Y714F</sup>	30840 ± 50	30882
<i>Pf</i> CCT MΔK <sup>W692F</sup>	30808 ± 50	30859
<i>Pf</i> CCT MΔK <sup>W692Y</sup>	30846 ± 50	30875
<i>Pf</i> CCT MΔK <sup>D623N</sup>	30856 ± 50	30897
<i>Pf</i> CCT MΔK <sup>Y741F</sup>	30956 ± 50	30882
<i>Pf</i> CCT MΔK <sup>W692A</sup>	30786 ± 50	30783

[a] Theoretical molecular masses are calculated based on the His-tagged protein sequence.

**Table 5 Results of PDB search for structures with quaternary ammonium ligands**

<b>Total # of enzyme hits with quaternary ammonium</b>		
<b>ligands<sup>[a]</sup></b>	<b>150</b>	
<b>composite aromatic box</b>	<b>86</b>	<b>93%</b>
<b>not composite aromatic box</b>	<b>6</b>	<b>7%</b>
<b>not relevant (solvent exposed, non-specific)<sup>[b]</sup></b>	<b>64</b>	
<b>Total # of receptor hits with quaternary ammonium</b>		
<b>ligands<sup>[a]</sup></b>	<b>313</b>	
<b>aromatic box</b>	<b>107</b>	<b>78%</b>
<b>composite aromatic box-like</b>	<b>30</b>	<b>22%</b>
<b>not relevant (solvent exposed or non-specific)<sup>[b]</sup></b>	<b>176</b>	

[a] To avoid redundancy, only a single hit was considered for each enzyme and receptor for the statistical analysis. Enzyme: ligand recognition was assumed only when the quaternary ammonium ligand that corresponds to the cognate substrate, product or analogue was accommodated to active site of the enzyme. Otherwise, receptor: ligand interaction was assumed, provided that the quaternary ammonium moiety of the ligand is accommodated within the ligand binding pocket of the enzyme.

[b] Ligands found absorbed on protein surface (i.e. not within the active site or ligand binding pocket) were categorized as 'non-specific'.

Table 6 Architecture of choline binding sites in enzymes

Enzyme name	E.C. #	Protein family	Pfam CLAN	Ligand	PDB ID	Resolution (Å)
Betaine aldehyde dehydrogenase, putative (BALDH)	1.2.1.8	Aldedh (PF00171)	ALDH-like (CL0099)	betaine aldehyde	1WNB	2.20
JMJ2D lysine demethylase	1.14.11	JmjC (PF02373), JmjN (PF02375), MORN (PF02493), SET (PF00856)	Cupin (CL0029)	trimethyllysine	4HON	1.80
Histone-lysine N-methyltransferase MLL5	2.1.1.43	MORN (PF02493), SET (PF00856)	MORN (CL0251)	trimethyllysine	4L58	1.48
RuBisCO LSMT	2.1.1.12 <sub>7</sub>	Rubis-subst-bind (PF09273)	n/a	trimethyllysine	2H23	2.45
CTP:phosphocholine Cytidyllyltransferase (LicC)[a]	2.7.7.15	NTP_transferase (PF00483)	GT-A (CL0110)	CDP-choline	1JYL	2.40
CTP:phosphocholine Cytidyllyltransferase (CCT)[a]	2.7.7.15	CTP_transf_2 (PF01467)	HUP (CL0039)	CDP-choline	3HL4	2.20
Carnitine O-Acetyltransferase (CrAT)	2.3.1.7	Carn_acyltransf (PF00755)	CoA-acyltrans (CL0149)	carnitine	1S50	1.80
Phosphocholine transferase, AnkX	2.7.1.-	Fic (PF02661), Ank_2 (PF12796)	Ank (CL0465)	choline-phosphate	4BES	2.54
Choline kinase (Ck)	2.7.1.32	Choline_kinase (PF01633)	PKinase (CL0016)	choline	3C5I	2.20
Cronobetaiyl-CoA:carnitine CoA transferase (CaiB)	2.8.3.-	CoA_transf_3 (PF02515)	n/a	carnitinyl-CoA	1XVV	2.40
Acetylcholinesterase (AChE)	3.1.1.7	COesterase (PF00135)	AB_hydrolase (CL0028)	choline	2HA3	2.25
Phospholipase C (PLC)	3.1.4.3	Zn_dep_PLPC (PF00882)	PhosC-NucP1 (CL0368)	phosphatidylcholine	1P6D	2.00
4-hydroxyproline betaine 2-epimerase (Hyp-B 2-epimerase)	5.1.1.-	MR_MLE (PF0118), MR_MLE_N (PF02746)	Enolase_TIM (CL0256), Enolase_N (CL0227)	l-proline betaine	4J10	1.60
Teichoic acid phosphorylcholine esterase/choline binding protein E (Cbpe)	n/a	Lactamase_B (PF00753)	Metallo-HOrase (CL0381)	choline-phosphate	2BIB	1.92

[a] These are analogous enzymes, i.e. they catalyze the same reaction but possess no detectable sequence similarity.

Enzyme active sites possessing composite aromatic box quaternary ammonium binding pattern. One representative is shown for each protein family clan.

Table 7 Architecture of quaternary ammonium binding sites in receptors

Receptors <sup>[a]</sup>	Protein family	Clan	Ligand	PDB code	Resolution (Å)
M3 muscarinic acetylcholine receptor (M <sub>3</sub> mAChR)	7_tm (PF00001)	GPCR_A (CL0192)	tiotropium	4DAJ	3.40
Cytochrome b-c1	Cytochrome b N_2 (PF00032)	2heme_cytochrom (CL0328)	phosphatidylcholine	1SQP	2.70
Seminal plasma protein (PDC-109)	fn_2 (PF00040)	n/a	choline-phosphate	1H8P	1.82
Coagulation factor X (Factor X)	Trypsin (PF00089)	Peptidase_PA (CL0124)	quaternary inhibitor	2JKH	1.25
Polycomb protein EED (EED)	WD40 (PF00400)	Beta_propeller (CL0186)	trimethyllysine	3K26	1.58
Transcriptional regulator, C7MT25	tetR (PF00440)	HTH (CL0123)	choline	4KWA	1.80
Nucleosome-remodeling factor subunit (BPTF)	PHD (PF00628)	zf_FYVE_PHD (CL0390)	trimethyllysine	2F6J	2.00
CRAL-TRIO domain-containing protein (YKL091C)	CRAL_TRIO (PF00650)	CRAL_TRIO (CL0512)	phosphatidylcholine	3B7Z	2.03
Choline-binding protein F (CbpF)	CW_binding_1 (PF01473)	n/a	choline	2V05	1.67
Phosphatidylcholine transfer protein (PC-TP)	START (PF01852)	Bet_V_1_like (CL0209)	phosphatidylcholine	1LN1	2.40
Glycine betaine transporter (BetP)	BCCT (PF02028)	n/a	betaine	4AIN	3.10
Spindlin-1 (SPIN1)	Spin-Ssty (PF02513)	n/a	trimethyllysine	4H75	2.1
Acetylcholine-binding protein (AcbBP)	Neur_chan_LBD (PF02931)	n/a	carbamy/l-choline	1UV6	2.50
Glycine betaine-binding periplasmic protein (proX)	OpuAC (PF04069)	PBP (CL0177)	betaine	1R9L	1.59
SAGA-associated factor 29 homolog, (SGF-29)	DUF1325 (PF07039)	Tudor (CL0049)	trimethyllysine	3MEA	1.26
Zinc finger CW-type PWWP domain protein 1 (ZCWPW1)	zf-CW (PF07496)	n/a	trimethyllysine	2RR4	(NMR)
Ig λ1 chain V	V-set (PF07686)	Ig (CL0011)	choline-phosphate	1DL7	2,35

[a] Receptor function is assigned to an enzyme, too, when the respective quaternary ammonium ligand was bound allosterically.

Receptor binding sites possessing aromatic box quaternary ammonium binding pattern. One representative is shown for each protein family (Pfam) clan.





## Résumé de la thèse

Le paludisme est causé par l'infection et la destruction des érythrocytes par les parasites protozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. Au cours de son développement dans l'érythrocyte, *Plasmodium falciparum* requiert la biosynthèse massive de membranes dont les principaux constituants lipidiques sont des phospholipides. La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) représentent à elles deux environ 80 % des lipides membranaires et l'inhibition de leur biosynthèse est létale pour le parasite. La PC et la PE sont synthétisées par le parasite, principalement *via* les voies *de novo* dépendantes de la CDP-choline et de la CDP-éthanolamine (ou voies de Kennedy) en utilisant respectivement la choline et l'éthanolamine comme précurseurs. Ces travaux de thèse se focalisent sur les deux enzymes CTP:phosphocholine et CTP:phosphoéthanolamine cytidylyltransférase (*PfCCT* et *PfECT*, respectivement), catalysant les étapes limitantes des voies de Kennedy. Chez *Plasmodium*, les CCT et ECT possèdent deux domaines cytidylyltransférases (CT) portant l'activité catalytique, séparés par une longue région de liaison. Pour la CCT, cette duplication est retrouvée seulement chez trois organismes, tous faisant partie du phylum des Apicomplexes : *Babesia*, *Theileria* et *Plasmodium*, alors que la présence de deux domaines CT est une caractéristique retrouvée chez toutes les ECT étudiées à ce jour. La première partie de ce travail de thèse concerne la caractérisation biochimique et l'inhibition la *PfCCT*. Nous avons montré que les deux domaines CT de la *PfCCT* sont actifs à l'inverse de la *PfECT* pour laquelle seul le domaine CT N-terminal est catalytiquement actif. A la suite d'un criblage virtuel basé sur la structure de l'enzyme, nous avons identifié un composé princeps capable d'inhiber l'activité de la *PfCCT in vitro*, la synthèse de PC et la croissance parasitaire. Ce premier composé actif (haut  $\mu\text{M}$ ) représente une base pour l'optimisation future de nouveaux composés plus efficaces. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons déterminé le mécanisme catalytique, la spécificité de liaison des ligands et l'organisation structurale de la *PfECT* grâce à la combinaison d'approches biochimiques et biophysiques. L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit apportent un éclairage important concernant le fonctionnement de ces deux cibles potentielles et constituent des étapes essentielles à l'élaboration d'une approche thérapeutique.

**Mots clés :** Paludisme, *Plasmodium*, Cytidylyltransférases, Phospholipides, Inhibition

---

## Thesis summary

The malaria parasite *Plasmodium falciparum* requires massive biosynthesis of membranes to sustain its growth and multiplication within the host erythrocyte. Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) together represent about 85% of the total membrane lipids and inhibition of their biosynthesis leads to parasite death. PC and PE are synthesized by the parasite's machinery mainly through the *de novo* CDP-choline and CDP-ethanolamine (Kennedy) pathways using respectively choline and ethanolamine as precursors. My thesis focused on the rate limiting steps of these pathways catalyzed by CTP:phosphocholine and CTP:phosphoethanolamine cytidylyltransferases (*PfCCT* and *PfECT*, respectively). In *Plasmodium* species, both CCT and ECT contain two catalytic cores (CT domains) separated by a long linker. Interestingly, for CCT this feature is found only in three organisms, all from the phylum of Apicomplexa: *Babesia*, *Theileria* and *Plasmodium*, whereas the presence of two CT domains is a general feature in all ECTs known so far. The first part of this study consisted in the biochemical characterization of *PfCCT* and the investigation of its druggability. We showed that both *PfCCT* CT domains are active and display similar kinetic parameters while only the N-terminal CT domain is active in *PfECT*. Subsequent to an *in silico* structure-based screening of compounds libraries, we identified a *PfCCT* inhibitor able to inhibit PC synthesis as well as *P. falciparum* growth *in vitro* in the  $\mu\text{M}$  range. This compound represents a first step toward the optimization of future more potent compounds. In the second part of this work, we investigated the catalytic mechanism of *PfECT* and deciphered its interactions with its ligands using biochemical, biophysical and structural approaches. Collectively, these results bring new insights into the biochemical and structural properties of these two key enzymes of the phospholipid metabolism in *P. falciparum* and support the development of novel antimalarial compounds with original mechanism of action.

**Key words :** Malaria, *Plasmodium*, Cytidylyltransferases, Phospholipids, Inhibition