

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

N° ORDRE : 3907
de la thèse



THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1

Mention : **BIOLOGIE**

par

GUILLAUME BOUYER

Equipe d'accueil : **Physiologie Cellulaire des Erythrocytes, Station Biologique, Roscoff**

Ecole Doctorale : **Vie Agro Santé**

Composante Universitaire : **Sciences de la Vie et de l'Environnement**

CARACTERISATION DES CANAUX ANIONIQUES DANS LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE HUMAIN INFECTE PAR *Plasmodium falciparum*

Soutenue le 15 MAI 2009 devant le jury composé de

Rapporteurs :

Dr Geneviève MILON, Directeur de Recherche, Institut Pasteur

Pr Hagai GINSBURG, Professeur, Hebrew University of Jerusalem

Examineurs :

Pr Virgilio LEW, Professeur, University of Cambridge

Dr François TIAHO, Maître de Conférence, Université de Rennes 1

Dr Daniel THOMAS, Directeur de Recherche, CNRS

Dr Serge THOMAS, Directeur de Recherche, CNRS, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont permis de réaliser ce travail de thèse au cours de ces années, ainsi que les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail.

En particulier, je remercie Serge, qui m'a fait confiance sans me connaître et alors que je n'avais jamais vu un poste de patch, et qui m'a initié aux joies du seal et des canaux.

Je remercie bien évidemment Stef, pour ses conseils, encouragements, sa disponibilité, patati et patata ... bien plus qu'un collègue, un vrai poto !

Un grand merci aussi à toute l'équipe de physio cellulaire : Anne, Aga, Edyta, Ursula, Ania, Aga2, Céline – pour leur aide et participation à ce travail, et surtout pour leur disponibilité et l'ambiance de travail qui règne dans le couloir ... Ce qui est bon c'est que je reste dans l'équipe !

Je remercie également tous les membres de l'UMR 7150, pour leurs conseils au long de cette thèse, et plus généralement tout le personnel de la station. Merci aussi à Dominique Marie pour ses conseils sur les manips de cytométrie, et à Poul Bennekou.

Un grand merci aux infirmières du service de jour de Perharidy, sans qui rien ne serait possible ...

Enfin des grandes dédicaces à tous ceux qui ont fait que ces premières années roscovites sont passées aussi vite qu'une côte de bœuf dans un barbecue Santecois : les thevenites Sab, Marjo and Rigoule the drummer, les favicois Gogo and Alice, la famille Raimond du laber (puq' 37 ans Céline), Caro&Ben, Regis&Flo, Conchita pour le ménage en culture, Anne-Laure, PO, Gilles, Gérard, Nat, etc

Merci à ma famille – qui m'a permis d'en arriver là par des chemins plus ou moins direct...

Et enfin merci au docteur Chambouvet – on va pouvoir mettre une plaque sur la maison – tu m'as encouragé pendant cette thèse, et surtout tu m'as supporté (dans tous les sens du terme): chapoba!

TABLE DES MATIERES

EN BREF : MALARIA ET ELECTROPHYSIOLOGIE	4
CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE	4
RESUME DES OBJECTIFS ET RESULTATS	6
LISTE DES PUBLICATIONS	8
PRESENTATIONS EN CONFERENCES INTERNATIONALES	8
 LISTE DES ABBREVIATIONS	 9
 LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	 10
 INTRODUCTION	 12
I - LE GLOBULE ROUGE HUMAIN	12
A - Originalité et caractéristiques physico-chimiques	12
B - L'homéostasie du globule rouge	13
C - Différents types de transporteurs dans la membrane de l'érythrocyte	14
1 - Transporteurs actifs	15
2 - Transporteurs passifs	16
3 - Canaux ioniques	16
E - Les systèmes de transport de l'érythrocyte et l'invasion par <i>P. falciparum</i>	20
II - ELEMENTS GENERAUX SUR LA MALARIA ET <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	21
A - Histoire de la découverte de <i>Plasmodium</i>	21
B - Données épidémiologique	22
C - Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	22
III - MODIFICATIONS DES PROPRIETES MEMBRANAIRES DE L'ERYTHROCYTE LORS DE L'INFECTION PAR <i>P. FALCIPARUM</i>	24
A - De fortes modifications dans le globule rouge infecté	24
B - Altérations du transport de solutés : les NPPs	25
C - Propriétés des NPPs	26
IV - LES ETUDES D'ELECTROPHYSIOLOGIE SUR LE GLOBULE ROUGE INFECTE	28
A - Configurations utilisées	28
B - Les points de consensus	28
C - Les modèles proposés par les différentes équipes	30
1 - Canal unique, d'origine parasitaire	30
2 - Canaux endogènes activés lors de l'infection	31
C - Variations sur un même thème	34
V - OBJECTIFS DE LA THESE	35
 MATERIEL ET METHODES	 38
I - CULTURE CELLULAIRE	38
II - LE PATCH-CLAMP	38
A - Principes	38

B - Enregistrement des courants	40
C - Analyse des courants enregistrés	42
1 - Conductances unitaires	42
2 - Conductances globales	43
III - TECHNIQUE DE LYSE ISOSMOTIQUE	43
A - Principe	43
B - Protocole utilisé	44
IV - TEST DE CROISSANCE PARASITAIRE	44
V - WESTERN BLOTS	45
A - Préparation des protéines membranaires	45
B - Extraction et dénaturation des protéines	45
C - Electrophorèse et marquage immunologique	45
 CHAPITRE 1 - CARACTERISATION DES CANAUX ANIONIQUES DE L'ERYTHROCYTE INFECTE EN CONFIGURATION CELL-ATTACHED	 47
I - RESUME EN FRANÇAIS	47
A - Contexte de l'étude	47
B - Résultats obtenus	48
1 - Conditions expérimentales utilisées	48
2 - Trois types de canaux anioniques spontanément actifs dans la membrane du globule rouge infecté	49
C - Discussion	50
II - ARTICLE <i>Blood Cells, Molecules, and Diseases</i>	51
 CHAPITRE 2 - INFLUENCE DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	 52
I - EFFETS DES CONCENTRATIONS IONIQUES SUR LES COURANTS MEMBRANAIRES DE L'ERYTHROCYTE INFECTE	53
A - Résumé en français	53
1 - Principes de l'étude	53
2 - Résultats obtenus en configuration <i>whole-cell</i>	54
3 - Résultats obtenus en configuration <i>cell-attached</i>	54
4 - Bilan de cette étude : vers un modèle unificateur	55
B - Article <i>Proceedings of the National Academy of Sciences</i>	56
II - EFFETS DE LA PRESENCE DE SERUM SUR LES CONDUCTANCES UNITAIRES	57
A - Résumé du principe et des résultats de l'étude	57
B - Effects of serum on the anion channels in <i>Plasmodium falciparum</i> -infected red cell membrane	58
 CHAPITRE 3 - IMPLICATION D'UN RECEPTEUR PBR ENDOGENE DANS LES NOUVELLES VOIES DE PERMEABILITE MEMBRANAIRE DE L'ERYTHROCYTE INFECTE	 62
I - RESUME EN FRANÇAIS	62
A - Contexte de l'étude	62
B - Résultats obtenus	63
1 - Présence des sous-unités du récepteur PBR dans la membrane érythrocytaire	63
2 - Effets des ligands PBR sur la conductance anionique globale des érythrocytes infectés.	64
3 - Effets des ligands du PBR sur la lyse isosmotique induite par le sorbitol et la croissance de <i>Plasmodium falciparum</i> <i>in vitro</i>	64
C - Discussion	65
II - IMPLICATION OF ENDOGENOUS PERIPHERAL BENZODIAZEPINE RECEPTOR IN THE NEW PERMEATION PATHWAYS OF MALARIA-INFECTED HUMAN ERYTHROCYTES	66
A - Context of the study	66

B - Results	69
1 - Detection of PBR subunits in the red cell membrane	69
2 - Effects of PBR ligands on anion conductance of infected cells	70
3 - Effects of PBR ligands on sorbitol-induced haemolysis of infected cells	70
4 - Effects of PBR ligands on <i>Plasmodium falciparum</i> growth <i>in vitro</i>	71
C - Discussion	72
1 - The PBR complex is present in the red cell membrane	72
2 - Correlation between the different strategies: implication of PBR in the NPPs	72
3 - Discussion on VDAC properties	73
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	74
I - VERS UN MODELE UNIFICATEUR DES CANAUX ANIONIQUES DANS LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE INFECTE	75
A - Activation des canaux endogènes au cours de l'infection	75
B - Correspondance des résultats de cette étude électrophysiologique avec les données de la littérature	78
II COMMENT RELIER CES RESULTATS AUX CARACTERISTIQUES DES NPPs ?	80
A - Considérations techniques	80
B - L'hypothèse de l'implication d'un récepteur PBR dans le phénomène des NPPs	81
1 - Données bibliographiques	81
2 - Résultats de l'étude	82
3 - L'hypothèse d'un récepteur PBR endogène au sein des NPPs	83
III - PERSPECTIVES	87
BIBLIOGRAPHIE	90

ANNEXE I : Article *PLoS Pathogens*

Plasmodium falciparum regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance

ANNEXE II : Article *Trends in Parasitology*

Anion channels in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and protein kinase A

EN BREF : MALARIA ET ELECTROPHYSIOLOGIE

Contexte général de l'étude

Ce travail de thèse porte sur un exemple d'interaction hôte / pathogène. Les objectifs sont de mieux comprendre la relation entre un parasite intracellulaire, *Plasmodium falciparum*, l'un des agents responsables du paludisme, et l'une de ses cellules-hôtes, l'érythrocyte humain. Il s'agit plus particulièrement de décrire par des techniques d'électrophysiologie les modifications de la perméabilité membranaire de la cellule-hôte observées lors de l'infection.

En pénétrant dans l'érythrocyte, *Plasmodium* se met à l'abri du système immunitaire, mais en contrepartie ses échanges avec le milieu extérieur deviennent complexes. En particulier, les nutriments nécessaires à son développement et les produits issus de son métabolisme doivent franchir la membrane érythrocytaire. On sait depuis les premiers travaux de l'équipe de Hagai Ginsburg au début des années 80, que la perméabilité membranaire du globule rouge est fortement augmentée durant l'infection. Ces modifications sont nécessaires pour l'accomplissement du cycle de développement érythrocytaire du parasite. Alors qu'une partie des flux observés à travers la membrane de l'érythrocyte infecté peut aisément s'expliquer par une augmentation de l'activité de transporteurs endogènes connus, une autre part importante semble liée à la mise en place de nouvelles voies de perméabilité appelées NPPs (pour New Permeation Pathways). Cependant, à l'heure actuelle, le nombre de voies constituant ces NPPs, leur nature moléculaire ou leur origine (parasitaire ou endogène) restent très mal connus. La caractérisation de ces voies de transport présente pourtant beaucoup d'intérêts, d'un point de vue fondamental dans la relation hôte / parasite et surtout d'un point de vue pharmacologique puisqu'elle pourrait permettre d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques. Ces NPPs, par leur sélectivité ou leur pharmacologie, ont des propriétés de canaux anioniques. Ainsi l'électrophysiologie est logiquement devenue un outil important

dans la caractérisation des altérations de la perméabilité membranaire des érythrocytes lors de l'infection.

En effet, les techniques d'électrophysiologie (*patch-clamp*), développées à la fin des années 1970 par Erwin Neher et Bert Sakmann (Hamill *et al.*, 1981; Neher and Sakmann, 1976) permettent, dans la plupart des types cellulaires, de caractériser le passage rapide d'ions aux travers de voies de conductance (canaux ioniques) présentes dans les membranes cellulaires. Jusqu'aux années 2000, ces techniques étaient assez peu appliquées aux membranes des globules rouges humains, structures non excitables, de petite taille et surtout très déformables, ce qui rendait difficile l'emploi des micropipettes utilisées en *patch-clamp*. Néanmoins, depuis quelques années cette application s'est bien développée et aujourd'hui l'électrophysiologie est devenue un outil complémentaire puissant dans l'étude des propriétés membranaires de l'érythrocyte, et de leurs modifications lors de l'infection par *P. falciparum*.

Cependant les résultats publiés par les différentes équipes travaillant sur le sujet depuis 2000 restent très contradictoires. De fait, si l'électrophysiologie a pu confirmer la présence de canaux anioniques spontanément actifs dans la membrane du globule rouge infecté, leur nombre, nature et origine restent, comme pour les NPPs, indéterminés. L'équipe de S. Desai, à Bethesda, propose l'existence d'un seul canal d'origine parasitaire, alors que les groupes de F. Lang à Tübingen, de H. DeJonge à Rotterdam et de S. Thomas à Roscoff montrent différents canaux endogènes activés lors de l'infection.

L'équipe de Physiologie Cellulaire de la Station Biologique de Roscoff travaille depuis de nombreuses années sur les transporteurs membranaires des globules rouges, nucléés ou non, et sur leur implication dans le transport des gaz respiratoires. L'activité des canaux ioniques y est un sujet particulièrement important. L'équipe a d'abord travaillé sur les globules rouges de différents modèles aquatiques (truite, lamproie), puis de poulet infectés ou non par *Plasmodium gallinaceum*, et enfin sur les érythrocytes humains infectés ou non par *P. falciparum*.

Deux thèses sur l'érythrocyte humain et l'infection ont été soutenues en 2004. Elles démontrent l'existence de canaux anioniques, peu actifs dans la membrane du globule rouge sain et par contre très actifs lors de l'infection.

Résumé des objectifs et résultats

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse ont été de poursuivre la caractérisation des différents types de canaux anioniques présents dans la membrane du globule rouge infecté. Dans un premier temps, j'ai cherché à décrire les canaux spontanément actifs dans la membrane de l'érythrocyte infecté, dans des conditions expérimentales aussi proches que possible des conditions physiologiques, et à relier ces résultats aux canaux décrits dans la membrane de l'érythrocyte sain. Ce travail m'a permis de décrire, au niveau unitaire, trois types de canaux anioniques actifs dans la membrane de l'érythrocyte infecté : l'IRC pour *Inwardly Rectifying Channel*, le SCC pour *Small Conductance Channel*, et l'ORC pour *Outwardly Rectifying Channel*. L'IRC et l'ORC correspondent aux canaux endogènes déjà décrits à Roscoff ; le SCC n'avait par contre pas été décrit jusqu'ici dans la membrane de l'érythrocyte sain ou infecté.

Par ailleurs, il semblait important d'étudier les conditions expérimentales utilisées par les autres équipes, pour comprendre l'origine des différences entre les résultats publiés depuis 2000. J'ai donc mis en place un protocole permettant d'évaluer l'importance des concentrations ioniques utilisées, ce qui m'a permis de relier les canaux décrits au cours de la première partie de l'étude aux modèles proposés par les différents groupes. En particulier, le SCC correspond au canal décrit par le groupe de S. Desai, et à un des canaux endogènes proposés par le groupe de F. Lang.

De même, le comportement des canaux semble être profondément modifié lorsque du sérum est présent lors des enregistrements. J'ai pu commencer à détailler au niveau unitaire l'effet de cette présence de sérum, qui n'avait été décrit jusqu'ici

qu'au niveau global sur la membrane entière de l'érythrocyte infecté. En particulier, le comportement de l'IRC présente de fortes modifications en présence de sérum, pouvant expliquer les modifications de la conductance observées au niveau global.

Enfin j'ai également voulu tester des hypothèses quant à la nature possible des canaux présents, dans le globule rouge sain et infecté. En étudiant les propriétés connues de la conductance anionique de l'érythrocyte infecté, et grâce aux résultats acquis durant les premières parties de ce travail, j'ai pu proposer une nouvelle hypothèse quant à l'identité du canal anionique présent, et mettre en évidence d'un point de vue pharmacologique son importance dans la génération du phénomène des NPPs.

Parallèlement à ce travail, j'ai également participé à une étude commencée depuis quelques années et rassemblant plusieurs équipes, étude qui vise à décrire l'implication d'étapes de phosphorylation dans l'activation des canaux anioniques du globule rouge humain lors de l'infection.

Liste des Publications

Malaria :

Merckx, A., Bouyer, G., Thomas, S.L., Langsley, G. and Egee, S. (2009) Anion channels in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and protein kinase A. *Trends Parasitol*, **25**, 139-144.

Merckx, A., Nivez, M.P., Bouyer, G., Alano, P., Langsley, G., Deitsch, K., Thomas, S., Doerig, C. and Egee, S. (2008) *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog*, **4**, e19.

Bouyer, G., Egee, S. and Thomas, S.L. (2007) Toward a unifying model of malaria-induced channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 11044-11049.

Bouyer, G., Egee, S. and Thomas, S.L. (2006) Three types of spontaneously active anionic channels in malaria-infected human red blood cells. *Blood Cells Mol Dis*, **36**, 248-254.

Autres :

Lapaix, F., Bouyer, G., Thomas, S. and Egee, S. (2008) Further characterization of cation channels present in the chicken red blood cell membrane. *Bioelectrochemistry*, **73**, 129-136.

Decherf, G., Bouyer, G., Egee, S. and Thomas, S.L. (2007) Chloride channels in normal and cystic fibrosis human erythrocyte membrane. *Blood Cells Mol Dis*, **39**, 24-34.

Présentations en conférences internationales

2^{ème} congrès BIOMALPAR, Avril 2006 à Heidelberg (Allemagne).

Poster : Three types of spontaneously active anionic channels in malaria-infected human red blood cells.

16^{ème} congrès EARCR (European Association for red Cell Research), Mars 2007, Oxford.

Présentation orale : Chloride channels in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell membrane

45^{ème} colloque GPLF (Groupement des Protistologues de Langue Française), Mai 2007, Roscoff.

Présentation orale : Chloride channels in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell membrane

LISTE DES ABBREVIATIONS

ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ANT : Adenine Nucleotide Transporter
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
BZRP : Benzodiazepine Receptor (Peripheral-type)
CF : Cystic Fibrosis
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
ClC : Chloride Channel
DBI : Diazepam Binding Inhibitor
DIDS : 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonate
EDTA : acide Ethylène Diamine TetraAcétique
EGTA : acide Ethylène Glycol TetraAcétique
EIPA : 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride
EPO : érythropoïétine
GABA : Gamma-Amino Butyric Acid
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
IBP : Isoquinoline Binding Protein
IRC : Inwardly Rectifying Channel
LC-MS/MS : Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
Maldi-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time-Of-Flight mass spectrometry
MRP : Multidrug Resistance-associated Protein
nA, pA : nanoAmpere, picoAmpere
NMDG : N-Méthyl-D-Glucamine
NPPB : 5-Nitro-2-(3-PhenylPropylamino) Benzoic acid
NPPs : New Permeation Pathways
nS, pS : nanoSiemens, picoSiemens
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORC : Outwardly Rectifying Channel
PAP-7 : PBR-Associated Protein 7
PBR : Peripheral Benzodiazepine Receptor
PGE2 : prostaglandine E2
PK11195 : 1-(2-chlorophenyl)-N-(1-methyl-propyl)-3-isoquinolinecarboxamide
PKA : Protéine Kinase AMPc-dépendante
PNUD : Programme des Nations-Unies pour le Développement
PPIX : Protoporphyrine IX
PSAC : Plasmodial Surface Anion Channel
Ro5-4864 : 4'-chlorodiazepam, 7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepine-2-one
ROS : Reactive Oxygen Species
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
SCC : Small Conductance Channel
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
TRIS : Tris (hydroxyméthyl)aminométhane hydrochloride
TSPO : Translocator Protein
TTN : Triakontatetraneuropeptide
UNICEF: United Nations Children's Emergency Fund
VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES :

Figure 1 : Principales voies de transport du globule rouge humain

Figure 2 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*

Figure 3 : Prévision de l'évolution des concentrations ioniques (Na⁺, K⁺) et du volume de l'érythrocyte au cours de l'infection

Figure 4 : Solutés pour lesquels une perméabilité *via* les NPPs a été démontrée

Figure 5 : Taux de transport relatifs à différents solutés via les NPPs dans la membrane des globules rouges infectés

Figure 6 : Les trois configurations du *patch-clamp* utilisées sur le globule rouge infecté

Figure 7 : Enregistrements caractéristiques d'un globule rouge infecté, en configuration *whole-cell*

Figure 8 : Effet de la présence de sérum sur la conductance globale

Figure 9 : Canal actif en configuration *excised* dans la membrane de l'érythrocyte sain ou infecté.

Figure 10 : Modèles proposés de modifications de la perméabilité membranaire de l'érythrocyte lors de l'infection par *P. falciparum*

Figure 11 : Les différents stades de développement de *Plasmodium falciparum*, après coloration au Giemsa

Figure 12 : Les différentes configurations du *patch-clamp*

Figure 13 : Principes de l'analyse des courants enregistrés en *patch-clamp*

Figure 14 : Population de globules rouges parasités colorée au SybrGreen et lue en cytométrie

Figure 15 : Evolution de la conductance globale des érythrocytes infectés en fonction de la concentration en chlorure

Figure 16 : Evolution du comportement de l'IRC avec la concentration en chlorure.

Figure 17 : Evolution du comportement du SCC avec la concentration en chlorure.

Figure 18 : Enregistrements des canaux IRC et SCC actifs simultanément dans la membrane

Figure 19 : Properties of the IRC in cell-attached configuration, without serum

Figure 20 : Properties of the IRC in cell-attached configuration after serum preincubation

Figure 21 : Presence of PBR subunits in the red cell membrane.

Figure 22 : Maldi-TOF readings of the different bands after trypsin digestion.

Figure 23 : Typical effect of Ro5-4864 (10 M) on the whole-cell conductance of an infected cell.

Figure 24 : Effects of Ro5-4864, PK11195 and Diazepam on the serum-induced whole-cell conductance

Figure 25 : Example of the effects of 50 M PK11195 or Ro5-4864 on sorbitol-induced haemolysis

Figure 26 : Effects of the PBR ligands on sorbitol-induced haemolysis

Figure 27 : Effect of PBR ligands on *Plasmodium falciparum in vitro* growth during 72h

Figure 28 : Structure et interactions du complexe PBR

Figure 29 : Multiples états de conductance du VDAC

Figure 30 : Enregistrements d'un maxi-canal anionique dans la membrane de l'érythrocyte non infecté

TABLEAUX

Tableau 1: Concentrations ioniques du plasma et de l'érythrocyte humain

Tableau 2 : Composition du milieu de culture complémenté (pour 5L de milieu)

Tableau 3 : Solutions utilisées pour les études en configuration *cell-attached*

Tableau 4 : Récapitulatif des caractéristiques des canaux anioniques actifs en configuration *cell-attached* dans la membrane du globule rouge infecté.

Table 5 : Summary of the pharmacological results obtained with PBR ligands

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I - Le globule rouge humain

A - Originalité et caractéristiques physico-chimiques

Le sang est un tissu particulier de l'organisme, qui remplit de nombreuses fonctions importantes. Au premier rang, le transport des gaz respiratoires réalisé essentiellement par les globules rouges permet une distribution adaptée de l'oxygène aux tissus et un retour du dioxyde de carbone vers les poumons. Pour assurer ces fonctions, les érythrocytes sont des cellules très différenciées, et la majorité des protéines érythrocytaires, membranaires ou cytoplasmiques, ont pour rôle le maintien de cette capacité de transport d'O₂ et de CO₂. C'est pourquoi, compte-tenu de la simplicité de ces cellules qui ont perdu leur noyau et leurs organites, les globules rouges humains ont toujours été un modèle biologique très utilisé pour l'étude des transports membranaires.

Les globules rouges humains proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, présentes dans la moelle osseuse, au cours de l'érythropoïèse. Sous l'action de l'érythropoïétine (EPO), ces cellules se différencient et perdent leur noyau, formant des réticulocytes qui entrent dans la circulation sanguine. Ceux-ci terminent leur maturation en 24 à 48h, avec les dernières synthèses d'hémoglobine puis la perte des mitochondries et des ribosomes (Klinken, 2002). Les globules rouges matures remplissent alors leur rôle principal de transporteurs des gaz respiratoires, pendant une durée de vie moyenne de 120 jours, avant d'être retirés de la circulation par les macrophages, particulièrement dans la rate.

Les globules rouges humains sont des cellules petites, en forme de disque biconcave d'un diamètre de 8µm, d'une épaisseur de 2µm et d'un volume moyen de 90 fL. Du fait de leur forme, la surface de membrane de 130 µm² est en excès de 40 %

	Plasma	Erythrocyte
<u>Cations :</u>		
Na ⁺	145	11
K ⁺	4.5	140
Ca ²⁺	2	0.0001
Mg ²⁺	1	1.5 - 2.4
<u>Anions</u>		
Cl ⁻	105	80
HCO ₃ ⁻	24	variable
HPO ₄ ²⁻	4	
protéines	14 (60 à 80g/L)	5 (340 g/L)
autres	6	

Tableau 1 : Concentrations ioniques du plasma et de l'érythrocyte humain, en mM

par rapport à une sphère de même volume, ce qui, associé à l'absence de noyau, permet à ces cellules de supporter des augmentations de volume très fortes, ou de passer dans des capillaires d'un diamètre plus petit que leur propre diamètre. Les érythrocytes représentent 40 à 45 % du volume sanguin, constituant ainsi la population très majoritaire du sang ; on en trouve de 4 à 6 millions dans un microlitre de sang.

Du fait de leur spécialisation, le cytoplasme des érythrocytes a un contenu très particulier, extrêmement riche en protéines. Il contient environ 5 mM d'hémoglobine, soit environ 340 g/L, ce qui représente environ 98 % de la masse protéique du globule rouge.

B - L'homéostasie du globule rouge

La capacité des érythrocytes à transporter les gaz respiratoires repose essentiellement sur deux molécules, présentes en très grande quantité dans le globule rouge : l'hémoglobine, cytoplasmique, transporteur de l'O₂, et l'échangeur d'anions membranaire Cl⁻/HCO₃⁻ (ou bande 3). Ce dernier est nécessaire au transport de CO₂ *via* le cycle de Jacobs-Stewart impliquant l'anhydrase carbonique (Jacobs and Stewart, 1942). Les érythrocytes supportent en effet 70 % du transport de CO₂ par le sang. Mais pour permettre le bon fonctionnement de ces deux machines moléculaires, tout un réseau de transporteurs membranaires et d'effecteurs cytoplasmiques sont présents. Ils permettent la régulation de la composition ionique, du volume ou de l'équilibre acido-basique d'une cellule circulante, dont l'environnement direct peut varier de façon très forte et très rapide. L'activité de ces transporteurs membranaires permet le maintien, en situation physiologique, d'un pH intracellulaire proche de 7.2, et des concentrations ioniques définies dans le tableau 1, avec celles du plasma.

Les transporteurs présents dans les membranes de toutes les cellules en général et de l'érythrocyte en particulier peuvent être classés en plusieurs catégories selon leur mode de fonctionnement.

- Les transporteurs actifs utilisent de l'énergie pour transporter des molécules contre leur gradient chimique ou électrochimique. Les transports actifs primaires utilisent en général directement l'énergie d'hydrolyse de l'ATP (on les appelle des pompes), les transporteurs actifs secondaires utilisant quant à eux les gradients construits grâce aux transporteurs actifs primaires. Ce sont toujours des cotransporteurs (symports ou antiports).

- Les transporteurs passifs permettent le passage à travers la membrane de molécules suivant leur gradient de diffusion. Ils peuvent être très spécifiques ou non d'un soluté. Parmi eux se trouvent les canaux ioniques, spécialisés dans le transport des molécules chargées. Par opposition aux autres transporteurs membranaires, les canaux ioniques (plus ou moins sélectifs) sont tous non saturables (du moins à des concentrations physiologiques), non stéréospécifiques et ont une faible énergie d'activation. En effet, si les autres types de transporteurs fixent de façon transitoire des solutés pour les transférer à travers la membrane, les canaux ioniques sont des pores aqueux, contenant un filtre de sélectivité, qui peuvent s'ouvrir ou se fermer. Il s'agit donc de transporteurs très efficaces, puisque le flux d'ions à travers un canal peut atteindre 100 millions d'ions par seconde, soit une vitesse 10^5 fois supérieure à la vitesse maximale de transport obtenue par l'intermédiaire de n'importe quel autre type de protéine de transport. Les mécanismes contrôlant l'ouverture ou la fermeture de ces canaux sont très variés, allant de la variation du potentiel membranaire (canaux voltage-dépendant), au stress mécanique (canaux mécanosensibles) ou à la fixation d'un ligand (récepteur-canal).

C - Différents types de transporteurs dans la membrane de l'érythrocyte

Dans la membrane du globule rouge, différents transporteurs sont décrits et plus ou moins bien caractérisés.

1 - Transporteurs actifs

Différents types de transporteurs actifs primaires sont décrits dans la membrane du globule rouge. La pompe Na^+/K^+ permet le maintien d'une forte concentration intracellulaire en potassium (environ 140 mM) et d'une faible concentration en sodium (environ 10 mM) (Tosteson and Hoffman, 1960). On trouve également la pompe calcique, qui permet de maintenir la concentration de calcium intracellulaire libre inférieure à 0.1 μM (Dagher and Lew, 1988).

Il semble également que la sortie de glutathion oxydé (sous forme de dimère GSSG) se fasse par l'intermédiaire d'une pompe nécessitant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP (Kondo *et al.*, 1987) qui pourrait être une protéine de la famille MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) (Pulaski *et al.*, 1996).

D'autres transporteurs utilisent les gradients établis par la pompe Na^+/K^+ pour faire franchir la membrane à des solutés contre leur gradient chimique. Parmi eux, on trouve en particulier des antiports ioniques indispensables aux fonctions métaboliques des érythrocytes, comme la bande 3, protéine la plus abondante dans la membrane des globules rouges. D'autres échangeurs ioniques permettent de maintenir l'homéostasie de l'érythrocyte. En particulier, un échangeur Na^+/H^+ intervient dans la régulation du pH intracellulaire (Semplicini *et al.*, 1989), un cotransporteur K^+/Cl^- et un cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ sont impliqués dans la régulation du volume de l'érythrocyte (Haas, 1989; Lauf *et al.*, 1992). Leur activité varie avec la pression partielle en O_2 (Gibson *et al.*, 2000), avec l'âge des érythrocytes (Bize *et al.*, 2003) ou l'état physiopathologique des cellules, comme dans le cas de l'anémie falciforme (Lew and Bookchin, 2005).

Il existe également différents cotransporteurs utilisant le gradient entrant de sodium pour faire entrer différents acides aminés dans la cellule, en particulier l'alanine, la sérine et la cystéine (système ASC), la glycine (système Gly), et la glutamine (système N) (Tunncliffe, 1994).

2 - Transporteurs passifs

Cabantchik (Cabantchik, 1999) distingue différentes catégories de transporteurs passifs dans la membrane de l'érythrocyte : un transporteur de choline (Deves and Krupka, 1979), des transporteurs d'hexoses (GLUT 1, 2 et 5) (Concha *et al.*, 1997), différents transporteurs d'acides aminés (leucine, tryptophane, acides aminés dibasiques) (Tunnichiff, 1994), un transporteur de monocarboxylate (MCT) (Poole and Halestrap, 1993), un transporteur de nucléoside (NT1) (Tse *et al.*, 1985) et un transporteur d'urée. Ces différents transporteurs permettent, en particulier, l'entrée des solutés nécessaires au fonctionnement de la glycolyse (seule voie métabolique permettant de couvrir les besoins en énergie de l'érythrocyte), et l'évacuation des déchets métaboliques.

Enfin, à ces transporteurs passifs de solutés, il faut rajouter les canaux ioniques présents dans la membrane de l'érythrocyte. Si les transporteurs précédemment décrits ont fait l'objet de nombreuses études, en revanche les canaux ioniques de l'érythrocyte humain restent encore très mal connus.

3 - Canaux ioniques

a - Canal Gardos

Dans les années 1950, Gardos démontre l'activation possible d'un flux de potassium dans la membrane des érythrocytes humains (Gardos, 1958). Dès 1981 avec les débuts du *patch-clamp*, Owen Hamill publie les premiers enregistrements de courants potassiques sur la membrane du globule rouge humain, démontrant ainsi que l'effet Gardos repose sur l'activité d'un canal potassique (Hamill, 1981). Ce canal, désormais appelé canal Gardos, est dépendant de la présence de calcium (activé dès 0.5 μM de Ca^{2+} sur la face interne de la membrane), et peut également être activé par le plomb (Grygorczyk and Schwarz, 1983). D'une conductance unitaire de 20pS en conditions symétriques KCl, il est le seul canal ionique identifié au niveau moléculaire dans la membrane de l'érythrocyte humain : il s'agit du canal hSK4

(*human small conductance calcium-activated K⁺ channel 4*) codé par le gène *kcnk4* (Hoffman *et al.*, 2003).

b - Canal cationique non sélectif

Un canal cationique, non sélectif et voltage-dépendant, a également été décrit (Christophersen and Bennekou, 1991). Ce canal, dont la conductance est d'environ 20pS, est couplé à un récepteur à l'acétylcholine (Bennekou, 1993). Il est perméable aux cations mono- et divalents (Ca²⁺ notamment), et peut être activé par une forte dépolarisation, par exemple dans un milieu à faible concentration en ions chlorure (Bennekou *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'équipe d'I. Bernhardt a décrit un autre canal cationique non sélectif, voltage-indépendant, et sensible à la prostaglandine PGE2 (Kaestner and Bernhardt, 2002; Kaestner *et al.*, 1999). Toutefois il n'est pas exclu que la description électrophysiologique des deux canaux résulte de l'activité d'une seule protéine ayant des comportements différents selon les conditions expérimentales (Kaestner *et al.*, 2000). L'équipe de F. Lang a également suggéré la présence d'un canal cationique non sélectif, sensible à l'oxydation et aux concentrations en ions chlorure, et inhibé par l'amiloride, le gadolinium ou l'EIPA (Duranton *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003). Il pourrait encore s'agir du même canal, d'une conductance équivalente mais dont le phénotype électrophysiologique pourrait dépendre des conditions expérimentales utilisées.

c - Canal calcium

Les travaux du groupe de P. Romero suggèrent également la présence d'un canal calcium mécano-sensible et voltage-dépendant dans la membrane des érythrocytes. Deux types différents de canaux (de type L et R) seraient présents, visibles en flux isotopiques et en marquage immunologique. Leur fonctionnement serait dépendant de l'âge des cellules (Romero and Romero, 1999; Romero *et al.*, 2006). Par ailleurs, un flux de calcium mécano-dépendant dans la membrane du globule rouge a été démontré, suite à un stress mécanique (Larsen *et al.*, 1981) ou *via*

passage des globules rouges à travers une membrane de filtration (Brain *et al.*, 2004). Enfin la pompe Ca^{2+} pourrait ponctuellement se comporter comme un canal calcique de type B, l'étude de Pinet *et al* suggérant même la présence de canaux de ce type dans la membrane (Pinet *et al.*, 2002).

d - Canaux anioniques

Les études sur le transport d'anions à travers la membrane du globule rouge ont longtemps été cantonnées à des travaux sur les cotransporteurs ioniques, dont la bande 3, du fait de son importance (elle représente 50 % des protéines intégrales de la membrane des érythrocytes) et de son rôle prépondérant dans la physiologie de la respiration. En conséquence, on a longtemps pensé que la bande 3, associée aux différents cotransporteurs d'ions chlorure, suffisait à expliquer les flux d'anions à travers la membrane érythrocytaire. Cependant, la présence de canaux anioniques est suggérée par deux idées : d'une part, le potentiel de membrane de l'érythrocyte est aux environs de -10 mV (Hoffman and Laris, 1974; Lassen and Sten-Knudsen, 1968), soit une valeur similaire à celle du potentiel d'équilibre électrochimique calculé pour les ions chlorure. Ces données suggèrent que les ions Cl^- peuvent franchir très facilement la membrane et qu'une voie de fuite électrogénique existe. D'autre part, il semble logique que les mouvements d'ions Cl^- via la bande 3 soient compensés par des mouvements en sens inverse de façon rapide pour permettre la charge et la décharge des globules rouges en HCO_3^- . Il n'est pas exclu, néanmoins, que la bande 3 puisse ponctuellement changer de sens de fonctionnement pour rééquilibrer les concentrations intracellulaires en ions chlorure. Cependant un flux anionique net peut être mesuré en perméabilisant la membrane érythrocytaire au potassium avec la valinomycine (Hunter, 1977). Freedman et collaborateurs ont montré que ce flux anionique est voltage-dépendant et DIDS-insensible (le DIDS est un inhibiteur de la bande 3) confirmant la présence d'un canal anionique (Freedman *et al.*, 1994).

De plus, dès 1989, Schwarz et collaborateurs ont présenté des enregistrements de courants unitaires certainement dus selon eux à un flux anionique (Schwarz *et al.*,

1989). Vingt ans plus tard, il reste difficile d'attribuer des identités moléculaires à ces canaux anioniques.

Plusieurs études suggèrent la présence d'un canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane-conductance Regulator) dans la membrane des érythrocytes. La protéine semble bien présente dans la membrane car visible en western blot, en immunocytochimie et par microscopie à force atomique (Abraham *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2006; Schillers, 2008). Ce canal fait partie de la famille des transporteurs ABC (pour ATP Binding Cassette), présentant deux sites de liaison à l'ATP, et dont l'activité est régulée par la fixation et / ou l'hydrolyse de l'ATP (Hyde *et al.*, 1990). En plus de ce rôle de canal anionique, le canal CFTR a également la capacité d'agir comme régulateur d'autres conductances, ce qui rend difficile leur étude (voir revue de (Schwiebert *et al.*, 1999)). Même si la protéine semble bien présente dans la membrane de l'érythrocyte, il n'est pas encore certain qu'elle y joue un rôle de canal. En effet, aucun enregistrement de conductance unitaire de ce canal n'a pu encore être montré.

e - Bilan des conductances

A l'heure actuelle, seule la présence du canal Gardos est pleinement confirmée, depuis l'ARNm, dans les précurseurs des érythrocytes, jusqu'à la protéine dans les membranes (western blot) avec signature électrophysiologique. On peut affirmer que la membrane des érythrocytes possède également un ou différents types de canaux cationiques non sélectifs, dont la nature moléculaire n'est pas définie. De plus, il est également certain que des canaux anioniques sont présents, même s'il est encore difficile à l'heure actuelle d'avoir des certitudes sur leur nature moléculaire, leur nombre et leur activité.

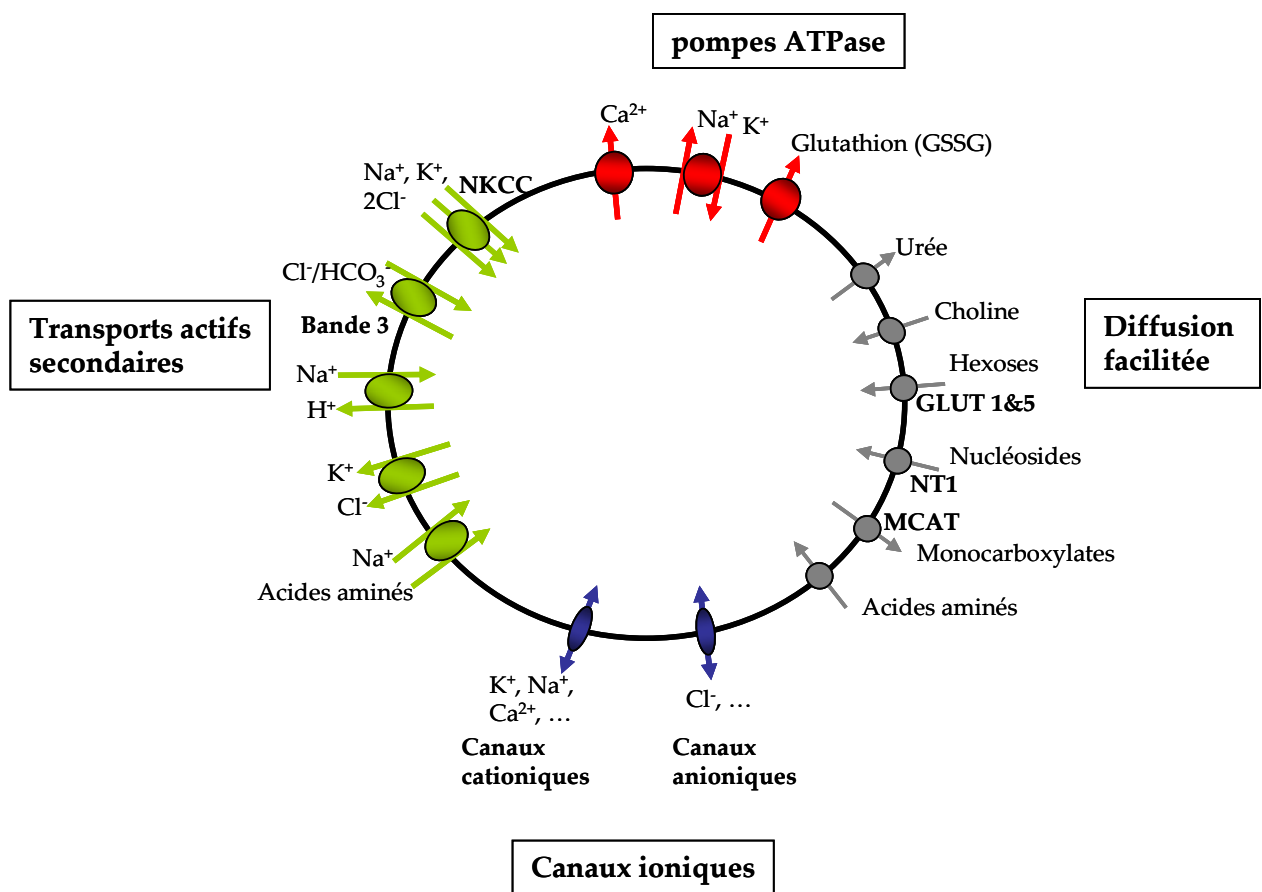


Figure 1 : Principales voies de transport du globule rouge humain

E - Les systèmes de transport de l'érythrocyte et l'invasion par *P. falciparum*

Le globule rouge humain est donc, en résumé, bien plus qu'un simple sac d'hémoglobine. Les voies de transport présentes dans sa membrane (figure 1) sont d'une part directement liées à son rôle principal de transporteur de gaz respiratoires, *via* le maintien des concentrations ioniques pour le fonctionnement de la bande 3 (donc le transport du CO₂), et du pH intracellulaire pour l'association oxygène-hémoglobine. Les cotransporteurs et canaux ioniques sont donc indispensables à ces fonctions. D'autre part ces transporteurs permettent de maintenir son homéostasie durant ses 120 jours de durée de vie, avec des adaptations nécessairement rapides à un environnement extracellulaire variable.

La connaissance des transporteurs présents dans la membrane de l'érythrocyte, et en particulier des canaux anioniques, est devenue très importante dans le cadre de l'étude des modifications des propriétés de l'érythrocyte humain lors de son infection par *Plasmodium falciparum*, parasite responsable du paludisme. En effet, l'entrée d'un tel parasite dans ce système bouscule évidemment l'homéostasie du globule rouge. Pour répondre aux besoins du parasite, les activités des transporteurs de la membrane de la cellule-hôte se trouvent fortement modifiées. Les premiers résultats obtenus au début des années 80 par les équipes de H. Ginsburg puis de K. Kirk ont démontré indirectement l'implication de canaux anioniques dans les modifications de perméabilité observées lors de l'infection (Ginsburg, 1994; Ginsburg *et al.*, 1983; Kirk, 2001).

II - Eléments généraux sur la malaria et Plasmodium falciparum

A - Histoire de la découverte de Plasmodium

Les symptômes de la maladie sont connus depuis plus de 3000 ans (dans les écrits égyptiens, puis chinois ou grecs), mais on a longtemps cru que la maladie était associée à des miasmes présents aux environs des zones marécageuses, d'où ses noms : malaria provenant de l'italien *mala aria* (littéralement « mauvais air ») ou paludisme en français, du latin *paludis*, marais.

En 1880, le français Charles Louis Alphonse Laveran découvre l'agent pathogène responsable du paludisme en observant au microscope, dans du sang de soldats souffrant de fièvres intermittentes, des filaments mobiles s'agitant autour d'un globule rouge (il s'agit de microgamètes mâles après exflagellation). La preuve de la transmission par le moustique a été apportée en 1897 par les travaux de l'anglais Ronald Ross. Il observa le développement du parasite dans les moustiques, et réussit la transmission expérimentale chez les oiseaux. Les travaux de ces deux chercheurs ont été récompensés par les prix Nobel de médecine de 1902 pour Ross et 1907 pour Laveran. En 1948, Short et Garnham décrivirent pour la première fois l'infection hépatique de *Plasmodium vivax*. Il faudra cependant attendre 1966 pour que cette étape soit démontrée chez *P. falciparum*, et donc que son cycle de développement complet soit connu.

La maladie est donc causée par un parasite du genre *Plasmodium* (protiste de l'embranchement des *Apicomplexes*) qui se transmet par l'intermédiaire de moustiques femelles du genre *Anopheles* (une soixantaine d'espèces peuvent être vecteurs). Il existe environ 150 espèces différentes de *Plasmodium*, qui infectent de nombreuses espèces de vertébrés. Quatre d'entre elles sont capables d'infecter l'homme : *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. falciparum*, ce dernier étant responsable de l'essentiel de la morbidité et de la mortalité liée au paludisme.

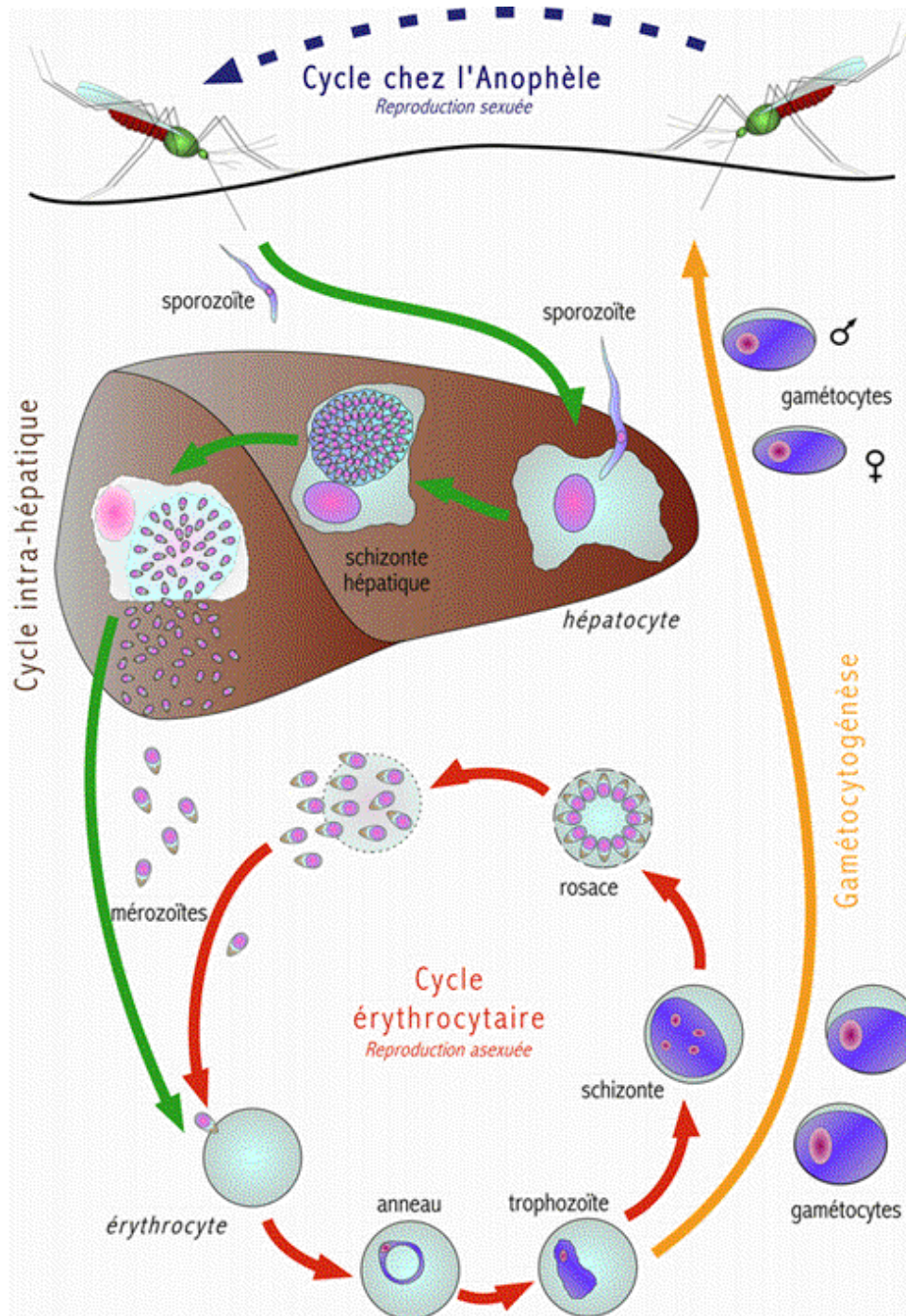


Figure 2 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*

Lors du repas sanguin de l'anophèle, un sporozoïte est introduit dans la circulation sanguine et gagne le foie. Il pénètre dans un hépatocyte et s'y multiplie par schizogonie, ce processus aboutissant à la formation de milliers de mérozoïtes libérés par éclatement de la cellule hôte. Ces mérozoïtes envahissent à leur tour des érythrocytes, amorçant la deuxième phase de multiplication asexuée : le cycle érythrocytaire.

Trois stades successifs peuvent alors être observés : anneau, trophozoïte puis schizonte. Les schizontes donneront de nouveau mérozoïtes infectant, libérés par éclatement du globule rouge.

A partir de certains stades trophozoïtes se forment des gamétocytes mâles et femelles, qui pourront être ingérés par un nouveau moustique dans lequel aura lieu la fécondation (d'après S. Bonnefoy, Institut Pasteur).

B - Données épidémiologique

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus fréquente au monde. La maladie se rencontre dans plus d'une centaine de pays, et la récolte de données fiables reste difficile. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé à 247 millions le nombre d'épisodes palustres en 2006. Toujours selon les estimations de l'OMS pour 2006, entre 610 000 et 1 212 000 personnes en sont décédées, dont 91 % en Afrique, et 85 % sont des enfants de moins de 5 ans (World Malaria Report 2008, OMS). Le paludisme touche essentiellement des régions pauvres et fortement peuplées, facteurs accentuant l'impact de la maladie. Environ 50 % de la population mondiale vit dans des zones impaludées. L'Afrique sub-saharienne est la principale zone touchée, concentrant 60 % des cas de paludisme et 75 % des infections à *P. falciparum*.

L'impact de la malaria a progressé dans le monde durant les années 80 et 90, mais le partenariat Roll Back Malaria, lancé conjointement en 1998 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le Programme des Nations-Unies pour le Développement (PNUD), le Fond des Nations-Unies pour l'Enfance (UNICEF) et la Banque Mondiale a pour objectif de faire reculer de moitié la mortalité et la morbidité imputables au paludisme d'ici à 2010 (rapport mondial sur le paludisme 2005, <http://www.rollbackmalaria.org/wmr2005/>).

C - Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*

Le cycle de développement du parasite est complexe et comporte plusieurs étapes dans chacun de ses hôtes (figure 2). La fécondation a lieu dans l'intestin du moustique, après un repas sanguin, par la rencontre du microgamète mâle, flagellé, et du macrogamète femelle. Le zygote diploïde devient un ookinète mobile, traverse la paroi du tube digestif et forme à sa face interne un oocyste. Après méiose et multiplication, de nombreux sporozoïtes sont libérés et migrent vers les glandes

salivaires, où ils pourront être inoculés à l'homme au cours d'un nouveau repas sanguin.

Chez l'homme, deux phases de multiplication asexuée ont lieu. La première a lieu dans les cellules du foie (cycle intra-hépatique), directement après l'infection par un moustique. Les sporozoïtes introduits dans la circulation sanguine lors de la piqûre gagnent en environ 30 minutes le foie, pénètrent dans les hépatocytes et s'y multiplient par schizogonie, formant à la fin de ce cycle 2 000 à 40 000 mérozoïtes (Mikolajczak and Kappe, 2006). A la suite de cette multiplication végétative d'au moins 7 jours, les mérozoïtes sont libérés par éclatement de la cellule hôte. Cette période correspond chez le malade à la phase d'incubation. Les mérozoïtes gagnent alors la circulation sanguine et vont à leur tour infecter les érythrocytes. C'est la seconde phase de multiplication asexuée, le cycle érythrocytaire, qui est responsable des effets cliniques du paludisme.

En pénétrant dans l'érythrocyte, le parasite s'entoure d'une membrane, qui va délimiter la vacuole parasitophore dans laquelle il va se développer. Il prend d'abord la forme d'un anneau (stade ring, durant une douzaine d'heures) ; puis se différencie en trophozoïte dans lequel le métabolisme devient plus intense. Enfin, à 40h post-invasion, le parasite arrive au stade schizonte, correspondant à une phase rapide de synthèse d'ADN/ARN, pour former de 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. Environ 48h post-invasion, l'érythrocyte infecté finit par éclater, libérant ces mérozoïtes prêts à infecter de nouveaux globules rouges. Sous certaines conditions de stress, les mérozoïtes peuvent se différencier dans le globule rouge en gamétocytes mâles ou femelles, qui resteront dans la circulation et pourront être ingérés par un moustique femelle au cours d'un repas sanguin.

En pénétrant dans l'érythrocyte, *Plasmodium* se met à l'abri des mécanismes de défense humains, et peut accomplir son cycle de développement à l'abri des réactions du système immunitaire. En contrepartie, son environnement extracellulaire direct devient très particulier. Les concentrations ioniques et protéiques dans l'érythrocyte, tout comme le pH, sont différents de ceux du plasma. Le parasite est également

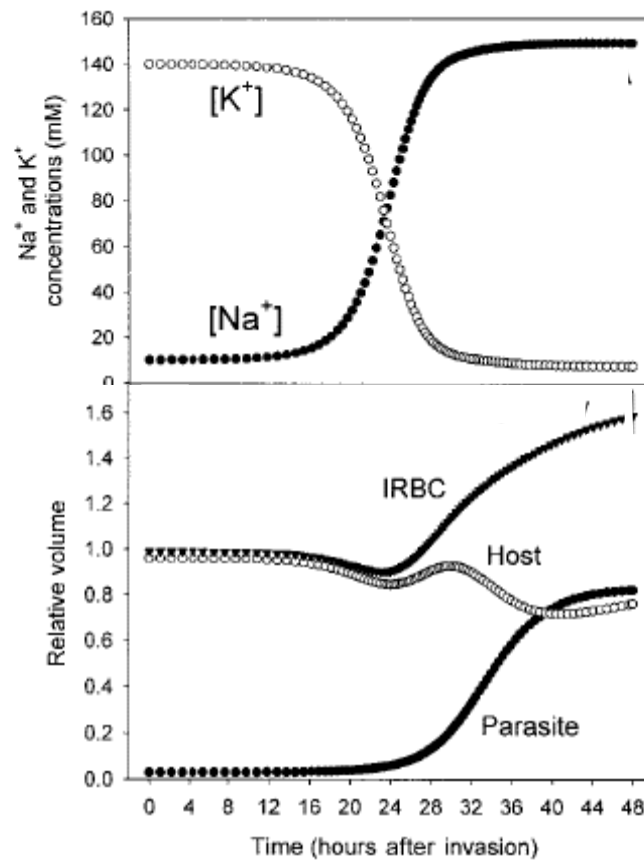


Figure 3 : Prévision de l volution des concentrations ioniques (Na⁺, K⁺) et du volume de l rythrocyte au cours de l'infection d'après (Lew et al., 2003)

Ces prévisions sont issues du modèle Lew-Bookchin. En haut, évolution des concentrations cytoplasmiques Na⁺ et K⁺ de l rythrocyte au cours de l'infection. En Bas, évolution des volumes de l rythrocyte infecté (IRBC), du cytoplasme de la cellule-hôte (Host) et du parasite. Les volumes sont donnés par rapport au volume de l rythrocyte au moment de l'invasion.

nécessairement dépendant des flux traversant la membrane de sa cellule hôte, l'érythrocyte. Ceux-ci doivent pouvoir lui apporter tous les éléments nécessaires à son développement, et permettre l'évacuation des déchets issus de son métabolisme. *Plasmodium* doit donc interagir avec la cellule-hôte pour que son environnement extracellulaire direct lui permette de mener à terme son cycle de développement.

III - Modifications des propriétés membranaires de l'érythrocyte lors de l'infection par *Plasmodium falciparum*

A - De fortes modifications dans le globule rouge infecté

Le parasite a de forts besoins pour réaliser son cycle de développement et produire jusqu'à 32 nouveaux parasites en 48h. Ainsi, le métabolisme global d'un érythrocyte est fortement augmenté durant l'infection. Par exemple, la consommation de glucose et la production de lactate issue du métabolisme sont multipliées par 50 à 100 (Roth, 1990). De même, les concentrations ioniques, le pH et le volume de l'érythrocyte sont fortement modifiés au cours du développement intraérythrocytaire. Le modèle intégré Lew-Bookchin (Lew and Bookchin, 1986) prédit ainsi une inversion des gradients Na^+ et K^+ complète après une trentaine d'heures (figure 3), conférant ainsi au cytosol de la cellule-hôte les caractéristiques ioniques d'un milieu extracellulaire (Lew *et al.*, 2003). Cette augmentation de la concentration sodique favorise alors le gradient entrant de sodium vers le parasite, permettant le fonctionnement des transports couplés à travers la membrane parasitaire (Martin *et al.*, 2005; Martin and Kirk, 2007; Saliba *et al.*, 2006). Par ailleurs, 70 % de l'hémoglobine de l'érythrocyte est digérée par le parasite, soit une fraction supérieure à celle (seulement 16 %) nécessaire à alimenter le parasite en acides aminés (Krugliak *et al.*, 2002; Lew *et al.*, 2003). Ceci laisse supposer qu'une partie des osmolytes ainsi générés est évacuée, contribuant ainsi (avec l'eau osmotiquement

liée) au maintien d'un volume cellulaire compatible avec la survie de la cellule-hôte jusqu'au développement complet du parasite (Lew *et al.*, 2003).

Toutes ces modifications s'accompagnent nécessairement d'une dérégulation des propriétés de perméabilité membranaire de l'érythrocyte, permettant en particulier l'approvisionnement du parasite et l'évacuation des déchets provenant de son métabolisme.

B - Altérations du transport de solutés : les NPPs

Le parasite, aussi bien que sa cellule-hôte, ne possède pas de stock de molécules énergétiques ou structurelles (qu'il faut donc importer). De même, l'important métabolisme aboutit à la production importante de déchets (essentiellement du lactate) qu'il faut évacuer. La mise en place d'un important trafic à la membrane de la cellule-hôte est donc nécessaire. Il s'agit d'un mécanisme très important dans l'établissement de la relation hôte-parasite, et d'un point de vue pharmacologique, l'étude des modifications des propriétés de transport de la membrane de l'érythrocyte présente un intérêt évident. C'est pourquoi depuis le début des années 80, de nombreuses études ont décrit les modifications de la perméabilité membranaire du globule rouge lors de l'infection.

Deux principales techniques ont pour cela été utilisées : les études de flux isotopiques, avec le suivi du transport de molécules marquées radioactivement, et les expériences de lyse isosmotique (voir le principe dans la partie matériel et méthodes).

Grâce à ces techniques, les équipes de Hagai Ginsburg puis de Kieran Kirk ont décrit, dans les années 80 et 90, la perméabilité membranaire du globule rouge infecté pour de nombreux solutés.

Pour certains d'entre eux, comme le glucose, l'activité des transporteurs endogènes (GLUT1) semble suffire aux besoins du parasite et donc à expliquer l'augmentation des flux observés (Kirk *et al.*, 1996). D'autres transporteurs voient

Carbohydrates	Amino acids	Nucleosides	Anions	Cations	Others
glycerol	alanine	D/L-adenosine	Cl ⁻	Na ⁺	thiourea
erythrytol	asparagine	D/L-thymidine	gluconate	K ⁺	phloridzin
D/L-arabitol	aspartate	uridine	lactate	Rb ⁺	di- and tri-peptides
arabinose	cysteine	NBMPR	DNDS	Mg ²⁺	glutathione
ribose	glutamate		dipicolinic	Ca ²⁺	GSSG
sorbitol	glutamine		panthotenic	Fe ²⁺ /Fe ³⁺	polypeptides
xylitol	glycine			choline	oligonucleotides
mannitol	isoleucine			polyamines	iron chelators
dulcitol	leucine				
D/L-glucose	serine				
2-deoxyglucose	taurine				
3OMglucose	threonine				
myo-inositol	valine				
rhamnose	NBD-aurine				
sedoheptulose	NBD-alanine				
	carnitine				

Figure 4 : Solutés pour lesquels une perméabilité *via* les NPPs a été démontrée
<http://sites.huji.ac.il/malaria/maps/Solutes.html>

également leurs activité augmenter durant l'infection, comme la pompe Na^+/K^+ dont le régime est multiplié par deux (Staines *et al.*, 2001).

Pour d'autres solutés en revanche, les capacités des transporteurs endogènes sont insuffisantes ou inexistantes. La production de lactate par le parasite, par exemple, entraîne une multiplication d'un facteur 600 du transport de lactate à travers la membrane du globule rouge infecté, dépassant les capacités des transporteurs endogènes décrits jusqu'alors (Cranmer *et al.*, 1995; Kanaani and Ginsburg, 1991). De même, la membrane des érythrocytes ne possède pas de système de transport pour le pantothénate (vitamine B5, précurseur du coenzyme A) (Saliba *et al.*, 1998), ou pour le glutamate (Elford *et al.*, 1985), pourtant indispensables au développement du parasite.

En conclusion, il y a donc induction dans la membrane du globule rouge infecté de nouvelles voies de perméabilité membranaire (NPPs, New Permeation Pathways), qui viennent compléter le transport endogène pour répondre aux besoins parasitaires.

C - Propriétés des NPPs

Bien que la nature moléculaire des NPPs reste à l'heure actuelle inconnue, elles sont décrites depuis près d'une trentaine d'années (Ginsburg *et al.*, 1983) et commencent à être bien caractérisées d'un point de vue physiologique (Kirk, 2001) :

- Elles sont mises en place entre 10 et 20 heures suivant l'invasion de l'érythrocyte (Elford *et al.*, 1985), (Staines *et al.*, 2001). La cinétique de leur apparition est encore mal déterminée, mais il semble qu'elles apparaissent de façon graduelle dans les populations de globules rouges infectées en culture (Krugliak and Ginsburg, 2006) ;

- Elles sont peu spécifiques, puisqu'elles peuvent laisser passer de nombreux ions, zwitterions ou molécules non chargées, organiques et inorganiques (figure 4). Elles sont également non stéréospécifiques (Ginsburg *et al.*, 1985), (Kirk *et al.*, 1994) et

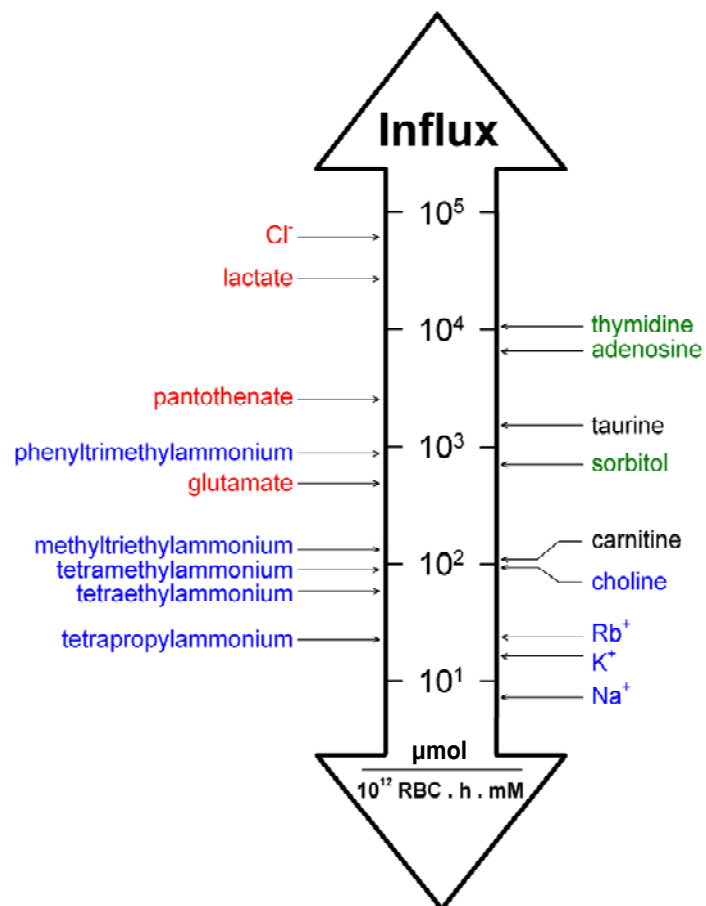


Figure 5 : Taux de transport relatifs à différents solutés *via* les NPPs dans la membrane des globules rouges infectés (d'après Kirk, 2001).

non saturables pour des concentrations physiologiques de solutés, en particulier pour la choline (Kirk *et al.*, 1991) ou le panthoténate (Saliba *et al.*, 1998) ;

- Le calcul de l'énergie nécessaire à leur activation a révélé une valeur faible, de l'ordre de 10 kcal/mol, soit une valeur typique d'un mécanisme de diffusion plutôt que *via* un transporteur (Ginsburg *et al.*, 1983) ;

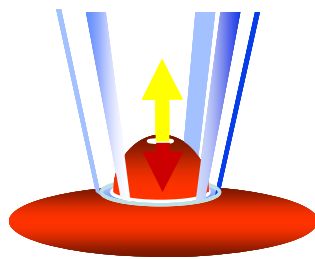
- Les NPPs sont sensibles aux inhibiteurs classiques des canaux anioniques (NPPB, niflumate, furosémide, glibenclamide) (Kirk *et al.*, 1993), (Kirk *et al.*, 1994) (Kirk and Horner, 1995) ;

- Enfin, elles présentent une sélectivité anionique. En effet, leur perméabilité est plus forte pour des petits anions inorganiques, loin devant des molécules neutres, des zwitterions ou des cations comme représenté sur la figure 5.

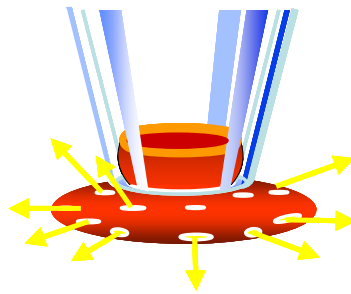
Malgré ces caractérisations fonctionnelles, de nombreuses données manquent encore quant à ces NPPs. En effet, ces approches techniques n'ont pu déterminer ni le nombre, ni la nature moléculaire ou l'origine (endogène ou parasitaire) de ces voies de perméabilité.

Toutes ces propriétés font néanmoins penser que les NPPs pourraient être constituées, au moins partiellement, d'un canal anionique peu sélectif (Kirk *et al.*, 1994). Ainsi, à la fin des années 90, les techniques d'électrophysiologie, qui permettent de mesurer les courants ioniques traversant les membranes biologiques (Neher *et al.*, 1978), se sont révélées être un nouvel outil adapté pour l'étude de ces NPPs.

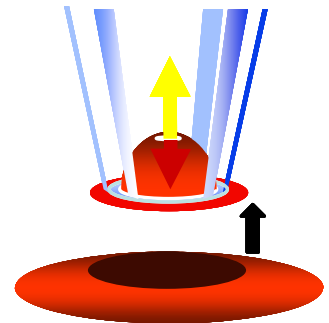
Il a fallu néanmoins optimiser la géométrie des pipettes, plus particulièrement pour la configuration *whole-cell*, qui permet d'enregistrer les courants globaux d'une cellule. En effet, le globule rouge est une cellule très petite et déformable, et il fallait éviter l'entrée de la cellule dans la pipette.



Cell-Attached



Whole-Cell



Excised Inside-Out

Figure 6 : Les trois configurations du *patch-clamp* utilisées sur le globule rouge infecté

IV - Les études d'électrophysiologie sur le globule rouge infecté

A - Configurations utilisées

A partir de l'année 2000 les techniques d'électrophysiologie sont venues compléter la liste des moyens utilisés pour caractériser les modifications de la perméabilité membranaire du globule rouge infecté. Trois des configurations de la technique du *patch-clamp* ont été utilisées (figure 6) :

- la configuration *cell-attached* où l'on enregistre des courants unitaires (travail sur un seul canal) sur une cellule intacte,
- la configuration *whole-cell* où l'on enregistre les courants globaux affectant l'ensemble de la membrane de la cellule,
- la configuration *excised inside-out* où l'on déchire le fragment de membrane sous la pointe de la pipette pour enregistrer des courants unitaires, tout en ayant accès à la face cytosolique de la membrane.

Le travail en configuration *whole-cell* est plus aisé d'un point de vue technique, et permet de décrire un comportement moyen de la membrane. Néanmoins, il ne permet pas la discrimination entre les différents types de canaux actifs, et, comme pour la configuration *excised*, la perte de l'environnement intra-cellulaire direct du canal peut modifier parfois de façon importante son fonctionnement.

Quatre groupes de recherche ont publié, depuis 2000, des études incluant l'électrophysiologie sur la membrane du globule rouge infecté. Du fait des disparités entre les résultats et les modèles proposés, je présenterai ici d'abord les principaux points de consensus, avant de détailler les différents modèles présentés par chaque équipe.

B - Les points de consensus

Depuis la première étude de *patch-clamp* sur la membrane du globule rouge infecté (Desai *et al.*, 2000), tous les travaux publiés ont démontré une forte

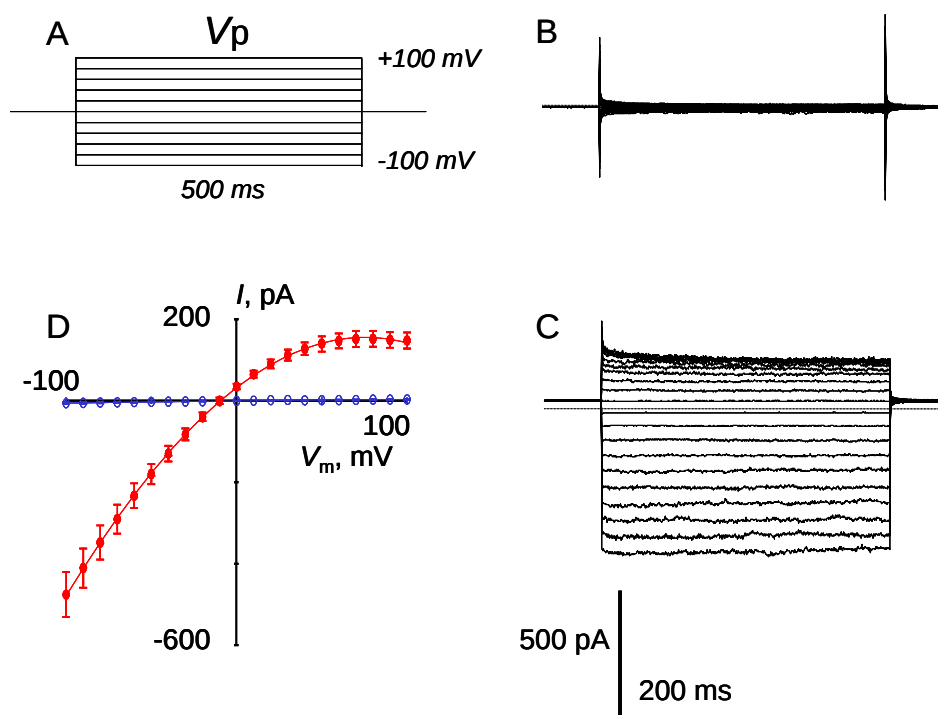


Figure 7 : Enregistrements caractéristiques d'un globule rouge infecté, en configuration *whole-cell*

A, Rampe de potentiels imposés. B, enregistrements de courants correspondants sur un érythrocyte sain. C, enregistrement sur un érythrocyte infecté. D, Courbes I-V correspondantes (bleu, sain ;rouge, infecté). Les solutions utilisées sont NMDG-Cl dans le bain et la pipette. Modifié d'après Egee *et al.* (2002).

augmentation (d'un facteur 100 à 150) des courants anioniques lors de l'infection par *P. falciparum*. Ces courants, étudiés en configuration *whole-cell* avec des concentrations symétriques de part et d'autres de la membrane et en l'absence de sérum, présentent une rectification entrante (voir matériels et méthodes) caractéristique (figure 7). Ces courants sont anioniques, et sensibles, comme les NPPs, aux inhibiteurs des canaux chlorures (furosémide, NPPB).

Cependant, en 2002, l'équipe de F. Lang, à Tübingen, a observé en configuration *whole-cell* un courant rectifié sortant sur certaines cellules infectées (Huber *et al.*, 2002). Un travail commun à trois équipes sur les conditions expérimentales a mis en évidence l'influence de la présence de sérum dans le bain (figure 8). En effet, celui-ci entraîne une forte augmentation des courants sortants, et une augmentation plus faible des courants entrants. De plus, l'imposition d'un potentiel négatif entre les rampes provoque une déactivation des courants entrants (Staines *et al.*, 2003). Ceci augmente alors le caractère rectifié sortant des courants globaux, comme décrit par l'équipe de F. Lang (Huber *et al.*, 2002).

L'effet du sérum semble suggérer la présence de différents types de canaux actifs, dont l'un serait sensible au sérum. Cette idée est corroborée par les études de Ginsburg et Stein qui démontrent, en compilant l'ensemble des données de lyse et de flux obtenues jusqu'alors, des divergences entre les résultats obtenus *via* ces deux techniques, et les comparent aux résultats d'électrophysiologie (Ginsburg and Stein, 2004; Ginsburg and Stein, 2005). Les auteurs concluent alors à la présence de deux types de pores, l'un présent en faible nombre (4 copies/cellule) et laissant passer les solutés neutres et les cations, l'autre beaucoup plus abondant (300 à 400 copies/cellule) et perméable aux anions et nucléosides. De même, l'étude de Staines *et al* démontre, en comparant des résultats d'électrophysiologie, d'hémolyse et de flux, l'impossibilité du flux de sorbitol par un canal ayant une faible probabilité d'ouverture aux potentiels de membrane positifs, suggérant donc la présence de transporteurs de types différents (Staines *et al.*, 2006).

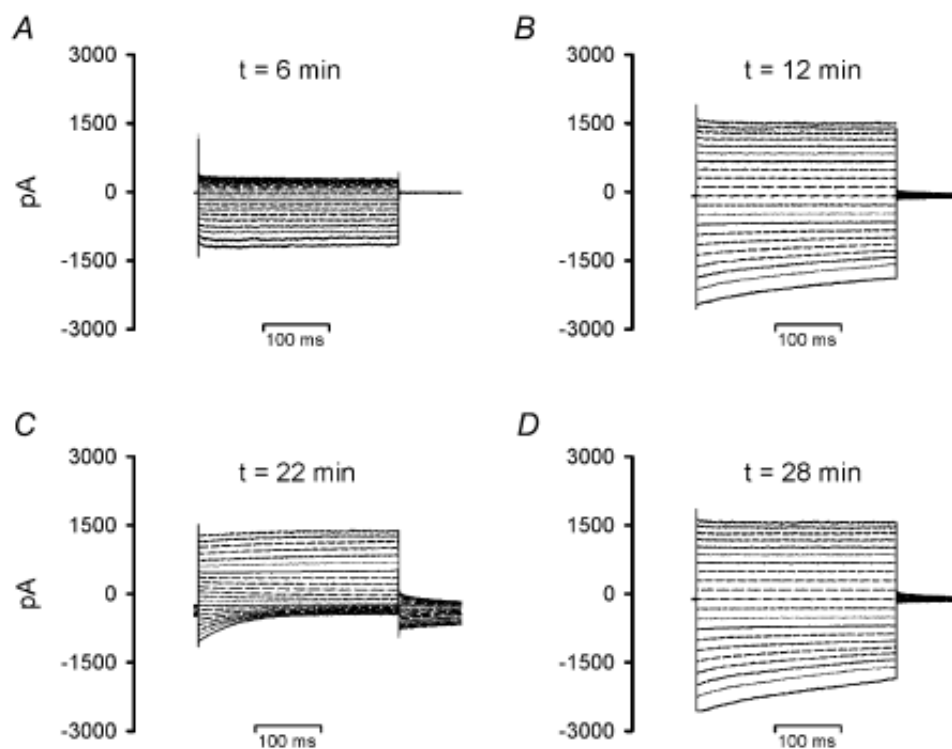


Figure 8 : Effet de la présence de sérum sur la conductance globale

A, courant global enregistré avant l'ajout de sérum, $V_{hold}=0mV$. B, Courant enregistré 6 minutes après l'addition de sérum, $V_{hold}=0mV$. C, courant enregistré 9 minutes après avoir passé V_{hold} à $-30mV$. D, courant enregistré 3 minutes après retour de V_{hold} à $0mV$. D'après Staines *et al.* (2003).

Les groupes utilisant les techniques de l'électrophysiologie sur le sujet ont proposé des modèles différents pour expliquer ces courants anioniques globaux et la corrélation canaux ioniques / NPPs. Deux des groupes, à Roscoff et Bethesda, ont présenté des enregistrements unitaires (obtenus avec la configuration *cell-attached*), les autres ont travaillé exclusivement avec la configuration *whole-cell*.

C - Les modèles proposés par les différentes équipes

1 - canal unique, d'origine parasitaire

La première étude utilisant la configuration *whole-cell* sur la membrane du globule rouge infecté a été publiée en 2000 par l'équipe de S. Desai à Bethesda. Elle décrit des courants anioniques membranaires augmentés d'un facteur 100 à 150, par rapport à ceux mesurés sur la membrane d'un érythrocyte non infecté, et présentant un fort caractère rectifié entrant. Dans cette première étude sont également montrés des enregistrements d'un canal anionique au niveau unitaire, obtenus en configuration *cell-attached* sur des cellules infectées (Desai *et al.*, 2000). Ce canal présente une plus forte probabilité d'ouverture aux potentiels négatifs, pouvant correspondre au caractère rectifié entrant des courants mesurés en configuration *whole-cell*. La conductance de ce canal est de 20 pS en conditions symétriques de Cl^- 1 M, correspondant à une conductance unitaire en conditions physiologiques de 3 pS. Selon les auteurs, ce canal (1) explique à lui seul les courants rectifiés entrants visibles en configuration *whole-cell* dans la membrane du globule rouge infecté, et (2) a une pharmacologie identique à celle des NPPs. Il pourrait donc suffire à expliquer le phénomène des NPPs. Les auteurs concluent donc à la présence d'environ 1000 canaux de ce type, qui sera baptisé PSAC (Plasmodial Surface Anion Channel) dans leurs études suivantes.

De plus, en utilisant des souches de parasite divergentes (en raison de leur origine géographique), cultivées dans les globules rouges d'un même donneur, ces auteurs ont décrit une légère variabilité de la cinétique d'ouverture du canal PSAC aux potentiels positifs, selon la souche utilisée. Ainsi, ils en concluent que ce canal est

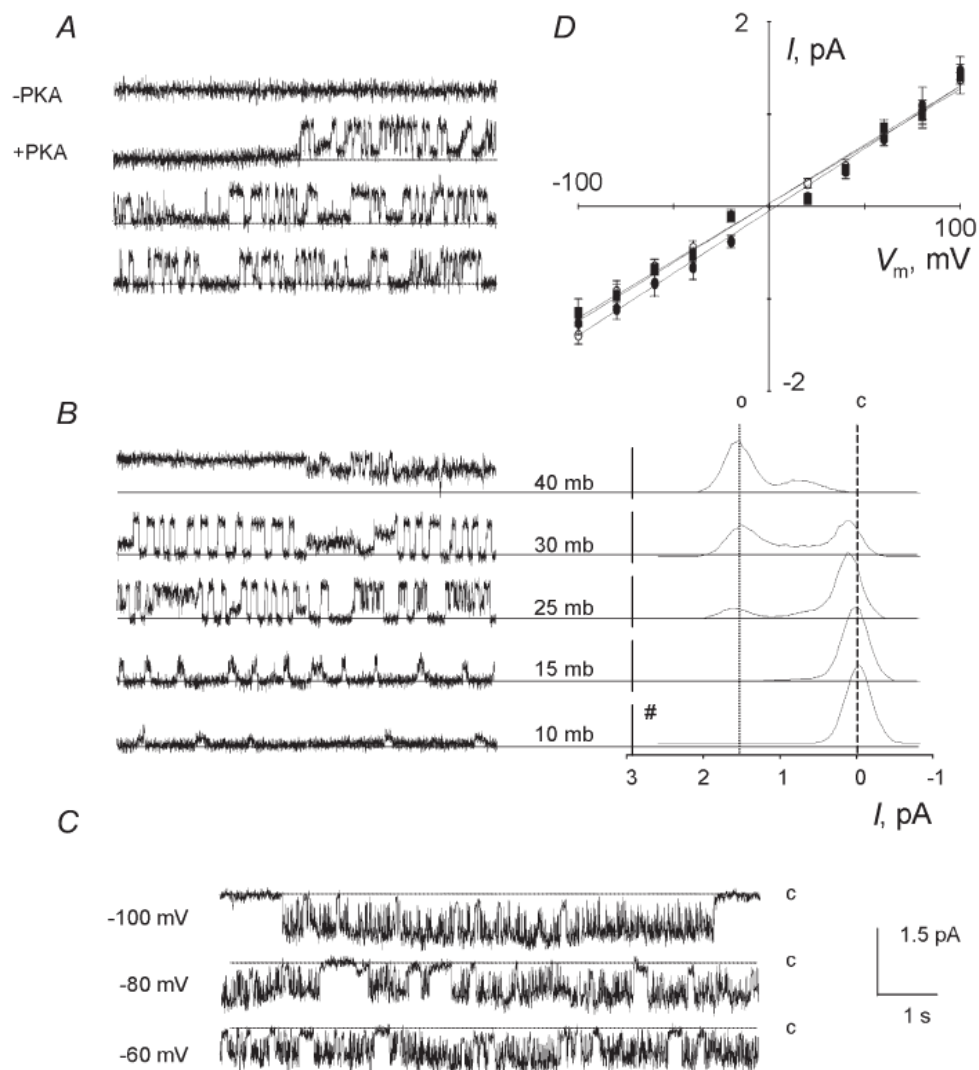


Figure 9 : Canal actif en configuration *excised* dans la membrane de l'érythrocyte sain ou infecté.

A, cellule non infectée, avant et après addition de PKA + ATP dans le bain, $V_m = +100$ mV. B, cellule non infectée, application d'un étirement de la membrane par dépression calibrée dans la pipette, $V_m = +100$ mV. C, cellule infectée, canal spontanément actif. D, courbe i/V correspondant à A (○), B (■) ou C (●). D'après Egee *et al.* (2002).

vraisemblablement d'origine parasitaire, et serait exporté à la membrane du globule rouge (Alkhalil *et al.*, 2004). Par ailleurs, dans une autre étude de ce groupe, la présence de canaux semblables au PSAC dans des globules rouges de singes rhésus infectés par *Plasmodium knowlesi* semble suggérer la présence d'une famille de canaux chlorure très conservée à travers le genre *Plasmodium* (Lisk and Desai, 2005).

Selon ce groupe, un seul canal anionique, le PSAC, est donc présent dans la membrane du globule rouge infecté. Il s'agit d'une protéine parasitaire, exportée à la membrane du globule rouge, qui expliquerait à elle seule les NPPs mis en place lors de l'infection.

2 - Canaux endogènes activés lors de l'infection

a - Groupe de Roscoff

Dès 2002, le groupe de S. Thomas, à Roscoff, a également utilisé la configuration *cell-attached* pour caractériser les conductances unitaires présentes dans la membrane du globule rouge infecté. L'étude montre un canal spontanément actif dans la membrane du globule rouge infecté (Egee *et al.*, 2002). Ce canal a une conductance moyenne de 18pS, et présente une probabilité d'ouverture voltage-dépendante (plus forte aux potentiels négatifs). Lors du passage en configuration *excised*, ce canal garde ses propriétés mais avec une conductance légèrement plus faible (15.7 pS). Contrairement au modèle présenté dans la partie précédente, il est apparu que ce canal pouvait être observé avec la même fréquence d'apparition chez un globule rouge non infecté, en configuration *excised*, après stimulation. En effet, l'addition de PKA+ATP dans le bain ou l'étirement de la membrane provoquent une activation de ce canal spontanément actif dans la membrane du globule rouge infecté (figure 9).

De plus, en configuration *whole-cell*, la présence de PKA+ATP dans la pipette active également des courants anioniques rectifiés entrants sur un érythrocyte non infecté. L'équipe propose alors la présence de 250 à 300 canaux de ce type, d'origine endogène et activé lors de l'infection par *P. falciparum*.

Contrairement aux résultats présentés par l'équipe de S. Desai, cette étude met donc en évidence l'implication de canaux anioniques endogènes dans la génération des courants membranaires de l'érythrocyte infecté, et leur possible régulation par des processus de phosphorylation. Cette étude décrit également la présence d'un canal présentant une rectification sortante, visible très rarement en configuration *excised* dans la membrane du globule rouge non infecté.

b - Groupe de Tübingen

Les études en configuration *whole-cell* du groupe de F. Lang, à Tübingen, montrent, on l'a vu, une rectification sortante des courants anioniques du globule rouge infecté (Huber *et al.*, 2002). Il est apparu que ce phénomène est lié à la présence de traces de sérum dans le bain et à l'imposition d'un potentiel de -30 mV entre les rampes d'enregistrements (Staines *et al.*, 2003). Les auteurs décrivent des différences de sensibilité aux inhibiteurs des NPPs pour les courants entrants et sortants. Les IC50 mesurées pour chaque inhibiteur se révèlent être plus faibles pour les courants sortants que pour les courants entrants, privilégiant ainsi l'hypothèse de voies de conductances différentes dans la génération des deux phénotypes. Toutefois, il convient de remarquer que la séquence d'efficacité des composés utilisés est identique sur les courants entrants et sortants (NPPB > DIDS = furosémide > glibenclamide) (Huber *et al.*, 2002). On ne peut donc pas exclure un effet dépendant du voltage pour les inhibiteurs utilisés.

De plus, dans cette étude, ce groupe montre que les courants membranaires de l'érythrocyte infecté sont sensibles aux agents réducteurs, et qu'inversement un processus d'oxydation peut induire la présence de courants entrants et sortants dans le globule rouge non infecté. Ces résultats sont corrélés avec des expériences d'hémolyses sur des globules rouges infectés ou non, suggérant un lien avec les NPPs. Ainsi cette équipe montre l'implication de deux types de canaux endogènes, sensibles à l'oxydation, dans la formation des NPPs. Par la suite, ce groupe a montré que la conductance sortante était perméable à différents osmolytes organiques

contrairement à la conductance entrante (Duranton *et al.*, 2004). La partie sortante de la conductance semble donc davantage correspondre aux NPPs.

Ce même groupe suggère, grâce à des travaux effectués chez l'homme et chez la souris, qu'une partie des courants membranaires observés dans les cellules infectées peut être expliquée par l'activité d'un canal de type ClC-2 (Huber *et al.*, 2004). Ce canal, détecté par anticorps dans les érythrocytes humains, serait à l'origine des variations de conductances (variations sensibles au zinc, inhibiteur du ClC-2) observées lors du gonflement en conditions hypotoniques des érythrocytes infectés. Il pourrait donc jouer un rôle dans le maintien du volume cellulaire des cellules infectées. De plus, au cours de cette même étude, l'infection de souris mutantes *Clcn2^{-/-}* par *Plasmodium berghei*, confirme l'activation de ce canal lors de l'infection. Ce canal pourrait être responsable de la conductance rectifiée entrante visible dans la membrane des érythrocytes infectés, puisque la fraction Zinc-sensible du courant présente une rectification entrante. Cependant, il ne semble pas indispensable au développement du parasite, puisque *Plasmodium berghei* peut réaliser son cycle complet dans les globules rouges de souris *Clcn2^{-/-}*.

Ce groupe a donc mis en évidence l'activation de canaux endogènes lors de l'infection par des mécanismes d'oxydation, l'un de ces canaux étant un canal ClC-2 non nécessaire au développement du parasite.

c - Groupe de Rotterdam

En 2004, le groupe de H. DeJonge, à Rotterdam, publie une étude sur le sujet dans laquelle sont comparées les signatures électrophysiologiques de globules rouges infectés ou non provenant de patients sains ou de patients CF $\Delta F508$ (Cystic Fibrosis), atteints de la mucoviscidose (absence de copies fonctionnelles du canal CFTR) (Verloo *et al.*, 2004). Selon leurs résultats, il y aurait dans la membrane des érythrocytes humains deux types de canaux anioniques : un canal CFTR, inductible par l'ATP, et un canal CFTR-like, activable par stress osmotique et dont l'activité dépendrait du CFTR. C'est ce canal qui serait activé lors de l'infection par

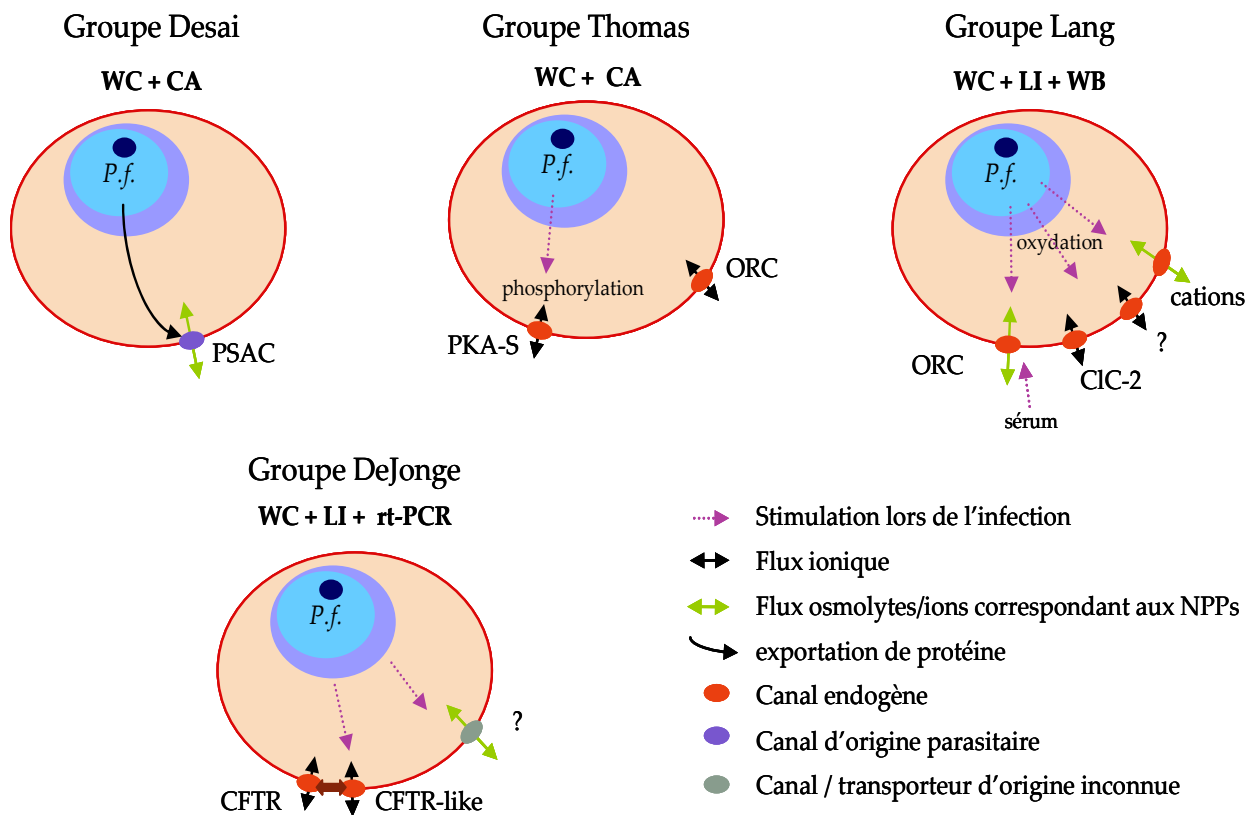


Figure 10 : Modèles proposés de modifications de la perméabilité membranaire de l'érythrocyte lors de l'infection par *P. falciparum*.

Les différentes techniques utilisées sont notées sous chaque groupe : WC, Whole-Cell ; CA, Cell-Attached ; FI, Flux isotopique ; LI, Lyse Isosmotique ; WB, Western Blot ; rt-PCR, reverse transcription-Polymerase Chain Reaction.

PSAC, Plasmodial Surface Anion Channel; ORCC, Outwardly Rectified Chloride Channel; PKA-S, Canal PKA sensible.

Plasmodium falciparum. Ces deux canaux sont fonctionnellement absents dans les globules rouges infectés de patients CF, qui ne présentent donc aucun courant en configuration *whole-cell*. Néanmoins, le parasite s'y développe de la même façon, et les flux d'osmolytes (visualisés en lyse isosmotique) n'y sont que peu altérés. L'activité de ces canaux anioniques (CFTR et CFTR-like) ne serait donc selon cette étude que très partiellement reliée aux NPPs par où transiteraient les osmolytes nécessaires au parasite. Ce canal CFTR-like semble identique au canal PKA-sensible décrit précédemment par le groupe de Roscoff.

C - Variations sur un même thème

La figure 10 résume les différents modèles proposés par les équipes travaillant en électrophysiologie sur le sujet. D'un point de vue électrophysiologique, sur l'origine, le nombre et la nature des canaux, les modèles divergent fortement.

De même, la contribution de ces différents canaux aux NPPs fait également l'objet de désaccord. Selon le groupe de Bethesda, PSAC et NPPs sont une même voie de transport, d'origine parasitaire. Il s'agirait alors d'un nouveau type de canal anionique, puisque l'analyse du génome de *Plasmodium falciparum* révèle l'absence de protéine parasitaire ayant une signature connue de canal anionique (Martin *et al.*, 2005). Pour les autres groupes, en particulier ceux de Roscoff et de Tübingen, des canaux endogènes sont impliqués. Ces canaux, dormants en situation physiologique dans la membrane du globule rouge sain, seraient activés lors de l'infection. Les mécanismes d'activation proposés sont différents : (1) des processus de phosphorylation semblent impliqués, avec un canal sensible à la PKA décrit à Roscoff (Egee *et al.*, 2002); (2) un effet de l'état redox semble également pouvoir activer des conductances dans le globule rouge sain (Huber *et al.*, 2002). Enfin, selon les travaux du groupe de Rotterdam, l'activité des NPPs est distincte des canaux anioniques, qui ne seraient pas indispensable au développement du parasite.

V - Objectifs de la thèse

Dans la continuité des travaux déjà effectués au laboratoire, le but de ce travail de thèse a été de mieux connaître et caractériser les conductances anioniques du globule rouge infecté par *P. falciparum*. Avant de définir leur éventuelle contribution aux NPPs, l'étude s'est focalisée sur la discrimination entre les différents canaux anioniques actifs dans la membrane d'un globule rouge infecté. Pour ce faire, le travail a été divisé en différentes étapes, chacune correspondant à un chapitre de ce manuscrit. Ces résultats sont présentés ici sous la forme d'articles publiés ou en préparation, précédés de résumés en français.

1 – L'utilisation de la configuration *cell-attached*, seule configuration préservant l'intégrité de la membrane cellulaire, permet de décrire les différents types de canaux anioniques spontanément actifs dans la membrane du globule rouge infecté. En effet, seule une étude sur des conductances unitaires, avec des conditions aussi proches que possible de la situation physiologique, permettrait de discriminer les différents types de canaux anioniques présents. J'ai donc réalisé une série importante d'enregistrements en configuration *cell-attached* sur des globules rouges infectés, avec des solutions d'osmolarité proches du physiologique.

2 – Un travail sur les effets des conditions expérimentales a été réalisé, dans l'optique de proposer un modèle réunificateur entre les différentes équipes. Les deux équipes ayant présenté des conductances au niveau unitaire (les groupes de Roscoff et de Bethesda) proposent des modèles très différents. Comment relier le PSAC décrit à Bethesda avec les différents canaux décrits dans la partie précédente, ainsi qu'avec le canal ClC-2, proposé par l'équipe de Tübingen en configuration *whole-cell* ? Les conditions expérimentales utilisées par les équipes sont très différentes. Le PSAC a toujours été décrit au niveau unitaire en ajoutant 1M de chlorure de choline dans le

bain. Une étude sur les impacts de la concentration en chlorure de choline, en utilisant l'électrophysiologie, a permis de proposer une explication des différences entre les modèles proposés par les équipes de Roscoff et de Bethesda.

D'autre part, la présence de sérum dans le bain semble modifier fortement le comportement des canaux actifs dans la membrane du globule rouge infecté. Les mécanismes à l'origine de cet effet restent encore mal connus, car ils n'ont été décrits jusqu'ici qu'en configuration *whole-cell*. Un travail de description de l'effet de la présence de sérum sur les conductances unitaires a donc été commencé. Nous avons pu mettre en évidence, en utilisant la configuration *cell-attached*, des modifications du fonctionnement d'un des canaux présents.

3 – Enfin, j'ai également voulu tester des hypothèses sur la nature moléculaire des canaux activés lors de l'infection par *P. falciparum*. Du fait des propriétés des canaux (en particulier de leur sélectivité), nous nous sommes intéressés à des catégories de canaux activés par des ligands. Certains ligands de ces canaux ayant des propriétés anti-plasmodiales, ils ont été testés en électrophysiologie sur les érythrocytes infectés en utilisant la configuration *whole-cell*. Ensuite, pour faire un lien avec les NPPs nécessaires au développement du parasite, j'ai testé ces composés en utilisant les techniques de lyse isosmotique et en évaluant leurs effets sur la croissance parasitaire *in vitro*. Ces résultats sont ici présentés sous la forme d'une publication en préparation, précédée d'un résumé en français.

Par ailleurs, l'équipe est impliquée dans un projet collectif visant à caractériser la participation de la protéine kinase A de *P. falciparum* (PfPKA) dans la dérégulation des conductances anioniques du globule rouge infecté. Dans le cadre de cette collaboration, des travaux déjà effectués ont permis de caractériser les sous-unités régulatrices et catalytiques de la PKA de *P. falciparum*, et de produire une souche de parasite sur-exprimant PfPKA-R. Cette souche a été utilisée pour démontrer

l'implication de PfPKA sur la mise en place des conductances anioniques du globule rouge infecté, et sur les NPPs en utilisant les techniques de lyse isosmotiques. Ces travaux, auxquels j'ai participé, ont été publiés en 2008 dans la revue *PLoS Pathogens*. J'ai également pris part à la rédaction d'une revue sur l'implication de la protéine kinase A dans la dérégulation des conductances anioniques du globule rouge infecté par *P. falciparum*, publiée en 2009 dans la revue *Trends in Parasitology*. Les résultats de ces études seront évoqués dans la discussion de ce manuscrit, et les publications associées sont présentées en annexe.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I - Culture cellulaire

Les érythrocytes utilisés pour la culture proviennent de culots sanguins de volontaires sains anonymes. Le plasma et les globules blancs sont supprimés par trois rinçages successifs avec du milieu de culture RPMI 1640 (centrifugation 4000 tours.mn⁻¹, pendant 4 mn). Les érythrocytes sont ensuite conservés à 4°C dans un milieu RPMI 1640 supplémenté (voire composition du milieu de culture – tableau 2) à un hémocrite de 50%, pendant 7 jours au maximum.

La culture de *Plasmodium falciparum in vitro* est basée sur la technique de culture développée par Trager et Jensen (Trager and Jensen, 1976), avec le milieu de culture décrit dans le tableau 2. La souche de *Plasmodium* utilisée est la souche 3D7, qui est celle utilisée pour l'établissement du génome complet de *Plasmodium falciparum* (disponible sur le site PlasmoDataBase, <http://plasmoDB.org/>).

Les cellules infectées sont maintenues en culture en flasques de 25 cm², avec un hémocrite de 5 % et une parasitémie ne dépassant jamais 10%. Les flasques sont incubées à 37°C dans une enceinte thermostatée avec une atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Le contrôle de la parasitémie se fait quotidiennement par frottis sur lame de verre et coloration au Giemsa (figure 11).

II - Le patch-clamp

A - Principes

Le *patch-clamp* est une technique d'électrophysiologie, mise au point par Edwin Neher et Bert Sakman (Hamill *et al.*, 1981; Neher and Sakmann, 1976), qui permet d'enregistrer des courants électriques transmembranaires liés aux déplacements d'ions *via* des canaux ioniques. Elle consiste à isoler un fragment de membrane (ou *patch*) à l'intérieur d'une pointe de pipette. Le contact entre la membrane et la pipette doit être suffisamment bon pour isoler mécaniquement et

	Concentration finale	Quantité
RPMI 1640 (Gibco)		79.45g
Hepes (1M)	35mM	50mL
NaHCO ₃ (0.75%)	0.21%	140mL
Gentamycine	20mg/L	10mL
Glucose	2g/L	10g
Hypoxanthine	50mg/L	250mg
Albumax (Gibco)	5g/L	25g

Tableau 2 : Composition du milieu de culture complétementé (pour 5L de milieu)
Après équilibration à 4°C, le pH est ajusté à 7.35, le milieu est filtré et conservé à -20°C.

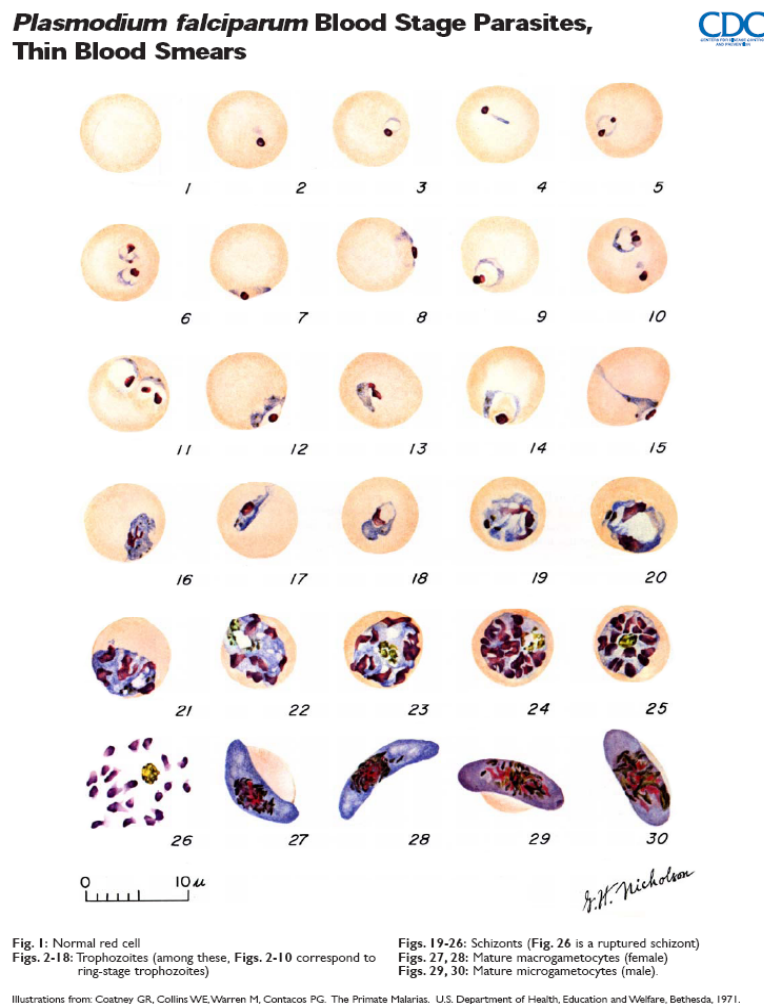


Figure 11 : Les différents stades de développement de *Plasmodium falciparum*, après coloration au Giemsa.

Figure issue du Center for Disease Control and prevention,
http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria_il.htm

électriquement le fragment de membrane, on parle de scellement ou *seal*, dont la qualité se mesure en Ohm. La valeur de ce *seal* doit être supérieure au gigaOhm, afin que le ratio signal / (bruit + fuite) soit suffisamment élevé pour mesurer les courants liés à l'activité d'un seul canal, soit des courants de l'ordre du picoampère (pA).

Une fois le *seal* obtenu, un système à deux électrodes (une de référence dans le bain, une de mesure dans la pipette) permet à la fois de faire varier le potentiel appliqué dans la pipette et de mesurer les courants ioniques franchissant la membrane. Différentes configurations sont alors possibles pour enregistrer les variations de courants, en travaillant soit sur une conductance unitaire, soit sur la conductance membranaire globale en ayant accès à l'une et/ou l'autre des faces de la membrane (figure 12).

La première configuration, qui est d'ailleurs systématiquement la première étape du patch clamp, est le *Cell-Attached*, obtenu par la simple formation du *gigaseal*. On peut alors directement enregistrer l'activité du ou des canaux présents dans le patch. Cette configuration est donc proche de la situation physiologique, puisque l'intégrité de la cellule est préservée, avec en particulier tout l'environnement du canal sur la face interne de la membrane (cytoplasme, cytosquelette, protéines membranaires). Le potentiel de membrane de la cellule (V_m) dans cette configuration peut être modifié par le potentiel appliqué à la pipette (V_p), on a alors $V_m = E_m - V_p$ (où E_m est le potentiel de membrane spontané de la cellule). On peut alors enregistrer l'activité d'un ou de plusieurs canaux présents dans le patch à différents potentiels.

Les autres configurations du *patch-clamp* découlent de la configuration *cell-attached*. En éloignant la pipette si la cellule adhère au fond de la boîte, ou en exposant la cellule à l'air si ce n'est pas le cas, on provoque la rupture de la membrane aux abords de la pointe de pipette : on obtient alors la configuration *Excised Inside-Out*, qui permet d'avoir accès à la face interne de la membrane, toujours sur des conductances unitaires. La valeur du potentiel de membrane est alors uniquement liée au potentiel imposé à la pipette, soit $V_m = -V_p$.

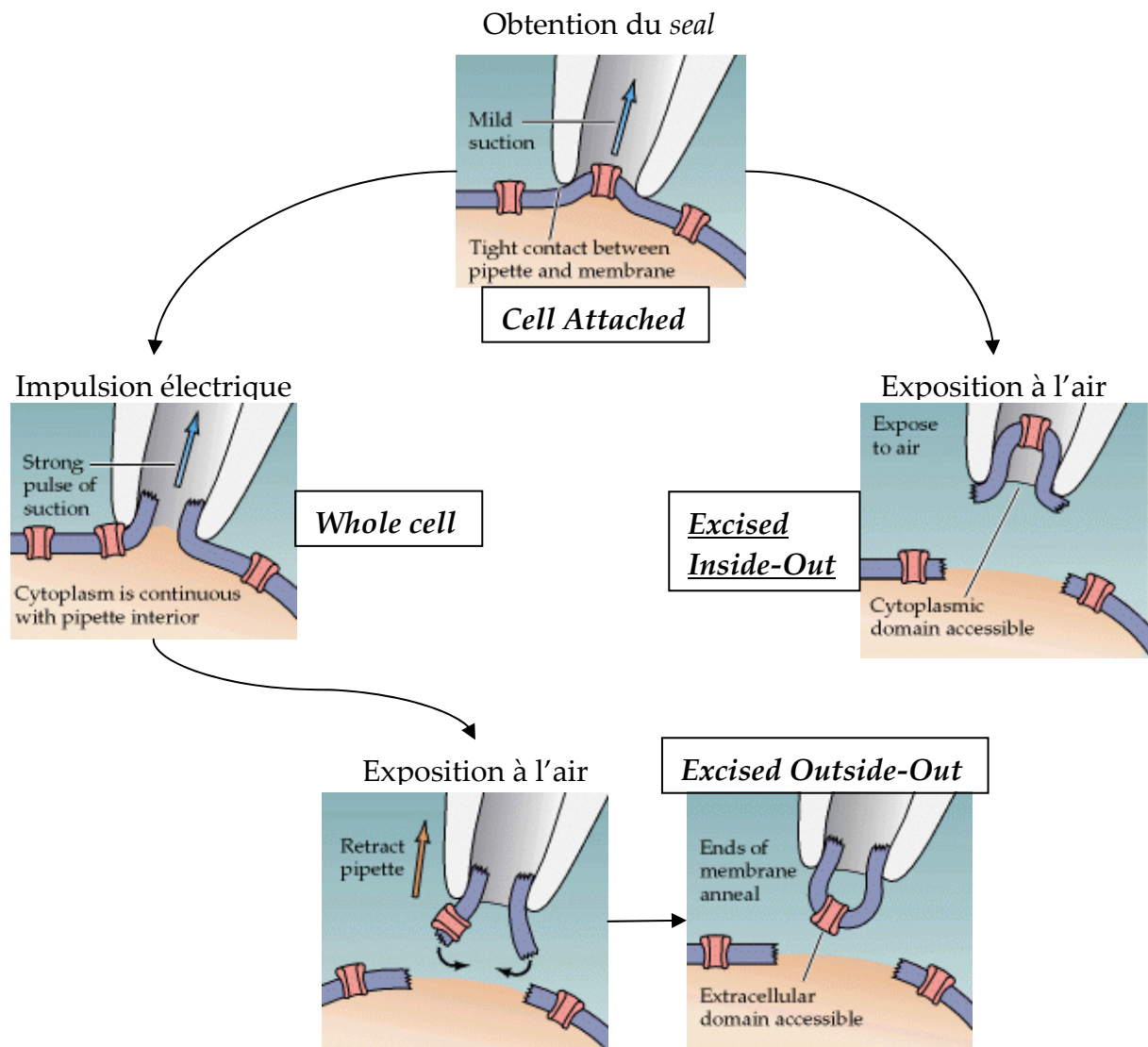


Figure 12 : Les différentes configurations du *patch-clamp*

A l'inverse, depuis la configuration *cell-attached* on peut, par une brève impulsion électrique (de l'ordre de la milliseconde), perforer le patch ; le cytoplasme se dilue alors dans la pipette et on peut enregistrer l'activité de l'ensemble des conductances de la membrane, c'est la configuration *whole-cell*. Le potentiel de membrane est alors égal au potentiel imposé à la pipette, soit $V_m = V_p$.

De cette configuration, si on excise la membrane autour de la pointe de pipette, un fragment de membrane peut se reformer mais en exposant la face externe de la membrane vers le bain, on est alors en *Excised Outside-Out*.

Au cours de cette étude, deux configurations ont été utilisées : les configurations *cell-attached* et *whole-cell*.

B - Enregistrement des courants

Les cellules infectées sont prélevées quotidiennement, et rincées trois fois dans la solution qui sera utilisée comme solution de bain lors de l'enregistrement. Quelques microlitres de ces cellules diluées sont ensuite placées dans une boîte de Petri de 35 mm contenant une chambre de perfusion en matériau composite neutre. Cette boîte de Petri est placée sur la platine d'un microscope inversé (Diaphot 300, Nikon). Les pipettes sont étirées sur le moment à partir de capillaires en borosilicate sur une étireuse de pipettes horizontale programmable (DMZ puller, Werner Zeitz, Allemagne), remplies de la solution choisie et positionnées sur le porte-pipette, avec l'électrode de mesure dedans. Le porte-pipette est fixé sur un micromanipulateur, qui permet de réaliser l'approche de la cellule. Lorsque la pointe de la pipette est en contact avec la cellule, une dépression d'environ 20 mbars (calibrée par un vacuomètre) est appliquée à l'intérieur de la pipette et facilite la réalisation du *seal*. Des impulsions électriques carrées de 10 mV (pulse) sont alors appliquées entre les deux électrodes et permettent de contrôler l'évolution du contact pipette/membrane, jusqu'à obtention d'un *gigaseal*. Le potentiel imposé à la pipette (V_p) se réfère à la masse constituée par l'électrode de référence dans le bain. Cette électrode de référence est constituée d'une électrode Ag/AgCl reliée au bain par un pont d'agar

	Ringer NaCl	Solution NMDG
NaCl	115mM	
NMDG-Cl		145mM
KCl	5mM	
MgCl ₂	10mM	1mM
CaCl ₂	5mM	1.4mM
Hepes	10mM	10mM
Glucose	10mM	10mM

Tableau 3 : Solutions utilisées pour les études en configuration *cell-attached*

Le pH des solutions est ajusté à 7.4, et leur osmolarité est toujours contrôlée, elle doit être aux environs de 300mOsm. Pour la configuration *whole-cell*, le pH est ajusté à 7.2 ; la pCa à 7 avec [Ca²⁺] = 1.89 mM, [Mg²⁺] = 1.2 mM et [EGTA] = 5 mM.

KCl (Agar à 3% dans du KCl 1M). Ainsi les solutions du bain peuvent être changées durant l'expérience sans modifier le potentiel de référence.

Au cours de cette étude, deux types de solutions ont été utilisées pour le bain et la pipette (tableau 3). La solution la plus classiquement utilisée est le Ringer NaCl, qui reflète les concentrations ioniques physiologiques. La présence de cations divalents facilite la formation du *seal*. La solution NMDG a également été utilisée. Le NMDG étant un cation imperméant, l'utilisation de cette solution permet de s'affranchir de courants cationiques. Pour la configuration *whole-cell*, la concentration en calcium de la solution pipette est ajustée à pCa 7 ($-\log[\text{Ca}^{2+}]=7$), avec 1.89 mM de Ca^{2+} , 1.2 mM de Mg^{2+} et 5 mM d'EGTA, et le pH est ajusté à 7.2. La concentration en calcium libre des solutions est calculée à l'aide du logiciel Calcium version 1.1 (Chang *et al.*, 1988).

Un amplificateur RK-400 (Biologic, France) permet à la fois d'imposer un potentiel à la pipette et d'amplifier les courants obtenus. Cet amplificateur possède également un filtre passe-bas réglable qui permet de limiter le bruit électrique présent dans le signal. Le signal sortant est ainsi filtré à 0.3 ou 1 kHz puis digitalisé par un convertisseur analogique/numérique (interface CED 1401, Cambridge Electronic Design, Angleterre) avant d'être stocké sur PC, à une fréquence d'échantillonnage de 2 kHz. Un oscilloscope branché sur l'amplificateur permet de visualiser en direct les courants obtenus.

L'enregistrement et l'analyse des courants sur PC sont faits grâce aux logiciels PAT (V 7.4c) et WinEDR (V 2.8.0.) pour les courants unitaires, et WCP (V 3.8.1) pour les conductances globales. Ces logiciels sont développés par J. Dempster à l'université de Strathclyde et sont en accès libre.

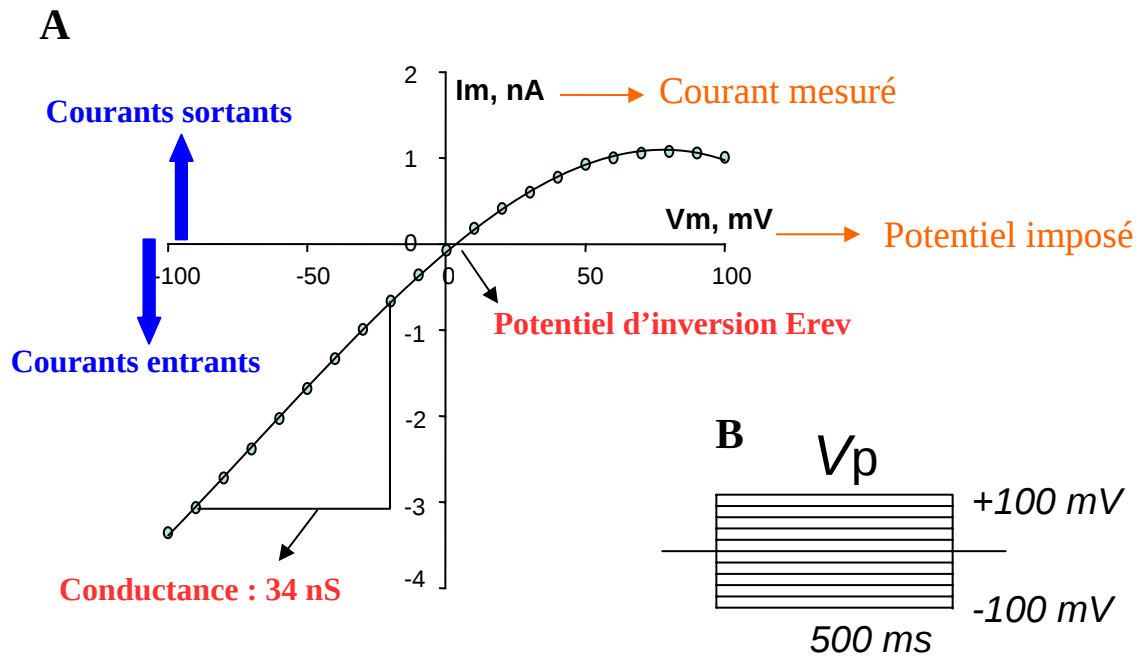


Figure 13 : Principes de l'analyse des courants enregistrés en *patch-clamp*

(A) Courbe I/V tracée après analyse des courants pour chaque potentiel imposé, ici en configuration *whole-cell*. On y lit la conductance et le potentiel d'inversion. (B) Stimulation imposée en configuration *whole-cell* : rampes de potentiels de -100 à +100mV d'une durée de 500ms chacune.

C - Analyse des courants enregistrés

1 - Conductances unitaires

Les courants enregistrés en configuration *Cell-Attached* ou *Excised Inside-Out* sont reportés sur une courbe courant-tension (figure 13). Pour chaque potentiel de membrane imposé (V_m), on place le courant obtenu en ordonnée et on obtient la courbe I/V . Ceci permet de déterminer la conductance du canal, qui est donnée par la pente de la courbe et traduit la facilité avec laquelle le courant passe à travers ce canal. On en déduit également les propriétés de rectification. Les courants situés sous l'axe des abscisses correspondent à un transfert de charges positives vers la cellule, ou de charges négatives vers l'extérieur, et sont par convention appelés courants entrants. A l'inverse, les courants positifs, au-dessus de l'axe des abscisses, correspondent à des mouvements de charges positives vers l'extérieur ou négatives vers l'intérieur et sont appelés courants sortants. Une conductance unitaire ou une conductance globale ayant un courant plus important dans un sens que dans l'autre est dite rectifiée (dans la figure 13, la conductance est rectifiée entrante).

Lorsqu'on travaille sur des conductances unitaires, on peut non seulement étudier la conductance du canal, mais également décrire son fonctionnement : la probabilité d'ouverture du canal (P_o) est définie comme le rapport entre le temps passé par le canal à l'état ouvert sur le temps total d'enregistrement. On peut détecter les transitions entre les états ouverts et fermés du canal, et en déduire les constantes d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_f), qui sont les durées moyennes de résidence du canal à l'état ouvert ou fermé. Cette analyse peut être rendue complexe par l'existence de sous-états de conductance variable pour un même canal.

Pour caractériser un canal, on cherche également à déterminer sa séquence de sélectivité, c'est-à-dire la facilité relative avec laquelle différents ions franchissent ce canal. Pour cela, en configuration *Excised Inside-Out*, on remplace dans le bain une partie des ions chlorure par l'anion considéré. L'évolution du potentiel d'inversion (E_{rev}) permet alors de déterminer grâce à une simplification de l'équation de Goldman, Hodgkin et Katz (GHK) la perméabilité relative pour l'anion X par rapport

au chlorure (P_{Cl}/P_x). On peut ainsi en déduire une séquence de sélectivité du canal, avec les perméabilités relatives de différents ions les uns par rapport aux autres.

2 - Conductances globales

En configuration *whole-cell*, le fait de travailler sur un grand nombre de canaux permet davantage de s'affranchir des transitions états ouverts / fermés des canaux individuels. En conséquence, il est possible d'appliquer des stimulations plus courtes afin d'obtenir des résultats statistiquement représentatifs du fonctionnement de l'ensemble des canaux. Le logiciel WCP permet, *via* l'interface CED1401, de piloter l'amplificateur (et donc le potentiel imposé à la pipette). On peut donc construire sur le logiciel différents protocoles de stimulation. Le plus souvent, des rampes de voltages sont imposées, d'une durée de 500 ms chacune, de 10 mV en 10 mV, à partir d'un potentiel de +100 mV. Entre chaque voltage, une période de 200 ms est respectée, au cours de laquelle aucun voltage n'est imposé.

Lors de l'analyse des enregistrements, le logiciel peut donner directement la courbe I/V, ou la valeur moyenne du courant obtenu durant chaque voltage imposé.

III - Technique de lyse isosmotique

A - Principe

Cette technique est basée sur les propriétés de la membrane des globules rouges infectés, perméable (*via* les NPPs) à une grande variété de solutés, dont le sorbitol, pour lesquels la membrane de la cellule non infectée est normalement totalement imperméable.

Les globules rouges sont placés dans une solution isosmotique de sorbitol ; il existe alors un fort gradient de part et d'autre de la membrane pour ce soluté. Si la perméabilité des globules rouge pour le sorbitol est supérieure à celle pour les solutés contenus dans le cytoplasme, l'influx de sorbitol dépassera nettement l'efflux de solutés, conduisant à une entrée nette de sorbitol accompagnée d'eau osmotiquement liée. Ceci provoquera un gonflement cellulaire et finalement la lyse

des globules rouges, libérant leur hémoglobine que l'on mesure par spectrophotométrie.

B - Protocole utilisé

Les cultures sont utilisées à une parasitémie de 5 %, lavées trois fois dans le milieu de culture non complémenté et resuspendues à un hématocrite de 50 %. A $t=0$, 0.4 mL de globule rouges infectés sont ajoutés à 3.6 mL d'une solution de sorbitol isosmotique (300 mM sorbitol, 10 mM Hepes, 5 mM glucose, pH 7.4). A intervalles de temps déterminés (0, 2.5, 6, 10, 15, 30 et 60 min), 0.5 mL sont prélevés et transférés dans des microtubes contenant une solution de 400 mM de sucrose stoppant la réaction. Après centrifugation (30 s), 200 μ L de surnageant sont prélevés et transférés dans une plaque 96 puits pour la lecture d'absorbance à 540 nM. On obtient donc une absorbance liée à la concentration d'hémoglobine dans la solution, donc fonction du pourcentage d'hémolyse.

IV- Test de croissance parasitaire

Pour les tests de croissance parasitaire avec différents inhibiteurs, les cultures sont synchronisées au stade ring par deux traitement au sorbitol à 48h d'intervalle (Lambros and Vanderberg, 1979).

Les cultures sont ensuite diluées pour atteindre un hématocrite de 2 % et une parasitémie de 1 %. Le test se fait en plaque 96 puits, avec 200 μ L de culture par puits, avec ou sans les différents inhibiteurs testés. La moitié du milieu de culture est renouvelée quotidiennement, et la parasitémie est lue à 72 h. La parasitémie est alors lue grâce à un cytomètre de flux, après coloration au SybrGreen I, suivant un protocole simple (Izumiyama *et al.*, 2009).

Le SybrGreen I est préparé à 1X dans un tampon TRIS salin (20 mM Tris (hydroxyméthyl)aminométhane hydrochloride (TRIS) ajusté à pH 8.8, dans une solution à 138 mM NaCl) et conservé à l'abri de la lumière. Cinq minutes avant lecture, 20 μ L de culture sont ajoutées à 300 μ L de Sybr TRIS salin. La lecture est faite

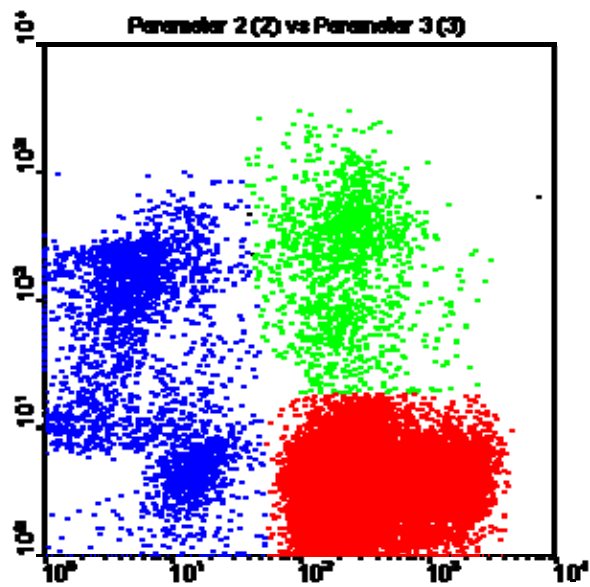


Figure 14 : Population de globules rouges parasités colorée au SybrGreen et lue en cytométrie (SSC vs FITC).

En rouge, les érythrocytes sains, en verts les infectés, et bleu les débris cellulaires et parasites libres.

sur un cytomètre BD FACSCanto™II. La parasitémie est évaluée sur 50 000 événements, grâce au logiciel WinMDI disponible sur le site <http://facs.scripps.edu/software.html>. (figure 14)

V - Western Blots

A - préparation des protéines membranaires

La détection de protéines membranaires est réalisée au laboratoire par western blot. Les membranes cellulaires sont d'abord préparées, pour les séparer des protéines cytoplasmiques et cytosquelettiques. On obtient ainsi des *ghosts*. Les cellules sont lavées plusieurs fois dans un tampon de lyse 5P8, préparé à partir d'une solution 100x constituée de NaH_2PO_4 0.5 M titré à pH8. L'obtention des membranes est réalisée par lavages successifs dans ce tampon additionné d'un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete™, Roche). Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 25 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les membranes ainsi obtenues, lorsque le surnageant est incolore, peuvent être stockées à -80°C.

B - Extraction et dénaturation des protéines

Les protéines membranaires doivent être extraites en présence de détergents, qui évitent l'agrégation des protéines liés à leurs régions hydrophobes. Les protéines sont donc solubilisées avec un tampon SDS: SDS 4,5 %, NaPi 150 mM, EDTA 3 mM, DTT 1 mM, ajusté à pH 7,6, et contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Deux volumes d'extraits sont solubilisés avec un volume de tampon, pendant 10 minutes avec étapes de sonication.

C - Electrophorèse et marquage immunologique

Les protéines extraites sont chauffées avec le tampon de charge 5 minutes à 100°C. 10 à 20 µg de protéines sont chargées sur des gels de polyacrylamide 7.5 % précoulés (BioRad), et la migration est effectuée à 100 V. Le transfert sur membrane

de nitrocellulose est ensuite effectué à voltage constant (100 V), puis la membrane est saturée dans une solution TBST + lait en poudre 5 %.

L'anticorps primaire est alors mis à incuber à 4°C durant une nuit, puis après 3 lavages au tampon TBST le deuxième anticorps est ajouté pour une incubation d'une heure à température ambiante. Les anticorps primaires utilisés ici sont produits chez le lapin ou la chèvre. Les anticorps secondaires, produits chez l'âne ou la chèvre, sont couplés à une peroxydase pour révélation en électrochimiluminescence, après incubation de la membrane 5 minutes dans un réactif ECL+ (Amersham). Le lecteur utilisé est le Typhoon (Amersham).

Tampon de dénaturation des membranes

SDS 4,5%	NaPi 150 mM	
EDTA 3mM	DTT 1 mM	Ajusté à pH 7,6

Tampon de charge 4X (8ml)

Tris 0,5M pH 6,8	1 ml	SDS 10%	1,6 ml
Glycerol	0,8 ml	βmercaptoéthanol	0,4 ml
bleu de bromophenol 1%	0,4 ml	eau distillée	3,8 ml

Tampon d'électrodes 5X

Tris base	9 g	Glycine	43,2 g
SDS	3 g	Eau distillée	600 ml

Tampon de transfert

Tris (25mM)	3 g	Glycine (192mM)	14,4 g
SDS 0,1%	10 ml de SDS 10 %	Méthanol 10%	100 ml
Eau distillée	qsp 1 L		

TBST

TBS 10X	100 ml	Tween20 0,05%	1 ml
Eau distillée	qsp 1 L		

**CHAPITRE 1 - CARACTERISATION DES CANAUX
ANIONIQUES DE L'ERYTHROCYTE INFECTE EN
CONFIGURATION CELL-ATTACHED**

CHAPITRE 1 - CARACTERISATION DES CANAUX ANIONIQUES DE L'ÉRYTHROCYTE INFECTÉ EN CONFIGURATION CELL-ATTACHED

I - Résumé en français

A - Contexte de l'étude

Différents types de canaux ioniques sont présents dans la membrane du globule rouge humain, mais ne sont peu ou pas actifs en l'absence de stimulation. Deux types de canaux cationiques ont été décrits en électrophysiologie au niveau unitaire : le canal potassique Gardos, activé par le calcium (Grygorczyk and Schwarz, 1983; Hoffman *et al.*, 2003), et au moins un canal cationique non sélectif dépendant du voltage (Christophersen and Bennekou, 1991; Kaestner *et al.*, 2000). A Roscoff, deux canaux anioniques ont également été décrits dans la membrane de l'érythrocyte sain, en utilisant la configuration *excised inside-out* : (1) un canal d'une conductance linéaire de 15 pS, activable soit par la présence de PKA + ATP, soit par déformation de la membrane, et (2) un canal présentant une rectification sortante, avec une conductance aux voltages positifs d'environ 80 pS (Egee *et al.*, 2002).

La perméabilité membranaire de l'érythrocyte est fortement modifiée lors de l'infection par le parasite de la malaria, *Plasmodium falciparum*. En particulier, de nouvelles voies de perméabilité membranaire (NPPs, New Permeation Pathways) apparaissent. L'emploi des techniques de lyse isosmotique ou de flux isotopiques a révélé pour ces NPPs des propriétés de canaux anioniques (Ginsburg, 1994; Kirk, 2001). Les premières études électrophysiologiques sur le globule rouge humain infecté ont en effet montré, en configuration *whole-cell*, une augmentation d'un facteur 100 à 150 des courants anioniques (Desai *et al.*, 2000; Egee *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2002). Cependant, la nature, le nombre et l'origine de ces canaux, de même que leur contribution aux NPPs, restent encore controversés. La configuration *cell-attached*

n'a été utilisée que par les équipes de S. Desai à Bethesda et S. Thomas à Roscoff, mais dans des conditions différentes.

L'équipe de Bethesda a décrit un canal anionique, le PSAC (Plasmodial Surface Anion Channel), d'une conductance de 20 pS dans des conditions supra-physiologiques (1.15 M d'ions Cl⁻), ce qui correspondrait à une conductance unitaire de 3 pS en conditions physiologiques de chlorure. Utilisant des concentrations ioniques plus proches des conditions physiologiques, le groupe de Roscoff a montré l'activation lors de l'infection du canal endogène (activable par la PKA) d'une conductance de 18 pS (Egee *et al.*, 2002).

A l'évidence, les conditions expérimentales utilisées ont un effet sur le comportement des canaux. Le premier travail de cette thèse a donc consisté à décrire au niveau unitaire les différents canaux anioniques spontanément actifs dans la membrane de l'érythrocyte infecté, dans des conditions les plus physiologiques possibles. Pour ce faire, la configuration *cell-attached* a été utilisée, puisqu'elle permet le respect de l'intégrité de la membrane cellulaire.

B - Résultats obtenus

1 - Conditions expérimentales utilisées

La solution utilisée dans le bain et la pipette de patch contient des concentrations ioniques et un pH proches des concentrations physiologiques (osmolarité proche de 300 mOsm, pH ajusté à 7.4, pCa ajustée à 3 ; voir matériel et méthodes). Dans l'optique de ne visualiser que des courants anioniques, les cations majoritaires en situation physiologique ont été remplacés dans la pipette par un cation non perméant, le N-Méthyl-D-Glucamine (NMDG). Ainsi, les courants entrants observés ne peuvent être dus qu'à une sortie d'anions, donc *via* des conductances anioniques. L'étude repose sur 227 tentatives de scellement en configuration *cell-attached*, dont la moitié environ a été obtenue. Les résistances de scellement (*seal*) obtenues étaient comprises entre 4 et 20 GΩ. Sur les 101 patches

réussis, 93 présentait une activité de conductance anionique, nous permettant de distinguer trois canaux anioniques différents.

2 - Trois types de canaux anioniques spontanément actifs dans la membrane du globule rouge infecté

Au cours de cette série d'enregistrements de conductances unitaires, les activités de trois types de canaux anioniques ont pu être décrites.

Le premier, nommé IRC pour « *Inwardly Rectifying anion Channel* », présente une conductance de 19.1 pS et une dépendance vis-à-vis du voltage imposé à la membrane. En effet, la probabilité d'ouverture est plus forte aux potentiels négatifs. La conductance et la cinétique de fonctionnement de ce canal correspondent à celles du canal précédemment décrit dans la membrane du globule rouge sain et infecté (Egee *et al.*, 2002).

Un deuxième type de canal, de faible conductance, est décrit pour la première fois au niveau unitaire dans cette étude. Il présente une conductance de 4.5 pS linéaire, et également une dépendance vis-à-vis du voltage, puisque sa probabilité d'ouverture diminue aussi aux potentiels positifs. Ce canal est nommé SCC pour « *Small Conductance anion Channel* ». Cependant, la faible conductance de ce canal rend l'étude cinétique de son comportement impossible ou peu significative. Le rapport signal/bruit est en effet insuffisant pour discriminer toutes les transitions entre les états ouverts et fermés.

Enfin, un canal de plus forte conductance, présentant une rectification sortante, a été vu dans trois patches. Il ressemble au canal endogène présentant une rectification sortante (ORC pour « *Outwardly Rectified Channel* ») décrit en 2002 (Egee *et al.*, 2002). Pour la première fois ce canal est décrit en configuration *cell-attached* comme spontanément actif dans la membrane du globule rouge infecté. Le faible nombre d'apparitions de ce canal suggère soit un très petit nombre de canaux dans la membrane, soit une activité spontanée faible dans les enregistrements effectués.

	Conductance et rectification	Constantes	Nombre de copies estimé	Probabilité d'ouverture
IRC	19.1pS, rectifié entrant	τ_o :18.2ms τ_c : 9.7ms	< 200-300 copies	Voltage - dépendante
SCC	4.5pS, linéaire	nd	65-80 copies	Voltage - dépendante
ORC	80pS, rectifié sortant	nd	3-4 copies	Constante

Tableau 4 : Récapitulatif des caractéristiques des canaux anioniques actifs en configuration *cell-attached* dans la membrane du globule rouge infecté

τ_o , constante d'ouverture ; τ_c , constante de fermeture. nd, non déterminé

Compte-tenu du nombre important d'expériences réalisées, la fréquence d'apparition des canaux actifs dans le fragment de membrane contenu dans la pipette nous a permis d'estimer le nombre de canaux de chaque type dans la membrane de la cellule. Ce calcul suppose que les canaux sont systématiquement actifs lorsqu'ils sont présents sous la pipette de patch. Pour cela, nous avons considéré que la surface moyenne d'un globule rouge est d'environ 130 μm^2 et celle du fragment de membrane contenu dans la pipette d'environ 2.5 à 3 μm^2 .

Les propriétés de ces trois canaux sont résumées dans le tableau 4.

C - Discussion

Au cours de ce travail, j'ai pu décrire dans une situation relativement proche des conditions physiologiques le nombre et les caractéristiques des canaux anioniques spontanément actifs dans la membrane d'un globule rouge infecté. Ce travail a pu être valorisé sous la forme d'une publication dans la revue *Blood Cells Molecules and Disease* et par la présentation d'un poster à la deuxième conférence annuelle du réseau BioMalPar à Heidelberg en Allemagne, en Avril 2006.

En conclusion, ce travail permet d'affirmer qu'en situation physiologique, trois types de canaux anioniques sont spontanément actifs dans la membrane du globule rouge infecté. Parmi ces trois types de canaux, deux semblent être endogènes puisqu'ils correspondent aux canaux décrits dans la membrane du globule rouge sain (Egee *et al.*, 2002). L'un est activable par phosphorylation ou par déformation de la membrane (IRC) ; l'autre présent en très faible nombre et dont les mécanismes d'activation sont encore mal connus (ORC). Un troisième type de canal (SCC), encore jamais décrit au niveau unitaire, est présent et actif mais sa nature moléculaire et son origine restent pour l'instant inconnues.

Si ces trois types de canaux anioniques sont présents, leur contribution relative dans la formation des NPPs reste néanmoins à déterminer. En effet, un ou plusieurs de ces canaux pourraient n'avoir un rôle physiologique que limité, lié aux effets de

l'infection par *Plasmodium* mais sans être indispensable au développement du parasite. D'autre part, les mécanismes conduisant à l'activation de ces canaux restent encore indéterminés. Bien que pour le canal IRC un mécanisme de phosphorylation lors de l'infection semble une hypothèse envisageable, l'activation des deux autres types de canaux pendant l'infection reste encore un processus à découvrir. Enfin, comment ces trois canaux peuvent-ils correspondre aux autres canaux décrits dans le globule rouge infecté ? Pour mieux comprendre les différents modèles proposés, il est nécessaire de regarder plus en détail et d'étudier les effets des conditions expérimentales utilisées par les différents groupes utilisant les techniques d'électrophysiologie sur le globule rouge infecté.

II - Article Blood Cells, Molecules, and Diseases

Three types of spontaneously active anionic channels in malaria-infected human red blood cells[☆]

Guillaume Bouyer, Stéphane Egée, Serge L. Thomas^{*}

CNRS, UMR 7150, Station Biologique, Place G. Teissier, BP 74, 29682 Roscoff cedex, France

Submitted 11 January 2006

(Communicated by J. Hoffman, M.D., 11 January 2006)

Abstract

The electrophysiological study of red blood cells (RBCs), using the patch-clamp technique, has been going through a renaissance with the recent discovery of novel channel activity in the host plasma membrane of *Plasmodium falciparum*-infected human RBCs (S.A. Desai et al., Nature 406, 1001–1005, 2000; S.M. Huber et al., EMBO J. 21 (2002) 22–30; S. Egée et al., J. Physiol. 542 (2002) 795–801). This arose from the finding that malaria-infected RBCs have altered permeability characteristics due to the induction of new permeation pathways (NPPs) (H. Ginsburg, Novartis Foundation Symposium 226 (1999) 99–108; K. Kirk, Physiol. Rev. 81 (2001) 495–537), which are defined, using non-electrophysiological techniques, as having the general characteristics of anion channels (i.e. high anion permeability, linear concentration dependence, inability to distinguish between stereo-isomers of permeant solutes). Discovering potent and specific inhibitors of the NPPs is an important therapeutic challenge, but too many questions remain unanswered: do the NPPs correspond to a single path or multiple pathways? Are they parasite-derived proteins? Are they up-regulated or modified endogenous quiescent red blood cell proteins? This article concerns the identification of different types of anionic channels that are expressed in malaria-infected human RBCs. Implications regarding the presence of these different types of channels in infected RBCs and their functional significance are discussed.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

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

Introduction

Uninfected human RBCs have an almost total absence of spontaneous ionic channel activity. This does not mean that the RBC membrane is devoid of ionic channels. Electrophysiological studies on human RBCs have resulted in documented description of two different cationic channels: an intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, known as the Gárdos channel [1,2], and a voltage-dependent non-selective cationic channel [3]. More recently, we have identified two types of anionic channels in uninfected RBCs [4]: a medium (~ 15 pS) linear conductance channel induced via two modes of activation (PKA/ATP and membrane deformation) and visible in more than 80% of membrane patches; an outwardly rectifying anion

channel (75–85 pS at positive membrane potentials) that is present in less than 5% of uninfected cell patches.

Malaria-infected RBCs have altered membrane permeability characteristics due to the induction of new permeation pathways (NPPs) [5,6] which were defined, using non-electrophysiological techniques, as having the general characteristics of anion channels, i.e. high anion permeability, linear concentration dependence, inability to distinguish between stereo-isomers of permeant solutes. Recent electrophysiological studies showed a membrane current 100- to 150-fold larger than in unstimulated uninfected cells [4,7] resulting from activation of small anion channels showing functional and pharmacological properties in keeping with those reported previously for the NPPs. However, the origin, molecular nature and biophysical features of the channels carrying the whole-cell current remain controversial, and the question of whether the NPPs correspond to a single or multiple pathways was not correctly addressed. Desai and co-workers claimed that increased current can be attributed to the presence of parasite-encoded small conductance anion channels

[☆] This paper is based on a presentation at the Red Cell Club Meeting held at Chicago University School of Medicine on September 30, 2005.

^{*} Corresponding author. Fax: +33 298 292310.

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

[7], whereas we observed spontaneous channel activity in infected RBCs consistent with the activation of the 18 pS endogenous anion channel described in uninfected RBCs [4]. In addition, the mean unit conductance of the anion channel measured in malaria-infected RBCs by our group using the cell-attached configuration under physiological concentrations (155 mM Cl^-) is several times higher than reported by Desai's group (~ 18 pS versus ~ 3 pS) but Desai and co-workers used the cell-attached configuration with 1150 mM Cl^- in the bath and pipette solutions which approximates to a channel conductance of only 3 pS under physiological conditions.

It is clear that these discrepant observations centered mainly on the different experimental conditions claimed necessary to obtain the published results, and the question arising from the data and interpretations is which behavior best represents the physiological condition.

In this paper, we detail our cell-attached studies of anionic single channel activity in *Plasmodium falciparum*-infected human RBCs. The experiments were performed (April to July 2005) with the special intention to obtain excellent signal-to-noise ratios with physiological solutions in bath and pipette even at very low voltages and at the spontaneous membrane potential (0 mV imposed). We used the cell-attached configuration for measuring on intact cells the current through $1\ \mu\text{m}^2$ of membrane within the tip of the pipette. This configuration does not give access to the cytosolic side of the membrane for pharmacological tests but has the advantage to respect the integrity of the cell and from this point of view is the most physiological situation. We present evidence for the existence of three anion channels activated by the parasite and displaying clearly visible activity at the spontaneous membrane potential. Our data are also compared to other recent publications in the same field.

Materials and methods

Preparation of cells

RBCs were obtained from healthy volunteers and washed three times in a saline solution containing (in mM) 150 NaCl, 5 KCl, 1.4 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 10 glucose, pH 7.4 and the buffy coat removed by suction. They were maintained at 37°C. All solutions were equilibrated in air (oxygen partial pressure, $\text{PO}_2 = 155$ mm Hg; carbon dioxide partial pressure, $\text{PCO}_2 = 0.3$ mm Hg) and filtered through 0.2 μm Millipore cellulose disks.

P. falciparum clone 3D7 was grown in human RBCs as described previously [4].

Current recordings

Patch pipettes (tip resistance 10–20 M Ω) were prepared from borosilicate glass capillaries (Vitrex, Modulohm, Herlev, Denmark), pulled and polished on a programmable puller (DMZ, Werner Zeitz, Augsburg, Germany). Since the object was to obtain excellent signal-to-noise ratios and detect/measure tiny electrical currents through channels in the cell membrane at the

spontaneous membrane potential, the seal had to be good to prevent artefacts resulting from leaky seals. Regarding experiments on human red blood cells, a compromise between large enough tip pipettes for low access resistance (necessary for whole-cell recordings) and narrow enough to avoid entry of the cell into the pipette during seal formation has to be done. Most electrophysiologists agree that this is well achieved in red cells by using short ends 10–15 M Ω borosilicate pipettes (in normal NaCl or NMDG–Cl 150 mM solutions) allowing 4 to 20 G Ω seals. Pipettes solutions contained (in mM) 155 NMDG–Cl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 10 glucose, pH 7.4, 320 ± 5 mosM ($\text{kg H}_2\text{O}$) $^{-1}$. The calcium concentrations were adjusted to different pCa ($-\text{Log}[\text{Ca}^{2+}]$) in the pipette and bathing solutions (pCa7 on the cytosolic side and pCa3 on the extracellular side). Seals were obtained by suction of 10–25 mm Hg applied for less than 20 s, using a syringe connected to the patch pipette. Single channel currents were recorded using a RK400 patch-clamp amplifier (Biologic, Claix, France), filtered at 0.3 or 1 kHz, digitized (48 kHz) and stored on a Digital Audio Tape (DTR 1204, Biologic). For analysis, the data were played back and transferred to a computer and analyzed by the PAT computer program (Dempster, Strathclyde Electrophysiology Software).

The sign of the clamped voltage (V_p) refers to the pipette solution with respect to the bath, and outward current (positive charges flowing across the patch membrane into the pipette) is shown as an upward deflection in the current traces. In the cell-attached configuration, the imposed membrane potential (V_m) is referred to as $-V_p$.

Current–voltage (I/V) curves were constructed by plotting the mean current amplitude for each clamped potential. Open probability (P_o) was determined as the fraction of digitized points above a threshold set midway between the closed and open peaks of current–amplitude histograms. P_o was determined from 60-s stable recordings. In these conditions, P_o was defined as the ratio of the total time spent in the open state to the total time of the complete record. Analysis were confined to patches containing one channel event histogram. Conventional 50% threshold analyses yielded distribution of dwell times that were fit by multiexponential or power functions consistent with multiple open and closed states.

Data are given as mean values $\pm$ SEM. Significance was assessed using the Fisher F test and Student's t test.

Results and discussion

Negligible channel activity was detected in uninfected cells. In this series of experiments, 227 attempts were made to obtain a G Ω seal on infected red cell membrane, among which $\sim 50\%$ were successful. The mean duration of a seal was 20–25 min in the cell-attached configuration due to the extreme fragility of the red blood cell membrane. Of 101 successful seals, 93 membrane patches showed channel activity. Eleven of these exhibited exclusively one single copy of inwardly rectifying channel (IRC) of intermediate conductance, and 18 exhibited channel activity of linear small conductance channel (SCC). In all other membrane patches, the presence of SCC was superimposed on the record of 1 to 3 IRC. Spontaneous activity

of outwardly rectifying channel (ORC) was briefly observed in 3 patches.

Biophysical characterization of channels present in the cell-attached membrane patches

Inwardly rectifying anionic channels (IRC)

Fig. 1a shows an example of the IRC gating at a range of applied potentials in cell-attached patches with saline solution in the bath and 155 NMDG–Cl in the pipette. Spontaneous channel activity was consistently observed as bursts of channel openings separated by brief closings at negative potentials. In the cell-attached configuration, the recordings of flickering currents provide important information on how single channel conductances and open-state probabilities vary with voltage. The single channel current–voltage (I/V) plot is presented in panel b of Fig. 1. Under these experimental conditions, the single channel current reversed polarity at the potential (E_r) of 5.8 ± 1.2 mV. When considering only negative potentials, the I/V relationship showed no significant deviation from linearity and the mean slope conductance between E_r and -60 mV was

19.1 ± 1.5 pS (58 data points from 6 experiments). Negative single channel currents correspond to an outward movement of anions for the cell into the electrode and give an unambiguous identification of anionic channels in cell-attached patches. Note that the current–voltage relationship saturated at positive potentials. I/V curves that deviate from the usual linear ohmic behavior are described as rectified; conductances measured under patch-clamp conditions are conventionally described as inward rectifiers if the current is reduced at positive membrane voltages (relative to the extracellular medium). When applied to single channels, rectification properties reflect the kinetics of the molecular components controlling the aperture of the conductive path. The present observation suggests that rectification in cell-attached patches is due to the anion concentration gradient or results from block by intracellular ions or is due solely to a voltage-dependent block. Replacement of NMDG–Cl in the pipette by NaCl did not significantly modify these values (data not shown). This channel exhibited voltage-dependent gating as clearly shown in panel c of Fig. 1 with high open probability (P_o) at negative potentials. A dwell time analysis was performed on patches containing only one

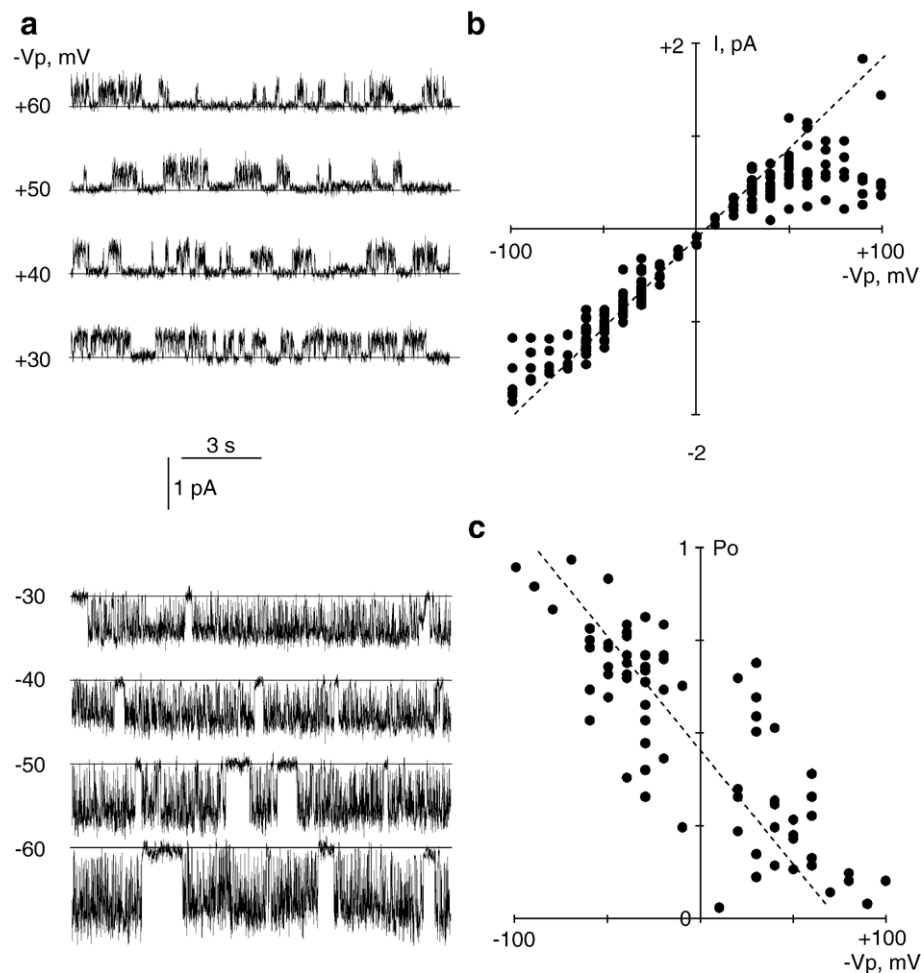


Fig. 1. Cell-attached single channel recordings of inwardly rectifying anionic channel activity in infected RBCs. (a) Typical current recordings at different potentials ($-V_p$) from infected RBCs bathing in NMDG–Cl solution. Solid lines indicate the closed state. (b) Corresponding I/V plots (voltage pulses between -100 and $+100$ mV, 10 mV increments, 60-s recordings). Dashed line: linear regression calculated between -60 mV and $+60$ mV. (c) Corresponding P_o values. Dashed line: linear regression calculated between -100 mV and $+100$ mV.

channel, and the kinetics analysis, made at holding potentials ($-V_p$) of -30 mV, showed that within bursts the open-time and closed-time durations were fitted best by single exponential distributions. The kinetic constants, τ_o and τ_c , were 18.2 ± 2.5 ms and $9.7 \pm 3.4.3$ ms ($n = 6$), respectively.

These data are in keeping with our previous publications [4], and further experiments should elucidate the reasons for inward rectification which is much more pronounced in cell-attached configuration than in excised inside-out configuration. Substitution experiments by replacement of chloride by other anions in the pipette will identify other anions permeating through this conductive pathway.

Small conductance anionic channels (SCC)

Fig. 2 shows typical data for spontaneously active small conductance channels as they appeared in cell-attached condition in 18 out of 93 membrane patches. In all cases, we have seen channels with similar characteristics. The negative current recorded for negative potentials in the presence of NMDG in the pipette again means an outward movement of anions. Since the channel conductance is very low, a detailed description of this channel is difficult. The slope of the I/V curve measured in the typical range of 100 mV to -100 mV gives an ohmic channel conductance of 4.5 ± 1.2 pS ($n = 6$) with E_r close

to 5 mV (Fig. 2b). This channel did not exhibit a flickering type of activity but rather long periods of opening separated by intervals of closing and presented voltage-dependent gating as shown in panel c of Fig. 2 with higher open probability (P_o) at negative potentials. The presence of this channel in infected cells is observed for the first time in this study. It was not mentioned in our previous studies and was not observed in uninfected RBCs activated by membrane deformation or by PKA and ATP. As the surface of the membrane patches entering the pipette ranges between 2.5 and $3.5 \mu\text{m}^2$, the calculated mean surface area of the red cells is $130 \mu\text{m}^2$, 1 – 2 copies are present in 90% of membrane patches, then the density of SCC channels is approximately of 65 – 80 copies per infected cell. The constant presence of 1 – 2 copies of this channel type in infected cell means that a significant fraction of the whole-cell current which was attributed to the IRC channels was carried by SCC channels which reduces the estimated number of IRC (250 – 300 copies of the 18 pS channel [4]) accordingly. Further experiments will be aimed at clarifying the exogenous or endogenous origin as well as the selectivity of this new channel.

Multichannel patches

Fig. 3 shows examples of current recordings from multichannel patches corresponding to the simultaneous presence of

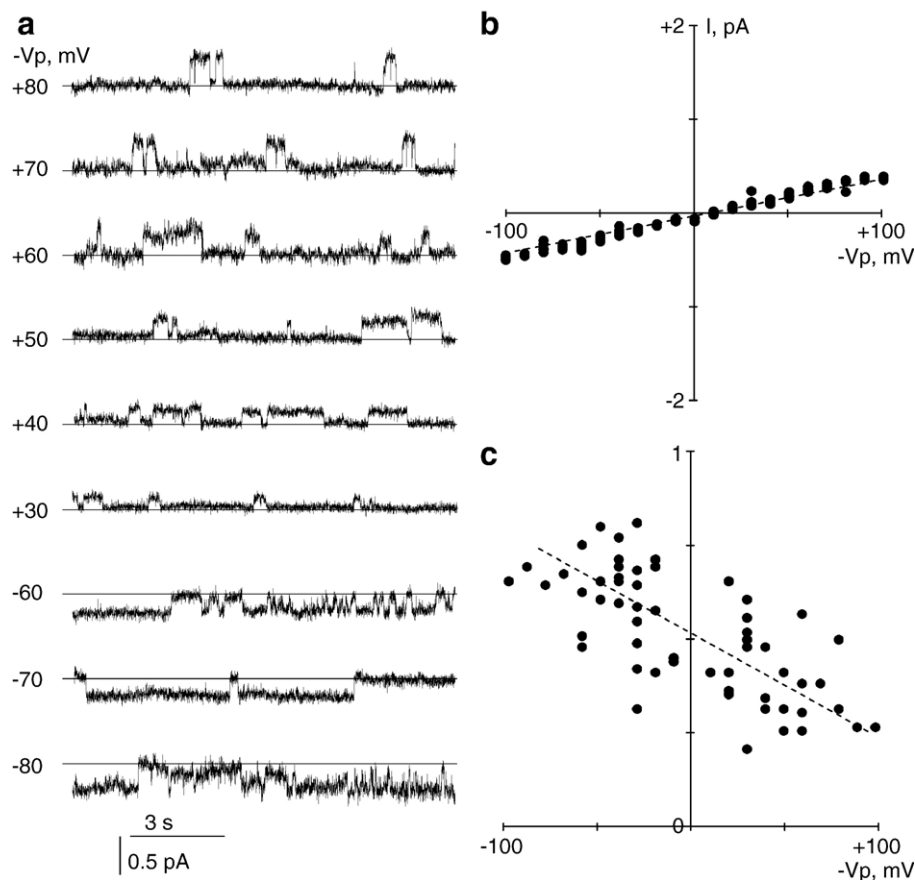


Fig. 2. Cell-attached single channel recordings of small conductance anionic channel activity in infected RBCs. (a) Typical current recordings at different potentials ($-V_p$) from infected RBCs bathing in NMDG-Cl solution. Solid lines correspond to the closed state. (b) Corresponding I/V plots (voltage pulses between -100 and $+100$ mV, 10 mV increments, 60 -s recordings). (c) Corresponding P_o values.

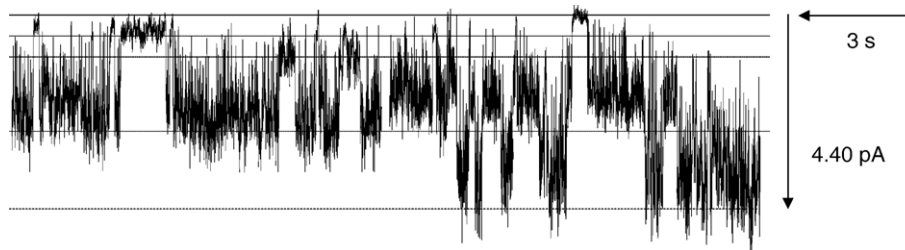


Fig. 3. Multichannel patch. A 4-channel patch recorded in infected RBCs at $-V_p = -100$ mV showing superimposition of two inwardly rectifying and two small conductance anion channels. Solid line: zero-current level, dashed line: simultaneous opening of 4 channels, dotted line: intermediary levels.

several copies of the small conductance anionic channel (SCC) superimposed on one or two copies of the IRC channel. This was the case for the great majority of recordings, and this complex situation makes it more difficult to build up a reliable and comprehensive picture of the biophysical characteristics of channels present in the membrane. This confirms that a large

number of observations with all the proper controls are essential in this line of research.

We did not encounter any other types of anionic channels in the membrane of infected RBCs on a regular basis, but it should be noted that in three patches was a very large channel seen briefly at the beginning of recordings (see Fig. 4).

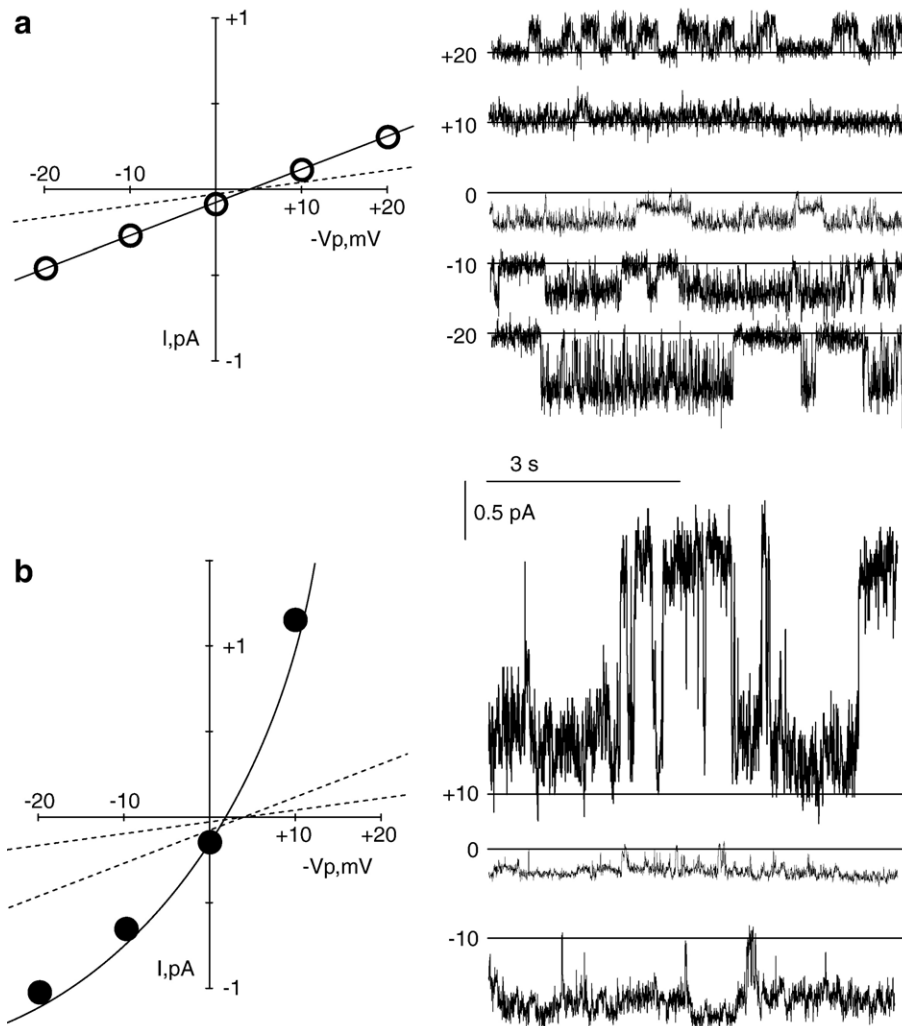


Fig. 4. Channel activity at physiological potentials. Examples of current recordings obtained in the -20 mV to $+20$ mV range of pipette potentials. 0 mV corresponds to the spontaneous membrane potential. (a) Inwardly rectifying channel (IRC). Right: current recordings; 2 copies are clearly active at 0 mV, indicating outward movement of anions. Left: corresponding I/V plot; lines figure the mean regressions for IRC (solid) and SCC (dashed). (b) Outwardly rectifying channel (ORC). Right: current recordings; channel is clearly active at 0 mV, indicating outward movement of anions. Left: corresponding I/V plot; dashed lines figure the mean regressions for IRC and SCC; solid line: hand-drawn connecting line.

Channel activity at physiological potentials

What is currently known about the functional and pharmacological properties of NPPs results from flux and hemolysis measurements performed by Hagai Ginsburg and colleagues [5,8–10] and by Kieran Kirk and colleagues [6,11]. Fluxes data are obtained in more physiological conditions than patch-clamp data which make difficult all attempt to directly compare results issuing from both techniques. If we want to compare, it must be kept in mind that fluxes data were obtained on intact cells at the spontaneous membrane potential. Since human red blood cells are normally thought to be inexcitable, we cannot expect large and sudden variations of the membrane potential, and the model for the malaria-infected RBC by Lew et al. [12] predicts that as the parasite matures the RBC membrane potential drops from approximately -12 mV to -14 mV before increasing again to -2 mV. Therefore, from a physiological point of view, it is of greater interest to speculate about the functional significance of cell-attached current recordings corresponding to voltage variations in the range -20 mV to $+20$ mV. The present study shows that it is possible to obtain excellent signal-to-noise ratios and detect and measure tiny electrical currents through channels in the cell membrane at the spontaneous membrane potential.

Fig. 4 shows examples of current recording obtained in this range of voltages. The activity of the IRC is clearly visible at low voltages (panel a), and the inward current recorded at 0 mV (i.e. at the spontaneous membrane potential) indicates that in this typical example this channel is active and carries outward movement of anions. As the intracellular parasite proceeds from ring to trophozoite stage, the inorganic ion composition of the red cell cytosol changes dramatically. In our experimental conditions, it is not possible to determine accurately the exact stage of the parasite present in the infected cells. It is therefore probable that intracellular anion concentrations are variable from one cell to another. As we used physiological concentrations in bathing solutions, the constant observation of outward movements of anions through the patch membrane at spontaneous membrane potential means that anions were always slightly above electrochemical equilibrium in infected cells.

Fig. 4b shows an example where we had the opportunity to briefly record the activity of a large outwardly rectifying (ORC) channel superimposed on the two others. This happened three times and constitutes the first observation of this type of channel activity in infected cells recorded in the cell-attached configuration. In all cases, outward movements of anions were also measured at the spontaneous membrane potential.

Taken together, the present results fit quite well with a recent analysis by Ginsburg and Stein [10] and available data from tracer fluxes, isosmotic lysis and electrophysiology which suggested that the NPPs consist of two types of channels. The first type is present in a small number of copies per cell (about 4), is charge and size-selective and discriminates against cations by a factor of 4. The second type is 100-fold more abundant (about 400 copies per cell) and allows the movement of anions and nucleosides.

In the work done with malaria-infected RBCs, the patch clamp has been used in three distinct configurations by different groups of electrophysiologists. The cell-attached configuration can be used for investigations on intact cells as is the case in the present study or simply constitutes the first compulsory step for reaching the excised inside-out or the whole-cell configurations. This configuration respects the integrity of the cell and is therefore the most physiological, provided that the electrode is actually filled with an appropriate saline solution. When the intention is to study the movements of anions across the intact membrane of infected RBCs, the use of pipettes filled with 155 mM NMDG-Cl is a judicious choice. The fact that replacement of NMDG-Cl by a saline solution containing (in mM) 150 NaCl + 5 KCl did not induce any qualitative modifications means that in these experimental conditions the membrane conductance of infected RBCs is carried by outward movements of anions at the spontaneous membrane potential. The infected cell undergoes a rapid dissipation of the normal Na, K and Cl gradients, however, the reversal potentials measured in the present study suggest that anion concentrations were not far from symmetry. In an attempt to reproduce Desai's cell-attached conditions [13], we used 1000 mM choline chloride + 115 mM NaCl in the pipette but as predicted the reversal potential was dramatically shifted and when the choline-chloride solution was added to the bathing solution the seal ruptured due to violent cell shrinkage. With these hypertonic conditions (more than 2000 mosM in bath and pipette) where symmetry cannot be obtained between pipette and intracellular medium, we could not perform cell-attached recordings in symmetric conditions.

The present study confirms that the NPPs are probably composed of several channel types. Their features and molecular nature remain to be clarified, and, as in previous papers, we can conclude that improvements in patch-clamp experiments will have to come from future work focused on physiological conditions. This implies working in isotonic conditions, in the presence of serum, bicarbonate ions and a CO_2 - and pH-controlled environment, as well as carefully evaluating the effects of changes in the composition of cell perfusates in whole-cell patch configurations.

Acknowledgment

The French Ministry of Defence (DGA) has supported work in our laboratories on this subject.

References

- [1] R. Grygorczyk, W. Schwarz, Properties of the Ca^{2+} -activated K^+ conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique, *Cell Calcium* 4 (1983) 499–510.
- [2] O.P. Hamill, Potassium channel currents in human red blood cells, *J. Physiol.* 319 (1981) 97–98.
- [3] P. Christophersen, P. Bennekou, Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 1065 (1991) 103–106.
- [4] S. Egée, F. Lapaix, G. Decherf, H.M. Staines, J.C. Ellory, C. Doerig, S.L.

- Thomas, A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *J. Physiol.* 542 (2002) 795–801.
- [5] H. Ginsburg, Transport pathways in the malaria-infected erythrocyte. Their characterization and their use as potential targets for chemotherapy, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 1847–1856.
- [6] K. Kirk, Membrane transport in malaria-infected erythrocytes, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 495–537.
- [7] S.A. Desai, S.M. Bezrukov, J. Zimmerberg, A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite, *Nature* 406 (2000) 1001–1005.
- [8] H. Ginsburg, K. Kirk, Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte, in: I.W. Sherman (Ed.), *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*, ASM Press, Washington, DC, 1998, pp. 219–232.
- [9] H. Ginsburg, S. Kutner, M. Krugliak, Z.I. Cabantchick, Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells, *Mol. Biochem. Parasitol.* 14 (1985) 185–199.
- [10] H. Ginsburg, H.D. Stein, The new permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of the infected erythrocyte: comparison of results using different experimental techniques, *J. Membr. Biol.* 197 (2004) 113–122.
- [11] K. Kirk, H.A. Horner, B.C. Elford, J.C. Ellory, C.I. Newbold, Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3339–3347.
- [12] V.L. Lew, R.M. Bookchin, Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model, *J. Membr. Biol.* 92 (1) (1986) 57–74.
- [13] S.A. Desai, Open and closed states of the plasmodial surface anion channel, *Nanomedicine: Nanotechnol., Biol., Med.* 1 (2005) 58–66.

CHAPITRE 2 – INFLUENCE DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

CHAPITRE 2 – INFLUENCE DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Dans la partie précédente, trois types de canaux spontanément actifs dans la membrane de l'érythrocyte infecté ont été décrits au niveau unitaire. Comment relier ces résultats aux modèles proposés par les autres groupes travaillant sur le sujet ? Comment expliquer les effets de la présence de sérum, qui modifie considérablement la conductance globale étudiée en configuration *whole-cell* ? Il devenait donc essentiel de détailler les effets des conditions expérimentales utilisées, en particulier les concentrations ioniques et la présence de sérum, au niveau global aussi bien qu'au niveau unitaire.

Pour améliorer la résolution des courants unitaires mesurés, l'équipe de Bethesda augmente les concentrations ioniques dans le bain et dans la pipette jusqu'à des valeurs nettement supra-physiologiques. Ainsi, selon la loi d'Ohm, l'augmentation des concentrations d'ions en solution entraîne un accroissement proportionnel des courants à enregistrer, et donc une augmentation du rapport signal/bruit. Ce groupe rajoute donc dans le bain et la pipette 1 M de chlorure de choline, leur permettant de décrire dans ces conditions un canal anionique de 20 pS dénommé PSAC (Plasmodial Surface Anion Channel). Cette valeur équivaldrait à une conductance d'environ 3 pS en situation physiologique, si on estime que la relation conductance / concentrations ioniques est linéaire (Alkhalil *et al.*, 2004; Desai, 2005; Desai *et al.*, 2000).

Pour relier nos résultats à ceux de Bethesda, nous avons suivi l'évolution des conductances globales et unitaires, l'évolution des probabilités d'ouverture de chacun des canaux ainsi que l'évolution de la réponse aux agents pharmacologiques lors de l'augmentation des concentrations ioniques des solutions utilisées dans le bain et la pipette. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés dans la première partie de ce chapitre, avec la publication issue de ce travail précédée d'un résumé en français.

D'autre part, la modification des courants globaux en présence de sérum est également un phénomène important, qui reste encore mal compris. En effet, bien que l'on connaisse les effets du sérum en configuration *whole-cell* (Staines *et al.*, 2003), qui ont une réalité physiologique, les mécanismes sous-jacents restent encore indéterminés. S'agit-il de l'activation d'un nouveau type de canal, ou d'une modification de l'activité de l'un des canaux déjà décrit ?

Pour essayer d'expliquer comment la présence de sérum peut modifier la conductance globale, j'ai donc réalisé une série d'enregistrements en configuration *cell-attached* en présence de sérum. Les résultats de cette étude préliminaire, sont présentés en anglais dans la seconde partie de ce chapitre, et résumés en français.

I - Effets des concentrations ioniques sur les courants membranaires de l'érythrocyte infecté

A - Résumé en français

1 - Principes de l'étude

L'étude a consisté à réaliser une grande série d'enregistrement, avec à chaque fois des concentrations ioniques symétriques dans le bain et la pipette. En partant des concentrations habituellement utilisées à Roscoff (solution A : 115 mM NaCl), nous avons ajouté 200, 400, 600, 800, 1000 ou 1200 mM de chlorure de choline pour aboutir aux concentrations utilisées à Bethesda. L'étude a d'abord porté sur les courants globaux enregistrés en configuration *whole-cell*. Nous avons également suivi avec cette configuration les effets de deux inhibiteurs classiques des conductances anioniques du globule rouge infecté et des NPPs : le NPPB et le furosémide. Le zinc, inhibiteur du canal ClC-2 dont la présence est suggérée par le groupe de Tübingen, a également été testé. Enfin nous avons utilisé la configuration *cell-attached* pour suivre l'évolution des conductances unitaires et de la probabilité d'ouverture de l'IRC et du SCC avec ces concentrations croissantes en ions, dans le bain et la pipette (l'IRC apparaît trop peu fréquemment pour en faire une étude précise).

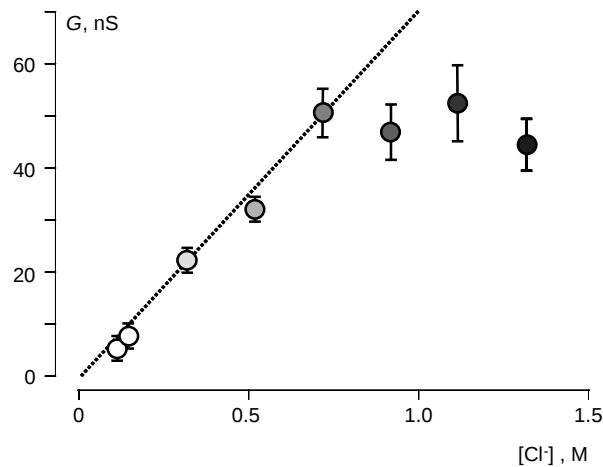


Figure 15 : Evolution de la conductance globale des érythrocytes infectés en fonction de la concentration en chlorure

La conductance est mesurée entre -100 et -50 mV aux différentes concentrations. Les valeurs de conductances sont la moyenne $\pm$ SEM de 7 à 13 expériences réalisées dans chaque condition de concentration.

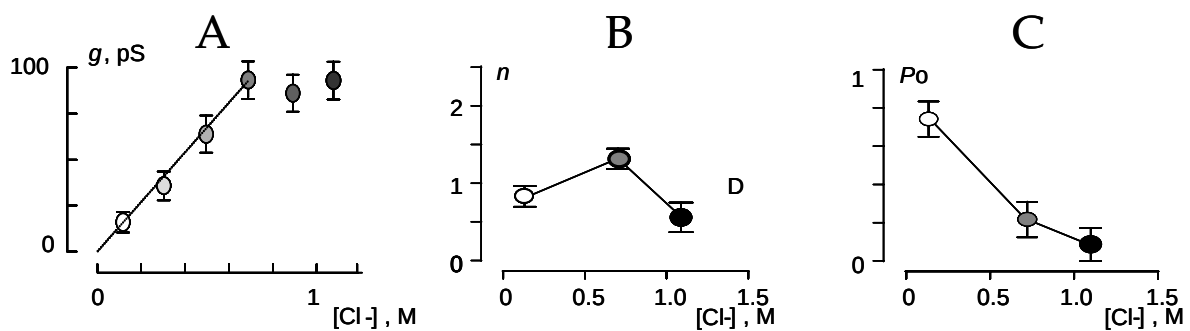


Figure 16 : Evolution du comportement de l'IRC avec la concentration en chlorure.

A, conductance unitaire mesurée entre -100 et -50 mV (pS). B, nombre moyen de canaux actifs sous la pipette. C, probabilité d'ouverture mesurée lorsqu'un seul canal était présent sous la pipette de patch. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ SEM d'au moins 6 expériences pour chaque condition.

2 – Résultats obtenus en configuration *whole-cell*

Les enregistrements effectués avec les concentrations croissantes de chlorure de choline montrent une saturation des courants globaux. Cette saturation apparaît nettement sur la figure 15 où sont représentées les conductances entrantes (calculées entre -100 et -50 mV) aux différentes concentrations. La saturation semble se mettre en place progressivement à partir d'environ 700 mM d'ions chlorure dans le bain.

L'effet des trois inhibiteurs testés s'est également révélé très dépendant des concentrations ioniques utilisées. En effet, pour le NPPB et le furosémide, plus la concentration en ions chlorure est importante, moins les inhibiteurs sont efficaces. Inversement, l'augmentation des concentrations semble potentialiser l'effet inhibiteur du zinc. Ce résultat indique soit que (1) les effets des inhibiteurs sont dépendants de la force ionique (interactions variables avec la protéine canal), ou (2) comme plusieurs types de canaux sont présents, leur activité est affectée par les concentrations en Cl⁻. Seule une étude de l'activité des canaux précédemment décrits en conditions unitaires pouvait permettre de répondre à cette question.

3 - Résultats obtenus en configuration *cell-attached*

- Activité de l'*Inwardly Rectifying Channel*

L'évolution des caractéristiques de fonctionnement de l'IRC est présentée sur la figure 16. Les enregistrements réalisés montrent un processus de saturation de la conductance unitaire de ce canal lorsqu'on atteint des fortes concentrations ioniques (> 700 mM d'ions chlorure).

De plus, ce canal IRC devient également de moins en moins fréquemment visible et actif sous la pipette de patch. Il semble donc que les fortes concentrations ioniques puissent provoquer une régulation de l'activité de ce canal, *via* un mécanisme indéterminé. De même, il apparaît que l'augmentation des concentrations ioniques affecte le fonctionnement du canal en réduisant fortement sa probabilité d'ouverture.

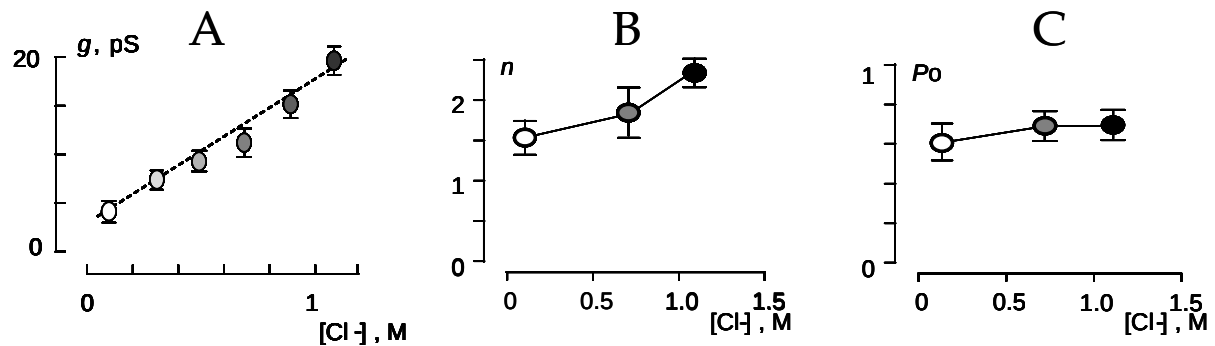


Figure 17 : Evolution du comportement du SCC avec la concentration en chlorure.

A, conductance unitaire mesurée entre -100 et -50 mV (pS). B, nombre moyen de canaux actifs sous la pipette. C, probabilité d'ouverture mesurée lorsqu'un seul canal était présent sous la pipette de patch. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ SEM d'au moins 6 expériences pour chaque condition.

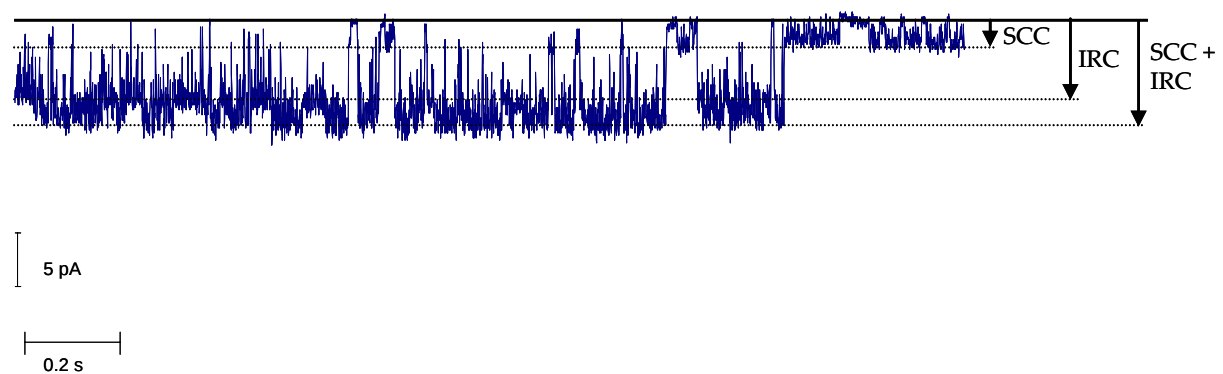


Figure 18 : Enregistrements des canaux IRC et SCC actifs simultanément dans la membrane

$V_m = -100$ mV, $[Cl^-]$ 1115 mM dans le bain et la pipette. Filtre 1 kHz.

- Activité du *Small Conductance Channel*

L'évolution du comportement du SCC en fonction des concentrations en ions chlorure est très différente (figure 17). La conductance unitaire de ce canal augmente de façon linéaire, allant de 4.1 ± 1.0 pS (n=12) à 19.9 ± 1.7 pS (n=17) pour des concentrations d'ions chlorure de 115 mM et 1115 mM, respectivement. Par ailleurs, la probabilité d'ouverture du SCC n'évolue pas avec l'augmentation des concentrations, et il semble que ce canal soit de plus en plus fréquemment actif sous la pipette de patch aux fortes concentrations d'ions chlorure. Ce canal ne présente donc pas de mécanismes de saturation de la conductance unitaire quelles que soient les concentrations en ions Cl^- utilisées.

On peut noter que la conductance unitaire de ce canal, obtenue à 1115 mM d'ions chlorure (soit les conditions utilisées par l'équipe de S. Desai), est équivalente à celle du PSAC dans ces conditions (soit 20 pS). On peut donc en déduire qu'il s'agit probablement du même canal.

Sur la figure 18, les deux types de canaux sont clairement visibles avec 1115 mM d'ions chlorure dans le bain et la pipette. La différence de conductance entre les deux types, l'IRC avec un courant d'environ 8.8 pA, et le SCC avec un courant d'environ 1.9 pA est clairement visible.

4 - Bilan de cette étude : vers un modèle unificateur

Les résultats obtenus en configuration *cell-attached* sont à mettre en relation avec ceux obtenus en configuration *whole-cell*. Il est clair que la saturation des courants globaux est reliée à des processus de saturation de l'IRC. La conductance unitaire de celui-ci atteint un plateau, phénomène accentué par la diminution du nombre de copies actives de ce canal et la baisse de sa probabilité d'ouverture.

Compte-tenu des conductances unitaires respectives des deux canaux et de leur fréquence d'apparition, on peut donc affirmer que l'IRC est responsable de la majorité du courant global en conditions physiologiques, alors qu'aux conditions

utilisées par l'équipe de S. Desai, le SCC devient prédominant. Cette conclusion est renforcée par les études pharmacologiques réalisées en configuration *whole-cell*. En effet il semble très vraisemblable que les deux types de canaux n'aient pas la même sensibilité aux inhibiteurs. Le SCC semblerait donc moins sensible au NPPB et au furosémide, et plus au zinc, que l'IRC. Ainsi plus la part du SCC dans le courant global est importante, moins les courants sont sensibles au NPPB et au furosémide, et plus ils sont sensibles au zinc.

Du fait de la conductance du SCC observée à 1115mM d'ions chlorure (20 pS), qui correspond à celle du PSAC décrit par l'équipe de S. Desai, et puisque ce canal semble prédominant dans ces conditions, nous pouvons donc dire que ces deux canaux sont identiques. Il semble assez logique que l'équipe de S. Desai n'observe pas l'activité de l'IRC dans leurs conditions expérimentales, en raison de sa faible activité.

L'autre résultat important de ce travail est le parallèle entre l'augmentation de la part du SCC dans le courant global et l'augmentation de la susceptibilité au zinc lorsque l'activité des ions Cl⁻ est augmentée. Ceci nous amène à penser que le canal SCC serait un canal ClC-2, puisque le zinc est un inhibiteur assez spécifique de ce type de canal (Clark *et al.*, 1998; Jentsch *et al.*, 2002). La présence d'un canal de ce type dans les érythrocytes humains a déjà été évoquée, en particulier lors de l'infection par *P. falciparum* (Huber *et al.*, 2004). Il s'agit d'un canal endogène, activable par le gonflement des cellules.

B – Article *Proceedings of the National Academy of Sciences*

Toward a unifying model of malaria-induced channel activity

Guillaume Bouyer, Stéphane Egée, and Serge L. Y. Thomas*

Laboratory of Cell Physiology of Erythrocytes, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie, Unité Mixte de Recherche 7150, Station Biologique, B.P. 74, 29682 Roscoff Cedex, France

Communicated by Joseph F. Hoffman, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, May 21, 2007 (received for review April 3, 2007)

Infection of RBC by the malaria parasite *Plasmodium falciparum* activates, at the trophozoite stage, a membrane current 100- to 150-fold larger than in uninfected RBC. This current is carried by small anion channels initially described in supraphysiological ion concentrations (1.115 M Cl⁻) and named plasmodial surface anion channels (PSAC), suggesting their plasmodial origin. Our results obtained with physiological ion concentrations (0.145 M Cl⁻) support the notion that the parasite-induced channels represent enhanced activity versions of anion channels already present in uninfected RBCs. Among them, an 18-pS inwardly rectifying anion channel (IRC) and a 4- to 5-pS small conductance anion channel (SCC) were present in most single-channel recordings of infected membranes. The aim of this study was to clarify disparities in the reported electrophysiological data and to investigate possible technical reasons why these discrepancies have arisen. We demonstrate that PSAC is the supraphysiological correlate of the SCC and is inhibited by Zn²⁺, suggesting that it is a ClC-2 channel. We show that in physiological solutions 80% of the membrane conductance in infected cells can be accounted for by IRC and 20% can be accounted for by SCC whereas in supraphysiological conditions the membrane conductance is almost exclusively carried by SCC (PSAC) because the IRC is functionally turned off.

ionic channels | new permeation pathways | *Plasmodium* | red blood cell

P*lasmodium falciparum*-infected human RBCs possess parasite-induced new permeation pathways (1), which allow the uptake of nutrients and excretion of metabolic waste products. The properties of the new permeation pathways have been a major area of interest particularly in the context of whether they are possible antimalarial targets for selective inhibition and routes for drug delivery in future chemotherapies (2). They were originally defined, using nonelectrophysiological techniques, as having the general characteristics of anion channels (3–5).

Recent whole-cell electrophysiological studies of human erythrocyte membrane in serum-free isotonic conditions showed that infection by *P. falciparum* activates, at the trophozoite stage, a membrane conductance 100- to 150-fold larger than in uninfected cells (6–9). The typical electrophysiological signature of infection is characterized by whole-cell current–voltage (*I*–*V*) curves showing inward rectification [lower current at positive membrane potential (*V*_m) than at negative values], anion selectivity, and inhibition by furosemide and 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate (NPPB). This whole-cell current is carried by anion channels, but the origin, number, molecular nature, and biophysical features of these channels remain controversial (10). Desai and coworkers (6, 11, 12), using the cell-attached configuration with 1 M choline chloride in bath and pipette solutions, described a 20-pS channel that they called plasmodial surface anion channel (PSAC) and considered as parasite-derived. They estimated PSAC's conductance at physiological ion concentration to 3 pS.

Our group, using physiological solutions (155 mM Cl⁻), observed spontaneous activity of three different channel types in infected RBCs (13): a 12- to 18-pS inwardly rectifying anion channel (IRC), a 4- to 5-pS small conductance anion channel

(SCC), and a third channel exhibiting outward rectification (i.e., greater currents at positive *V*_m) (outwardly rectifying chloride channel). Under our conditions IRC and SCC are present on >95% of membrane patches of infected RBCs. The IRC has some similarities to PSAC in that it exhibits fewer and shorter openings at positive *V*_m and flickering gating but with an ≈5-fold-higher single-channel conductance. It also shows significant differences in levels of inhibition by certain antagonists (NPPB and furosemide) and can be induced on uninfected erythrocytes by either membrane stretch or protein kinases, whereas Desai and colleagues (12) failed to activate channels by PKA and ATP on uninfected erythrocytes under their experimental conditions. The SCC also exhibits fewer and shorter openings at positive *V*_m and has a single-channel conductance close to the value calculated for PSAC at physiological ion concentrations but displays different gating.

In other studies, Lang and coworkers (14, 15), using whole-cell measurements (single-channel studies were not performed), suggested three channel types permeable to anions. They showed that two of the anion conductances exhibit inward rectification and provided evidence that one of them is attributable to the chloride channel ClC-2, sensitive to cell volume and inhibited by Zn²⁺ (16); the third conductance exhibits outward rectification. This group also found that conductances similar to each of those seen in infected cells can be activated in uninfected erythrocytes by oxidation (14).

To explore to what extent technical issues might account for the disparities in the reported electrophysiological data, we designed this series of experiments to follow the behavior of global membrane conductance and single-channel activity of infected RBCs exposed to increasing chloride concentrations from 115 mM (close to physiological conditions) to 1,150 mM [Desai's group (6, 11, 12)] and varied concentrations of the main inhibitors used by all groups.

Results

Whole-Cell Patch-Clamp of *P. falciparum*-Infected RBCs. Cells were washed three times in the experimental solutions and kept in this solution at least 15–20 min before seal formation.

Fig. 1 *A–C* illustrates typical whole-cell current recordings, which we have observed in infected RBCs using our usual physiological solutions A (150 mM NaCl plus 5 mM KCl), B [155 mM *N*-methyl-D-glucamine chloride (NMDG)-Cl], and C (155 mM choline-Cl) in bath and pipettes. The *I*–*V* curves (not shown) constructed from the averaged data of all whole-cell current recordings showed inward rectification and reversal potentials close to 0 mV. The membrane slope conductances were calcu-

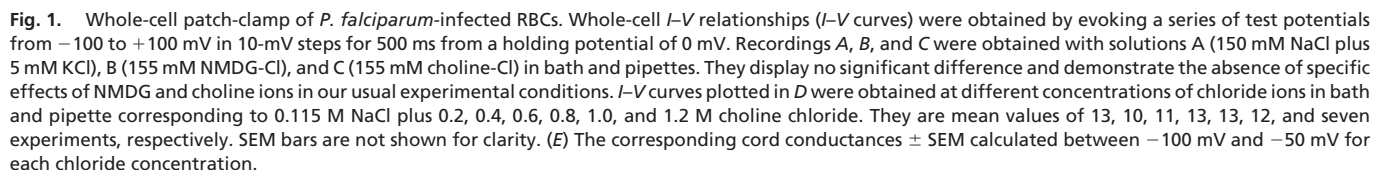
Author contributions: G.B., S.E., and S.L.Y.T. designed research; G.B., S.E., and S.L.Y.T. performed research; G.B., S.E., and S.L.Y.T. analyzed data; and S.L.Y.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations: SCC, small conductance anion channel; IRC, inwardly rectifying anion channel; PSAC, plasmodial surface anion channel; NPPB, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate; *I*–*V*, current–voltage.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: thomas@sb-roscoff.fr.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA



SCC. Fig. 3 depicts the behavior of SCC present on the membrane patch at the six different chloride concentrations used. The mean I - V curves presented in Fig. 3A were established in the typical range of -100 mV to $+100$ mV by steps of 10 mV. When considering only negative potentials, the I - V relationships showed no significant deviation from linearity. By contrast, I - V relationships saturated at positive potentials for high chloride concentrations. The ohmic channel conductance (g) calculated between -100 mV and 0 mV was 4.1 ± 1.0 pS ($n = 12$) at 0.115 M chloride (open circles) and 19.9 ± 1.7 pS ($n = 17$) at 1.115 M (filled circles), which fits closely with the values reported for PSAC in the literature. The depen-

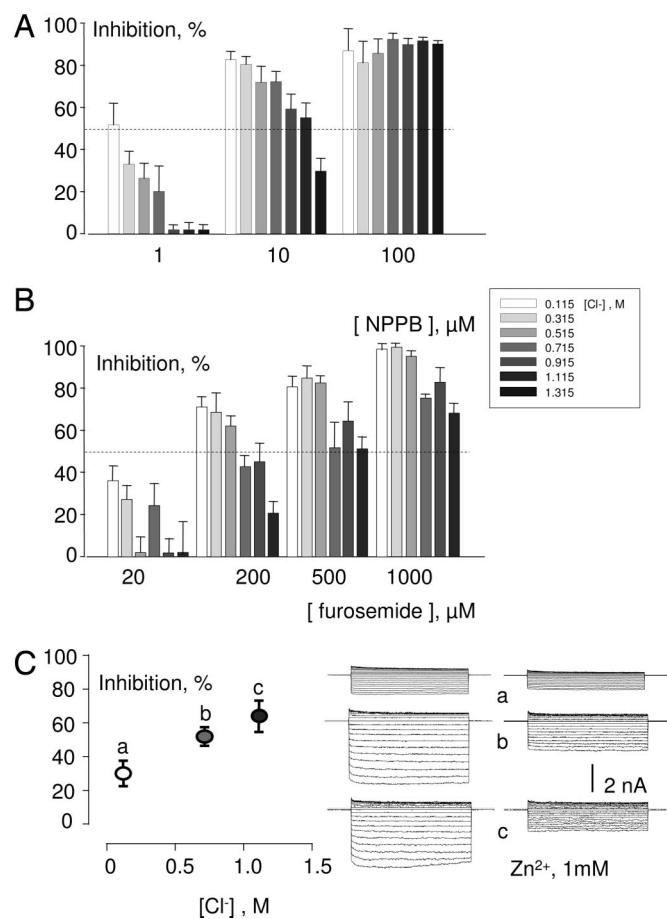


Fig. 2. Inhibition of whole-cell currents by NPPB (A), furosemide (B), and Zn^{2+} (C). Inhibitors were added to the bathing solutions to obtain final nominal concentrations 1, 10, and 100 μM for NPPB, 20, 200, 500, and 1,000 μM for furosemide, and 1 mM for Zn^{2+} . The percentage of inhibition was calculated on the cord conductance between -100 mV and -50 mV for each chloride concentration. Vertical bars correspond to SEM, and each calculated value was a mean of six or more I - V curves obtained by evoking a series of test potentials from -100 to $+100$ mV in 10-mV steps for 300 or 500 ms from a holding potential of 0 mV. Typical examples are given in C (a, b, and c).

dence of conductances on chloride concentrations showed a linear relationship (Fig. 3B) indicating that no process of saturation occurred for SCC at negative potentials. Fig. 3C shows typical recordings obtained at -100 mV. At this potential and at all negative potential, spontaneous channel activity was consistently observed as bursts of channel openings separated by brief closings. In addition to the increase in channel conductance, the increase in chloride concentration induced an increase in the number (n) of channels simultaneously open (Fig. 3D) whereas the open-state probability (P_o) remained approximately constant (Fig. 3E). At a fixed number of channels in the patch, an increased frequency of multiple openings should correspond to an increase of the open-state probability; otherwise, cooperativity can be suspected.

IRC. As we showed in a previous article (13), at physiological chloride concentrations, the I - V relationships of this channel deviates slightly from linearity and saturates at positive potentials (Fig. 4A), hence its descriptor/acronym. The ohmic channel conductance (g) calculated between -100 mV and -50 mV was 18.0 ± 1.0 pS ($n = 17$) at 0.115 M chloride (open circles) and 85.5 ± 1.7 pS ($n = 7$) at 1.115 M (filled circles), but it is important to note that this value was already reached at 0.715 M chloride, indicating, as shown in Fig. 4B, that the dependence of the

conductances on chloride concentration follows a linear relationship between 0.115 M and 0.715 M before reaching a plateau at higher concentrations. This is illustrated in Fig. 4C, where typical recordings obtained at -100 mV clearly show that the intensity is similar at 0.715 M and 1.115 M. In addition, Fig. 4D shows that the mean number of channels (n) active on the membrane patch declines above 0.715 M, and Fig. 4E indicates that the open probability declines dramatically from 0.75 ± 0.09 ($n = 15$) at 0.115 M Cl^- to 0.10 ± 0.09 ($n = 7$) at 1.115 M Cl^- , which means that this channel is rarely observed at supraphysiological Cl^- concentrations.

An estimation of the relative contribution of each channel type to the whole-cell global membrane conductance (G , measured between -100 and -50 mV) can be obtained by multiplying the mean single-channel conductance (g) by the mean number of channels present on the patch (n) and by the corresponding open probability (P_o) (Fig. 5). This calculation attributes 74% and 26% of the whole-cell conductance, at 0.115 M Cl^- , to the IRC and the SCC, respectively, 66% and 34% at 0.715 M and 10% and 90% at 1.115 M.

We did not encounter any other type of anion channels in the membrane of infected RBCs on a regular basis, and it must be noted that the very large outwardly rectifying chloride channel seen briefly at the beginning of some recordings in physiological conditions and mentioned in our previous article (13) did not show up in any of the recordings in choline chloride solutions.

Discussion

These data lead to the clarification of some uncertainties and confirm that technical issues account for the disparities in the reported electrophysiological observations. Taken together they demonstrate the following.

1. In cell-attached configuration, among the three types of channels recently identified in infected RBC's membrane (13), the SCC displays under supraphysiological ionic concentrations the same conductance and type of gating as PSAC [as reported by Desai and coworkers (6, 11, 12)]. PSAC is therefore the supraphysiological correlate of the SCC.
2. Under physiological solutions 80% of the membrane conductance in infected cells can be accounted for by IRC and 20% can be accounted for by SCC whereas under supraphysiological conditions the membrane conductance is almost exclusively carried by SCC (PSAC) because the IRC is functionally turned off.
3. The channels carrying the whole-cell current in physiological conditions (predominantly IRC) display a higher sensitivity to NPPB and furosemide than the channels carrying the whole-cell current under supraphysiological conditions (i.e., SCC-PSAC).
4. The channels carrying the whole-cell current under supraphysiological conditions (i.e., SCC-PSAC) are inhibited by Zn^{2+} , suggesting that SCC-PSAC is a ClC-2 channel.

This work clarifies the confusion between IRC (which is activated by PKA and ATP in noninfected cells) and PSAC. Because the present protocols were specially designed to follow the behavior of the global membrane conductance and single-channel activity in infected RBCs by progressively moving from our usual experimental conditions to those used by the group of Desai (6, 11, 12), we can reasonably assert that PSAC is the supraphysiological correlate of the SCC. In the supraphysiological experimental conditions where PSAC was described, the conductance of the IRC is in the range of 80–90 pS, and, more importantly, its open probability is so low that it is functionally turned off and rarely observed during our 1- to 3-min recordings under each voltage. In these conditions it is not surprising that Desai and colleagues have not seen this IRC during their shorter

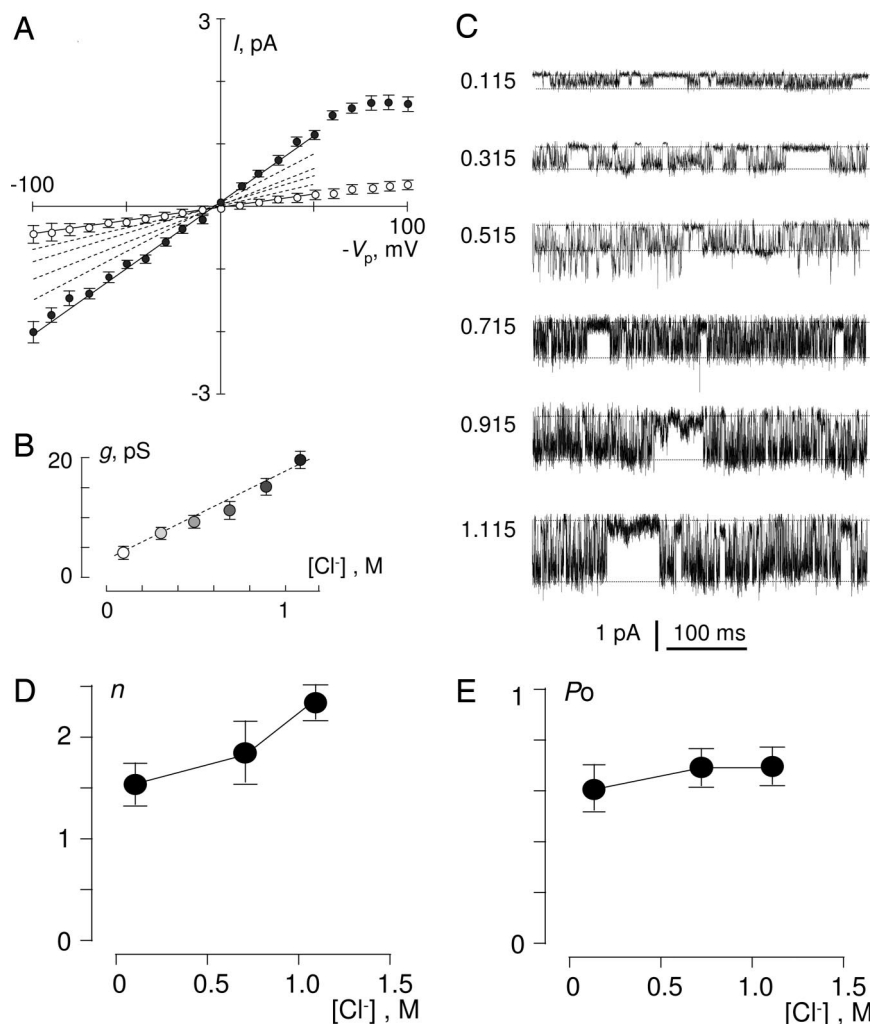


Fig. 3. Cell-attached single-channel recordings of SCC activity in infected RBCs at different chloride concentrations (0.115 M NaCl plus 0, 200, 400, 600, 800, or 1,000 mM choline chloride). The *I-V* curves presented in *A* were established in the typical range of -100 mV to $+100$ mV by steps of 10 mV. *I-V* curves were constructed from mean $\pm$ SEM values obtained from 12, six, six, 12, six, and 12, respectively, complete curves. For clarity's sake 0.115 M and 1.115 M curves are presented in full. Intermediary curves are presented by the linear regression dashed lines. *B* shows the corresponding cord conductances (*g*) $\pm$ SEM calculated between -100 mV and -50 mV for each chloride concentration. Typical recordings obtained at -100 mV (*C*) show bursts of channel openings separated by brief closings. *D* and *E* indicate the mean $\pm$ SEM number of channels (*n*) present on membrane patches and the open probability (*P*_o) calculated from 1-min recordings at 0.115 M (*n* = 12), 0.715 M (*n* = 12), and 1.115 M (*n* = 12) chloride concentrations.

recordings either in infected cells or when they tried to induce channel activity by PKA and ATP in noninfected cells.

According to the present model based on two different types of channels activated by *P. falciparum* it is possible to interpret the biphasic behavior of the whole-cell membrane conductance as the sum of two components displaying different conductances and divergent evolution of open probability when chloride concentration increases. The dependence of the whole-cell conductance on chloride concentration (activity) described here is in marked contrast with the linear relationship presented by Desai *et al.* in their original study (6), from which they concluded the existence of only one parasite-derived channel type. The present study confirms the existence of at least two channels activated under physiological conditions (the activity of the third, the outwardly rectifying chloride channel, is observed too infrequently to deserve consideration) (13), and their endogenous origin is more than likely. The IRC can be activated by forskolin in intact noninfected cells and in RBCs of cystic fibrosis patients; it is able to transport ATP, and its membership of the ATP binding cassette family of anion channel was suggested

(17). It is probable that the Zn^{2+} -sensitive channel belongs to the CIC-2 family, in keeping with the observations of Lang's group (16), who found by immunoblotting that CIC-2 protein is expressed in human RBCs. However, with regard to slow gating of CIC-2 channel (18), further experiments are clearly needed before definitely identifying the SCC-PSAC as a CIC-2 channel. CIC-2 channels are activated by cell swelling (19). Therefore, if SCC-PSAC is a CIC-2 channel, its activation in infected cells may mean that this channel accomplishes a regulatory volume decrease of the volume-challenged host RBC. Lang's group (14) also showed that conductances similar to each of those seen in infected cells can be activated in uninfected erythrocytes by oxidation, suggesting a single mechanism of activation by the parasite and pointing toward modified endogenous channels as the basis of altered permeability.

The inward rectification of the whole-cell $I-V$ curve is typical of infected cells washed under isotonic conditions at least three times in serum-free media. In this case the inward rectification is due to a dramatic decline in IRC current amplitude and open probability at positive potentials, which account for 80% of the

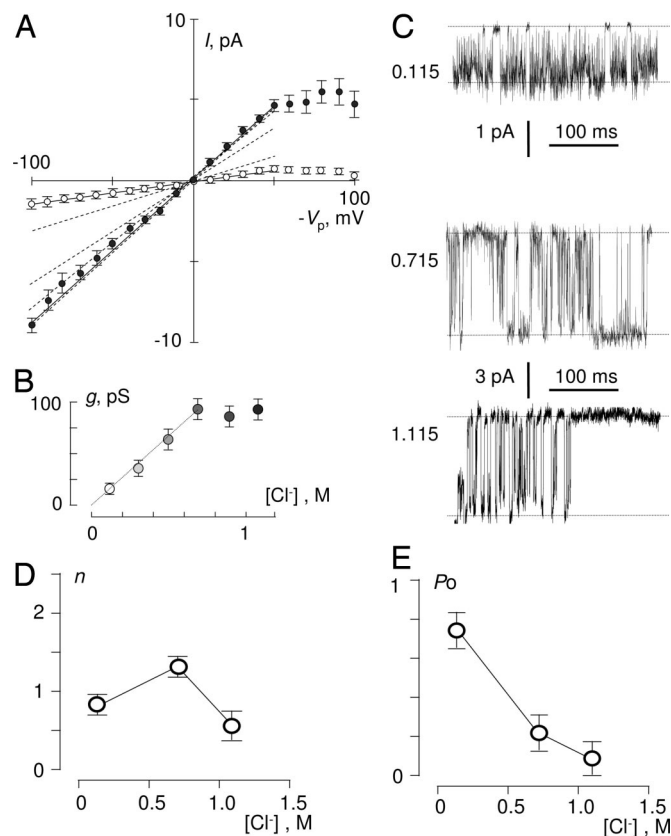


Fig. 4. Cell-attached single-channel recordings of IRC activity in infected RBCs at different chloride concentrations (0.115 M NaCl plus 0, 200, 400, 600, 800, or 1,000 mM choline chloride). The I - V curves presented in **A** were established in the typical range of -100 mV to $+100$ mV by steps of 10 mV. I - V curves were constructed from mean $\pm$ SEM values obtained from 15, seven, six, eight, six, and six, respectively, complete curves. For clarity's sake 0.115 M and 0.715 M curves are presented in full. Other curves are presented by the linear regression dashed lines. **B** shows the corresponding conductances (g) $\pm$ SEM calculated between -100 mV and -50 mV for each chloride concentration. Typical recordings obtained at -100 mV (**C**) show bursts of channel openings separated by brief closings and similar current amplitude at 0.715 and 1.115 M. **D** and **E** indicate the mean $\pm$ SEM number of channels (n) present on membrane patches and the open probability (P_o) calculated from 1-min recordings at 0.115 M ($n = 12$), 0.715 M ($n = 8$), and 1.115 M ($n = 6$) chloride concentrations.

global current, and to a much lower extent to a reduction in the open-state probability of SCC (PSAC).

Different whole-cell I - V curves are recorded in different experimental conditions, including addition of serum or imposition of holding potentials between test pulses. The addition of human serum increased both inward and outward whole-cell currents significantly (8). A time-dependent inactivation of inward currents develops when a negative holding potential is maintained between test pulses evoked for obtaining I - V curves leading to a outward rectification (8). When applied to single channels, rectification properties reflect the kinetics of the molecular components controlling the gating process of the conductive path. The fact that addition of serum increases the global current or that a negative holding potential alters the conductance phenotype from inwardly to outwardly rectifying does not necessary mean that more inwardly rectifying and small conductance ion channels or new channel types (outwardly rectifying chloride channel) are recruited. It may solely mean that the inwardly or outwardly rectifying behavior in whole-cell configurations represents alternative kinetic

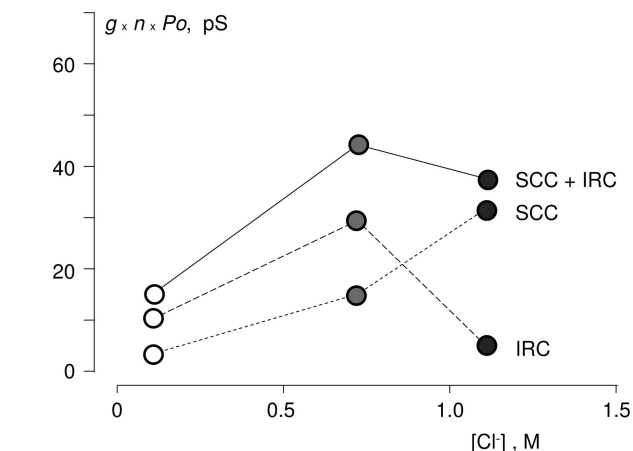


Fig. 5. Estimation of the relative contribution of SCC and IRC to the whole-cell global membrane conductance (G , measured between -100 and -50 mV). This graph was obtained by plotting, for each chloride concentration, the mean single-channel conductance (g) multiplied by the mean number of channels present on the patch (n) and by the corresponding open probability (P_o) for SCC (dotted line) and IRC (dashed line) and the sum of both (solid line). It shows the increasing contribution of SCC when chloride concentration increases and the opposite evolution of IRC.

modalities of the same channels, dependent on conditions. Single-channel recordings will clarify the mechanisms underlying these changes.

The present data do not tell us whether the conductances that are observed in the patch-clamp experiments are the “electrophysiological correlate” of the new permeation pathway or are a collateral effect of red cell invasion. The answer to this question will be provided by electrophysiological experiments performed in conditions similar to those prevailing in radio-tracer experiments on intact cells at the spontaneous membrane potential. Because the model for the malaria-infected RBC predicts that as the parasite matures the RBC membrane potential changes from about -10 mV to -2 mV (20, 21), future electrophysiological studies should focus on cell-attached current recordings corresponding to voltage variations in the range of -20 mV to $+20$ mV. Our recent study shows that this is possible in physiological ionic concentrations, and the current recordings obtained in this range of voltages indicate that IRC and SCC carry outward movement of anions through the patch membrane at spontaneous membrane potential.

Materials and Methods

Preparation of Cells. Venous blood was drawn into heparinized syringes from healthy volunteers. RBCs were washed three times by centrifugation and resuspension in large volumes of culture RPMI medium 1640 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The buffy coat containing platelets and white cells was removed by suction after each wash. After the last wash, the cells were suspended at 50% hematocrit in RPMI medium 1640. *P. falciparum* clone 3D7 was grown in human RBCs as described previously (7, 22).

Solutions. The basic solutions used were as follows: **A**, saline solution containing 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid-Na), and 10 mM glucose (pH 7.4); **B**, pipette and bathing solution containing 155 mM NMDG-Cl, 1 mM MgCl_2 , 1.4 mM CaCl_2 , 10 mM Hepes, and 10 mM glucose (pH 7.4); **C**, pipette and bathing solution containing 155 mM choline-Cl, 1 mM MgCl_2 , 1.4 mM CaCl_2 , 10 mM Hepes, and 10 mM glucose (pH 7.4); **D**, pipette and bathing solution containing 115

II - Effets de la présence de sérum sur les conductances unitaires

A - Résumé du principe et des résultats de l'étude

La présence de sérum dans le bain modifie fortement les courants anioniques globaux, étudiés en configuration *whole-cell* (Staines *et al.*, 2003). Cet effet a une grande importance physiologique, puisque *Plasmodium falciparum* ne croît pas en culture en absence de sérum (Trager and Jensen, 1976). Cependant les mécanismes impliqués dans ce phénomène restent encore indéterminés. Une étude utilisant la configuration *cell-attached* en présence de sérum, afin d'étudier les modifications engendrées au niveau unitaire, a donc été entamée.

Comme la présence de sérum dans la pipette rend très difficile l'obtention du *seal* nécessaire aux enregistrements en *patch-clamp*, le principe de cette étude a été de pré-incuber les cellules en présence de 1% de sérum (volume/volume) dans une solution saline physiologique, avant de les utiliser en configuration *cell-attached*. Les résultats préliminaires de cette étude montrent que la présence de sérum induit une forte modification du fonctionnement de l'IRC.

En absence de sérum, ce canal présente une rectification entrante : la conductance est plus importante aux potentiels négatifs. De plus, le mécanisme d'ouverture de ce canal est dépendant du voltage, puisqu'on observe une baisse de la probabilité d'ouverture aux potentiels positifs. Par ailleurs, la fréquente apparition de deux niveaux de courants aux potentiels négatifs suggère l'existence de deux sous-états de conductance pour ce canal.

En présence de sérum, la probabilité d'ouverture de ce canal devient indépendante du voltage. De plus, la conductance devient linéaire, et un deuxième sous-état apparaît aux potentiels positifs. Le sérum modifie donc fortement l'activité de ce canal : la rectification disparaît, et des sous-états de conductance plus forte semblent favorisés. Ce phénomène pourrait correspondre aux effets de la présence de sérum sur la conductance globale, déjà décrits en configuration *whole-cell*.

Les résultats sont présentés en anglais dans la partie suivante.

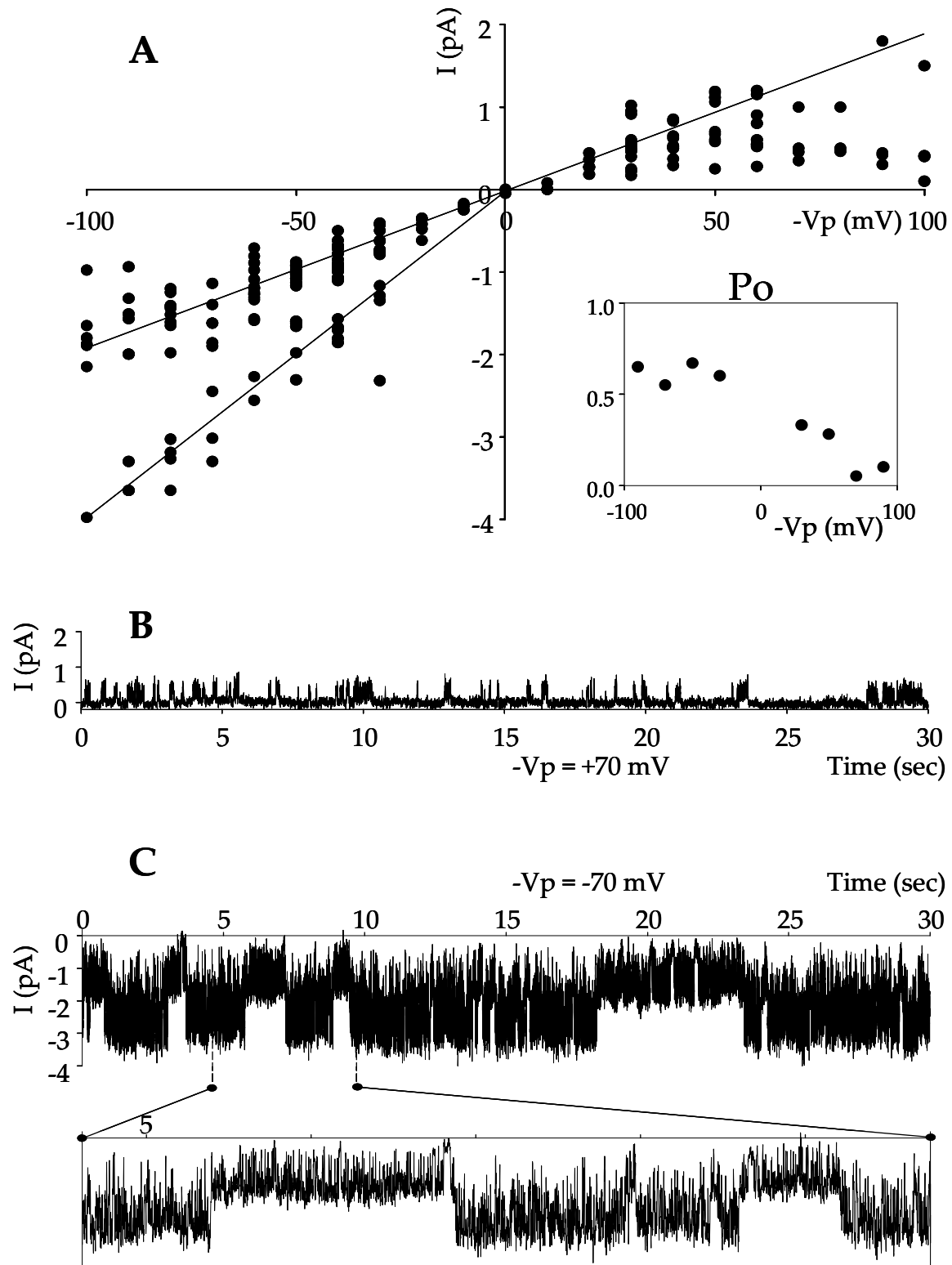


Figure 19 : Properties of the IRC in cell-attached configuration, without serum
A, Plots of currents recorded at different voltages, without serum in the bath, and open probability (inset). B, Typical recordings at positive membrane potentials. C, Typical recordings of traces at negative membrane potentials.

B - Effects of serum on the anion channels in *Plasmodium falciparum*-infected red cell membrane

Serum presence has been shown to modify tremendously the membrane currents observed after malaria invasion of human red blood cells, suggesting that changes in channels activity occur. Using the whole-cell configuration, Staines *et al.* described that traces of serum (0.4 %) in the bath induces a 4-times increase of the outward currents and a 2-times increase of inward currents recorded on an infected red blood cell (Staines *et al.*, 2003). This phenomenon may have a high physiological relevance, as the parasite can not grow without serum (Trager and Jensen, 1976).

However, the mechanism by which serum modulates the global anion conductance of infected cells remains totally unknown. Indeed either new quiescent channels are revealed by serum, or the behaviour of formerly described channels is strongly modified.

To bring new comprehension about this phenomenon, I started a study using the *cell-attached* configuration of the patch-clamp technique. Infected cells were taken from culture medium and washed three times with 115 mM NaCl patch solution. They were then pre-incubated with 1 % serum added to the same solution, for at least 10 minutes, prior to patch-clamp recordings. Serum could not be added to the pipette solution because it prevents the formation of high quality seals. However, it was possible to obtain seals with serum in the bath. Using this protocol, we could observe modifications of the behaviour of one of the three channels already described, the IRC. The results presented here are a comparison of the characteristics of this channel, without (figure 19) or with serum (figure 20) in the bath. The I/V curves show the plots of experimental data obtained. For the serum conditions, the plots come from recordings obtained on 6 different cells.

The properties of the current through IRC, recorded without serum, are reminded on figure 19. As seen on figure 19A, the I/V curve displays a typical inward rectification, meaning that outward currents (currents at positive voltages) are smaller than inward currents albeit that some cells display linear I/V relationship.

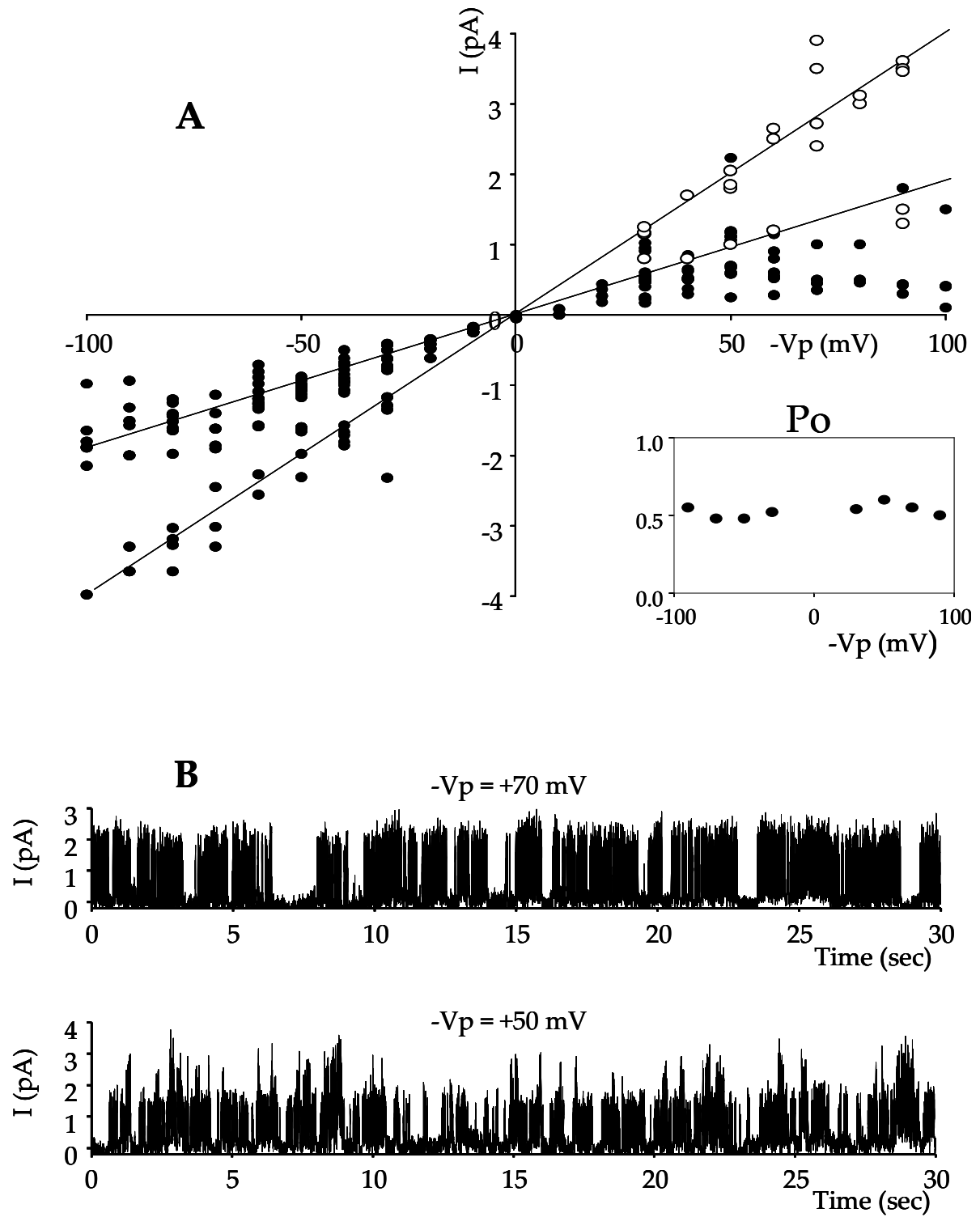


Figure 20 : Properties of the IRC in cell-attached configuration after serum preincubation

A, Plots of currents recorded at different voltages, with ($\circ$) or without ($\bullet$) serum in the bath, and open probability with serum (inset). B, Typical recordings at positive membrane potentials, after serum preincubation.

This typical behaviour is also showed on the recordings presented in figure 19B and 19C. The differences of conductance and open probability (see also inset figure 19A) at positive and negative membrane potentials are readable. However, it should be noticed that frequently two current levels could be detected at negative membrane potentials when we recorded IRC activity (figure 19A & 19C). The magnification of this recording shows that these two levels could be two conductance substates of the same channel, since there are very few returns to the zero current level from the second conductance level. This idea is strengthened by the fact that at positive membrane potentials, most of the time only one level of conductance could be seen, even if two levels were present at negative voltage potential on the same patched cell. Anyway, further analysis using the Patlak Mean Variance analysis method, should help us to confirm or infirm this possibility.

When the infected cells were pre-incubated with 1% serum, IRC behaviour was markedly changed, as shown on figure 20. The inward current displayed same characteristics, with two different levels of conductance. Nevertheless, the currents at positive membrane potentials showed important differences when compared to currents in absence of serum. With serum pre-incubation, the open probability was not reduced compared to negative potentials, as shown in inset in figure 20A. The gating of the channel was thus modified by serum presence. Furthermore, the current passing through one channel was increased, as seen on figure 20B. More precisely, the conductance of the channel became linear obeying now to the Ohm law: at positive membrane potentials, two levels of conductance were also present. The I/V curves at these potentials became the prolongation of I/V curves in the negative potential part (figure 20A). The white circles on figure 20A are the outward currents recorded in the presence of serum, and can be compared to black circles (absence of serum). The higher level of conductance was even more often present than the first one. This also suggests the presence of different conductance substates of the same channel, rather than two copies of the same channel. Anyway these

recordings clearly show an influence of serum on the outward conductance of the IRC.

From this early study, we demonstrate with single channel recordings that IRC is the channel supporting the serum effect described with the *whole-cell* configuration.

These results can be compared to a recent report on the serum effects at the single channel level (Huber *et al.*, 2008). Using *cell-attached* configuration, this study proposed that an outwardly rectified channel (corresponding to the ORC previously described) could be activated by addition of human recombinant serum albumin. However in their study this group saw ORC and IRC with the same very low frequency, around 3% of all experiment with serum. In our results, the ORC appears with this same frequency without serum. This might mean that ORC has always a very low activity independently of serum presence. Thus IRC would not be seen with the recording conditions used in Tübingen. Their recordings were made on short time stimulations (voltages ramps of 400 ms) that might not be long enough to describe IRC activity. Furthermore, a +30 mV holding potential was applied to the pipette between the ramps. This voltage corresponds to a membrane potential applied of -30 mV: in the *cell-attached* configuration, membrane potential (V_m) is given by the equation $V_m = E_m - V_p$, where E_m is the cell resting membrane potential, and V_p the pipette potential. This might have some effects on IRC properties: it was already shown that in *whole-cell* configuration, a negative membrane potential applied between the ramps induces deactivation of inward currents (Staines *et al.*, 2003).

Our results show that serum modifies the gating and conductance of the IRC channel. It seems that the mechanism relies on the existence of subconductance levels of this channel. The high conductance level can be seen without serum at negative membrane potentials, and is dependant on the serum presence for the positive membrane potentials (outward currents). Then the IRC becomes linear, with a more important frequency of the higher subconductance level. However these data are

preliminary results, and further experiments and analysis are needed to confirm this mechanism.

**CHAPITRE 3 – IMPLICATION D’UN RECEPTEUR PBR
ENDOGENE DANS LES NOUVELLES VOIES DE
PERMEABILITE MEMBRANAIRE DE L’ERYTHROCYTE
INFECTE**

CHAPITRE 3 – IMPLICATION D'UN RECEPTEUR PBR ENDOGENE

DANS LES NOUVELLES VOIES DE PERMEABILITE MEMBRANAIRE

DE L'ERYTHROCYTE INFECTE

I - Résumé en français

A - Contexte de l'étude

La perméabilité anionique d'un érythrocyte infecté présente, en absence de sérum, une sélectivité $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ en configuration *whole-cell* (Desai *et al.*, 2000). Cette séquence correspond à une sélectivité Eisenman de type I, et suggère un pore de large diamètre et de faible sélectivité. La famille des canaux anioniques ligands-dépendants correspond à ces propriétés, avec entre autres les canaux GABA-A ou les récepteurs à la glycine ou glutamate (Jentsch *et al.*, 2002). Si aucune étude ne suggère la présence de ces canaux dans la membrane de l'érythrocyte, en revanche la présence d'un récepteur PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor) a été évoquée dans plusieurs études. Ces récepteurs PBR sont essentiellement décrits dans les membranes mitochondriales, mais sont également présents dans d'autres membranes, y compris plasmiques (Woods and Williams, 1996). Ce type de récepteur est généralement composé de trois sous-unités :

- une sous-unité régulatrice appelée TSPO (Translocator Protein, dénomination utilisée dans ce manuscrit) ou IBP pour Isoquinoline Binding Protein ou encore BZRP (Benzodiazepine Receptor (Peripheral-type)) (Papadopoulos *et al.*, 2006),
- un canal VDAC (Voltage-Dependant Anion Channel) (McEnery *et al.*, 1992),
- un transporteur ANT (Adenine Nucleotide Transporter) (McEnery *et al.*, 1992).

Plusieurs travaux en particulier ont montré la présence de sites de fixation des ligands spécifiques des PBR dans la membrane des érythrocytes (Canat *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1988). De plus, l'activité d'un canal VDAC a été détectée dans la

membrane des érythrocytes humains (Shimizu *et al.*, 2001; Sugiyama *et al.*, 2002). Enfin l'analyse du transcriptome des réticulocytes a révélé la présence d'ARNm codant pour la protéine TSPO et le canal VDAC dans ces cellules (Goh *et al.*, 2007). Par ailleurs, en 2002, Dzierszinski *et al.* ont montré l'effet de ligands spécifiques des PBR sur la croissance de *Plasmodium falciparum in vitro* (Dzierszinski *et al.*, 2002).

Une étude sur l'implication éventuelle des composants du récepteur PBR dans le phénomène des NPPs a donc été commencée. Tout d'abord les sous-unités du récepteur PBR ont été recherchées dans la membrane érythrocytaire, par western blot et par séquençage peptidique. Par la suite, j'ai étudié les effets de ligands spécifiques des récepteurs PBR sur la conductance anionique du globule rouge infecté. Enfin, j'ai comparé ces effets à ceux obtenus sur la lyse isosmotique au sorbitol de globules rouges infectés, considérée comme représentative de l'activité des NPPs, et sur la croissance parasitaire *in vitro*.

Les composés testés sont des ligands classiques des PBR : Ro5-4864 (4'-Chlordiazepam), Diazepam et PK11195 (1-(2-chlorophenyl)-N-(1-méthyl-propyl)-3-isoquinolinecarboxamide). Les deux premiers sont des benzodiazépines, le dernier est une isoquinoline se fixant spécifiquement sur le TSPO (Veenman and Gavish, 2006).

B - Résultats obtenus

1 - Présence des sous-unités du récepteur PBR dans la membrane érythrocytaire

Les westerns blot ont été réalisés à Roscoff par Anne Cueff, et le séquençage peptidique à Rennes (Innova Proteomics), par digestion trypsique des bandes d'intérêts obtenues sur gel colorés au Coomassie et analyse en Maldi-TOF. Des résultats positifs ont été obtenus en western blot quant à la présence des sous-unités constitutives du récepteur PBR dans la membrane érythrocytaire. Quatre des différents anticorps utilisés et dirigés contre les trois sous-unités ubiquitaires du complexe PBR ont donné des marquages spécifiques. Les trois sous-unités ont été

marquées aux poids moléculaires attendus, même si l'apparition de bandes à des poids supérieurs suggère une dissociation incomplète des complexes PBR.

Le séquençage peptidique réalisé par digestion trypsique puis spectrométrie de masse Maldi-TOF n'a pas permis d'affirmer avec certitude que les trois protéines recherchées étaient bien présentes dans la membrane des érythrocytes. En effet, les bandes excisées du gel et analysées se sont révélées être un mélange multi-protéique où les protéines d'intérêt étaient vraisemblablement très minoritaires. Toutefois, une analyse complète de tous les fragments peptidiques issus de la digestion trypsique a permis de détecter des fragments peptidiques minoritaires correspondants aux protéines d'intérêts. Ceux-ci sont toutefois en nombres trop faibles pour avoir des certitudes. Une analyse en LC-MS/MS pourrait permettre de mieux identifier ces protéines.

2 - Effets des ligands PBR sur la conductance anionique globale des érythrocytes infectés

Les effets des trois ligands sur la conductance anionique des érythrocytes infectés ont été testés en présence de sérum dans le bain. Ces ligands ont un effet inhibiteur sur la conductance, avec une efficacité plus importante sur la fraction des courants sérum-dépendante. Ainsi, le Ro5-4864 possède la plus forte activité, avec un effet visible dès 10 μ M : $13 \pm 5,9$ % et $43.6 \pm 11,1$ % d'inhibition sur les courants entrants et sortants, respectivement.

3 - Effets des ligands du PBR sur la lyse isosmotique induite par le sorbitol et la croissance de *Plasmodium falciparum* in vitro

La technique de lyse isosmotique au sorbitol est classiquement employée pour caractériser les NPPs (Ginsburg *et al.*, 1985). Grâce à l'utilisation de cette technique, j'ai pu mettre en évidence un effet des ligands du PBR sur la perméabilité au sorbitol des érythrocytes infectés. En effet, le Ro5-4864 et le diazepam inhibent l'hémolyse des globules rouge infectés due à l'influx de sorbitol et d'eau. Des IC₅₀ de 45 et 75 μ M

ont été obtenues respectivement pour ces composés. Le PK11195 a également un effet sur l'hémolyse, mais n'induit pas une inhibition du phénomène. En revanche ce composé provoque un retard de la cinétique de l'hémolyse des érythrocytes infectés.

De même, ces composés ont montré un effet inhibiteur sur la croissance du parasite *in vitro*. La croissance à 72h a été évaluée par cytométrie en flux. Les résultats montrent une IC₅₀ d'environ 50 et 45 μ M pour le Diazepam et le Ro5-4864, respectivement. Pour le PK11195, une inhibition de 55 % a été obtenue pour une concentration de 10 μ M. Des concentrations supérieures de ce composé induisent une forte hémolyse des globules rouges, rendant les résultats non interprétables.

C - Discussion

La présence des différentes sous-unités du PBR dans la membrane des érythrocytes humains a été confirmée par western blot, et suggérée par les résultats encore préliminaires du séquençage peptidique.

De plus, les données pharmacologiques obtenues montrent non seulement la capacité des ligands PBR (1) à diminuer les courants membranaires induits par l'infection, et plus particulièrement la fraction sensible à la présence de sérum, mais aussi (2) à inhiber le phénomène des NPPs tel que décrit par la technique de lyse isosmotique. Ces résultats peuvent expliquer les effets observés des ligands du PBR sur la croissance parasitaire *in vitro* obtenus au cours de cette étude et déjà reportés dans la littérature (Dzierszinski *et al.*, 2002).

Ainsi l'implication d'éléments du complexe PBR endogène dans les NPPs semble très envisageable. De plus, les caractéristiques de perméabilité du VDAC (faible sélectivité) font du complexe PBR un bon candidat pour être à l'origine des flux *via* les NPPs.

Néanmoins, les signatures électrophysiologiques obtenues jusqu'ici sur l'érythrocyte infecté, au niveau unitaire, ne sont pas celles d'un PBR ou d'un VDAC. Les résultats préliminaires présentés dans le chapitre deux montrent cependant qu'en présence de sérum, l'un des canaux actifs montre un comportement différent

avec des sous-états de conductances différents de ceux précédemment décrits. La caractérisation des ces sous-états est à poursuivre. Par ailleurs, le VDAC peut être modulé de multiples façons, en particulier par le glutamate, la phosphorylation ou les liaisons au cytosquelette qui pourraient lui donner un comportement particulier dans le globule rouge infecté.

II - Implication of endogenous Peripheral Benzodiazepine Receptor in the New Permeation Pathways of malaria-infected human erythrocytes

A - Context of the study

The New Permeation Pathways, induced in the host red blood cell membrane during infection, is at least partly constituted by anion channels (Ginsburg and Stein, 2004; Kirk, 2001; Kirk *et al.*, 1994). The molecular nature of these pathways, however, remains unknown. Analysis of fluxes experiments and cell physiology data suggests the existence of two independent pathways, one for cations and neutral solutes, in a very low copy number, and another one for anions and nucleosides, present with a high copy number (several hundreds) (Ginsburg and Stein, 2004). However the link between these data and electrophysiology results remains unclear and no molecular nature for the potentially involved channels have been proposed yet.

Global anion conductance activated after malaria infection presents a permselectivity $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ in absence of serum (Desai *et al.*, 2000), or $\text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ with traces of serum, when outwardly rectified phenotype can develop (Huber *et al.*, 2002). However, the permeability of SCN^- at the single channel level has not been tested (Egee *et al.*, 2002). This permeability sequence corresponds to Eisenman selectivity sequence number I for anions, suggesting permeation through a channel with a weak binding site and a large pore radius (Wright and Diamond, 1977). These properties are in particular those of the ligand-gated channel family, which include GABA, glycine and glutamate receptors that have this selectivity

sequence (Jentsch *et al.*, 2002). Moreover, our results (see chapter two) suggest that one of the channels active in the infected cell membrane could develop several conductance substates under serum influence. The existence of multiple conductance substates is also typical of this family of ligand-gated channels (Jentsch *et al.*, 2002). In the literature, the presence of such ligand-gated channels has never been suggested in human red blood cells. However, the presence of peripheral benzodiazepine receptor, which, as GABA receptors, binds benzodiazepine, and can mediate anion currents, has been reported in different works. This type of receptor is widely found in the outer mitochondrial membrane but also in some cytoplasmic membranes (Woods and Williams, 1996). Multiple functions have been suggested for PBR, such as implication in apoptosis, cell growth and differentiation, regulation of steroid production, mitochondrial respiration and others (Gavish *et al.*, 1999; Veenman and Gavish, 2006). It has usually a multimeric structure, comprising:

- a small regulatory subunit of 18 kDa named Isoquinoline Binding Protein (IBP) or translocator protein (TSPO) (Papadopoulos *et al.*, 2006);
- a Voltage Dependant Anion Channel (VDAC) of 32 kDa (McEnery *et al.*, 1992);
- an Adenine Nucleotide Transporter (ANT) of 30 kDa (McEnery *et al.*, 1992).

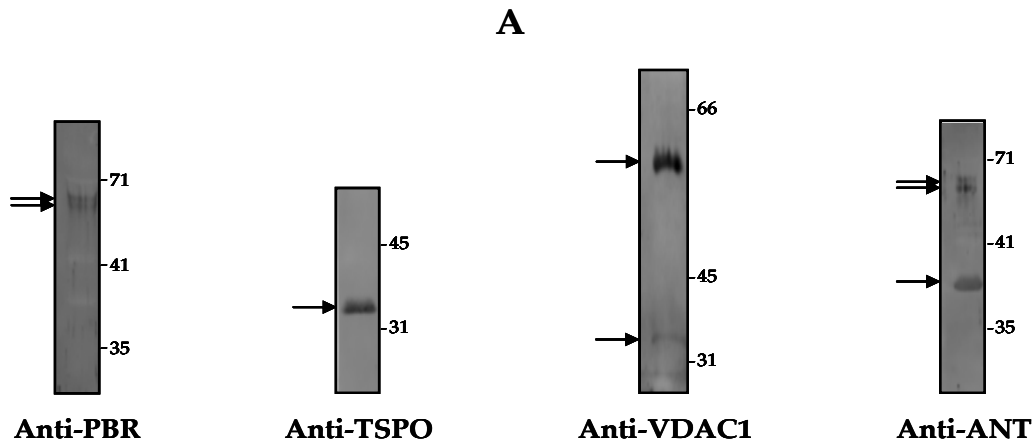
The conductive properties of such structure has never been demonstrated in the red blood cell membrane, but two different reports have shown the presence of benzodiazepine and PBR-specific isoquinoline PK11195 binding sites in the membrane of human erythrocytes (Canat *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1988). Moreover, two studies reported the presence of VDAC on red blood cell membranes and their involvement in apoptosis phenomenon induced by pro-apoptotic proteins Bim and Bax (Shimizu *et al.*, 2001; Sugiyama *et al.*, 2002). Finally, mRNA coding for VDAC 3 and TSPO (named BZRP) can be found in the human reticulocyte transcriptome (Goh *et al.*, 2007).

Furthermore, some specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor have been shown to have strong anti-malarial activity *in vitro*. PK11195 (which has a high and specific affinity for PBR (McEnery *et al.*, 1992)) and flurazepam inhibit parasite growth *in vitro* with an IC₅₀ around 60 and 80 μ M respectively (Dzierszinski *et al.*, 2002). Some plant extracts showing good anti-malarial activity *in vivo* also show some benzodiazepine receptor binding properties (Bah *et al.*, 2007).

The VDAC channel has multiple subconductance levels and shows a strong voltage dependence, with the highest conductance level at low potentials (Shoshan-Barmatz and Gincel, 2003). This conductance can reach 3.7 nS in symmetrical 1 M NaCl at 10 mV (Gincel *et al.*, 2000). However, VDAC has been reported to exist in multiple functional states with variable conductivities, including 'closed' states with much lower conductance (Colombini, 1987; Rostovtseva *et al.*, 2005). This channel is permeable to small ions (Cl⁻, K⁺, Na⁺) but also to large anions like glutamate or ATP and cations like acetylcholine (Gincel *et al.*, 2000; Rostovtseva and Colombini, 1997) and can be inhibited by DIDS (Shoshan-Barmatz *et al.*, 1996). The PBR activity also seems to have a sensitivity to classical anion transport inhibitors such as 9-AC or furosemide (Basile *et al.*, 1988). These characteristics could fit with some properties of the NPPs, such as weak anion selectivity, permeability to big anions and cations, and susceptibility to anion inhibitors.

Taken together, these facts make the Peripheral Benzodiazepine Receptor a good candidate for being implied in the New Permeation Pathways described in malaria-infected erythrocytes.

In this study we first tested the presence of PBR subunits in the red cell membrane, by western blots and by Maldi-TOF reading after trypsin digestion. Then the effects of specific PBR ligands on the whole-cell anion conductance of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells were evaluated, with and without serum. Potency of these compounds to inhibit membrane currents was compared to their efficiency to block isosmotic sorbitol-induced haemolysis, and to impair *Plasmodium falciparum* growth *in vitro*.



B

	Predicted	Observed	Possible combination
Anti-PBR	18 kDa	2 bands ~ 65-70 KdA	3 TSPO, 1 VDAC + 2 TSPO, 1 ANT + 2 TSPO
Anti-TSPO	18 or 35 kDa	1 band ~ 35 kDa	2 TSPO
Anti-VDAC1	30-35 kDa	1 band ~ 30-35 kDa 1 band ~ 55-60 kDa	1 VDAC 2 VDAC, VDAC + TSPO
Anti-ANT1	33 kDa	2 bands ~ 65-70 kDa 1 band ~ 35-40 kDa	1 ANT + 2 TSPO 1 ANT

Figure 21 : Presence of PBR subunits in the red cell membrane

A, western-blot detection. B, table summing up the different bands obtained with the different antibodies:

- Rabbit Anti-HumanPBR directed against full length human TSPO (Santa Cruz, n° sc-20120).
Dilutions : Anti-PBR 1/2000, secondary antibody 1/10000
- Goat Anti-HumanTSPO directed against C-terminal part of human TSPO (Everest Biotechnology, n°EB-07387), TSPO is 18kDa protein but supplier evokes a band at 35 kDa with this antibody
Dilutions : Anti-TSPO 1/200, secondary antibody 1/5000
- Goat Anti-HumanVDAC directed against C-terminal part of human VDAC1 (SantaCruz, n°sc-8829)
Dilutions : Anti-VDAC 1/200, secondary antibody 1/5000
- Rabbit Anti-Human ANT directed against amino acids 45-233 of human ANT1 (SantaCruz, n°sc-11433).
Dilutions : Anti-ANT 1/1000, secondary antibody 1/10000

nombre peptides matchés (erreur de clivage)	VDAC1	VDAC2	VDAC3	ANT1	ANT2	ANT3	TSPO	PBR-like
RBC1	1 (1)	3 (0+0+1)	0	2 (1+0)	3 (1+1+1)	4 (0+0+1+1)	0	1 (0)
RBC2	2 (0+1)	1 (0)	0	4 (1+1+0+0)	2 (1+1)	4 (0+0+0+1)	0	2 (0+0)
RBC3	2 (1+1)	2 (1+0)	1 (0)	0	3 (0+1+1)	2 (1+1)	0	1 (0)
RBC4	0	0	0	0	0	0	0	0
RBC5	0	0	1 (0)	2 (1+1)	3 (0+1+1)	2 (1+1)	0	2 (0+0)
RBC6	3 (1+1+1)	0	1 (0)	1 (1)	3 (0+1+1)	2 (1+1)	0	0

Figure 22 : Maldi-TOF readings of the different bands after trypsin digestion

The table gives the number of corresponding peptides found for each sequence of interest, on the different bands digested by trypsin. The numbers between brackets are miscleavages for each peptide.

Three specific ligands of the PBR were used: Ro5-4864 (4'-Chlorodiazepam), Diazepam and PK11195 (1-(2-chlorophenyl)-N-(1-methyl-propyl)-3-isoquinolinecarboxamide). These three molecules present different affinities and binding sites for PBR and GABA receptors. PK11195 binds only to PBR whereas Ro5-4864 and diazepam binds to GABA receptors and PBR (Casellas *et al.*, 2002; Kassiou *et al.*, 2005; Veenman and Gavish, 2006). Diazepam has high affinity for both receptors, but Ro5-4864 has a much higher affinity for PBR (Casellas *et al.*, 2002).

B - Results

1- Detection of PBR subunits in the red cell membrane

The presence of PBR subunits in erythrocytes was assessed by western blots. Antibodies used confirmed the presence of the different PBR subunits in the human red cell membrane (figure 21A). Each subunit could be seen at its predicted size, as shown on figure 21B. However, the PBR complex might not have been fully dissociated, since oversized probed bands could also be detected with anti-TSPO, anti-VDAC and anti-ANT antibodies. Possible sub-unit combinations for these bands are proposed in figure 21B.

To obtain further confirmation of the presence of these proteins, trypsin digestion followed by Maldi-TOF peptide analysis was performed on the different regions where bands were revealed by western blots (InnovaProteomics, Rennes, France). Six spots (excised bands) were analysed. However, this method was not fully conclusive, due to the very low abundance of the expected proteins compared to the major proteins of the red cell membrane. Nevertheless, some peptides corresponding to the PBR subunits were found (figure 22). It should be noticed that peptides corresponding to the different PBR sub-units were found in 5 out of 6 analysed spots. This also leads to the hypothesis of an incompletely dissociated complex, which could explain the western blot results. Moreover, peptides corresponding to the PBR-like (PBRL, or BZRPL1, acc. Numb. NP_001010873), a putative isoform of the TSPO, were found. Interestingly, Nakazawa *et al.* reported the

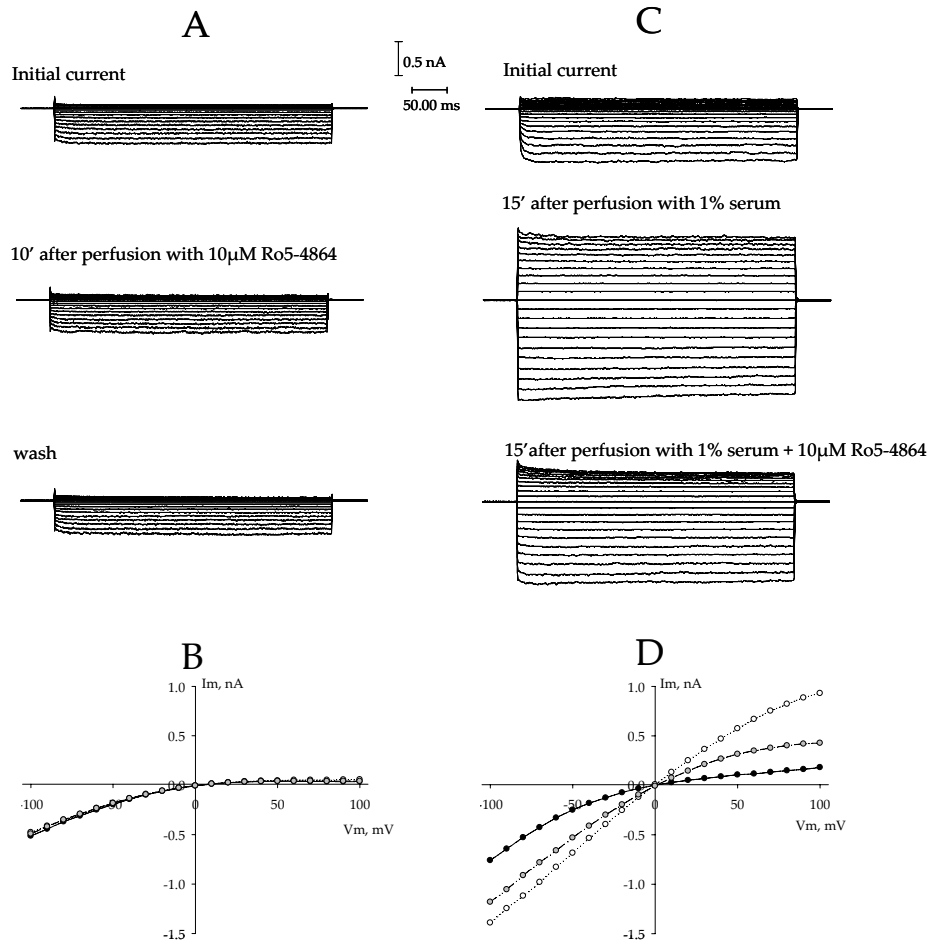


Figure 23 : Typical effect of Ro5-4864 (10μM) on the whole cell conductance of an infected cell

A, Current traces recorded in NMDG-Cl solution in bath and pipette. Initial current was measured 10 minutes after obtention of whole cell configuration. B, corresponding I/V plots are superimposed. C, Current traces recorded in NMDG-Cl solution in bath and pipette before, after perfusion with 1% serum and after perfusion with 1% serum plus 10μM Ro5-4864. D, corresponding I/V plots. Black, white and grey circles represent initial current, current after serum and serum + Ro5-4864 perfusion, respectively.

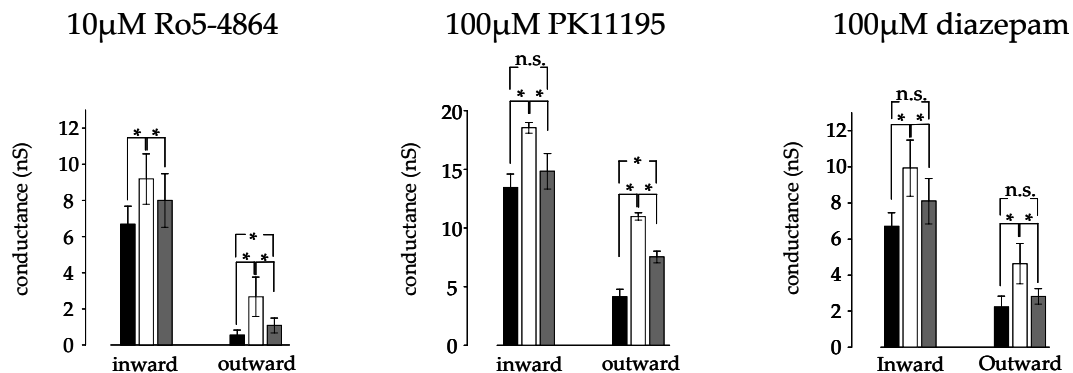


Figure 24 : Effects of Ro5-4864, PK11195 and Diazepam on the serum-induced whole cell conductance

Black bars, original conductance; white bars, after perfusion with 1% serum; grey bars, after perfusion with 1% serum and Ro5-4864, PK11195 or Diazepam. (Data are mean± SEM of n=6 experiments, * indicate statistical difference, p<0.05).

presence of this PBRL in differentiating chicken erythrocytes (Nakazawa *et al.*, 2009). Anyway, the number of peptides found for each proteins and their coverage of the sequences are not high enough to be conclusive. Further LC-MS/MS analyses are in progress to confirm the presence of these proteins in the human red blood cell membrane.

2 - Effects of PBR ligands on anion conductance of infected cells

Figure 23 shows the typical effect of Ro5-4864 (10 μ M) on whole-cell currents of an infected human erythrocyte. At this concentration, this compound had no significant activity on the inwardly rectified currents (figure 23A-B). However, after addition of 1 % serum, the inward and outward currents increased with different patterns, as described by (Staines *et al.*, 2003). The perfusion of 10 μ M Ro5-4864 with 1 % serum inhibits the serum-induced current, as shown in figure 23C-D. This compound clearly exerts a strong inhibition of the whole cell currents, at 10 μ M.

Effects of 10 μ M Ro5-4864, 100 μ M Diazepam and 100 μ M PK11195 were tested on the current recorded on infected cell membranes after perfusion with 1% human serum (figure 24). Ro5-4864 was the most active compound with $13 \pm 5,9$ % and $43.6 \pm 11,1$ % inhibition of inward and outward currents, respectively (n=6). Diazepam and PK11195 had the same characteristics, showing effects on the serum-induced part of the current at 100 μ M. The inhibition was 17.6 ± 2.9 % and 33.6 ± 6.3 % for inward and outward currents, respectively (n=6), with diazepam, and 20.3 ± 4.5 % and 27.1 ± 4.3 %, respectively, with PK11195 (n=4).

3 - Effects of PBR ligands on sorbitol-induced haemolysis of infected cells

The effects of the PBR ligands were evaluated on sorbitol-induced haemolysis experiments. This technique is based on the differential permeability for sorbitol of infected and uninfected cells, and is one of the strategy used to study NPPs activity (Ginsburg *et al.*, 1985). Figure 25 shows an example of the effects induced by 50 μ M PK11195 or Ro5-4864 on the isosmotic sorbitol-induced haemolysis.

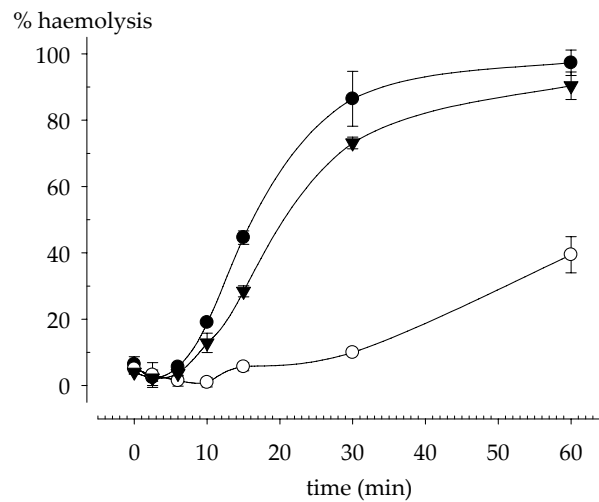


Figure 25 : Example of the effects of 50 μ M PK11195 or Ro5-4864 on sorbitol-induced haemolysis

Sorbitol-induced haemolysis was followed in duplicate with 50 μ M of PK11195 (▼) or Ro5-4864 (○) added at $t=0$; ●, control. Results are shown as percent of maximal haemolysis, $\pm$ sd.

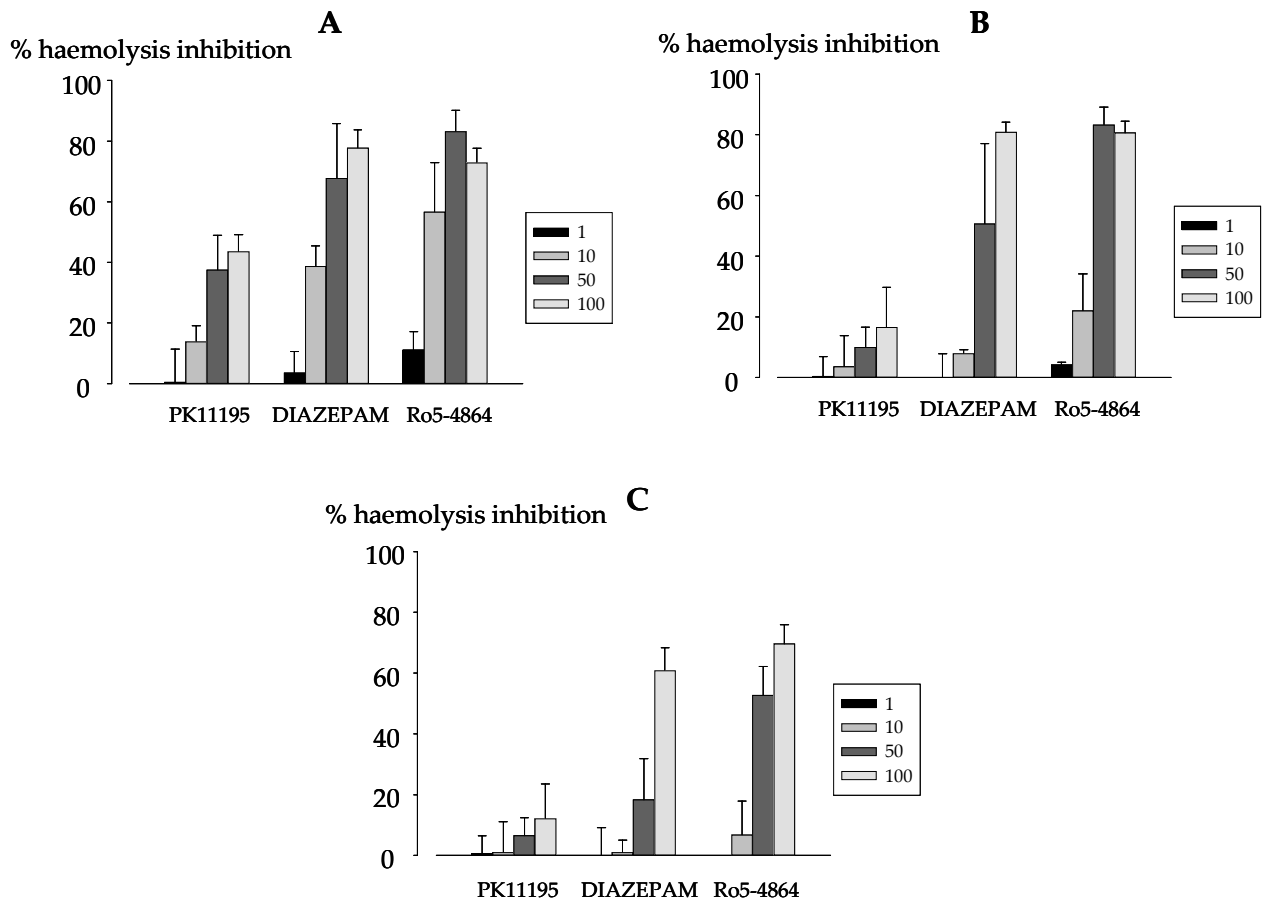


Figure 26 : Effects of the PBR ligands on sorbitol-induced haemolysis

% of haemolysis inhibition at 15 (A), 30 (B) and 60 (C) min. Data are mean $\pm$ SEM of $n=3$ experiments in duplicate. Ligands concentrations are given in μ M.

The haemolysis inhibition at 15, 30 and 60 minutes are presented in figure 26. Ro5-4864 and diazepam had a pronounced inhibitory effect, decreasing the global haemolysis at the end of the experiment (60 minutes) with IC₅₀ around 45 μM and 75 μM, respectively. The effect of PK11195 was limited to the kinetic of the haemolysis. The final haemolysis rate was inhibited by only 12.1 ± 6.6 % at the concentration of 100 μM, but a delay in the haemolysis could be observed as showed by haemolysis inhibition at 15 minutes on figure 26A.

4 - Effects of PBR ligands on *Plasmodium falciparum* growth *in vitro*

The growth of *Plasmodium falciparum* 3D7 strain *in vitro* was also followed in the presence of the three ligands in the media. Chloroquine was used as a positive control of growth inhibition, and NPPB as control of growth inhibition by an anion channel inhibitor. In these experiments, chloroquine inhibited *P. falciparum* growth with an IC₅₀ of 11 nM, and NPPB, 111 μM (figure 27). This is in good agreement with others : in a medium with 8.5 % serum, NPPB had little effect on parasite growth at concentrations up to 50 μM, but the IC₅₀ was reduced to 30 μM in a medium with 2 % serum (Kirk and Horner, 1995). In our conditions, medium culture contains 5 % albumax.

Diazepam and Ro5-4864 inhibited *P. falciparum* growth with IC₅₀ of 50 and 45 μM, respectively. PK 11195 also inhibited parasite growth, with 55.2 ± 2 % inhibition at a concentration of 10 μM. However, effects at higher concentrations for this compound could not be described due to important haemolysis of non infected cell population. Dzierszinski *et al.* gave an IC 50 of 20 μg/mL (56 μM) for PK11195, using hypoxanthine incorporation assays (Dzierszinski *et al.*, 2002).

From these experiments, we have shown that the PBR ligands have more potency to inhibit parasite growth *in vitro* than NPPB, one of the classical anion channel and NPPs inhibitor.

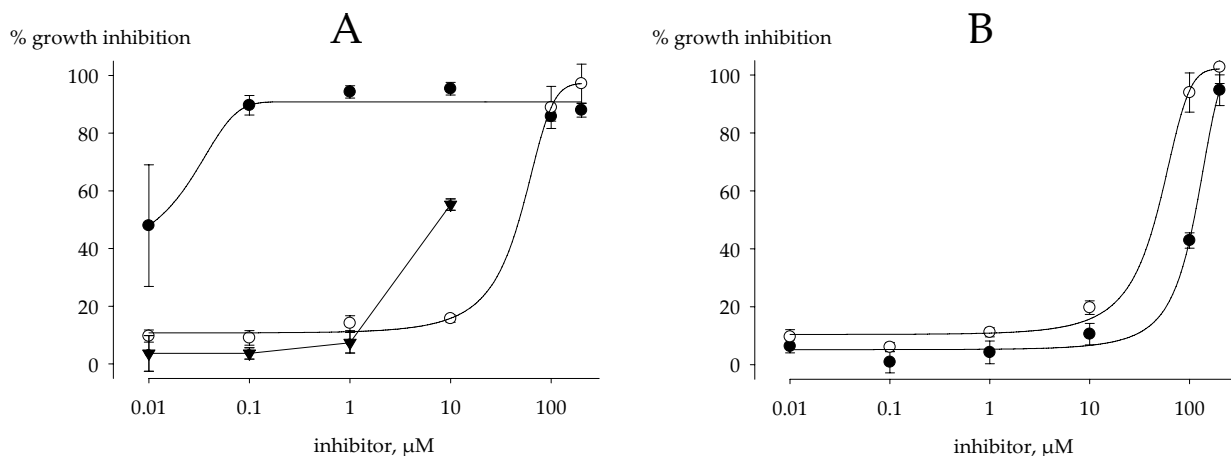


Figure 27 : Effects of PBR ligands on *Plasmodium falciparum* in vitro growth during 72h
A, effects of chloroquine (●) pK11195 (▼) and diazepam (○). B, effects of NPPB (●) and Ro5-4864 (○). Data are mean ± SEM of two experiments in triplicates.

Parasite cultures were synchronized before beginning of the test by two sorbitol treatment at 48 h interval as described (Lambros and Vanderberg, 1979). Ring-infected cultures were set at t=0 at 2% parasitemia, with 1% hematocrit in 96 wells plates, with increasing compound concentrations. Total parasitemia was evaluated at 72h by flow cytometry on a BD FACSCanto™II cytometer, after coloration by Sybr Green in Tris saline pH8.8 as described (Izumiyama et al., 2009).

Compounds	Whole-cell without serum	Whole cell with serum	Sorbitol - induced haemolysis	<i>Plasmodium falciparum</i> growth
Ro5-4864	ns	++	++	++
Diazepam	nd	+	++	++
PK11195	nd	+	+	++

Table 5 : Summary of the pharmacological results obtained with PBR ligands

++, effect at 10μM for patch experiments, or < 100μM for the other techniques. +, effect at 100μM.
ns, not significant; nd, not determined.

C - Discussion

1 - The PBR complex is present in the red cell membrane

We have shown in this study the presence of the PBR constitutive sub-units in the human erythrocyte membrane by western blots. Four different antibodies revealed the presence of TSPO, VDAC1 and ANT on the red cell membrane. Anyway the structure of the PBR complex remains unclear, as the molecular weights detected were sometimes higher than expected. It is possible that the complex was not fully dissociated. Furthermore, it is known that several TSPO can associate with one or more VDAC and/or ANT, because TSPO has the ability to form polymers (Lacapere and Papadopoulos, 2003; Veenman and Gavish, 2006). The Maldi-TOF readings gave promising results, which might be confirmed by LC/MS-MS analysis.

These results are congruent with the literature, with benzodiazepine and isoquinoline binding sites on the red cell membrane (Canat *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1988), presence of TSPO and VDAC mRNA in the reticulocyte transcriptome (Goh *et al.*, 2007), and effects of Anti-VDAC antibodies on the red cell membrane (Shimizu *et al.*, 2001).

2 - Correlation between the different strategies: implication of PBR in the NPPs

The different strategies used to characterize the effects of the PBR ligands on the infected red cell membrane permeability gave consistent results (table 5). Ro5-4864, Diazepam and PK11195 produced similar effects on whole cell currents, sorbitol permeability and *P. falciparum* growth. The dose-response curves obtained for sorbitol-induced haemolysis and *P. falciparum* growth inhibition assays were in the same range, with IC₅₀ between 10 and 75 μ M for the three compounds. IC₅₀ for patch-clamp experiments have not been evaluated yet. Nevertheless, the effects of the inhibitors at least on the serum-dependant whole-cell conductance revealed a high potency of these compounds to reduce infection-induced currents.

Taken together, these results suggest that elements of the PBR complex have an important implication in the permeability of *Plasmodium*-infected human red

blood cell, and could constitute part of the NPPs. Patch-clamp and cell physiology experiments have revealed that NPPs and anion currents in the infected red blood cell membrane have the same susceptibility to PBR ligands. The differential current inhibition pattern observed in presence or absence of serum tends to highlight that the serum-induced part of the conductance is the most important fraction correlated to NPPs.

3 - Discussion on VDAC properties

We have shown here that pharmacological data fit with a PBR/VDAC system active in the membrane of infected cells, and probably being part of the NPPs. If this complex is involved, an endogenous nature seems more probable, as suggested first by our western blot identification, second by the different works describing the presence of PBR in red cell membrane and third by the fact that no homolog sequences of this complex could be found in *Plasmodium* genome (Dzierszinski *et al.*, 2002).

No single channel recordings on infected cells have shown VDAC or PBR-like activity yet. However, first data obtained in cell-attached configuration with serum in the bath (see chapter two) showed a very different gating and conductance of the IRC channel previously described in our group. Further characterization remains to be done, to evaluate if these modifications could fit with a PBR/VDAC nature. It is known that PBR complex, and VDAC alone, have multiple regulation processes. In particular, PBR can bind cholesterol (Lacapere and Papadopoulos, 2003) or be regulated by protoporphyrin IX (Verma *et al.*, 1987). VDAC can be phosphorylated by cAMP-dependant protein kinase A (Bera *et al.*, 1995) or interact with plasminogen (Banerjee and Ghosh, 2004), actin or tubulin (Rostovtseva and Bezrukov, 2008). The particular environment of these proteins in the infected red cell membrane could explain a different behaviour of this channel.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de mieux décrire les canaux anioniques spontanément actifs dans la membrane de l'érythrocyte infecté par *Plasmodium falciparum*. En effet, au moins une partie des modifications de la perméabilité membranaire du globule rouge observées lors de l'infection semble être liée à l'activité d'un ou plusieurs canaux anioniques de nature indéterminée (Kirk, 2001).

Avant cette étude, deux types de canaux anioniques avaient été décrits comme présents dans la membrane des érythrocytes non infectés. Ces deux canaux ont été caractérisés au niveau unitaire en utilisant les techniques du *patch-clamp*, et semblent dormants en situation physiologique. L'un peut être activé par addition de PKA + ATP (dans le bain en configuration *excised*, ou dans la pipette en configuration *whole-cell*) (Egee *et al.*, 2002) ou par pré-incubation avec la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, en configuration *cell-attached* (Decherf *et al.*, 2007). Le deuxième canal n'est visible que très ponctuellement dans la membrane, en configuration *excised*. Il présente dans ces conditions une rectification sortante, avec une conductance de 80pS aux potentiels positifs (canal ORC).

Le canal sensible à la PKA avait déjà été décrit comme spontanément actif dans la membrane de l'érythrocyte infecté, en configuration *cell-attached* (Egee *et al.*, 2002). Cependant ses caractéristiques ne correspondaient pas aux résultats présentés par le groupe de S. Desai, qui décrivait un canal avec une conductance évaluée à environ 3pS en conditions physiologiques, le PSAC (Desai *et al.*, 2000).

I - Vers un modèle unificateur des canaux anioniques dans la membrane du globule rouge infecté

A - Activation des canaux endogènes au cours de l'infection

Lors de la présente étude (chapitre 1), nous avons pu confirmer l'activité du canal PKA-sensible (l'IRC) dans la membrane des cellules infectées. Par ailleurs, cette thèse a permis de montrer pour la première fois (1) l'activité spontanée d'un canal de type ORC dans le globule rouge infecté et (2) l'existence d'un nouveau type de canal (canal SCC), encore jamais décrit dans la membrane de l'érythrocyte sain ou infecté. Ce dernier a pu être observé grâce à l'amélioration du rapport signal/bruit permettant une meilleure résolution des transitions entre les états ouverts et fermés des canaux. Ces trois types de canaux (IRC, ORC et SCC) sont spontanément actifs dans la membrane des érythrocytes infectés, puisque nous avons pu les décrire en utilisant des solutions proches des conditions physiologiques et en configuration *cell-attached*, configuration qui préserve l'intégrité de la membrane cellulaire. Ces trois canaux ont les propriétés suivantes :

- Le canal ORC n'est apparu actif que dans très peu d'enregistrements. Deux hypothèses sont envisageables : (1) il n'est présent qu'en très petit nombre dans la membrane des érythrocytes, et est activé lors de l'infection par un processus non décrit ; ou (2) un plus grand nombre de copies est présent mais leur activité n'est pas liée à l'infection. Dans ce cas, l'apparition ponctuelle de copies actives de ce canal résulte du fonctionnement stochastique des canaux ioniques. Ainsi, suite à des variations légères de son environnement, le canal pourrait s'activer pendant une durée donnée mais resterait le plus souvent à l'état fermé. Par ailleurs, la présence de sérum dans le bain n'a pas provoqué une augmentation de la fréquence d'apparition de ce canal. Ces résultats semblent en accord avec les données récemment publiées (Huber *et al.*, 2008). Compte-tenu de ses caractéristiques physiologiques, ce canal pourrait intervenir ponctuellement dans le cadre de la régulation du volume

cellulaire. En effet, les canaux de type ORC sont connus pour être activés lors d'un gonflement cellulaire (Okada *et al.*, 2006).

Par ailleurs, dans une étude publiée par notre groupe (Decherf *et al.*, 2007), la fréquence d'apparition du canal ORC est augmentée de 27 % dans les globules rouges de patients atteints de mucoviscidose. Ces globules rouges ont un nombre plus faible de copies actives de CFTR dans la membrane (Lange *et al.*, 2006). Ce résultat suggère une sous-régulation de ce canal dans les globules rouges de patients sains, ce qui donne du poids à l'idée d'un canal présent mais très peu actif dans la membrane de l'érythrocyte sain ou infecté. Dans des lignées cellulaires humaines, les canaux de type ORC peuvent être inactifs en *cell-attached*, faiblement actifs en configuration *excised*, et activés par des mécanismes variés comme la phosphorylation ou l'exposition à un fort voltage (Tabcharani and Hanrahan, 1991).

- Le canal IRC avait déjà été décrit comme endogène, et spontanément actif dans la membrane de l'érythrocyte infecté (Egee *et al.*, 2002). Au cours de notre étude en *cell-attached* (chapitre 1), nous avons retrouvé ce canal, dont les propriétés correspondent au canal sensible à la PKA décrit dans la membrane de l'érythrocyte non infecté. La deuxième partie de cette étude a permis de montrer que ce canal présente une forte baisse d'activité (saturation de la conductance unitaire et baisse de la probabilité d'ouverture) aux concentrations ioniques supra-physiologiques utilisées par l'équipe de S. Desai (chapitre 2). Ces résultats expliqueraient pourquoi ces auteurs n'ont pu décrire l'activité d'un tel canal lors de leurs enregistrements en configuration *cell-attached* (Alkhalil *et al.*, 2004; Desai *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les résultats préliminaires obtenus lors de la présente étude (chapitre 2) montrent que le comportement de ce canal est fortement modifié en présence de sérum. Ainsi en configuration *cell-attached*, la rectification entrante de la conductance, typique de ce canal en absence de sérum, disparaît après pré-incubation des cellules avec 1 % de sérum. De même, de multiples états de conductance pour ce canal semblent apparaître, avec un état de conductance

supérieure favorisé et stabilisé en présence de sérum. Ces résultats restent cependant préliminaires, et s'il est sûr que le fonctionnement du canal est modifié par le sérum, de nouveaux enregistrements et analyses sont nécessaires pour détailler ce mécanisme. Compte-tenu du nombre important de copies actives de ce canal dans la membrane cellulaire (environ 150 à 250 copies), une telle modification de la conductance unitaire de ce canal pourrait rendre compte des valeurs de conductances globales mesurées en présence de sérum en configuration *whole-cell*. En effet, un calcul approximatif peut être effectué :

- Nombre N de canaux : 150 à 250.

Ce nombre avait été estimé en première approximation à 250-300 copies (Egee *et al.*, 2002), à partir de la conductance unitaire de ce canal et du courant en *whole-cell*. Cependant ce calcul ne tenait pas compte de la part du SCC dans le courant (environ 25 % en situation physiologique, chapitre 2).

- Augmentation ΔI du courant unitaire *via* ce canal à +100 mV : 2 à 3 pA (voir chapitre 2, figure 20)

- Augmentation ΔP de la probabilité d'ouverture du canal pour les potentiels de membrane positifs : multiplication par un facteur 3 à 4 (voir chapitre 2, figure 19 et 20)

Augmentation totale de courant dû à l'effet du sérum sur l'IRC :

$$\underline{N \times \Delta C \times \Delta P = 900 \text{ à } 3000 \text{ pA}}$$

Cette valeur est très approximative, mais donne néanmoins une idée de l'amplitude possible d'un tel mécanisme. Cet ordre de grandeur correspond aux valeurs généralement observées en configuration *whole-cell* (augmentation du courant d'environ 1 000 pA à $V_m = +100$ mV) lors de l'ajout de sérum dans le bain (Staines *et al.*, 2003).

- Le canal SCC a été décrit pour la première fois dans la membrane du globule rouge infecté au niveau unitaire. L'étude en configuration *cell-attached* a révélé un

canal ayant une conductance linéaire, mais dont la probabilité d'ouverture diminue aux potentiels de membrane positifs. Le nombre de copies de ce canal a été estimé entre 65 et 80, en se basant sur la fréquence d'apparition de ce canal (chapitre 1). La deuxième partie de cette étude nous a permis de démontrer que ce canal correspond au canal PSAC décrit par le groupe de Bethesda (chapitre 2). En effet, la conductance de 4.5 pS pour ce canal en situation physiologique augmente jusqu'à 19.9 pS dans les conditions supra-physiologiques utilisées par ce groupe. La correspondance de cette valeur de conductance avec celle du PSAC dans les mêmes conditions (1 M d'ions Cl⁻) associée au fait qu'à ces concentrations le SCC est le canal majoritairement visible, nous amène à conclure qu'il s'agit du PSAC précédemment décrit à Bethesda (Alkhalil *et al.*, 2004; Desai *et al.*, 2000).

Par ailleurs, lors de l'accroissement de la concentration en ions chlorure dans les solutions utilisées, la fraction de courant sensible au zinc en configuration *whole-cell* augmente, et peut être corrélée à l'augmentation de la part du SCC dans le courant global. Or, le zinc est un inhibiteur des canaux de type ClC-2 (Clark *et al.*, 1998). Ces résultats nous permettent de proposer que le canal SCC serait un canal ClC-2. La conductance unitaire de ce type de canaux est de l'ordre de 3 pS (Weinreich and Jentsch, 2001), valeur qui correspond à la conductance de 4.5 pS décrite pour le SCC dans le globule rouge infecté en configuration *cell-attached*. De plus, cette hypothèse rejoint les travaux du groupe de Tübingen qui a démontré la présence et l'activité d'un canal ClC-2 endogène dans la membrane du globule rouge humain infecté, en configuration *whole-cell* (Huber *et al.*, 2004).

B - Correspondance des résultats de cette étude électrophysiologique avec les données de la littérature

Les résultats de cette étude ont permis d'établir une certaine cohérence avec les résultats présentés par les différentes équipes, en particulier avec les travaux des groupes de Bethesda et Tübingen. Néanmoins deux principales divergences subsistent : nous n'avons pas étudié l'implication du canal CFTR, hypothèse

suggérée par les travaux du groupe de Rotterdam. De plus, les travaux du groupe de Tübingen proposent une modification de l'activité d'un canal ORC comme support des effets de la présence de sérum.

Le groupe de H. DeJonge évoquait en 2004 l'implication d'un canal CFTR dans les courants anioniques visibles chez un globule rouge infecté (Verloo *et al.*, 2004). Selon cette étude, la présence d'un canal CFTR est nécessaire à l'activation lors de l'infection d'un autre type de canal, appelé CFTR-like. Ce canal serait responsable du courant rectifié entrant dans l'érythrocyte infecté. Cependant ces canaux, dont l'activité disparaît dans les globules rouges de patients CF (atteints de mucoviscidose), ne seraient pas indispensables au parasite, et par conséquent seraient indépendants du phénomène des NPPs. En contradiction avec ces résultats, les travaux du groupe de S. Desai montrent des courants en configuration *whole-cell* similaires dans la membrane des globules rouges de patients sains ou CF infectés par *Plasmodium falciparum* (Alkhalil *et al.*, 2004). De plus, les travaux du groupe de Roscoff montrent la présence de canaux activables par PKA + ATP dans les érythrocytes de patients CF, canaux identiques à l'IRC mais avec une cinétique modifiées chez les globules rouges de patients CF (Decherf *et al.*, 2007). Au cours de sa thèse, Gaëtan Decherf a également montré que ces canaux étaient spontanément actifs, en configuration *cell-attached*, dans la membrane des érythrocytes de patients CF infectés par *Plasmodium falciparum*. Le groupe de Rotterdam utilise des solutions de chlorure de césium dans le bain, qui ont peut-être un effet sur le fonctionnement des canaux présents dans la membrane du globule rouge.

Un autre point de désaccord reste le processus expliquant les effets de la présence de sérum. Nous proposons ici un mécanisme basé sur une modification du comportement de l'IRC, avec une suppression de la rectification de ce canal, et de la dépendance de sa probabilité d'ouverture au voltage. Les travaux récents du groupe de Tübingen suggèrent au contraire l'activation d'un canal de type ORC correspondant à celui décrit à Roscoff (Huber *et al.*, 2008). Cependant la fréquence d'apparition de ce canal en configuration *cell-attached* décrite dans leur étude en

présence de sérum, correspond à celle décrite à Roscoff en absence de sérum (chapitre 1). Il semblerait donc que l'activité de ce canal ne soit pas dépendante du sérum. Les enregistrements réalisés à Tübingen dans cette configuration sont des rampes de voltages de 400 ms, correspondant à celles utilisées pour la configuration *whole-cell*. Il est possible que ce temps très court d'enregistrement ne permette pas de visualiser le canal IRC en configuration *cell-attached*.

II - Comment relier ces résultats aux caractéristiques des NPPs ?

A - Considérations techniques

A l'origine, les techniques d'électrophysiologie ont commencé à être utilisées sur le globule rouge humain infecté pour caractériser voire identifier le canal anionique susceptible d'être à l'origine des NPPs. Après une dizaine d'années d'études, force est de constater que l'objectif n'est pas rempli, et que l'identité des NPPs (nombre de voies de perméabilités, origine, nature moléculaire) reste encore très mal comprise. La corrélation entre les résultats d'électrophysiologie et les résultats obtenus par les autres techniques d'études (lyse isosmotique ou flux isotopiques) reste difficile, du fait des effets inhérents à chaque protocole.

Ainsi la technique de lyse isosmotique au sorbitol induit nécessairement un fort changement du potentiel membranaire. Le modèle mathématique Lew-Bookchin (Lew and Bookchin, 1986; Lew *et al.*, 2003) prédit une forte dépolarisation de la membrane de l'érythrocyte infecté lors de l'utilisation des solutions d'hémolyse. Par exemple, le potentiel de membrane d'un érythrocyte infecté au stade trophozoïte passe d'une valeur comprise entre -10 et -3 mV à une valeur de +80 mV si on le place dans une solution isosmotique de sorbitol, même si celle-ci contient 5 mM d'ions chlorure (Staines *et al.*, 2006).

De même, les enregistrements en électrophysiologie sont généralement menés avec des hématocrites très faibles (de l'ordre de 0.001%). Ainsi le contact entre les cellules est fortement diminué, et la présence du lysat cellulaire (importante en hémolyse, du fait du principe même de la méthode) est très faible. L'étude de Staines

et al. démontre, en configuration *whole-cell*, un effet similaire à la présence de sérum de (1) l'augmentation de l'hématocrite à 5 % et (2) l'ajout dans le bain d'un lysat cellulaire issu de globules rouges infectés (Staines *et al.*, 2006). Les comparaisons entre les résultats d'hémolyse et d'électrophysiologie sont donc rendues complexes.

Dans cette même étude, en suivant le flux de sorbitol marqué radioactivement (donc *via* les NPPs) dans différentes conditions, Staines *et al.* montrent que l'entrée de sorbitol ne peut pas se faire par un canal ayant une faible probabilité d'ouverture aux potentiels de membrane positifs. Ces résultats excluaient donc le SCC et l'IRC des voies potentielles pour l'entrée de sorbitol. Néanmoins, nos résultats montrent une activité plus forte de l'IRC aux potentiels positifs en présence de sérum, ce qui laisse penser que ce canal reste un bon candidat pour expliquer les NPPs.

En compilant les données de flux isotopiques et de lyse isosmotique, Ginsburg et Stein concluent à la présence dans la membrane de l'érythrocyte infecté de deux voies de conductances, l'une perméable aux anions et nucléosides et présente en plusieurs centaines de copies, l'autre perméable aux solutés neutres et aux cations et présente en très faible nombre, de l'ordre de quatre copies (Ginsburg and Stein, 2004). La dernière partie de ce travail peut aller dans ce sens, avec l'hypothèse d'un canal de type VDAC ayant un comportement variable.

B - L'hypothèse de l'implication d'un récepteur PBR dans le phénomène des NPPs

1 - Données bibliographiques

Les résultats de la dernière partie de l'étude pourraient contribuer à valider une hypothèse originale quant à la nature de l'un des canaux impliqués dans les NPPs. Les récepteurs PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor) sont classiquement localisés dans les membranes mitochondriales, mais ont également été décrits dans d'autres membranes, y compris plasmiques (Woods and Williams, 1996). Différentes données de la littérature suggèrent l'existence d'un récepteur PBR dans la membrane des érythrocytes.

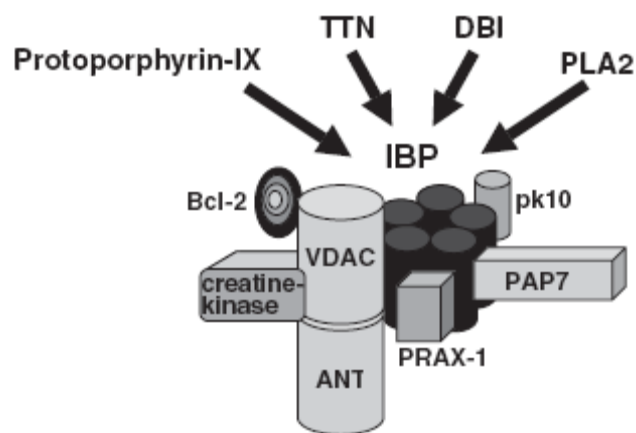


Figure 28 : Structure et interactions du complexe PBR (Veenman and Gavish, 2006)

Le PBR est le plus souvent constitué de plusieurs sous-unités IBP (ou TSPO), associées avec le VDAC et l'ANT. PAP-7 (PBR-Associated Protein 7), PRAX-1 (PBR-associated Protein 1) et pk10 (Protein of 10 kDa) peuvent également être associées au TSPO. De même, les protéines de la famille Bcl-2 et la créatine kinase peuvent être liées au VDAC et à l'ANT. Les ligands endogènes incluent la protoporphyrine IX, le peptide DBI (Diazepam Binding Inhibitor), le peptide TTN (Triakontatetraneuropeptide) et la phospholipase A2.

En effet, les transcrits codant pour le canal VDAC3 et le TSPO (encore appelé BZRP) sont trouvés dans le transcriptome du réticulocyte humain (Goh *et al.*, 2007). Par ailleurs, des sites de fixations au PK11195, et au Ro5-4864, ligands spécifiques du récepteur PBR, sont présents dans la membrane érythrocytaire (Canat *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1988). Enfin, les anticorps anti-VDAC inhibent des effets induits sur des globules rouges humains par des facteurs pro-apoptotiques, connus pour agir sur le VDAC (Shimizu *et al.*, 2001).

De plus, des ligands du PBR, dont le PK11195, ont montré une activité inhibitrice sur la croissance de *Plasmodium falciparum in vitro* (Dzierszynski *et al.*, 2002).

2 - Résultats de l'étude

Les premiers résultats de cette étude montrent la présence des composants du PBR dans la membrane de l'érythrocyte. Les trois principaux éléments constitutifs du PBR (TSPO, VDAC et ANT, figure 28) ont pu être identifiés par western-blot, même si lors de cette étude la dissociation du complexe n'était pas complète. La composition du complexe protéique (nombre de sous-unités) reste encore indéterminée. Les résultats obtenus en Maldi-TOF sont encourageants, et une analyse en LC-MS/MS est en cours pour valider ces résultats. Cette approche sera poursuivie par l'utilisation de techniques d'immunoprécipitation, qui devraient nous permettre d'enrichir les échantillons en protéines d'intérêts.

Par ailleurs, les résultats pharmacologiques obtenus au cours de cette partie de l'étude confirment l'efficacité des ligands du PBR sur la croissance parasitaire *in vitro*. Nous avons également pu montrer que les effets de ces ligands passent par une altération de la perméabilité membranaire de l'érythrocyte infecté, en utilisant deux approches techniques différentes :

(1) En électrophysiologie, ces ligands ont un effet inhibiteur sur les courants enregistrés en configuration *whole-cell* sur la membrane du globule rouge infecté. Cet effet porte plus particulièrement sur la partie sérum-dépendante de ces courants.

(2) En utilisant la méthode de lyse isosmotique au sorbitol, un effet de ces ligands sur la perméabilité au sorbitol des globules rouges infectés a pu être montré. Ces résultats montrent plus directement un effet des ligands du PBR sur le phénomène des NPPs.

La corrélation entre les trois approches utilisées apporte des éléments nouveaux et importants pour la compréhension des NPPs. D'un point de vue technique, en particulier, la partie du courant sérum-dépendante mesurée en électrophysiologie semble être l'analogie des flux de sorbitol observés en hémolyse. Cette hypothèse avait déjà été émise dans différentes publications (Duranton *et al.*, 2004; Staines *et al.*, 2006). L'étude de Staines *et al.* démontrait qu'en utilisant la configuration *whole-cell* avec des conditions identiques à celles utilisées en hémolyse (hématocrite à 5 %, ou présence de lysat cellulaire), les courants observés ont les mêmes caractéristiques que ceux observés en présence de sérum. Par ailleurs, le groupe de Tübingen a montré que la perméabilité membranaire à différents osmolytes (en particulier au lactate et au sorbitol) correspond aux courants sortants vus en électrophysiologie en présence de sérum (Duranton *et al.*, 2004).

3 - L'hypothèse d'un récepteur PBR endogène au sein des NPPs

Le second élément apporté par cette étude, et sans doute le plus important, est l'hypothèse de l'implication du PBR dans les NPPs. En effet, après plus de 30 années d'études, aucune nature moléculaire n'a pu être démontrée pour les NPPs.

L'étude pharmacologique réalisée au cours de cette étude, associée aux résultats démontrant la présence des composants du PBR (TSPO, VDAC et ANT) dans la membrane érythrocytaire (chapitre 3), permettent de formuler cette hypothèse. Le complexe PBR est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, et possède une structure variable et de nombreux mécanismes de modulations (Veenman and Gavish, 2006) (figure 28).

Par ailleurs, des propriétés décrites du canal VDAC et du complexe PBR accréditent cette possibilité :

- La perméabilité très peu sélective du VDAC pourrait correspondre aux propriétés des NPPs : ce canal est perméable aux anions, petits ou plus gros comme l'ATP ou le glutamate, mais aussi aux cations, petits ou gros comme l'acétylcholine (Gincel *et al.*, 2000; Shoshan-Barmatz and Gincel, 2003).

- le canal VDAC est sensible à la phosphorylation, en particulier par la Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) (Das *et al.*, 2008). La GSK3 plasmodiale (PfGSK3) est exportée vers le cytoplasme de l'érythrocyte durant l'infection (Droucheau *et al.*, 2004). Par ailleurs, le canal VDAC peut surtout être phosphorylé par la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) (Bera *et al.*, 1995). De même le TSPO est également sensible à la PKA (Whalin *et al.*, 1994). Enfin, le complexe PBR peut être associé dans la membrane mitochondriale à la protéine PAP7 (PBR-Associated Protein 7), qui fonctionnerait comme une protéine d'ancrage de la PKA (Liu *et al.*, 2003). L'implication de la PKA (plasmodiale ou endogène) dans la dérégulation des conductances anioniques de l'érythrocyte infecté a été démontrée (Merckx *et al.*, 2009; Merckx *et al.*, 2008). Il est donc possibles que ces étapes de phosphorylation impliquent les sous-unités du PBR.

- Les protoporphyrines, dont la protoporphyrine IX (PPIX) sont des ligands endogènes du PBR (Verma *et al.*, 1987; Wendler *et al.*, 2003). Nous avons testé les effets de la PPIX sur la lyse isosmotique au sorbitol des globules rouges sains ou infectés. Aucun effet (activateur ou inhibiteur) n'a pu être observé. Cependant Berkovitch *et al.* ont montré sur des lymphocytes que les récepteurs PBR dans la membrane cytoplasmique avaient une affinité beaucoup plus faible pour la PPIX que les PBR mitochondriaux (Berkovich *et al.*, 1993).

- La régulation du canal VDAC par le TSPO semble passer par la production de ROS (Reactive Oxygen Species) ce qui suggère une sensibilité du VDAC à l'oxydation (Veenman *et al.*, 2008). Des mécanismes d'oxydation ont également été

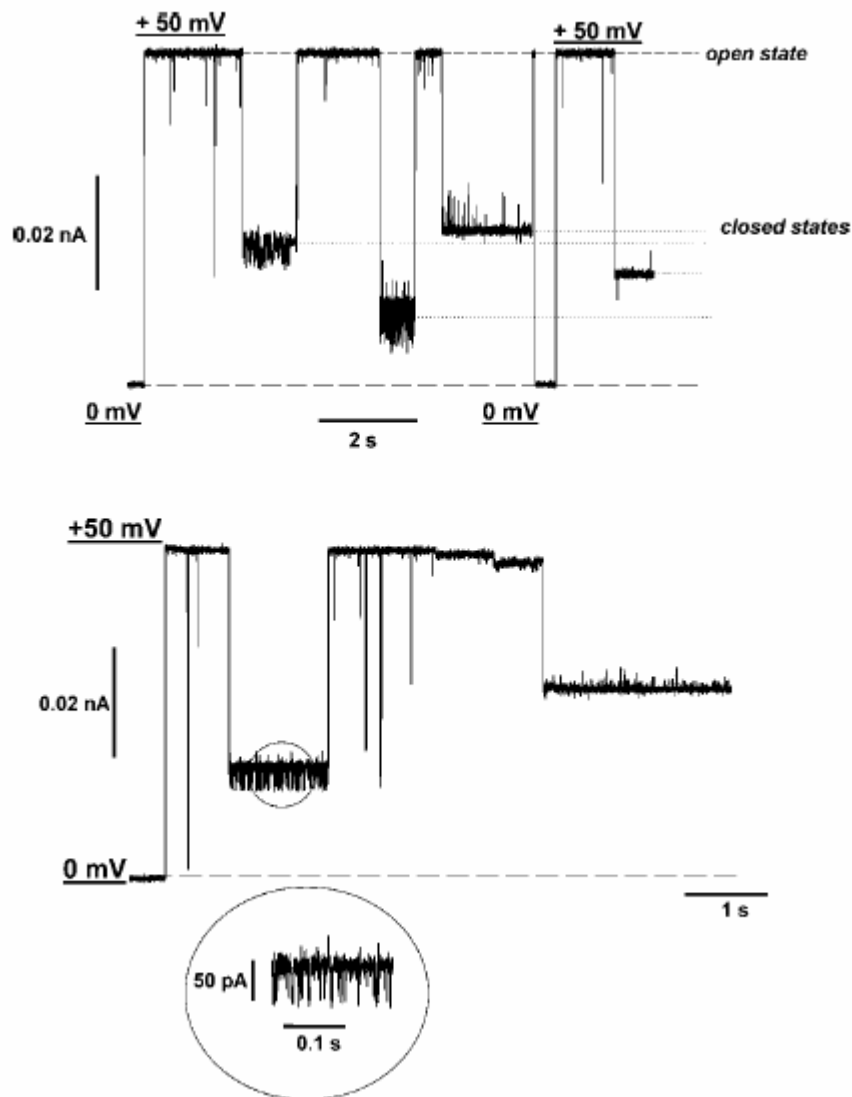


Figure 29: Multiples états de conductance du VDAC (Rostovtseva et al., 2005)

Dans cette figure sont visibles l'état « ouvert », de conductance maximale, et plusieurs états « fermés », de faible conductance. Le canal VDAC étudié est isolé à partir de membranes de *Neurospora crassa*, et inséré dans une bicouche lipidique reconstituée. Le milieu contient 250 mM KCl, 1mM CaCl₂ et 5 mM Hepes, pH 7.2.

impliqués dans la dérégulation des conductances anioniques des érythrocytes infectés (Huber *et al.*, 2002).

Cependant, il reste encore à démontrer que les courants anioniques vus dans la membrane de l'érythrocyte infecté correspondent à l'activité d'un récepteur PBR ou d'un VDAC. En effet, si le TSPO semble pouvoir se comporter seul comme un transporteur, en particulier pour le cholestérol (Lacapere and Papadopoulos, 2003; Veenman *et al.*, 2007), un fonctionnement de type canal pour cette protéine reste à démontrer.

Le VDAC est un canal anionique de forte conductance, avec de multiples sous-états. Sa conductance est maximale aux faibles potentiels, avec un état alors très stable, mais des sous-états de conductances plus faibles peuvent apparaître (Rostovtseva and Bezrukov, 2008; Rostovtseva *et al.*, 2005; Shoshan-Barmatz and Gincel, 2003) (figure 29). La conductance maximale peut atteindre 3.7 nS en conditions symétriques de NaCl 1 M (Gincel *et al.*, 2000), équivalent à environ 400 pS en condition physiologiques (Dermietzel *et al.*, 1994). Le diamètre de ce pore a été estimé à 1.8 à 3 nm en fonction de l'état de conductance du canal (Carneiro *et al.*, 2003; Rostovtseva *et al.*, 2002; Shoshan-Barmatz and Gincel, 2003). Par comparaison, la taille du pore constituant les NPPs avait été estimée à 1.4 nm de diamètre, par un calcul utilisant les données de flux isotopiques et de lyse isosmotique (Ginsburg *et al.*, 1985).

Les propriétés électrophysiologiques du VDAC ne correspondent pas aux canaux décrits pour l'instant en configuration *cell-attached* dans la membrane du globule rouge infecté. Cependant, l'activité du VDAC est régulée par de nombreux facteurs. En particulier, une interaction avec le plasminogène a été évoquée, tendant à fortement réduire la conductance du VDAC (Banerjee and Ghosh, 2004; Gonzalez-Gronow *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'existence d'isoformes du VDAC1, exportées vers la membrane (pl-VDAC 1) ou vers la mitochondrie (mt-VDAC 1) a été démontrée (Buettner *et al.*, 2000). L'affinité de l'isoforme membranaire pour la protoporphyrine

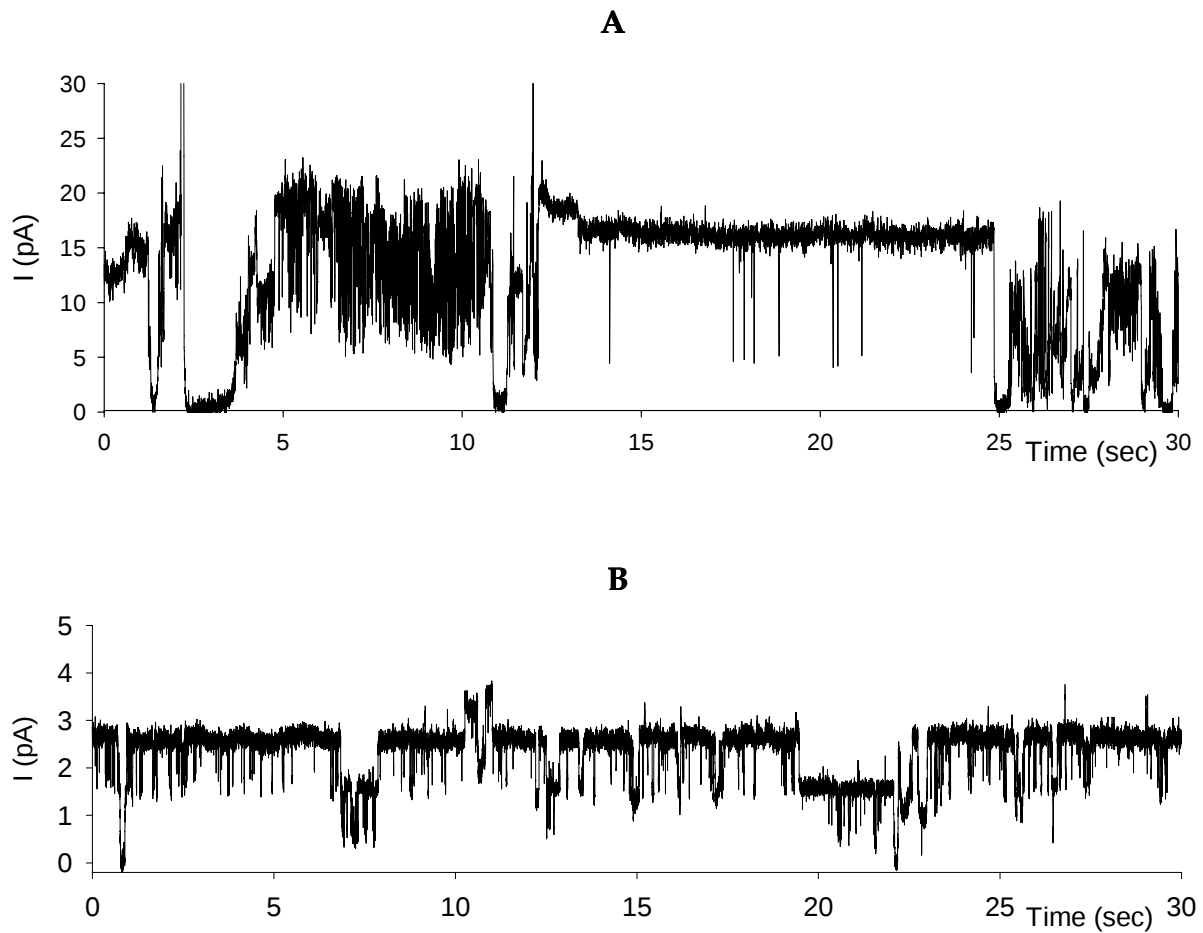


Figure 30 : Enregistrements d'un maxi-canal anionique dans la membrane de l'érythrocyte non infecté.

Enregistrements effectués en configuration cell-attached, avec une solution Ringer NaCl 115 mM dans le bain et la pipette, $V_m = +50\text{mV}$. A, Canal présentant plusieurs sous-états, avec une conductance maximale d'environ 300pS. B, canal présentant plusieurs sous-états, avec des conductances jusqu'à 60 pS.

IX est diminuée (Berkovich *et al.*, 1993). Ces données pourraient suggérer un fonctionnement particulier du VDAC dans la membrane de l'érythrocyte infecté.

Par ailleurs l'hypothèse de l'association du VDAC avec le CFTR, présent dans la membrane de l'érythrocyte et dont le rôle de régulateur est connu (Schwiebert *et al.*, 1999), a été émise (Thinnes, 2009; Winkelbach *et al.*, 1994).

Ainsi le rôle du VDAC dans la membrane plasmatisque reste encore mal compris, mais ses propriétés, conjuguées à l'effet d'anticorps anti-VDAC sur la membrane des érythrocytes (Shimizu *et al.*, 2001), rendent crédible l'hypothèse de la présence et de l'implication d'un canal VDAC dans la membrane du globule rouge infecté.

L'apparition de différents sous-états pour l'IRC en présence de sérum laisse envisager l'existence d'autres sous-états pour ce canal, de conductance plus forte. Si l'on émet l'hypothèse que l'IRC est un canal VDAC, celui-ci pourrait avoir différents types de comportements :

- en absence de sérum, un seul type d'état, rectifié entrant,
- en présence de sérum, deux types de comportements apparaîtraient : (1) un comportement avec les deux sous-états décrits dans ce travail, avec une activité linéaire selon le voltage, et (2) un état de conductance maximale, apparaissant de façon ponctuelle. Ces deux comportements en présence de sérum seraient alors à mettre en relation avec le modèle issu de l'étude de Ginsburg et Stein, avec 2 types de canaux constituant les NPPs : l'un, présent en petit nombre et perméable aux cations et solutés neutres, l'autre présent en plus grand nombre et perméable aux anions et nucléosides (Ginsburg and Stein, 2004).

Si ce fonctionnement reste une hypothèse, des enregistrements effectués dans l'équipe en configuration *cell-attached* sur la membrane de l'érythrocyte sain montrent la présence d'un canal de forte conductance (figure 30). Par ailleurs, une étude sur la présence de pannexin 1 dans les érythrocytes montre la présence d'un canal ayant une conductance unitaire de 475 pS, perméable à l'ATP, dans la membrane des

érythrocytes humains (Locovei *et al.*, 2006). L'hypothèse d'un maxi-canal anionique dans ces cellules, et son activité dans la membrane de l'érythrocyte infecté, est donc envisageable.

III - Perspectives

Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre les modifications de la conductance anionique du globule rouge lors de l'infection par *Plasmodium falciparum*. Cependant, si deux types de canaux sont activés lors de l'infection (l'IRC et le SCC-PSAC), les mécanismes régissant cette activation restent indéterminés.

Si le SCC est bien un canal de type ClC-2, son rôle dans la membrane pourrait alors être lié à la régulation du volume cellulaire. Le travail du groupe de Tübingen montre un effet du gonflement cellulaire sur ce canal dans la membrane de l'érythrocyte infecté (Huber *et al.*, 2004). Cependant ces effets ne sont pas reproductibles dans la membrane de l'érythrocyte sain. Ceci suggère que si ce canal est bien un régulateur du volume dans les cellules infectées, il subit d'abord une activation par le parasite, activation dont le mécanisme reste encore indéterminé. Un travail de caractérisation de ce canal, en configuration *cell-attached* sur des cellules infectées avec différentes conditions osmotiques, permettrait dans un premier temps de confirmer l'identité ClC-2 du canal SCC. Ensuite différents mécanismes d'activation pourraient être testés sur la membrane de l'érythrocyte non infecté : phosphorylation, oxydation (mimant les effets de l'infection) associés à des stress osmotiques.

Par ailleurs, selon les résultats de cette étude le canal IRC semble être le meilleur candidat « électrophysiologique » pour correspondre aux NPPs. La poursuite de la caractérisation des effets de la présence de sérum sur ce canal reste une priorité, en particulier la réalisation d'une séquence de sélectivité en configuration *excised* en présence de sérum. Différents solutés, connus pour franchir les NPPs pourraient être testé pour confirmer ou infirmer le lien entre l'activité de ce

canal en présence de sérum et les NPPs. Cette étude nécessite une série importante d'enregistrements de l'activité unitaire de ce canal.

L'hypothèse de la présence d'un maxi-canal anionique dans la membrane du globule rouge a pu être émise, en envisageant que l'IRC serait un sous-état de ce canal. Quelques enregistrements effectués à Roscoff sur l'érythrocyte non infecté suggèrent bien la présence d'un tel canal dans la membrane érythrocytaire, dont la conductance serait de l'ordre de grandeur de celles du VDAC ou de Pannexin 1. De nouvelles séries d'enregistrements devraient permettre de confirmer cette hypothèse dans la membrane de l'érythrocyte sain ou infecté. Pour cela, l'utilisation de la configuration *cell-attached* ou *excised* avec les ligands du PBR sera nécessaire. Enfin, il sera également important de travailler sur les mécanismes d'activation potentiels, en particulier l'oxydation et/ou la phosphorylation.

La voie purinergique reste également à explorer : des récepteurs purinergiques P2Y₁ endogènes semblent impliqués dans l'activation des canaux anioniques de l'érythrocyte lors de l'infection (Tanneur *et al.*, 2005). Par ailleurs, les canaux anioniques activés lors de l'infection par *Plasmodium falciparum*, et plus particulièrement la partie rectifiée sortante est une voie de sortie de l'ATP (Akkaya *et al.*, 2008). Ainsi la sortie d'ATP par un canal (les maxi-canaux anioniques sont perméables à l'ATP) pourrait activer ces récepteurs purinergiques, P2Y₁ (Tanneur *et al.*, 2005) ou P2X₇, également présents dans la membrane érythrocytaire (Sluyter *et al.*, 2007), engendrant une série d'effets sur la perméabilité et le métabolisme de l'érythrocyte infecté.

Enfin, le passage en configuration *whole-cell* entraîne la dilution du cytoplasme de la cellule dans la solution contenue dans la pipette. En conséquence, l'environnement intra-cellulaire des canaux est fortement modifié dans cette configuration. L'utilisation de la nystatine pourrait permettre de remédier à ce problème. En effet, cet antibiotique forme dans la membrane des pores perméables aux ions monovalents, permet d'enregistrer l'activité des canaux sur l'ensemble de la membrane sans perdre les facteurs régulant l'activité des canaux. Cette technique

pourrait permettre de mieux faire le lien entre les résultats obtenus en configuration *cell-attached* et *whole-cell*.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, E.H., Sterling, K.M., Kim, R.J., Salikhova, A.Y., Huffman, H.B., Crockett, M.A., Johnston, N., Parker, H.W., Boyle, W.E., Jr., Hartov, A., Demidenko, E., Efird, J., Kahn, J., Grubman, S.A., Jefferson, D.M., Robson, S.C., Thakar, J.H., Lorico, A., Rappa, G., Sartorelli, A.C. and Okunieff, P. (2001) Erythrocyte membrane ATP binding cassette (ABC) proteins: MRP1 and CFTR as well as CD39 (ecto-apyrase) involved in RBC ATP transport and elevated blood plasma ATP of cystic fibrosis. *Blood Cells Mol Dis*, **27**, 165-180.
- Akkaya, C., Shumilina, E., Bobballa, D., Brand, V.B., Mahmud, H., Lang, F. and Huber, S.M. (2008) The *Plasmodium falciparum*-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway. *Pflugers Arch*.
- Alkhalil, A., Cohn, J.V., Wagner, M.A., Cabrera, J.S., Rajapandi, T. and Desai, S.A. (2004) *Plasmodium falciparum* likely encodes the principal anion channel on infected human erythrocytes. *Blood*, **104**, 4279-4286.
- Bah, S., Jager, A.K., Adersen, A., Diallo, D. and Paulsen, B.S. (2007) Antiplasmodial and GABA(A)-benzodiazepine receptor binding activities of five plants used in traditional medicine in Mali, West Africa. *J Ethnopharmacol*, **110**, 451-457.
- Banerjee, J. and Ghosh, S. (2004) Interaction of mitochondrial voltage-dependent anion channel from rat brain with plasminogen protein leads to partial closure of the channel. *Biochim Biophys Acta*, **1663**, 6-8.
- Basile, A.S., Lueddens, H.W. and Skolnick, P. (1988) Regulation of renal peripheral benzodiazepine receptors by anion transport inhibitors. *Life Sci*, **42**, 715-726.
- Bennekou, P. (1993) The voltage-gated non-selective cation channel from human red cells is sensitive to acetylcholine. *Biochim Biophys Acta*, **1147**, 165-167.
- Bennekou, P., Barksman, T.L., Kristensen, B.I., Jensen, L.R. and Christophersen, P. (2004) Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel. Part II: inactivation and blocking. *Blood Cells Mol Dis*, **33**, 356-361.
- Bera, A.K., Ghosh, S. and Das, S. (1995) Mitochondrial VDAC can be phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **209**, 213-217.
- Berkovich, A., Ferrarese, C., Cavaletti, G., Alho, H., Marzorati, C., Bianchi, G., Guidotti, A. and Costa, E. (1993) Topology of two DBI receptors in human lymphocytes. *Life Sci*, **52**, 1265-1277.
- Bize, I., Taher, S. and Brugnara, C. (2003) Regulation of K-Cl cotransport during reticulocyte maturation and erythrocyte aging in normal and sickle erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **285**, C31-38.
- Brain, M.C., Pihl, C., Robertson, L. and Brown, C.B. (2004) Evidence for a mechanosensitive calcium influx into red cells. *Blood Cells Mol Dis*, **32**, 349-352.
- Buettner, R., Papoutsoglou, G., Scemes, E., Spray, D.C. and Dermietzel, R. (2000) Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3201-3206.
- Cabantchik, Z.I. (1999) Erythrocyte membrane transport. *Novartis Found Symp*, **226**, 6-16.
- Canat, X., Carayon, P., Bouaboula, M., Cahard, D., Shire, D., Roque, C., Le Fur, G. and Casellas, P. (1993) Distribution profile and properties of peripheral-type benzodiazepine receptors on human hemopoietic cells. *Life Sci*, **52**, 107-118.

- Carneiro, C.M., Merzlyak, P.G., Yuldasheva, L.N., Silva, L.G., Thinnés, F.P. and Krasilnikov, O.V. (2003) Probing the volume changes during voltage gating of Porin 31BM channel with nonelectrolyte polymers. *Biochim Biophys Acta*, **1612**, 144-153.
- Casellas, P., Galiegue, S. and Basile, A.S. (2002) Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int*, **40**, 475-486.
- Chang, D., Hsieh, P.S. and Dawson, D.C. (1988) Calcium: a program in BASIC for calculating the composition of solutions with specified free concentrations of calcium, magnesium and other divalent cations. *Comput Biol Med*, **18**, 351-366.
- Christophersen, P. and Bennekou, P. (1991) Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1065**, 103-106.
- Clark, S., Jordt, S.E., Jentsch, T.J. and Mathie, A. (1998) Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J Physiol*, **506 (Pt 3)**, 665-678.
- Colombini, M. (1987) Regulation of the mitochondrial outer membrane channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr*, **19**, 309-320.
- Concha, II, Velasquez, F.V., Martinez, J.M., Angulo, C., Droppelmann, A., Reyes, A.M., Slebe, J.C., Vera, J.C. and Golde, D.W. (1997) Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose. *Blood*, **89**, 4190-4195.
- Cranmer, S.L., Conant, A.R., Gutteridge, W.E. and Halestrap, A.P. (1995) Characterization of the enhanced transport of L- and D-lactate into human red blood cells infected with *Plasmodium falciparum* suggests the presence of a novel saturable lactate proton cotransporter. *J Biol Chem*, **270**, 15045-15052.
- Dagher, G. and Lew, V.L. (1988) Maximal calcium extrusion capacity and stoichiometry of the human red cell calcium pump. *J Physiol*, **407**, 569-586.
- Das, S., Wong, R., Rajapakse, N., Murphy, E. and Steenbergen, C. (2008) Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circ Res*, **103**, 983-991.
- Decherf, G., Bouyer, G., Egee, S. and Thomas, S.L. (2007) Chloride channels in normal and cystic fibrosis human erythrocyte membrane. *Blood Cells Mol Dis*, **39**, 24-34.
- Dermietzel, R., Hwang, T.K., Buettner, R., Hofer, A., Dotzler, E., Kremer, M., Deutzmann, R., Thinnés, F.P., Fishman, G.I., Spray, D.C. and et al. (1994) Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 499-503.
- Desai, S. (2005) Open and closed states of the plasmodial surface anion channel. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, **1**, 58-66.
- Desai, S.A., Bezrukov, S.M. and Zimmerberg, J. (2000) A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature*, **406**, 1001-1005.
- Deves, R. and Krupka, R.M. (1979) The binding and translocation steps in transport as related to substrate structure. A study of the choline carrier of erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, **557**, 469-485.
- Droucheau, E., Primot, A., Thomas, V., Mattei, D., Knockaert, M., Richardson, C., Sallicandro, P., Alano, P., Jafarshad, A., Baratte, B., Kunick, C., Parzy, D., Pearl, L., Doerig, C. and Meijer, L. (2004) *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, **1697**, 181-196.
- Duranton, C., Huber, S.M. and Lang, F. (2002) Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol*, **539**, 847-855.

- Durantón, C., Huber, S.M., Tanneur, V., Brand, V.B., Akkaya, C., Shumilina, E.V., Sandu, C.D. and Lang, F. (2004) Organic osmolyte permeabilities of the malaria-induced anion conductances in human erythrocytes. *J Gen Physiol*, **123**, 417-426.
- Dzierszinski, F., Coppin, A., Mortuaire, M., Dewailly, E., Slomianny, C., Ameisen, J.C., DeBels, F. and Tomavo, S. (2002) Ligands of the peripheral benzodiazepine receptor are potent inhibitors of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 3197-3207.
- Egee, S., Lapaix, F., Decherf, G., Staines, H.M., Ellory, J.C., Doerig, C. and Thomas, S.L. (2002) A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Physiol*, **542**, 795-801.
- Elford, B.C., Haynes, J.D., Chulay, J.D. and Wilson, R.J. (1985) Selective stage-specific changes in the permeability to small hydrophilic solutes of human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **16**, 43-60.
- Freedman, J.C., Novak, T.S., Bisognano, J.D. and Pratap, P.R. (1994) Voltage dependence of DIDS-insensitive chloride conductance in human red blood cells treated with valinomycin or gramicidin. *J Gen Physiol*, **104**, 961-983.
- Gardos, G. (1958) The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, **30**, 653-654.
- Gavish, M., Bachman, I., Shoukrun, R., Katz, Y., Veenman, L., Weisinger, G. and Weizman, A. (1999) Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol Rev*, **51**, 629-650.
- Gibson, J.S., Cossins, A.R. and Ellory, J.C. (2000) Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells. *J Exp Biol*, **203 Pt 9**, 1395-1407.
- Gincel, D., Silberberg, S.D. and Shoshan-Barmatz, V. (2000) Modulation of the Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) by Glutamate1. *J Bioenerg Biomembr*, **32**, 571-583.
- Ginsburg, H. (1994) Transport pathways in the malaria-infected erythrocyte. Their characterization and their use as potential targets for chemotherapy. *Biochem Pharmacol*, **48**, 1847-1856.
- Ginsburg, H., Krugliak, M., Eidelman, O. and Cabantchik, Z.I. (1983) New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, **8**, 177-190.
- Ginsburg, H., Kutner, S., Krugliak, M. and Cabantchik, Z.I. (1985) Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Mol Biochem Parasitol*, **14**, 313-322.
- Ginsburg, H. and Stein, W.D. (2004) The new permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of the infected erythrocyte: comparison of results using different experimental techniques. *J Membr Biol*, **197**, 113-134.
- Ginsburg, H. and Stein, W.D. (2005) How many functional transport pathways does *Plasmodium falciparum* induce in the membrane of its host erythrocyte? *Trends Parasitol*, **21**, 118-121.
- Goh, S.H., Josleyn, M., Lee, Y.T., Danner, R.L., Gherman, R.B., Cam, M.C. and Miller, J.L. (2007) The human reticulocyte transcriptome. *Physiol Genomics*, **30**, 172-178.
- Gonzalez-Gronow, M., Kalfa, T., Johnson, C.E., Gawdi, G. and Pizzo, S.V. (2003) The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells. *J Biol Chem*, **278**, 27312-27318.
- Grygorczyk, R. and Schwarz, W. (1983) Properties of the Ca^{2+} -activated K^{+} conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium*, **4**, 499-510.
- Haas, M. (1989) Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters. *Annu Rev Physiol*, **51**, 443-457.

- Hamill, O.P. (1981) Potassium channel currents in human red blood cells. *J Physiol*, **319** (suppl), 97P-98P.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**, 85-100.
- Hoffman, J.F., Joiner, W., Nehrke, K., Potapova, O., Foye, K. and Wickrema, A. (2003) The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7366-7371.
- Hoffman, J.F. and Laris, P.C. (1974) Determination of membrane potentials in human and *Amphiuma* red blood cells by means of fluorescent probe. *J Physiol*, **239**, 519-552.
- Huber, S.M., Duranton, C., Henke, G., Van De Sand, C., Heussler, V., Shumilina, E., Sandu, C.D., Tanneur, V., Brand, V., Kasinathan, R.S., Lang, K.S., Kremsner, P.G., Hubner, C.A., Rust, M.B., Dedek, K., Jentsch, T.J. and Lang, F. (2004) *Plasmodium* induces swelling-activated ClC-2 anion channels in the host erythrocyte. *J Biol Chem*, **279**, 41444-41452.
- Huber, S.M., Gamper, N. and Lang, F. (2001) Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch*, **441**, 551-558.
- Huber, S.M., Lang, C., Lang, F. and Duranton, C. (2008) Organic osmolyte channels in malaria-infected erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **376**, 514-518.
- Huber, S.M., Uhlemann, A.C., Gamper, N.L., Duranton, C., Kremsner, P.G. and Lang, F. (2002) *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *Embo J*, **21**, 22-30.
- Hunter, M.J. (1977) Human erythrocyte anion permeabilities measured under conditions of net charge transfer. *J Physiol*, **268**, 35-49.
- Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E. and Higgins, C.F. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, **346**, 362-365.
- Izumiyama, S., Omura, M., Takasaki, T., Ohmae, H. and Asahi, H. (2009) *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Exp Parasitol*, **121**, 144-150.
- Jacobs, M.H. and Stewart, D. (1942) The role of carbonic anhydrase in certain ionic exchanges involving the erythrocyte. *J Gen Physiol*, **25**, 539-552.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F. and Zdebik, A.A. (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*, **82**, 503-568.
- Kaestner, L. and Bernhardt, I. (2002) Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry*, **55**, 71-74.
- Kaestner, L., Bollensdorff, C. and Bernhardt, I. (1999) Non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1417**, 9-15.
- Kaestner, L., Christophersen, P., Bernhardt, I. and Bennekou, P. (2000) The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterisation. *Bioelectrochemistry*, **52**, 117-125.
- Kanaani, J. and Ginsburg, H. (1991) Transport of lactate in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *J Cell Physiol*, **149**, 469-476.
- Kassiou, M., Meikle, S.R. and Banati, R.B. (2005) Ligands for peripheral benzodiazepine binding sites in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev*, **48**, 207-210.

- Kirk, K. (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev*, **81**, 495-537.
- Kirk, K. and Horner, H.A. (1995) In search of a selective inhibitor of the induced transport of small solutes in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: effects of arylaminobenzoates. *Biochem J*, **311**, 761-768.
- Kirk, K., Horner, H.A., Elford, B.C., Ellory, J.C. and Newbold, C.I. (1994) Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J Biol Chem*, **269**, 3339-3347.
- Kirk, K., Horner, H.A. and Kirk, J. (1996) Glucose uptake in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is an equilibrative not an active process. *Mol Biochem Parasitol*, **82**, 195-205.
- Kirk, K., Horner, H.A., Spillett, D.J. and Elford, B.C. (1993) Glibenclamide and meglitinide block the transport of low molecular weight solutes into malaria-infected erythrocytes. *FEBS Lett*, **323**, 123-128.
- Kirk, K., Wong, H.Y., Elford, B.C., Newbold, C.I. and Ellory, J.C. (1991) Enhanced choline and Rb⁺ transport in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*, **278**, 521-525.
- Klinken, S.P. (2002) Red blood cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1513-1518.
- Kondo, T., Kawakami, Y., Taniguchi, N. and Beutler, E. (1987) Glutathione disulfide-stimulated Mg²⁺-ATPase of human erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7373-7377.
- Krugliak, M. and Ginsburg, H. (2006) The evolution of the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes-a kinetic analysis. *Exp Parasitol*.
- Krugliak, M., Zhang, J. and Ginsburg, H. (2002) Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol Biochem Parasitol*, **119**, 249-256.
- Lacapere, J.J. and Papadopoulos, V. (2003) Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids*, **68**, 569-585.
- Lambros, C. and Vanderberg, J.P. (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, **65**, 418-420.
- Lang, K.S., Myssina, S., Tanneur, V., Wieder, T., Huber, S.M., Lang, F. and Duranton, C. (2003) Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **367**, 391-396.
- Lange, T., Jungmann, P., Haberle, J., Falk, S., Duebbers, A., Bruns, R., Ebner, A., Hinterdorfer, P., Oberleithner, H. and Schillers, H. (2006) Reduced number of CFTR molecules in erythrocyte plasma membrane of cystic fibrosis patients. *Mol Membr Biol*, **23**, 317-323.
- Larsen, F.L., Katz, S., Roufogalis, B.D. and Brooks, D.E. (1981) Physiological shear stresses enhance the Ca²⁺ permeability of human erythrocytes. *Nature*, **294**, 667-668.
- Lassen, U.V. and Sten-Knudsen, O. (1968) Direct measurements of membrane potential and membrane resistance of human red cells. *J Physiol*, **195**, 681-696.
- Lauf, P.K., Bauer, J., Adragna, N.C., Fujise, H., Zade-Oppen, A.M., Ryu, K.H. and Delpire, E. (1992) Erythrocyte K-Cl cotransport: properties and regulation. *Am J Physiol*, **263**, C917-932.
- Lew, V.L. and Bookchin, R.M. (1986) Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model. *J Membr Biol*, **92**, 57-74.
- Lew, V.L. and Bookchin, R.M. (2005) Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. *Physiol Rev*, **85**, 179-200.

- Lew, V.L., Tiffert, T. and Ginsburg, H. (2003) Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood*, **101**, 4189-4194.
- Lisk, G. and Desai, S.A. (2005) The Plasmodial Surface Anion Channel Is Functionally Conserved in Divergent Malaria Parasites. *Eukaryot Cell*, **4**, 2153-2159.
- Liu, J., Li, H. and Papadopoulos, V. (2003) PAP7, a PBR/PKA-RIalpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**, 275-283.
- Locovei, S., Bao, L. and Dahl, G. (2006) Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7655-7659.
- Martin, R.E., Henry, R.I., Abbey, J.L., Clements, J.D. and Kirk, K. (2005) The 'permeome' of the malaria parasite: an overview of the membrane transport proteins of *Plasmodium falciparum*. *Genome Biol*, **6**, R26.
- Martin, R.E. and Kirk, K. (2007) Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood*, **109**, 2217-2224.
- McEnergy, M.W., Snowman, A.M., Trifiletti, R.R. and Snyder, S.H. (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3170-3174.
- Merckx, A., Bouyer, G., Thomas, S.L., Langsley, G. and Egee, S. (2009) Anion channels in *Plasmodium-falciparum*-infected erythrocytes and protein kinase A. *Trends Parasitol*, **25**, 139-144.
- Merckx, A., Nivez, M.P., Bouyer, G., Alano, P., Langsley, G., Deitsch, K., Thomas, S., Doerig, C. and Egee, S. (2008) *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog*, **4**, e19.
- Mikolajczak, S.A. and Kappe, S.H. (2006) A clash to conquer: the malaria parasite liver infection. *Mol Microbiol*, **62**, 1499-1506.
- Nakazawa, F., Alev, C., Shin, M., Nakaya, Y., Jakt, L.M. and Sheng, G. (2009) PBRL, a putative peripheral benzodiazepine receptor, in primitive erythropoiesis. *Gene Expr Patterns*, **9**, 114-121.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **260**, 799-802.
- Neher, E., Sakmann, B. and Steinbach, J.H. (1978) The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch*, **375**, 219-228.
- Okada, Y., Shimizu, T., Maeno, E., Tanabe, S., Wang, X. and Takahashi, N. (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol*, **209**, 21-29.
- Olson, J.M., Ciliax, B.J., Mancini, W.R. and Young, A.B. (1988) Presence of peripheral-type benzodiazepine binding sites on human erythrocyte membranes. *Eur J Pharmacol*, **152**, 47-53.
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T.R., Knudsen, T.B., Lacapere, J.J., Lindemann, P., Norenberg, M.D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.R. and Gavish, M. (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 402-409.
- Pinet, C., Antoine, S., Filoteo, A.G., Penniston, J.T. and Coulombe, A. (2002) Reincorporated Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase can Mediate B-Type Ca²⁺ Channels Observed in Native Membrane of Human Red Blood Cells. *J Membr Biol*, **187**, 185-201.
- Poole, R.C. and Halestrap, A.P. (1993) Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol*, **264**, C761-782.

- Pulaski, L., Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U. and Keppler, D. (1996) Identification of the multidrug-resistance protein (MRP) as the glutathione-S-conjugate export pump of erythrocytes. *Eur J Biochem*, **241**, 644-648.
- Romero, P.J. and Romero, E.A. (1999) Effect of cell ageing on Ca^{2+} influx into human red cells. *Cell Calcium*, **26**, 131-137.
- Romero, P.J., Romero, E.A., Mateu, D., Hernandez, C. and Fernandez, I. (2006) Voltage-dependent calcium channels in young and old human red cells. *Cell Biochem Biophys*, **46**, 265-276.
- Rostovtseva, T. and Colombini, M. (1997) VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J*, **72**, 1954-1962.
- Rostovtseva, T.K. and Bezrukov, S.M. (2008) VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J Bioenerg Biomembr*, **40**, 163-170.
- Rostovtseva, T.K., Komarov, A., Bezrukov, S.M. and Colombini, M. (2002) VDAC channels differentiate between natural metabolites and synthetic molecules. *J Membr Biol*, **187**, 147-156.
- Rostovtseva, T.K., Tan, W. and Colombini, M. (2005) On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. *J Bioenerg Biomembr*, **37**, 129-142.
- Roth, E., Jr. (1990) *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells*, **16**, 453-460; discussion 461-456.
- Saliba, K.J., Horner, H.A. and Kirk, K. (1998) Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, **273**, 10190-10195.
- Saliba, K.J., Martin, R.E., Broer, A., Henry, R.I., McCarthy, C.S., Downie, M.J., Allen, R.J., Mullin, K.A., McFadden, G.I., Broer, S. and Kirk, K. (2006) Sodium-dependent uptake of inorganic phosphate by the intracellular malaria parasite. *Nature*, **443**, 582-585.
- Schillers, H. (2008) Imaging CFTR in its native environment. *Pflugers Arch*, **456**, 163-177.
- Schwarz, W., Grygorczyk, R. and Hof, D. (1989) Recording single-channel currents from human red cells. *Methods Enzymol*, **173**, 112-121.
- Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J. and Guggino, W.B. (1999) CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev*, **79**, S145-166.
- Semplicini, A., Spalvins, A. and Canessa, M. (1989) Kinetics and stoichiometry of the human red cell Na^+/H^+ exchanger. *J Membr Biol*, **107**, 219-228.
- Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. (2001) Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol*, **152**, 237-250.
- Shoshan-Barmatz, V. and Gincel, D. (2003) The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys*, **39**, 279-292.
- Shoshan-Barmatz, V., Hadad, N., Feng, W., Shafir, I., Orr, I., Varsanyi, M. and Heilmeyer, L.M. (1996) VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *FEBS Lett*, **386**, 205-210.
- Sluyter, R., Shemon, A.N. and Wiley, J.S. (2007) P2X(7) receptor activation causes phosphatidylserine exposure in human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **355**, 169-173.
- Staines, H.M., Ashmore, S., Felgate, H., Moore, J., Powell, T. and Ellory, J.C. (2006) Solute transport via the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells is not consistent with a simple single channel model. *Blood*.

- Staines, H.M., Ellory, J.C. and Kirk, K. (2001) Perturbation of the pump-leak balance for Na(+) and K(+) in malaria- infected erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **280**, C1576-1587.
- Staines, H.M., Powell, T., Ellory, J.C., Egee, S., Lapaix, F., Decherf, G., Thomas, S.L., Duranton, C., Lang, F. and Huber, S.M. (2003) Modulation of whole-cell currents in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by holding potential and serum. *J Physiol*, **552**, 177-183.
- Sugiyama, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. (2002) Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by apro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene*, **21**, 4944-4956.
- Tabcharani, J.A. and Hanrahan, J.W. (1991) On the activation of outwardly rectifying anion channels in excised patches. *Am J Physiol*, **261**, G992-999.
- Tanneur, V., Duranton, C., Brand, V.B., Sandu, C.D., Akkaya, C., Kasinathan, R.S., Gachet, C., Sluyter, R., Barden, J.A., Wiley, J.S., Lang, F. and Huber, S.M. (2005) Purinoceptors are involved in the induction of an osmolyte permeability in malaria-infected and oxidized human erythrocytes. *Faseb J*.
- Thinnes, F.P. (2009) VDAC-cored CaCC, CF patients best friend - Finding novel therapeutics for CF. *Mol Genet Metab*.
- Tosteson, D.C. and Hoffman, J.F. (1960) Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J Gen Physiol*, **44**, 169-194.
- Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193**, 673-675.
- Tse, C.M., Belt, J.A., Jarvis, S.M., Paterson, A.R., Wu, J.S. and Young, J.D. (1985) Reconstitution studies of the human erythrocyte nucleoside transporter. *J Biol Chem*, **260**, 3506-3511.
- Tunncliffe, G. (1994) Amino acid transport by human erythrocyte membranes. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, **108**, 471-478.
- Veenman, L. and Gavish, M. (2006) The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol Ther*, **110**, 503-524.
- Veenman, L., Papadopoulos, V. and Gavish, M. (2007) Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. *Curr Pharm Des*, **13**, 2385-2405.
- Veenman, L., Shandalov, Y. and Gavish, M. (2008) VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*, **40**, 199-205.
- Verloo, P., Kocken, C.H., Van der Wel, A., Tilly, B.C., Hogema, B.M., Sinaasappel, M., Thomas, A.W. and De Jonge, H.R. (2004) *Plasmodium falciparum*-activated chloride channels are defective in erythrocytes from cystic fibrosis patients. *J Biol Chem*, **279**, 10316-10322.
- Verma, A., Nye, J.S. and Snyder, S.H. (1987) Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 2256-2260.
- Weinreich, F. and Jentsch, T.J. (2001) Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *J Biol Chem*, **276**, 2347-2353.
- Wendler, G., Lindemann, P., Lacapere, J.J. and Papadopoulos, V. (2003) Protoporphyrin IX binding and transport by recombinant mouse PBR. *Biochem Biophys Res Commun*, **311**, 847-852.
- Whalin, M.E., Boujrad, N., Papadopoulos, V. and Krueger, K.E. (1994) Studies on the phosphorylation of the 18 kDa mitochondrial benzodiazepine receptor protein. *J Recept Res*, **14**, 217-228.
- Winkelbach, H., Walter, G., Morys-Wortmann, C., Paetzold, G., Hesse, D., Zimmermann, B., Florke, H., Reymann, S., Stadtmüller, U. and Thinnes, F.P. (1994) Studies on human porin. XII. Eight monoclonal

mouse anti-"porin 31HL" antibodies discriminate type 1 and type 2 mammalian porin channels/VDACs in western blotting and enzyme-linked immunosorbent assays. *Biochem Med Metab Biol*, **52**, 120-127.

Woods, M.J. and Williams, D.C. (1996) Multiple forms and locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Biochem Pharmacol*, **52**, 1805-1814.

Wright, E.M. and Diamond, J.M. (1977) Anion selectivity in biological systems. *Physiol Rev*, **57**, 109-156.

ANNEXE I

Plasmodium falciparum Regulatory Subunit of cAMP-Dependent PKA and Anion Channel Conductance

Anaïs Merckx^{1,2}, Marie-Paule Nivez¹, Guillaume Bouyer³, Pietro Alano⁴, Gordon Langsley², Kirk Deitsch⁵, Serge Thomas³, Christian Doerig¹, Stéphane Egée^{3*}

1 INSERM U609, Wellcome Center for Molecular Parasitology, Glasgow Biomedical Research Centre, Glasgow, Scotland, United Kingdom, **2** Institut Cochin, INSERM U567, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France, **3** Université Pierre et Marie Curie – CNRS UMR 7150, Roscoff, France, **4** Instituto Superiore de Sanita, Rome, Italy, **5** Department of Microbiology and Immunology, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York, United States of America

Malaria symptoms occur during *Plasmodium falciparum* development into red blood cells. During this process, the parasites make substantial modifications to the host cell in order to facilitate nutrient uptake and aid in parasite metabolism. One significant alteration that is required for parasite development is the establishment of an anion channel, as part of the establishment of New Permeation Pathways (NPPs) in the red blood cell plasma membrane, and we have shown previously that one channel can be activated in uninfected cells by exogenous protein kinase A. Here, we present evidence that in *P. falciparum*-infected red blood cells, a cAMP pathway modulates anion conductance of the erythrocyte membrane. In patch-clamp experiments on infected erythrocytes, addition of recombinant PfPKA-R to the pipette *in vitro*, or overexpression of PfPKA-R in transgenic parasites lead to down-regulation of anion conductance. Moreover, this overexpressing PfPKA-R strain has a growth defect that can be restored by increasing the levels of intracellular cAMP. Our data demonstrate that the anion channel is indeed regulated by a cAMP-dependent pathway in *P. falciparum*-infected red blood cells. The discovery of a parasite regulatory pathway responsible for modulating anion channel activity in the membranes of *P. falciparum*-infected red blood cells represents an important insight into how parasites modify host cell permeation pathways. These findings may also provide an avenue for the development of new intervention strategies targeting this important anion channel and its regulation.

Citation: Merckx A, Nivez MP, Bouyer G, Alano P, Langsley G, et al. (2008) *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. PLoS Pathog 4(2): e19. doi:10.1371/journal.ppat.0040019

Introduction

Plasmodium falciparum is the species responsible for the lethal form of malaria [1]. The disease is caused by the developmental cycle of the blood stage of the parasite [2]. Their proliferation within the red blood cells (RBCs) requires amino acids from the degradation of haemoglobin, but it also depends on the uptake of essential nutrients from blood plasma such as panthotenate or glutamate, whereas waste products such as lactate have to be extruded. These compounds are imported/exported via constitutively active endogenous transporters and new parasite-induced permeation pathways (NPPs) [3]. NPPs appear about 12–15 h after red blood cell invasion by merozoites and increase noticeably reaching a plateau 36 h post-invasion [4]. The substrate specificities of NPPs have been extensively characterized by means of tracer fluxes and iso-osmotic haemolysis experiments and show permeability for monosaccharide sugars and other small polyols, amino acids, peptides, nucleosides, various monocarboxylates, small quaternary ammonium compounds, and monovalent inorganic anions and cations including Ca^{2+} (for review [5,6]). Furthermore, they have been found to be non-saturable, to have an activation energy lower than that typical of carrier-mediated transports and to be blocked by numerous anion transport inhibitors (e.g. Furosemide and 5-nitro-2(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB)) leading to the conclusion that NPPs have some of the characteristics of anion channels [6].

It has been previously shown that after invasion, at the trophozoite stage, anion conductances are activated in the red cell membrane [7–9]. Even if the number and the origin (human or parasite encoded) of the channels responsible for this increase in membrane conductance are still under debate [10–12], today there appears to be a consensus that membrane conductance of infected cells is predominantly inwardly rectified and due to the activity of anion channels [11]. Moreover, recent data showed that this inwardly rectified membrane conductance can be accounted for by the activity of two different types of channels [13]. However, whether or not these channels are indeed correlates of NPPs already described by fluxes and semi-quantitative haemolysis experiments has not been established [11]. Nevertheless, in a recent attempt to unify the different data provided by flux experiments, semi-quantitative haemolysis experiments and results reported using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique, it was shown that solute transport via NPPs is not consistent with a single channel model [10,11].

Editor: Choukri Mamoun, University of Connecticut Health Center, United States of America

Received: July 9, 2007; **Accepted:** December 17, 2007; **Published:** February 1, 2008

Copyright: © 2008 Merckx et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: egee@sb-roscoff.fr

Author Summary

By replicating within red blood cells malaria parasites are largely hidden from immune recognition, but within mature erythrocytes nutrients are limiting and accumulation of potentially hazardous metabolic end products can rapidly become critical. In order to survive within red blood cells malaria parasites, therefore, alter the permeability of the erythrocyte plasma membrane either by up-regulating existing carriers, or by creating new permeation pathways. Recent electrophysiological studies of *Plasmodium*-infected erythrocytes have demonstrated that these changes reflect trans-membrane transport through ion channels in the infected erythrocyte plasma membrane. Protein phosphorylation has been documented in protozoan parasites for a number of years and is implicated in key processes of both parasites and parasitized host cells. It has been established that cAMP-dependent regulated pathways are able to activate ion channels in the red cell membrane and a better understanding of how the parasite manipulates cAMP-dependent signaling to activate anion channels could be important in developing novel strategies for future anti-malarial chemotherapies.

For example, sorbitol does not enter infected RBCs via a channel with a low open-state probability at positive membrane potential.

We have previously shown using cell-attached and inside-out configurations of the patch-clamp technique that one of the anion channels described at the single channel level could be activated in uninfected erythrocytes by stimulation of the cAMP-dependent signalling pathway, while in infected red blood cells this anion channel is activated by the parasite [8,14]. Moreover, this increase in membrane conductance following parasite infection can be inhibited by intracellular dephosphorylation [15,16].

The cAMP-dependent signalling pathway has attracted interest from a number of groups [17–19] and cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (PKA-C) homologues have been reported in *P. yoelii* [20] and *P. falciparum* [21,22]. The cAMP pathway plays a central role in many developmental processes in eukaryotes [23–25]. It is generally activated by the binding of a ligand to a membrane receptor, which then causes dissociation of heterotrimeric G-proteins. One of the monomeric G-proteins activates a membrane-bound adenylate cyclase, which causes an increase in intracellular cAMP concentration. In un-stimulated cells, PKA-C is bound to an inhibitory regulatory subunit (PKA-R) in a tetrameric complex composed of two PKA-R and two PKA-C molecules. Binding of cAMP to the regulatory subunits, each of which contains two cAMP-binding sites, releases the PKA-C subunits, which results in their activation. PKA-C substrates include transcription factors and other proteins involved in developmental processes [17].

PKA activity has been detected in *P. falciparum* asexual blood-stage parasites and is higher in mature schizonts than in younger stages of parasite development [22]. Treatment of infected cultures with H89, a chemical inhibitor of PKA, inhibits parasite proliferation [22]. It is unclear however, whether the unique target is the PKA of the parasite, that of the host red blood cell, or another enzyme altogether (H89 inhibits other protein kinases in addition to PKA) [26]. Some residues of mammalian PKA-C that are important for binding to the regulatory subunit are not conserved in the PKA-C

subunits of *P. yoelii* and *P. falciparum*. Biochemical evidence for the presence of cAMP-binding proteins in parasite extracts, which may include parasite PKA regulatory subunits, has been reported [27]. Moreover, cAMP has also been implicated in regulation of the parasite's cell cycle [25].

In addition to PfPKA-C, which is the only PKA-C subunit among all the *P. falciparum* kinases (commonly called the *P. falciparum* kinome) [28], nucleotide cyclases [29] and phosphodiesterases [30] have also been described in *P. falciparum*. To complete the picture of the cAMP pathway in the parasite, we characterised the single PKA-R subunit of *P. falciparum* (PfPKA-R), and demonstrate that this protein interacts with a cAMP-inducible kinase activity in *P. falciparum* extracts. Finally, we show that exogenous recombinant PfPKA-R, as well as overexpression of PfPKA-R in transgenic parasites, affects electrophysiological properties of the anion membrane conductance of infected erythrocytes.

Results

Identification of PfPKA-R

BLASTP analyses of predicted *P. falciparum* proteins in the PlasmoDB database using PKA-R subunits from various eukaryotes as queries identified a single *P. falciparum* polypeptide displaying significant homology to the query sequences, in agreement with our previous study [28]. The predicted 441-residue protein, which we call PfPKA-R (PlasmoDB identifier PFL1110c, or GenBank [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/] EBI Data Bank [http://www.ebi.ac.uk/embl/] accession number AJ441326), displays 42.7% and 47.7% similarity to human II α and I α PKA regulatory subunits, respectively (Figure 1), and contains a Pfam cNMP domain (PF00027) that encompasses two pairs of the PROSITE cNMP-binding motifs (PS00888 and PS00889). More specifically, PfPKA-R contains two cyclic nucleotide binding site signatures (Figure 1), called Phosphate Binding Cassettes, that specifically identify proteins belonging to the R-subunit PKA family [31]. PfPKA-R does not appear to possess a dimerisation domain and shows very weak homology to known PKA-R in the C-terminal part of the protein. Overall, *P. falciparum* PKA-R is most similar to the human RI subunit, but by the presence of a phosphorylatable residue (serine) in the hinge region (K₁₄₆RLSV₁₅₀), PfPKA-R also resembles the RII subunit found in higher eukaryotes [32] (see Figure S1). Thus, the single PKA-R subunit present in *P. falciparum* shares characteristics with both mammalian RI and RII subunits (Figure 1). Sequence analysis of the *pfpkar* coding region amplified from a cDNA library confirmed the annotation gene prediction proposed in PlasmoDB (www.PlasmoDB.org). Northern blot analysis detected a 2.2 kb *pfpkar* transcript (see below), with higher levels in asexual parasites compared to gametocytes. We have previously reported a similar pattern for *pfpkac* mRNA [22].

To determine whether PfPKA-R is able to modulate a cAMP-dependent kinase activity, PfPKA-R was expressed as a Maltose-Binding Protein (MBP) fusion protein and incubated with parasite extracts in the presence or absence of cAMP. As a control we incubated the MBP moiety alone with parasite extracts. A kinase reaction was then performed and ³²P incorporation into Kemptide was monitored (Figure 2). PKA activity was normalised to Kemptide-kinase activity in absence of cAMP. There is a significant difference in activity when the kinase assays are performed in presence compared

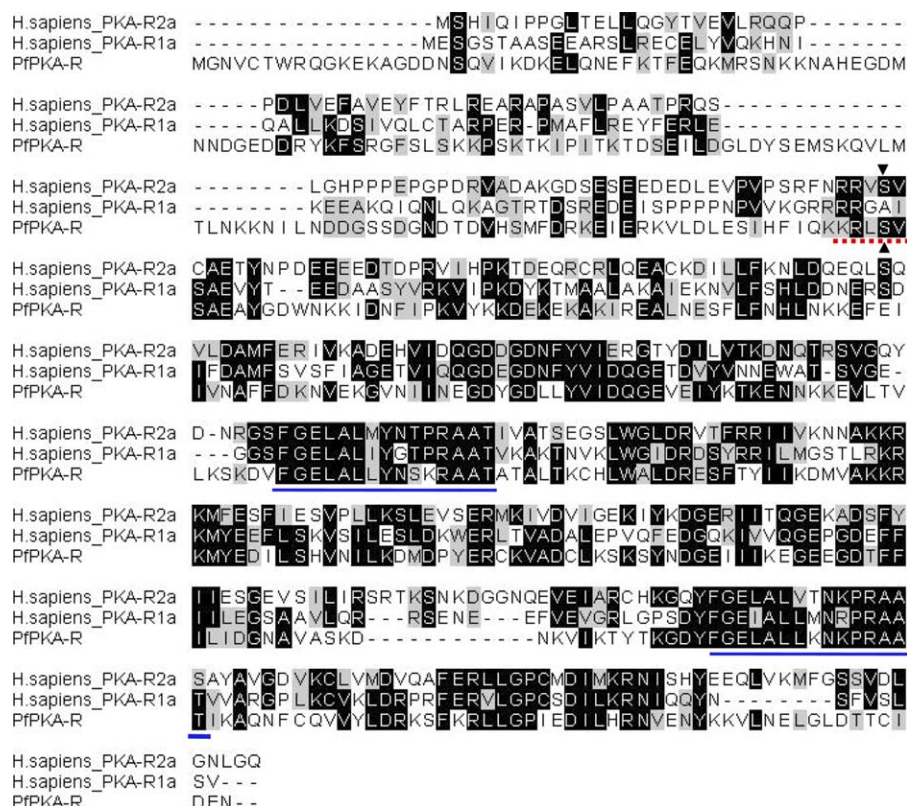


Figure 1. Alignment of the PfPKA-R Protein Sequence with That of Human PKA Regulatory Type I α and Type II β Subunits

The conserved cyclic nucleotide binding motifs are underlined in blue, and residues involved in interaction of mammalian PKA-R with the catalytic subunit (the inhibitory sequence) are underlined in red, and the phosphorylatable serine is indicated by black arrows.

doi:10.1371/journal.ppat.0040019.g001

to the absence of cAMP in parasite extracts (columns 1 and 2, $p = 0.0002$, $n = 2$), as we previously reported [22], and compared to parasite extracts incubated with only the MBP moiety (columns 5 and 6, $p = 0.0032$, $n = 2$) showing that MBP has no significant effect on PKA activity on its own. In

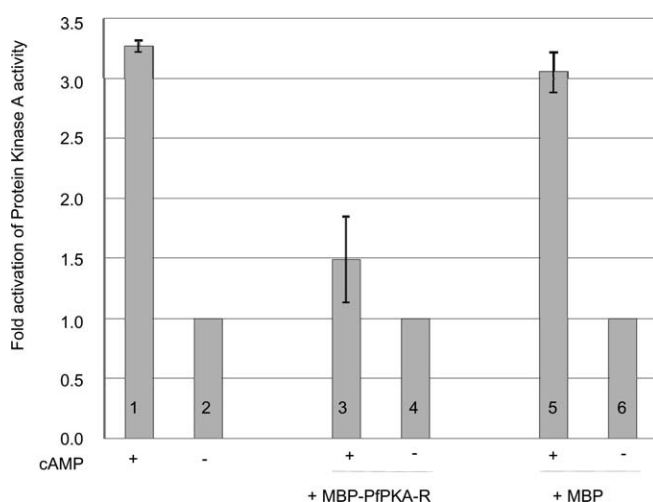


Figure 2. Fold of Activation of a Kemptide-Kinase Activity in Parasite Extracts Following Addition of cAMP, and in Presence of MBP-PfPKA-R and MBP (as a Control)

PKA activity has been normalised to Kemptide-kinase activity in absence of cAMP and was measured as described in Methods.

doi:10.1371/journal.ppat.0040019.g002

contrast, addition of MBP-PfPKA-R causes a 55% decrease in the cAMP-dependent Kemptide kinase activity present in the parasite extract (columns 3 and 4, $p = 0.1524$, $n = 2$), suggesting in this case that the cAMP interacts with the endogenous PfPKA-R and with the recombinant MBP-PfPKA-R.

PKA Regulation of Anion Transport across the Infected Erythrocyte Membrane

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique allows one to follow changes in membrane conductance after erythrocyte infection. Although this configuration gives activity measurements of all channels present in the red blood cell membrane, it is limited experimentally, as one cannot change the cytosolic medium during the time course of recordings. For this reason, in this study non-diffusible compounds were added to the pipette solution and the effects were compared to control cells tested the same day in parallel. An inwardly rectified whole cell current is inducible in uninfected erythrocytes by addition of bovine PKA and ATP, and the resulting membrane currents are similar in shape to those measured in *P. falciparum*-infected red blood cells [8]. The addition of alkaline phosphatase (0.1 u/ml) results in a complete inhibition of current, suggesting regulation by phosphorylation (Figure 3). Thus, in order to test the implication of a cAMP-dependent kinase, we added the natural inhibitor of mammalian PKA, PKI (1 μ g/ml), into the pipette. PKI is a small heat-stable protein that is highly specific ($K_i = 2.3$ nM) [33] interacting with the mammalian

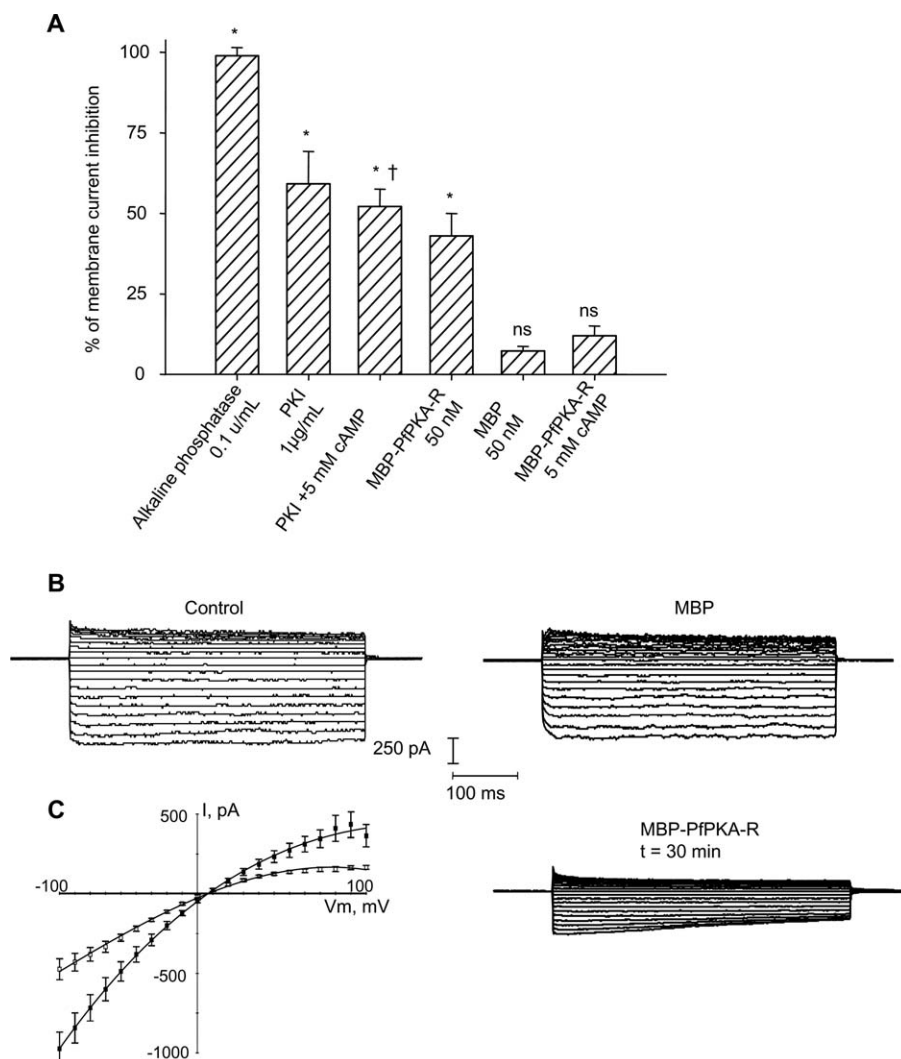


Figure 3. Patch Clamp Experiments on Infected Erythrocytes

(A) Membrane current inhibition expressed as a percentage, in presence of 0.1 U/ml alkaline phosphatase ($n = 6$), 1 µg/ml PKI with and without 5 mM cAMP ($n = 4$), 50 nM MBP-PfPKA-R with and without 5 mM cAMP ($n = 6$), and in presence of MBP ($n = 6$). Percentage of membrane current inhibition were established when the effect of the drug reached the maximum and calculated against the values of membrane currents obtained directly after patch rupture and whole-cell achievement. All daily measurements were compared to non-treated cells. In all cases, n denotes the number of cells tested. *, $p < 0.05$ paired, two-tailed t-test relative to the control; ns, not significantly different; †, $p > 0.05$ between the conditions with PKI in presence or absence of cAMP.

(B) Typical current traces obtained in the presence of MBP in the pipette (negative control).

(C) Current traces in presence of 50 nM MBP-PfPKA-R (□, $n = 6$) and corresponding I-V plots with control cells (MBP alone, ■, $n = 6$) (mean ± standard error of the mean).

doi:10.1371/journal.ppat.0040019.g003

catalytic subunit within the cleft (between the two lobes) and with the larger lobe of the enzyme [34].

Maximum inhibition of current is reached after 10–15 minutes and corresponds to $59.2 \pm 10.0\%$ of membrane currents inhibition ($n = 4$). As expected, according to the mode of inhibition of PKA by PKI in mammals, this inhibition could not be reversed by competition with exogenous 5 mM cAMP, suggesting a direct interaction between the PKI and the PKA-C target (Figure 3A).

We next investigated whether or not addition of recombinant PfPKA-R into the pipette could repress the *P. falciparum*-induced membrane currents. Addition of MBP-PfPKA-R down-regulates whole-cell membrane conductance in a time-dependent manner (Figure 3C). Maximum inhibition

of membrane current is $43.0 \pm 7.0\%$ ($n = 4$), whereas MBP alone did not change the shape of currents, nor membrane conductance during at least 30 minutes (Figure 3B). Moreover, the down-regulation appears to be regulated by cAMP, as addition of 5 mM cAMP resulted in $<10\%$ inhibition (versus $>40\%$ in the absence of cAMP, see Figure 3A). These results demonstrate that addition of exogenous PfPKA-R interferes with the parasite-dependent activation of infected red blood cell membrane conductance.

To investigate PfPKA-R function *in vivo*, we generated a *P. falciparum* line that overexpresses the protein from the pHL-dhfr-pfpa-r vector. Using parasites transfected with pHL-dhfr-luciferase as a control, we assessed the expression of the pfpa-r transgene. The expression occurs in asexual stages, as

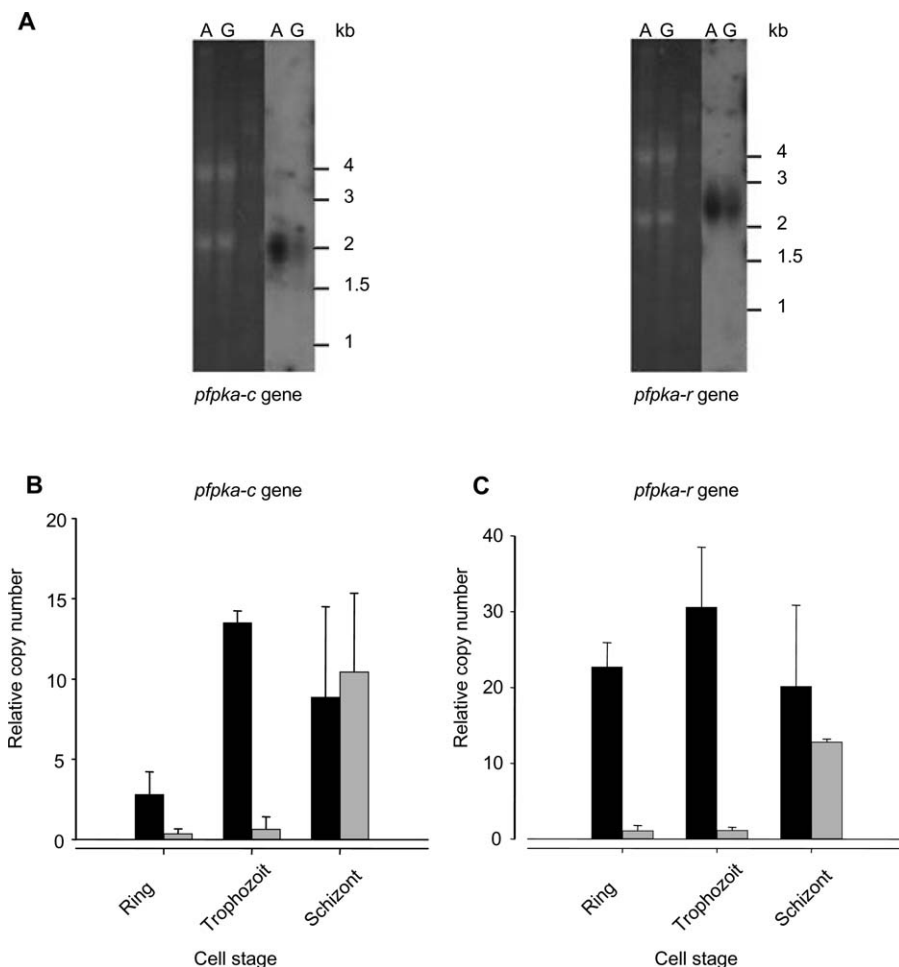


Figure 4. *pfpkc-c* and *pfpkc-r* Transcription Profiles in Wild-Type and PfPKA-R Overexpressing Parasites

(A) Ethidium bromide staining and northern blot analysis on 3D7 asexual asynchronous parasites (lanes A) and Percoll purified 3D7 gametocytes (stages III and IV, 95% pure) (lanes G) for *pfpkc-c* (left panel) and *pfpkc-r* (right panel) transcripts.

(B) Analysis of the level of transcription profile of *pfpkc-c* and (C) *pfpkc-r* genes in transformed pHL-dhfr-luciferase (grey bars) and pHL-dhfr-pfpka-r (black bars) cell lines. Data were calculated from triplicated data from two different RNA extractions. All values are presented as relative copy number to the housekeeping gene *seryl-tRNA synthetase* (PF07_0073).

doi:10.1371/journal.ppat.0040019.g004

observed in wild type parasites (Figure 4A), but was high and constant throughout the erythrocytic cycle (Figure 4C), as expected for a transgene driven by the *hrp3* promoter [35]. In wild-type and in pHL-dhfr-luciferase-transformed control parasites, expression of *pfpkc-c* and *pfpkc-r* peaks at the schizont stage, with very low levels in earlier stages of the asexual cycle (Figure 4B and 4C and <http://www.plasmodb.org/>). In contrast, the PfPKA-R overexpressors produced large amounts of *pfpkc-c* transcripts at the ring and trophozoite stages (Figure 4B). This might be explained by the parasite's attempt to compensate any deleterious effects stemming from overexpression of the regulatory subunit. Growth of PfPKA-R-overexpressing parasites was monitored for five days. While the growth rate of pHL-dhfr-luciferase transgenic parasites was similar to that of the parental wild type NF54 strain ($p = 0.6$, $n = 3$ after five days, Figure 5A), overexpression of PfPKA-R reduced parasite growth rate by $78 \pm 3\%$ after five days ($p < 0.05$, $n = 3$) (Figure 5A). In order to check if reduced growth was due to dampened cAMP signalling, we monitored the growth of NF54 (and of NF54 transformed either with pHL-dhfr-pfpka-r, or pHL-dhfr-luciferase) in the presence of a

phosphodiesterase inhibitor (IBMX). Addition of IBMX (500 μM) to the culture medium caused a rise in cAMP levels in control infected cells and in parasites overexpressing PfPKA-R from 0.20 ± 0.03 pmol/ 10^8 cells to 0.82 ± 0.05 pmol/ 10^8 cells ($p < 0.05$, $n = 2$) and from 0.60 ± 0.20 pmol/ 10^8 cells to 1.40 ± 0.34 pmol/ 10^8 cells ($p < 0.05$, $n = 2$) respectively, as previously described [25]. This partially restored the growth rate of parasites overexpressing PfPKA-R, reaching $66\% \pm 7$ ($n = 3$) of the normalized parasitaemia of non-transformed NF54 parasites ($p > 0.1$, $n = 3$, Figure 5B). However, IBMX stimulation of the pHL-dhfr-luciferase transformed parasites caused a dramatic fall of the growth to $43\% \pm 6$ of the normalized parasitaemia of non-transformed NF54 parasites ($p < 0.05$, $n = 3$, Figure 5B). A similar phenomenon is observed in non-transformed NF54 parasites (data not shown). Moreover, addition of the permeable analogue of cAMP (8Br-cAMP, 0.1 μM), enhanced the growth of the PfPKA-R overexpressing parasites reaching $82 \pm 19\%$ ($n = 3$) of the normalized parasitaemia of non-transformed NF54 parasites ($p = 0.6$, $n = 3$, Figure 5C). Stimulation by exogenous 8Br-cAMP of pHL-dhfr-luciferase transformed parasites caused

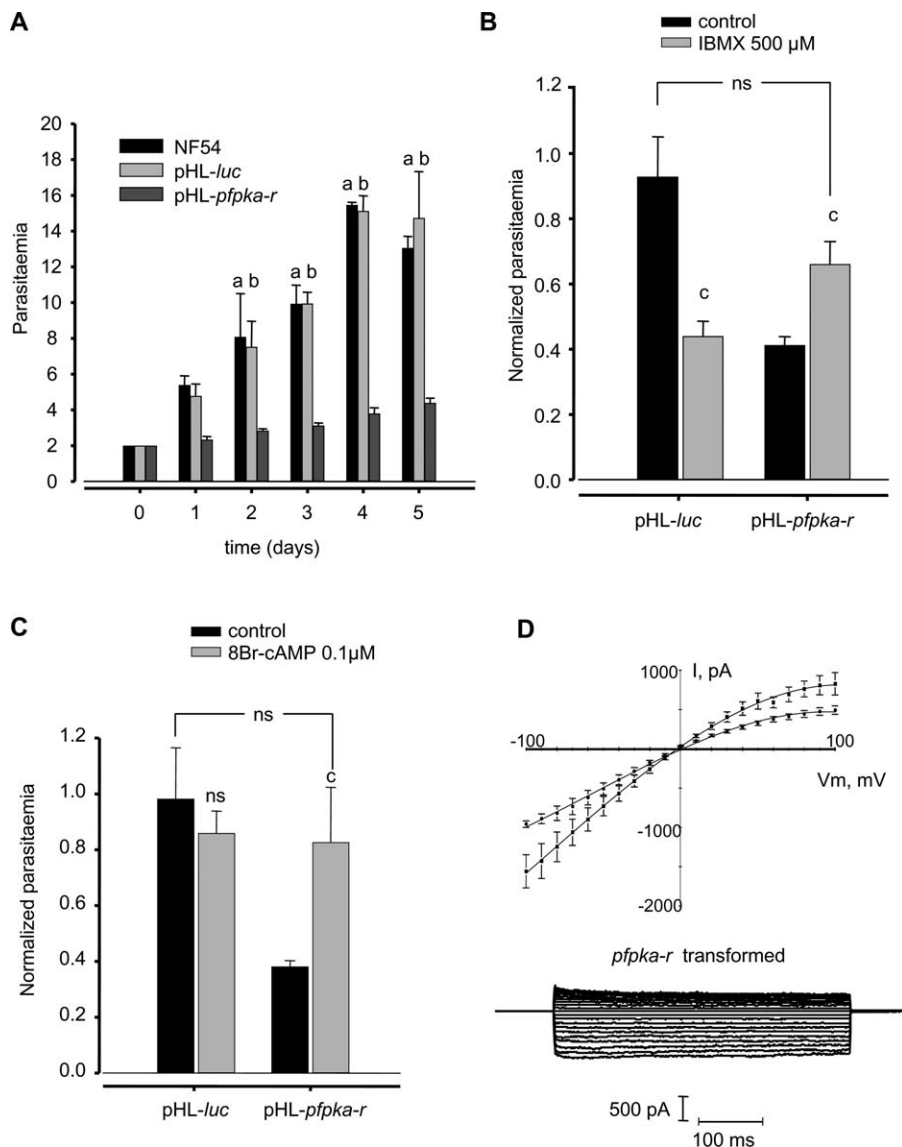


Figure 5. Growth and Membrane Anion Conductance of PfPKA-R Overexpressing Parasites

(A) Growth of the NF54 wild type (black bars), *luciferase* (grey bars) transformed parasites, and *pfpka-r* (dark grey bars) transformed parasites. The parasitaemia (percentage of red cells infected) was determined by counting infected cells (1,000) from three different experiments. Initial parasitaemia was 2%, and the maximal parasitaemia was around 15%. (a) and (b) denote respectively, statistical differences ($p < 0.05$) between parasitaemia of NF54 (a) strain and pHL-*dhfr-luciferase* transformed parasites (b) with PfPKA-R overexpressing parasites ($n = 3$ for each condition).

(B) Effect of the phosphodiesterase inhibitor IBMX (500 μ M) on the growth of *pfpka-r* transformed parasites. Data are expressed as the mean normalized parasitaemia compared to the control NF54 parasites without treatments ($\pm$ standard error of the mean; $n = 3$). Experiments were realized by propagating synchronized cultures in normal medium (black bar) or in medium supplemented with 500 μ M IBMX (grey bars) during 72 h. In these experiments the initial parasitaemia was 2%. c, $p < 0.05$ paired, two-tailed t-test relative to the parasites without drug; ns, not significantly different between pHL-*dhfr-luciferase* parasites and IBMX treated *pfpka-r* parasites.

(C) Effect of the cell permeable analogue of cAMP (8Br-cAMP, 0.1 μ M) on the growth of *pfpka-r* transformed parasites. Data are expressed as the mean normalized parasitaemia compared to the control NF54 parasites without treatments ($\pm$ standard error of the mean; $n = 3$). Experiments were realized by propagating synchronized cultures in normal medium (black bar), or in medium supplemented with 0.1 μ M 8Br-cAMP (grey bars) during 72h. In these experiments the initial parasitaemia was 2%. c, $p < 0.05$ paired, two-tailed t-test relative to the parasites without drug; ns, not significantly different between pHL-*dhfr-luciferase* parasites and 8Br-cAMP treated *pfpka-r* parasites.

(D) Current traces recorded on PfPKA-R overexpressing parasite-infected erythrocytes ($\bullet$, $n = 6$) and corresponding I-V plots and pHL-*dhfr-luciferase* transformed cells as control ($\blacksquare$, $n = 6$) (mean $\pm$ standard error of the mean). In all cases, n denotes the number of cells tested.

doi:10.1371/journal.ppat.0040019.g005

a decrease in growth (Figure 5C) that was not significant ($p = 0.6$, $n = 4$), as previously seen with IBMX. Together, these results suggest that the level of intracellular cAMP has to be finely tuned in order to ensure normal cell cycle and differentiation.

The PfPKA-R overexpressor and control parasite popula-

tions were analysed using the whole-cell patch-clamp method. While the luciferase expressing population showed membrane currents similar to those found in non-transfected cells, the population overexpressing PfPKA-R presented a clear reduction of membrane currents ($40.4 \pm 6.6\%$, $n = 6$) (Figure 5D and data not shown). The inhibition was similar in

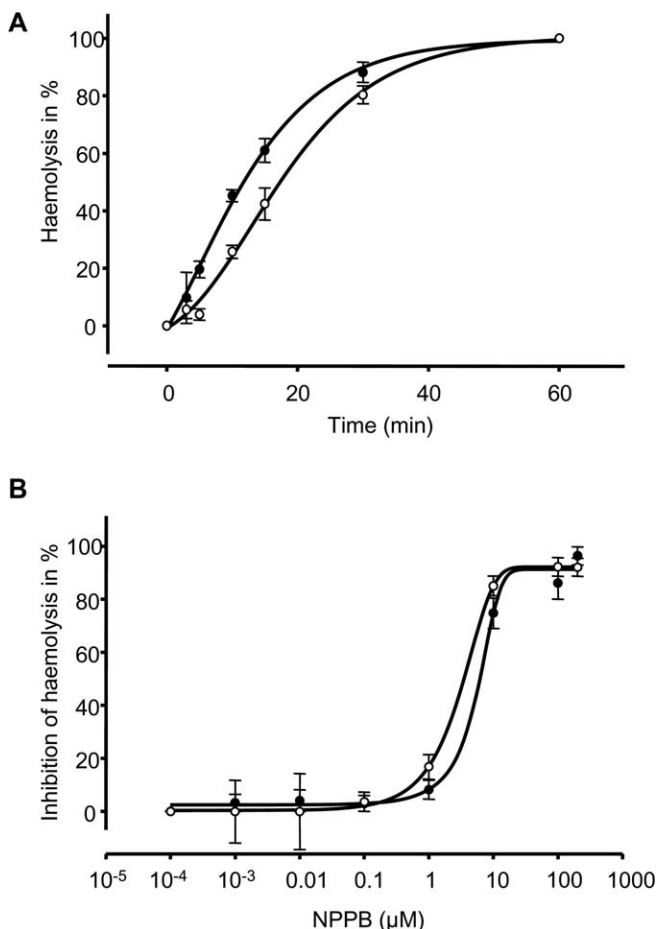


Figure 6. Haemolysis of *pfpkar* Transformed Parasites

(A) Time course haemolysis of *pfpkar* parasites ($\circ$, $n = 3$) and control parasites ($\bullet$, $n = 3$) suspended in iso-osmotic solution of sorbitol. (B) Dose-response curves for NPPB on the sorbitol haemolysis of *pfpkar*-transformed parasites ($\circ$, $n = 3$) and control parasites ($\bullet$, $n = 3$). doi:10.1371/journal.ppat.0040019.g006

amplitude to that observed when the MBP-PfPKA-R recombinant protein was added to the patch pipette (see Figure 3A and 3C). Interestingly, 24 h stimulation of the overexpressing PfPKA-R cells, in the presence of IBMX, restored the membrane conductances (Figure S2), reaching values similar to those observed in control cells either for inward currents ($p = 0.20$, $n = 4$), or outward currents ($p = 0.15$, $n = 4$). However, neither stimulation by IBMX during time course of the patch-clamp experiments, nor addition of cAMP into the patch pipette changed membrane conductance of the cells overexpressing PfPKA-R cells (data not shown).

In order to test whether PfPKA-R overexpression could interfere with NPP activity, semi-quantitative haemolysis experiments were carried out using sorbitol as permeating substrate through NPPs. In parasites overexpressing PfPKA-R permeability to sorbitol appeared reduced, since $t_{1/2}$ of lysis was significantly increased (18.2 ± 1.6 min, $n = 3$) compared to what is observed in control cells (12.7 ± 0.8 min, $n = 3$, $p = 0.03$, Figure 6A). However, sensitivity to the anion carrier inhibitor NPPB was not altered, since IC_{50} measurements in our conditions are similar in parasites overexpressing PfPKA-R and in control parasites (4.5 ± 1 μ M and 7 ± 1 μ M respectively $n = 3$, Figure 6B).

Discussion

In contrast to mammalian cells that have several PKA-C and PKA-R subunits, we show here that cAMP signalling in *P. falciparum* is extremely reduced, as the parasite possesses only a single regulatory subunit in addition of its single PKA-C subunit. Overexpression of the regulatory subunit in transgenic parasites, or addition of recombinant PfPKA-R or PKI to the pipette in patch-clamp experiments, significantly down-regulates the conductance of one of the erythrocyte plasma membrane anion channels that we have previously described at the single channel level [36]. In this context, it is worth noting that no gene encoding PKI can be detected in the *P. falciparum* genome, although we have shown previously that *P. falciparum* PKA-C activity is somewhat PKI sensitive [22]. One of the *P. falciparum* adenylate cyclases that have been reported has a putative N-terminal ion channel domain encoding a canonical S4 voltage sensor [37]. This leads to the intriguing possibility that cAMP signalling in malaria parasites may regulate anion conductance at the plasma membrane. Membrane currents measured in this study arise from the activity of two different types of chloride channel [13]: besides the activity of the PKA-dependent chloride channel, another type of chloride channel belonging to the ClC-2 family is constitutively active in infected cells. Although the possible activation of this channel type by phosphorylation is still controversial [38,39], this could explain why addition of PfPKA-R failed to completely inhibit anion transport.

Transgenic parasites that overexpress the regulatory subunit have a reduced growth (Figure 5A) and normal growth rate is largely restored upon enhancement of intracellular cAMP levels (Figure 5B and 5C). This is consistent with our previous observation that H89, which inhibits PfPKA kinase activity *in vitro*, blocked parasite growth [22] and the more recent report that the parasite cell cycle is also regulated by cAMP [25]. This could also explain why changes in intracellular cAMP concentrations following addition of IBMX, seems to be lethal for the parasite. During erythrocyte development cAMP levels appear to be finely regulated, as over-stimulation of cAMP production tends to the accumulation of parasites at the schizont stage [25]. Furthermore, IBMX, is poorly selective between cAMP phosphodiesterases and cGMP phosphodiesterases, so we cannot exclude the possibility that the effects observed in the presence of IBMX are due to increases in intracellular concentrations of other cNMPs, as has been shown for exflagellation [40,41], or the growth defect observed in the presence of 8-Bromo-cGMP (ED_{50} 10 μ M) [30]. *P. falciparum* codes for four different phosphodiesterases, but only one (PfPDE1) has been characterised and, shows no cAMP hydrolytic activity up to 5 mM cAMP, but has 135 times higher cGMP hydrolysing activity without any competition between cAMP and cGMP [30]. In addition, nor can we rule out the possibility that the effects of cAMP agonists (IBMX and 8-Br-cAMP) observed in the present study are a consequence of a rise in intracellular Ca^{2+} concentrations, as described by Beraldo *et al.* [42]. Indeed, it is known that modulation of Ca^{2+} signalling can be modulated by a cAMP-dependent pathway and some evidence suggests an important role for Ca^{2+} in the control of key processes in *Plasmodium* such as genes expression and cell cycle progression [25,43]. Therefore, it is possible that PfPKA regulates parasite growth via other factors independent of

anion channel conductance, as the lack of a similar channel in erythrocytes from cystic fibrosis patients does not seem to interfere with parasite growth [14,16]. Moreover, repeated attempts to disrupt the PKA regulatory or catalytic domain in *P. berghei*, the rodent parasite, failed, suggesting the crucial role of the protein for the malaria parasite (Tewari, Moon and Billker, pers. com.).

In patch-clamp experiments on erythrocytes infected by PfPKA-R overexpressing parasites, the addition of non-permeable cAMP in the patch-clamp pipette does not release the inhibition of anion conductance, whereas 24 h IBMX stimulation restore the membrane conductance to the level of controlled cells. This raises the question of the localisation of the PfPKA-R. Previous studies have shown that a PEXEL/HT motif promotes export of proteins from the parasite into the host cell [44,45]. PfPKA-R and PfPKA-C sequences do not have a recognisable PEXEL/HT motif, but a parasite antigen (PfEMP1) present in the red blood cell plasma membrane and the kinase PfGSK-3 [46], which is addressed to the Maurer's cleft also lack recognisable export motifs [47].

cAMP in infected cells is most likely synthesized in the parasite cytosol and cAMP is normally membrane impermeable. However, we cannot rule out that some parasite-derived cAMP might get into the erythrocyte cytosol via the non specific channel that can pass soluble macromolecules of up to 1400 Da and functions as a high capacity, low affinity molecular sieve [48]. We entertain here, the possibility that overexpression of the PfPKA regulatory subunit leads it to act as a sink for cAMP thereby reducing available cAMP levels, both within the parasite and eventually in the erythrocyte cytosol. In this scenario, addition of recombinant MBP-PfPKA-R would limit the release of monomeric active PKA catalytic subunit (host PKA-C, or secreted PfPKA-C), and thus the activation of subsequent cellular mechanisms such as the activation of the anion transport.

The delay observed in haemolysis for the parasites overexpressing PfPKA-R, together with and the complete inhibition of membrane currents by unspecific dephosphorylations suggest that some NPP activity is under the dependence of phosphorylation via cAMP-dependent kinases, either directly or indirectly. In the absence of compelling localization data for PfPKA-R and PfPKA-C, we cannot exclude that the effect of PfPKA-R on anion conductance at the erythrocyte membrane may be mediated indirectly, through PKA-dependent regulation of other effectors. In this respect, it is worth mentioning that several protein kinases and phosphatases have been shown to be targeted to the erythrocyte and cAMP-dependent PKA may be involved in their activation and/or secretion [46,49,50].

It has been known for some time that non-infected erythrocytes have a PKA activity and regulatory RI and RII subunits, with the RI subunit being associated with the plasma membrane [51]. PKA activity at the plasma membrane could contribute to the low-level anion channel conductance of non-parasitized red blood cells [8]. In extracts from *P. falciparum*-infected erythrocytes host cell PKA-C appears to be cleaved, although the physiological significance of this observation has not been established [22]. Although a role for PfPKA-C in the regulation of anion channels seems likely, we cannot exclude the possibility that host PKA-C contributes to induction of anion conductance in *P. falciparum*-infected red blood cells. In this scenario, erythrocyte PKA-C would

become active at the schizont stage, perhaps following a parasite-dependent increase in cAMP levels in the red blood cell cytosol. At the red blood cell plasma membrane erythrocyte PKA-C is associated with the RI subunit and the recent report that RI can bind integrin $\alpha 4 \beta 1$ and recruit PKA-C to phosphorylate the integrin's cytoplasmic tail [52] opens up a wealth of new possibilities for parasite-modulation of integrin function in malaria. Even though erythrocytes do not express $\alpha 4 \beta 1$ one possibility that we are currently testing is that the R subunit (host and/or parasite) binds directly to another integrin and regulates anion channel conductance in an integrin-dependent fashion, as a role for $\beta 1$ integrin in anion channel conductance has been reported for ventricular myocytes [53]. Clearly, other integrin-dependent signalling pathways in *P. falciparum*-infected hepatocytes and erythrocytes could be also modulated by PKA, whether it be of erythrocyte or parasite origin.

Materials and Methods

Cloning and expression of PfPKA-R. Primers were designed for amplification and cloning of the entire ORF of 1326 bp (PlasmoDB identifier PFL1110c) into the pMALc2X vector (New England Biolabs). The primers contained *Eco*RI (forward primer: CCGGAATTCATGGGCAATGTGTGCACATGG), or *Hind*III (reverse primer: CCCAAGCTTTTAAATTTTCATCAATACAA-GTTG) restriction sites (single underline). After amplification from a *P. falciparum* cDNA library (kindly provided by Alister Craig) with a *Taq* DNA polymerase (Takara), the PCR product was digested with *Eco*RI and *Hind*III prior to insertion in the pMALc2X vector (New England Biolabs). The pMALc2X-pfpha-r plasmid was electroporated into *E. coli* BL21, and the insert was verified by sequencing prior to expression of the recombinant protein. Protein expression was induced for 3h at 37°C with 0.3 mM isopropyl- α -D-galactoside (IPTG), after the 250 ml culture has reached an OD₆₀₀ value of 0.6 in 2xYT medium with 100 μ g/ml ampicillin. All purification steps were performed at 4°C. Bacterial pellets were lysed with lysosyme and by sonication in 5 ml of lysis buffer (50 mM Tris pH7.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] and Complex™ protease inhibitors protease inhibitor tablet from Roche Molecular Biochemicals). Lysates were cleared by centrifugation (11,000 rpm, 4°C, 30 min) and the soluble fraction was incubated for 90 minutes at 4°C under mild agitation with 0.5 ml of amylose beads (New England Biolabs). The slurry was washed in lysis buffer and the MBP-PfPKA-R fusion protein was eluted with elution buffer (50 mM Tris pH8.0, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF, Complex™ protease inhibitors protease inhibitor tablet and 12 mM maltose).

Parasite extracts. *P. falciparum* 3D7 maintained in a modified erythrocyte culture were synchronized by 5% sorbitol. The parasites were released from infected erythrocytes by saponin (0.1% w/v) lysis and *P. falciparum* pellets were sonicated in RIPA buffer (30 mM Tris, pH8.0, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10 μ M ATP, 0.5% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM NaF, 0.1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM benzamidine, and Complex™ protease inhibitors). The lysates were cleared by centrifugation (15,000 rpm for 15 min at 4°C), and the total amount of proteins in the supernatant was measured by a Bio-Rad protein assay, based on the method of Bradford, using BSA as a standard.

Kinase assays. PKA activity was assayed by measuring ³²P incorporation into a synthetic peptide (Kemptide L-R-R-A-S-L-G, Promega), as described previously [22]. Briefly, in a standard volume (30 μ l) containing (50 mM MOPS pH7, 0.5 mM MgCl₂, 40 μ g/ml BSA, 50 mM NaF, 1 mM β glycerophosphate, 1 mM PMSF and Complex TM mixture tablets Roche Molecular Biochemicals), reactions were initiated by addition of 300 μ M Kemptide and 15 μ M ATP / 5 μ Ci of (γ -³²P)-ATP. The reactions were performed in presence or absence of 40 μ M cAMP (prior incubation at 30°C for 15 min), and in presence or absence of recombinant MBP-PfPKA-R (or MBP as a control). Significance was assessed using the Fisher *F* test and Student's *t*-test.

Northern blot analysis. Approximately 5 micrograms of total RNA were electrophoresed in a 1% agarose/formaldehyde gel. After RNA visualisation with ethidium bromide staining, which confirmed that equivalent amounts of RNA were loaded in the two samples, gel was

blotted to Hybond-C nitrocellulose (Amersham). Filters were cut, and hybridised with 32 P-labelled probes specific for the *pfpka-c* and the *pfpka-r* genes, respectively. 735 bp PCR fragment for *pfpka-c*, and the whole *pfpka-r* gene (1326 bp) were amplified with the following primers: CATGGATCATTCAAAGATGAC (PfpKA F2); GGAA-GATCTCTACCAATCATAAAATGGATCATTTTC (PfpKA BglII stop R); CCGGAATTCATGGGCAATGTGTGCACATGG (PfpKA SUR EcoRI F); CCCAAGCTTTTAATTTTCATCAATACAAGTTG (PfpKA SUR HindIII R). Hybridisation signals were revealed after autoradiographic exposure (40 h).

Construct for *P. falciparum* transfection. Oligonucleotides were designed for amplification containing *Pst*I and *Hind*III restriction sites (single underline in primers) (forward primer: ATACTGCA-GATTATGGGCAATGTGTGCACATGG; reverse primer: ATAAAGCTTAACGACGGCCAGTGCCAAGCT). After amplification, PCR products were restriction digested with *Pst*I and *Hind*III prior to insertion in the expression vector pHL-dhfr [50].

Parasite transfection and PfpKA-R overexpression. The entire *pfpka-r* coding region was amplified from cDNA and cloned into the transfection plasmid pHL-dhfr, a derivative of pHLH1 vector [54]. pHL-dhfr-luciferase includes a luciferase open reading frame (*luc*) flanked by the *P. falciparum* 5'hrp3 promoter and the 3'hrp2 terminator. The vector contains the human dihydrofolate reductase sequence (*dhfr*), which allows selection of stable transformed parasites NF54 isolate (from which the 3D7 line is derived) by addition of 40 ng/ml pyrimethamine in the culture medium. The pHL-dhfr-*pfpka-r* plasmid differs from the pHL-dhfr-luciferase plasmid by replacement of the luciferase open reading frame by that of *pfpka-r*. Parasites were transfected, as previously described [55]. Briefly, uninfected human erythrocytes were electroporated with 50 μ g of plasmid DNA in complete cytomix medium (120 mM KCl; 0.115 mM CaCl₂; 5 mM MgCl₂; 5 mM K₂HPO₄; 5 mM KH₂PO₄; 2 mM EGTA and 30 mM Hepes pH7.6 adjusted with NaOH) using a Bio-Rad gene pulser and 0.2 cm cuvettes (conditions 0.31 kV and 960 μ F). Erythrocytes from two electroporations were combined for each 5 ml culture and inoculated with late stage parasites purified using a Percoll/sorbitol. Validation of the transfection was done by Q-PCR. After transfection, and the selection by pyrimethamine, more than two months were necessary to recover significant amount of parasites. Moreover, due to the defect of growth of the *pfpka-r* transformed parasites, the cultures were maintained at the beginning with a 2.5% hematocrit instead of the 5% hematocrit generally used, in order to ensure the possibility of adding fresh blood more frequently, improving the fitness of the culture and the relative amount of infected cells.

RNA preparation and real-time PCR assays of gene transcription. Prior RNA extraction, synchronized infected RBCs (Rings, trophozoites and schizonts) were washed 2 times in 1 $\times$ PBS, permeabilized with 0.05% saponin, and then pelleted parasites were rapidly washed 3 times with 1 $\times$ PBS. RNA extraction was performed with the TRIZOL LS Reagent[®] as previously described [56]. RNA to be used for cDNA synthesis was treated with Deoxyribonuclease I[®] (Invitrogen) as described by the manufacturer. A total of 1600 ng of RNA was digested in a 20 μ l reaction. Samples were incubated at room temperature for 30 minutes followed by 10 minutes heat inactivation at 65°C. cDNA synthesis was performed with Superscript II RNase H reverse transcriptase[®] (Invitrogen) with random primers[®] (Invitrogen) as described by the manufacturer. cDNA was synthesized from 800 ng RNA in a 40 μ l reaction. For each cDNA synthesis reaction, a control reaction without reverse transcriptase was performed with identical amounts of template.

Gene specific primers were designed for the *pfpka-c* (PF11685w) and *pfpka-r* genes using primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (forward primer :TTAATGAC-GACGGTTCAAGC [PfpKA_r_qf]; reverse primer : TCCAGTCACCA-TATGCTTCG [PfpKA_r_qr] and forward primer : TGGATGTTTTTATGCAGCTCAG [PfpKA_c_qf]; reverse primer TCCATGTCCGACGTTCAATA [PfpKA_c_qr]). With this primer set 153 bp fragments of *pfpka-r* gene and 223 bp fragments of *pfpka-c* present in the NF54 *Plasmodium falciparum* strain are generated. Amplification efficiency was verified by testing all primer pairs using a two 3 log range of concentrations of genomic DNA obtained from transformed parasites and two control genes, namely *arginyl-tRNA synthetase* (PFL0900c) and *seryl-tRNA synthetase* (PF07_0073) kindly provided by T.J. Templeton and C. Lavazec. Real-time PCR was performed using an ABI Prism 7900HT sequence detector (Applied Biosystems). Reactions were prepared in 25 μ l volume using SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) and 1 μ M primers. Specificity of amplification was confirmed by melting-curve analysis for each PCR product. Triplicate PCR were analyzed for each sample. The genes transcriptions were expressed relative to the expression of

a single copy housekeeping gene (Δ Ct method). Briefly, the Δ Ct for each individual primer pair was determined by subtracting the measured Ct value from the Ct value of the control *seryl-tRNA synthetase* (User bulletin 2, Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.com/>). Δ Cts were then converted to relative copy numbers with the formula $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Plasmodium cell cycle. The effects of drugs on the growth of *in vitro* parasite cultures were determined as follows. Erythrocyte suspensions with ring-stage synchronized parasites were distributed in triplicate into 24-well plates at 2% parasitemia and 2% hematocrit. The incubations were performed for 72 h at 37°C in a closed chamber with controlled atmosphere in stationary condition. The proportion of different parasite stages as well as parasitemia was determined by analyzing 1,000 RBCs on Giemsa-stained slides. As a negative control, cultures treated with solvent only (DMSO) were assayed. The total parasitemia was an arithmetic sum of rings, trophozoites, and schizonts at each time point.

Patch clamp experiments. The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was assessed by the development of small capacitance transient and reduction of access resistance. Cation movements across the membrane from the exterior (bath) to cytoplasmic side is defined as inward current and shown as downward deflection in whole cell recordings. Seal resistances were 4–20 G Ω .

Patch pipettes (tip resistance 10–20 M Ω) were prepared from borosilicate glass capillaries (GC150 TF-10, Clark Medical Instruments, PHYMED, France) pulled and polished on a Werner Zeitz DMZ programmable puller (Augsburg, Germany). The ruptured patch whole-cell configuration was used to record whole-cell currents. Whole-cell currents were recorded using a RK400 (Biologic, France) amplifier, with voltage command protocols generated and the currents analyzed using the WCP Software (WCP V3.3.3. Software, Strathclyde, UK) by evoking a series of test potentials (VT) from –100 to +100 mV in 10 mV steps for 500 ms from a holding potential (VH) of 0 mV. Data for the construction of *I*–*V* curves were the mean current measured between 200 and 400 ms. Data are given as mean values $\pm$ S.E.M. Significance was assessed using the Fisher *F* test and Student's *t*-test. In all cases, *n* denotes the number of cells tested.

Different bath (150 mM NMDG-Cl, 1.4 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 15 mM Hepes, 10 mM glucose, pH7.4, 320 $\pm$ 5 mOsmol, pCa3) and pipette (150 mM NMDG-Cl, 0.29 mM CaCl₂, 1.22 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes-Tris, 10 mM glucose, pH7.2, 320 $\pm$ 5 mOsmol, pCa7) solutions were used to ensure proper free calcium concentrations at both sides of the membrane. Since temperature has no influence on whole cell currents in infected red blood cells all experiments were performed at room temperature.

Reagents used in patch-clamp experiments. RBCs were obtained from healthy volunteers, who gave informed, written consent, in accordance with the Declaration of Helsinki, cAMP (cyclic adenosine-monophosphate), alkaline phosphatase, 8Br-cAMP (8-Bromide-cyclic adenosine-monophosphate), PKI (Protein Kinase Inhibitor), NMDG Cl (N-methyl-D-glucamine chloride), IBMX (isobutylmethylxanthine) and NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

cAMP enzyme immunoassay. *P. falciparum*-infected cells were submitted to 24 h of IBMX treatment. Following treatment cells were washed twice in 1 $\times$ PBS and analysed with the cAMP immunoassay kit (GE Healthcare, Amersham Biotrak) following protocol N°3.

Haemolysis experiments. For standard semi-quantitative haemolysis assays, haemoglobin release was used to estimate lysis time, as previously described [57]. Culture suspensions (2–5% parasitaemia) were washed three times in culture medium without serum and resuspended at 50% hematocrit.

Time courses started with the addition of a 0.4 ml aliquot of cell suspension to 3.6 ml of the sorbitol iso-osmotic solutions (300 mM sorbitol, 10 mM hepes, 5 mM glucose, pH 7.4) to give a cell concentration of approximately 0.5.10⁸ cells/ml. Experiments were performed in triplicates. At predetermined intervals (0, 3, 5, 10, 15, 30, 60 min) 0.5 ml aliquots of the suspension were transferred to microcentrifuge tubes containing 0.5 ml of an ice-cold “stopping solution” (400 mM sucrose in H₂O). The tubes were centrifuged for 30 seconds then 0.9 ml of the supernatant solution was transferred to another tube for the subsequent spectrophotometric estimation of haemoglobin concentration by absorption at a wavelength of 540 nm (*A*₅₄₀). In all such experiments the *A*₅₄₀ value corresponding to full haemolysis of trophozoite-infected erythrocytes was estimated from the final *A*₅₄₀ value achieved in the supernatant solution from infected cells suspended in an iso-osmotic sorbitol.

The percent lysis values at different times were fitted by nonlinear regression using equation for a sigmoidal shape according the equation $y = a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$, where *y* is the percent lysis value, *a*

is the maximal lysis, x is the sampling time, x_0 is essentially the $t_{1/2}$ of lysis, and b represents the variability of cells in the population [58]. The $t_{1/2}$ of lysis calculated for each experiment was then compared using a paired two-tailed Student's t -test.

When drugs were tested, the percentage of inhibition was determined relative to non-treated cells when haemolysis was at maximum.

Supporting Information

Figure S1. Phylogenetic Tree of cAMP-Dependent Kinase Regulatory Subunits Constructed Using the “Neighbours Joining” (N-J Tree) Algorithm Included in CLUSTALX

The tree includes the Type I alpha, Type I beta, Type II alpha, and Type II beta human PKA regulatory subunits, as well as the regulatory subunits of *Euplotes octocarinatus*, *Drosophila melanogaster*, and *P. falciparum*.

Found at doi:10.1371/journal.ppat.0040019.sg001 (2.8 MB TIF).

Figure S2. IBMX Stimulation of Membrane Anion Conductance of *pfpka-r* Transformed Parasites

(A) Slope conductance for the outward current calculated by linear regression between +20 and +100 mV on current-voltage relationships for control cells, *pfpka-r* transformed parasites, and *pfpka-r* transformed parasites stimulated 24 h with IBMX (500 μ M).

(B) Slope conductance for the inward current calculated by linear regression between -100 and -40 mV on current-voltage relationships for control cells, *pfpka-r* transformed parasites, and *pfpka-r* transformed parasites stimulated 24 h with IBMX (500 μ M).

Data are means $\pm$ standard error of the mean; $n = 3-5$. *, significant difference between membrane conductance calculated for control cells and *pfpka-r* transformed parasites or significant difference between membrane conductance calculated for *pfpka-r* transformed parasites and *pfpka-r* transformed parasites stimulated with 500 μ M IBMX ($p < 0.05$, two-tailed t -test); ns, no significant difference

References

- Ridley RG (2002) Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* 415: 686–693.
- Clark IA, Schofield L (2000) Pathogenesis of malaria. *Parasitol Today* 16: 451–454.
- Martin RE, Kirk K (2007) Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood* 109: 2217–2224.
- Staines HM, Ellory JC, Kirk K (2001) Perturbation of the pump-leak balance for Na(+) and K(+) in malaria-infected erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1576–C1587.
- Huber SM, Duranton C, Lang F (2005) Patch-clamp analysis of the “new permeability pathways” in malaria-infected erythrocytes. *Int Rev Cytol* 246: 59–134.
- Kirk K (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* 81: 495–537.
- Desai SA, Bezrukov SM, Zimmerberg J (2000) A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* 406: 1001–1005.
- Egee S, Lapaix F, Decherf G, Staines HM, Ellory JC, et al. (2002) A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Physiol* 542: 795–801.
- Huber SM, Uhlemann AC, Gamper NL, Duranton C, Kremsner PG, et al. (2002) *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(−) channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J* 21: 22–30.
- Ginsburg H, Stein WD (2005) How many functional transport pathways does *Plasmodium falciparum* induce in the membrane of its host erythrocyte? *Trends Parasitol* 21: 118–121.
- Staines HM, Alkhalil A, Allen RJ, De Jonge HR, Derbyshire E, et al. (2007) Electrophysiological studies of malaria parasite-infected erythrocytes: current status. *Int J Parasitol* 37: 475–482.
- Staines HM, Ashmore S, Felgate H, Moore J, Powell T, et al. (2006) Solute transport via the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells is not consistent with a simple single-channel model. *Blood* 108: 3187–3194.
- Bouyer G, Egee S, Thomas SL (2007) Toward a unifying model of malaria-induced channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11044–11049.
- Decherf G, Bouyer G, Egee S, Thomas SL (2007) Chloride channels in normal and cystic fibrosis human erythrocyte membrane. *Blood Cells Mol Dis* 39: 24–34.
- Decherf G, Egee S, Staines HM, Ellory JC, Thomas SL (2004) Anionic channels in malaria-infected human red blood cells. *Blood Cells Mol Dis* 32: 366–371.

between control cells and *pfpka-r* transformed parasites stimulated with 500 μ M IBMX (two-tailed t -test).

Found at doi:10.1371/journal.ppat.0040019.sg002 (4.1 MB TIF).

Acknowledgments

Part of this work was performed by SE during a sabbatical leave in the Deitch Laboratory at the Weill Medical College, supported by Pierre & Marie Curie University. We are grateful to R. Dzikowski, M. Frank, C. Epp, and C. Lavazec for their considerable help in the construction of expression plasmids and for valuable discussions. We thank S. Krishna and H.M. Staines for their advice on haemolysis experiments. Sequencing of *P. falciparum* was accomplished, as part of the Malaria Genome Project with support by the Wellcome Trust and the Burroughs Wellcome Fund.

Author contributions. A. Merckx, K. Deitsch, C. Doerig, and S. Egée conceived and designed the experiments. A. Merckx, M-P. Nivez, G. Bouyer, P. Alano, K. Deitsch, and S. Egée performed the experiments. A. Merckx, G. Bouyer, P. Alano, G. Langsley, S. Thomas, C. Doerig, and S. Egée analyzed the data. A. Merckx, G. Langsley, C. Doerig, and S. Egée wrote the paper.

Funding. This work was financed by the French Ministère de la Recherche et de la Technologie, the Délégation générale pour l'Armement (DGA, French Ministère de la Défense) (ST and CD); by the United Nations Development Program (UNDP)/World Bank/World Health Organization (WHO) Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) (CD); and by the European Commission FP6 (SIGMAL and ANTIMAL projects) (CD). AM was supported in part by an Ile de France fellowship and AM, MPN, GL, and CD received support from INSERM and the Wellcome Trust. KWD is supported by National Institutes of Health Grant AI 52390. The Department of Microbiology and Immunology at Weill Medical College of Cornell University acknowledges the support of the William Randolph Hearst Foundation.

Competing interests. The authors have declared that no competing interests exist.

- Verloo P, Kocken CH, Van der Wel A, Tilly BC, Hogema BM, et al. (2004) *Plasmodium falciparum*-activated chloride channels are defective in erythrocytes from cystic fibrosis patients. *J Biol Chem* 279: 10316–10322.
- Johnson DA, Akamine P, Radzio-Andzelm E, Madhusudan M, Taylor SS (2001) Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 101: 2243–2270.
- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243: 3763–3765.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, et al. (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253: 407–414.
- Saito-Ito A, He S, Kimura M, Matsumura T, Tanabe K (1995) Cloning and structural analysis of the gene for cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from *Plasmodium yoelii*. *Biochim Biophys Acta* 1269: 1–5.
- Li J, Cox LS (2000) Isolation and characterisation of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit gene from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 109: 157–163.
- Syin C, Parzy D, Traincard F, Boccaccio I, Joshi MB, et al. (2001) The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes. *Eur J Biochem* 268: 4842–4849.
- Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV (2005) cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cell Signal* 17: 279–287.
- Della Fazio MA, Servillo G, Sassone-Corsi P (1997) Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett* 410: 22–24.
- Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, Garcia CR (2005) Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol* 170: 551–557.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351: 95–105.
- Read LK, Mikkelsen RB (1991) Comparison of adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase in gametocytogenic and nongametocytogenic clones of *Plasmodium falciparum*. *J Parasitol* 77: 346–352.
- Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C (2004) Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 5: 79.
- Baker DA (2004) Adenylyl and guanylyl cyclases from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *IUBMB Life* 56: 535–540.
- Yuasa K, Mi-Ichi F, Kobayashi T, Yamanouchi M, Kotera J, et al. (2005)

- PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 392: 221–229.
31. Canaves JM, Taylor SS (2002) Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *J Mol Evol* 54: 17–29.
 32. Cheng X, Phelps C, Taylor SS (2001) Differential binding of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit isoforms Ialpha and Ibeta to the catalytic subunit. *J Biol Chem* 276: 4102–4108.
 33. Cheng HC, van Patten SM, Smith AJ, Walsh DA (1985) An active twenty-amino-acid-residue peptide derived from the inhibitor protein of the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem J* 231: 655–661.
 34. Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Xuong NH, Taylor SS, et al. (1991) Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253: 414–420.
 35. Lavazec C, Sanyal S, Templeton TJ (2006) Hypervariability within the Rifin, Stevor and Pfmc-2TM superfamilies in *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* 34: 6696–6707.
 36. Bouyer G, Egee S, Thomas SL (2006) Three types of spontaneously active anionic channels in malaria-infected human red blood cells. *Blood Cells Mol Dis* 36: 248–254.
 37. Weber JH, Vishnyakov A, Hambach K, Schultz A, Schultz JE, et al. (2004) Adenylyl cyclases from *Plasmodium*, *Paramecium* and *Tetrahymena* are novel ion channel/enzyme fusion proteins. *Cell Signal* 16: 115–125.
 38. Cuppoletti J, Tewari KP, Sherry AM, Ferrante CJ, Malinowska DH (2004) Sites of protein kinase A activation of the human CLC-2 Cl(-) channel. *J Biol Chem* 279: 21849–21856.
 39. Jentsch TJ, Neagoe I, Scheel O (2005) CLC chloride channels and transporters. *Curr Opin Neurobiol* 15: 319–325.
 40. Kawamoto F, Alejo-Blanco R, Fleck SL, Kawamoto Y, Sinden RE (1990) Possible roles of Ca²⁺ and cGMP as mediators of the exflagellation of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 42: 101–108.
 41. Muhia DK, Swales CA, Deng W, Kelly JM, Baker DA (2001) The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 42: 553–560.
 42. Beraldo FH, Mikoshiba K, Garcia CR (2007) Human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the *P. falciparum* cell cycle. *J Pineal Res* 43: 360–364.
 43. Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, Varotti FP, Lopes C, et al. (2000) Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol* 2: 466–468.
 44. Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, Liolios K, Harrison T, et al. (2004) A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306: 1934–1937.
 45. Marti M, Good RT, Rug M, Knuepfer E, Cowman AF (2004) Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306: 1930–1933.
 46. Droucheau E, Primot A, Thomas V, Mattei D, Knockaert M, et al. (2004) *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1697: 181–196.
 47. Templeton TJ, Deitsch KW (2005) Targeting malaria parasite proteins to the erythrocyte. *Trends Parasitol* 21: 399–402.
 48. Desai SA, Rosenberg RL (1997) Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2045–2049.
 49. Nunes MC, Goldring JP, Doerig C, Scherf A (2007) A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. *Mol Microbiol* 63: 391–403.
 50. Schneider AG, Mercereau-Puijalon O (2005) A new Apicomplexa-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. *BMC Genomics* 6: 30.
 51. Dreyfuss G, Schwartz KJ, Blout ER (1978) Compartmentalization of cyclic AMP-dependent protein kinases in human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5926–5930.
 52. Lim CJ, Han J, Yousefi N, Ma Y, Amieux PS, et al. (2007) Alpha4 integrins are type I cAMP-dependent protein kinase-anchoring proteins. *Nat Cell Biol* 9: 415–421.
 53. Browe DM, Baumgarten CM (2006) EGFR kinase regulates volume-sensitive chloride current elicited by integrin stretch via PI-3K and NADPH oxidase in ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 127: 237–251.
 54. Wu Y, Sifri CD, Lei HH, Su XZ, Welles TE (1995) Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 973–977.
 55. Deitsch K, Driskill C, Welles T (2001) Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res* 29: 850–853.
 56. Frank M, Dzikowski R, Costantini D, Amulic B, Berdugo E, et al. (2006) Strict pairing of var promoters and introns is required for var gene silencing in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 281: 9942–9952.
 57. Staines HM, Godfrey EM, Lapaix F, Egee S, Thomas S, et al. (2002) Two functionally distinct organic osmolyte pathways in *Plasmodium gallinaceum*-infected chicken red blood cells. *Biochim Biophys Acta* 1561: 98–108.
 58. Krugliak M, Ginsburg H (2006) The evolution of the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes—a kinetic analysis. *Exp Parasitol* 114: 253–258.

ANNEXE II

Anion channels in *Plasmodium-falciparum*-infected erythrocytes and protein kinase A

Anaïs Merckx¹, Guillaume Bouyer², Serge L.Y. Thomas²,
Gordon Langsley¹ and Stéphane Egée²

¹ Institut Cochin, INSERM U567, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France

² Université Pierre et Marie Curie Paris 6 – CNRS UMR7150 Station Biologique, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France

By replicating within red blood cells, malaria parasites are largely hidden from immune recognition; however, in the cells, nutrients are limiting and hazardous metabolic end products can rapidly accumulate. Therefore, to survive within erythrocytes, parasites alter the permeability of the host plasma membrane, either by upregulating existing transporters or by creating new permeation pathways. Recent electrophysiological studies of *Plasmodium*-infected erythrocytes have demonstrated that membrane permeability is mediated by transmembrane transport through ion channels in the infected erythrocyte. This article discusses the evidence and controversies concerning the nature of these channels and surveys the potential role of phosphorylation in activating anion channels that could be important in developing novel strategies for future malarial chemotherapies.

Plasmodium-falciparum-infected erythrocyte membrane permeability

Intracellular parasitism affords protection against the host's immune response, but even in the new intracellular niche, pathogens still face a hostile environment, at least regarding chemical concentrations (predominantly Na⁺, K⁺ and Ca²⁺) [1] with an unusual extracellular medium and redox state [2]. Moreover, *Plasmodium falciparum* becomes highly dependent on being supplied with nutrients and on its ability to dispose of metabolic waste in the 48 h needed for complete intraerythrocytic development. Indeed, this implies a high rate of protein synthesis, leading to the need for essential nutrients such as panthothenate [3], isoleucine [4] and glutamate [5] and to the production of waste products (mostly lactate) that have to be removed to avoid self-poisoning [6]. Moreover, the digestion of haemoglobin, the principal source of amino acids, leads to changes in the intracellular osmotic pressure that could be hazardous for parasite survival if not regulated [7]. Red blood cells (RBCs) consistently have marked alterations in membrane transport properties during *Plasmodium* intraerythrocytic development. In addition to endogenous transporter activities, such as the NaK-ATPase pump or band 3, that undergo modifications upon infection [1,8], the so-called 'new permeation

pathways' (NPPs) [9] can be detected 12–15 h after invasion by merozoites. Indeed, the rate of transport via NPPs increases during the course of infection, reaching a plateau after 36 h post-invasion [10,11]. The substrate specificities of NPPs have been extensively characterized by means of tracer fluxes and iso-osmotic haemolysis experiments. They show permeability for monosaccharide sugars and other small polyols, amino acids, peptides, nucleosides, various monocarboxylates, small quaternary ammonium compounds, and monovalent inorganic anions and cations [6,12]. Furthermore, they have been found to be non-saturable, to have an activation energy lower than that typical of carrier-mediated transports and to be blocked by numerous anion-transport inhibitors, such as furosemide and 5-nitro-2(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB); this has led to the conclusion that NPPs have some of the characteristics of anion channels [13–15]. This has driven an intensive effort to characterize these new transport routes with the 'patch-clamp' technique (Figure 1), which is the most relevant technique for studying channel activity.

Contribution of electrophysiology data to the comprehension of NPPs

Between the first successful recordings showing Ca²⁺ channel activities at the infected RBC membrane [16] and the first whole-cell recording on an infected cell [17], four years were necessary to solve the technical problems linked to the adaptation of this configuration of the patch-clamp technique to such a small and deformable cell. The main advantage of this configuration is that it enables one to record the activity of all channels present at the membrane that are susceptible to being active, depending on the different solutes present in the bath and the pipette.

In a seminal work, Desai and co-workers [17] demonstrated for the first time that the low spontaneous conductance (below 50 pS) of non-infected cells is increased by a factor of 100 to 150 in infected cells. The infection-induced current is anion selective and shows a permeability sequence for monovalent anions of SCN[−] > I[−] > Br[−] > Cl[−] > acetate[−] > lactate[−] > glutamate[−], indicating that SCN[−] is the most permeable anion through the channels. Importantly, the membrane currents show a strong inward rectification (Figure 1). These membrane currents were attributed to an anion channel with low unitary conductance

Corresponding author: Egée, S. (ege@s-b-roscoff.fr).

membrane conductance of infected cells, in absence of traces of serum and without holding resting potential applied to the membrane, is predominantly inwardly rectified and caused by the activity of anion channels [23]. Even if the majority of authors consider today that membrane currents are due to upregulation of endogenous channels that are quiescent in the mature erythrocytes [23], a parasite origin of the ion channels responsible for the increase of membrane currents observed in infected RBC has been suggested. Indeed, PSAC-gating polymorphisms identified by using two distinct parasite isolates (7G8 and Indo-1), grown in RBCs from a single donor, exhibit channel activity with measurably different voltage-dependent gating [24], and a spontaneous blasticidin-resistant parasite line shows altered PSAC activity, leading to an altered selectivity profile and pharmacology [25]. However, whole-cell and cell-attached patch clamp applied to rhesus erythrocytes infected with the highly phylogenetically divergent species *Plasmodium knowlesi* show no discernable channel activity compared to *P. falciparum*-infected human erythrocytes [26]. Moreover, application of chymotrypsin to the patch-clamp bathing solution inhibits membrane currents and this preferentially affects the outward currents. This inhibition was not reversible, contrary to what was observed in haemolysis experiments [27]. Nonetheless, it is not clear whether NPP activity can be exclusively defined by anion channels activity or whether NPPs can collectively include other types of solute transporters. Nevertheless, in a recent attempt to unify the different data, it was shown that solute transport via NPPs is not consistent with a single-channel model [28,29]. For example, sorbitol does not enter infected RBC via a channel with a low open-state probability at positive membrane potential [30], and this commonly explains the inward rectification in whole-cell configuration in the absence of traces of serum. Moreover, recent data showed that the inwardly rectified membrane conductance can be accounted for by, at least, the activity of two different types of channels [31,32].

Molecular identity and regulation of induced channels in infected erythrocytes

The molecular identity of channels that constitute the electrophysiological profile of an infected cell is still elusive. After complete annotation of the *P. falciparum* genome [33], a computer search based on the hydropathy plots of the predicted proteome identified more than 100 putative transport proteins [34]. However, only a few proteins were assigned as putative channels [35,36] and none were assigned as homologues of known eukaryotic anion channels [37]. Moreover, known inhibitors of anion transporters do not seem sufficiently specific to discriminate between different types of channels, and this is particularly true for channels activated in infected erythrocytes [38,39]. Even dantrolene, which was reported as a selective inhibitor of PSAC [40], inhibits the outwardly rectified current elicited by serum [23]. Furthermore, we cannot rule out that the differences observed regarding the 50% inhibitory concentration (e.g. for NPPB and furosemide) for the inward and outward currents correlate to voltage-dependent effects of such compounds, meaning that the potency of the compound is dependent on the driving force.

If one supposes that channels in the RBC membrane are endogenous and upregulated upon infection, studies on uninfected erythrocytes provide a way to discriminate between channels and elucidate their molecular nature using both whole-cell recordings and single-channel recordings. Strong evidence indicates that the channels responsible for the outwardly rectifying current phenotype are responsible for the passage of organic osmolytes [20,41,42] and that these channels have common characteristics with the outwardly rectifying chloride channels, which were previously described in non-infected RBCs [19]. Furthermore, it seems that at least two different types of channels are involved in the inwardly rectifying currents [21,31,32,43]. One type resembles chloride channels 2 [43] and the other resembles the cystic fibrosis transmembrane regulator [21], a well-known cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent channel, or a channel apparently dependent on the cAMP-signalling pathway [19,21,31,44,45]. Even though these dormant channels seem endogenous, the parasite clearly has found an efficient way to activate them.

Two different facets of the same hypotheses have been proposed to account for the activation of the channels. The first proposes that oxidative stress caused by the parasite activates and/or modulates the channels [20,46,47]. Indeed, strikingly similar, if not identical, channels can be activated by simply imposing oxidative stress on non-infected RBCs [20,48]. The second facet is that a sudden change in the phosphorylation state of quiescent channels induces their activation [19,21,44,49], and it is well known that post-infection changes in the phosphorylation state of certain host plasma membrane and cytoskeleton proteins occur [50,51]. These two facets are related because the generation of reactive oxygen intermediates by numerous eukaryotic cells triggers the activation of signalling pathways via kinases [52,53]. Moreover, RBCs possess a complete cAMP-dependent signalling pathway [54], and the ability of protein kinase A (PKA) to influence channel activity has been demonstrated [55–57]. This is particularly relevant because some of these channels are usually associated with the release of ATP as part of an autocrine- or paracrine-signalling pathway involving purinergic receptors [45,55,56]. In this context, induction of osmolyte permeability in *Plasmodium*-infected erythrocytes involves autocrine purino-receptor signalling (P2Y1 receptor), which is present in the RBC membrane [58,59] (Figure 2). Thus, the cAMP-dependent signalling pathway and PKA are of high interest.

PKA is a key effector of parasite-induced channels and a potential therapeutic target

One of the main components of the cAMP-dependent signalling pathway is PKA. In its non-active form, PKA is a tetramer composed of two catalytic (PKA-C) subunits and a dimer of regulatory (PKA-R) subunits. cAMP binding to each PKA-R subunit liberates and activates PKA-C. Among the 65 kinases identified in *P. falciparum* [60], just a single gene encodes *P. falciparum* PKA-C (PfPKA-C) and a single gene encodes *P. falciparum* PKA-R (PfPKA-R). The predicted proteins of PfPKA-C and PfPKA-R display 46% and 42% identity with their human orthologues [49,61,62]. Previous studies also characterized PKA-C in

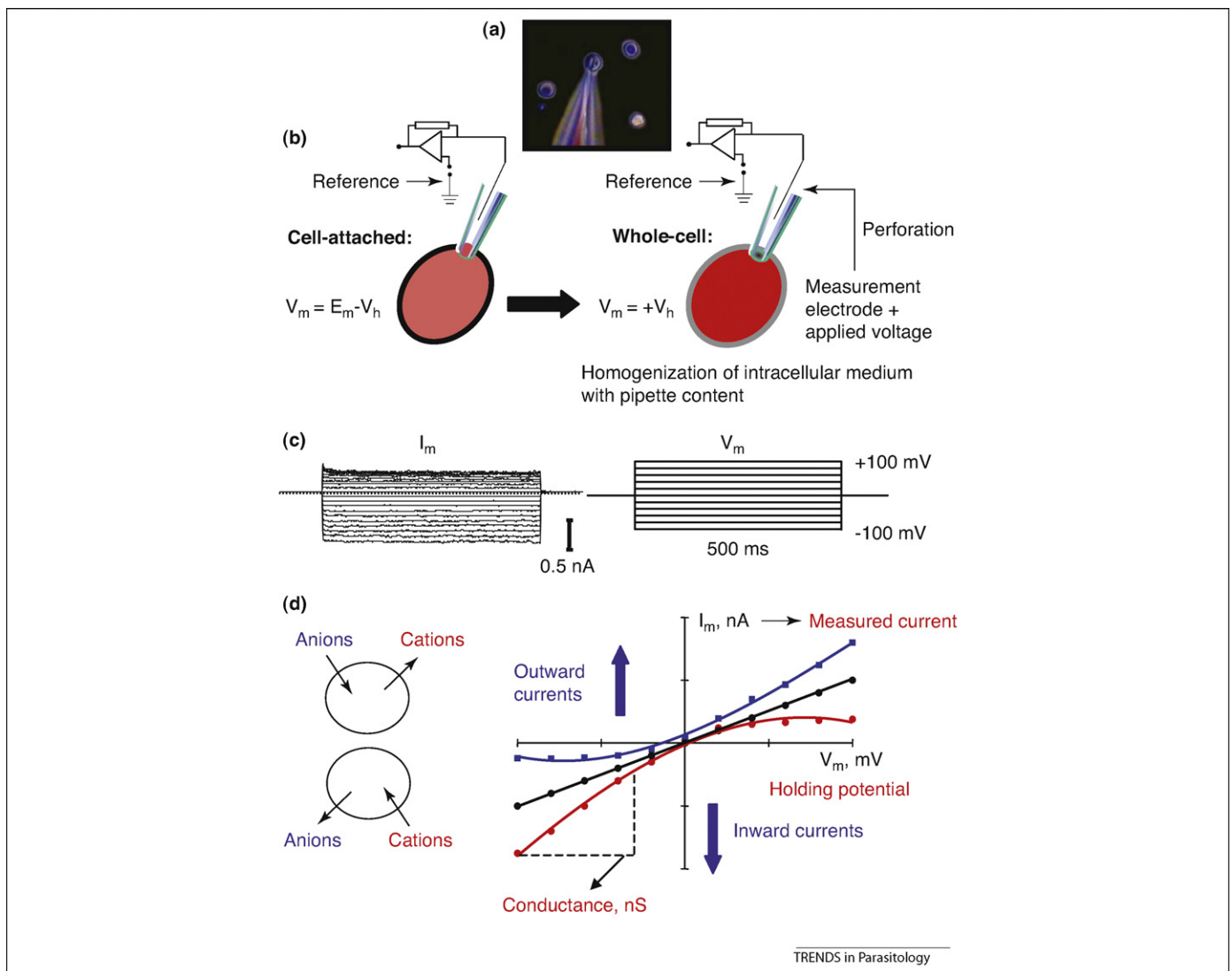


Figure 1. Patch-clamp technique. Patch clamp means imposing on a membrane patch a defined voltage (voltage clamp) with the purpose of measuring the resulting current for the calculation of the patch conductance. (a) A small glass tube (the patch electrode) with a cone-shaped end (usually $\sim 1 \mu\text{m}^2$) is filled with an appropriate saline solution and brought into contact with the surface of a cell using a microscope with the purpose of generating a high-resistance electrical seal around the edge of the tip. (b) Once the seal is established, the membrane potential across the patch or whole cell is fully under experimental control and can be held (holding potential) or varied at will. Currents are measured by applying voltage steps across the membrane. Cell-attached configuration (b) is used for measuring the current through the membrane within the tip of the pipette. This configuration maintains the integrity of the cell and is, therefore, the most physiological. The membrane potential (V_m) of the cell is in this configuration defined by the equation $V_m = E_m - V_h$, where E_m is the resting membrane potential of the cell and V_h the holding potential applied to the pipette. Whole-cell configuration is obtained with the cell-attached configuration when the patch of membrane is ruptured by suction or by application of brief electric shocks (b). The currents measured are those flowing through all the ionic channels present and active in the cell. (c) In this configuration, the cell content changes dramatically as the cell cytosol equilibrates with the fluid within the patch pipette. The membrane potential is then defined by the equation $V_m = +V_h$. By convention in electrophysiology, the direction of the current is given by the direction of the positive charges. An inward current can be attributed to an entry of cations into the cell or an efflux of anions leaving the cell. (d) An outward current defined by efflux of cations or influx of anions. In the cell-attached and whole-cell configuration, the inward currents are negative currents and are depicted by a downward deflection of the baseline (zero current) (c). Knowing the current values for each holding potential, it is then possible to fit the current-voltage (I-V) relationship. The I-V relationship is one of the characteristics of the channel (in single mode) or of the cell membrane (in whole-cell configuration). The conductance is an index of the facility by which an ion flows through an ionic channel and it is an important characteristic of channels for this reason. Graphically, this is determined by the value of the slope of the I-V curve (d). Often, the I-V relationship is not linear, as predicted by Ohm's law. Usually, one can say that the I-V curve is rectified according to the part of the curve where current is greater. The selectivity sequence of the channel can be determined by a simple substitution of part of the different ions present in the bathing and pipette solution and by measuring the shift of the equilibrium potential (graphically, this corresponds to the potential for the I-V curve to cross the voltage axis). The current-voltage (I-V) curves provide additional information on the collective kinetics of the channels.

(20 pS conductance in symmetrical 1.1 M Cl^-) [17]. This channel was never observed by the authors examining uninfected RBCs and was subsequently called the plasmoidal erythrocyte surface anion channel (PSAC) [18]. However, different results were reported in three independent studies, revealing a much more complex system than expected [19–21]. Two of these studies confirmed the inward-rectified nature of the whole-cell conductance induced after infection [19,21] and the third found a pheno-

typically and pharmacologically different current in addition to these inward-rectified anionic currents [20]. Indeed, the third study observed an outwardly rectified current at the trophozoite stage. This apparent discrepancy was due to residual amounts of serum present in the bathing solution surrounding the cells and to a particular time-dependent fast inactivation of the inward currents, when negative holding potentials are applied between the ramps of voltage [22]. Today, there seems to be a consensus that

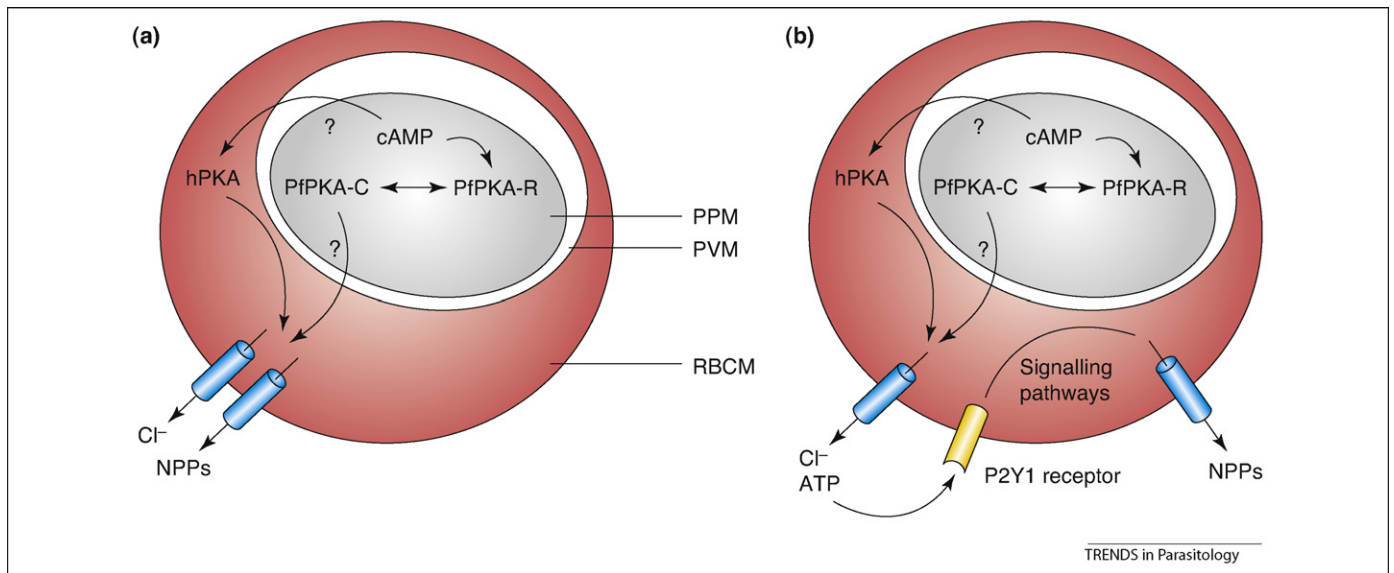


Figure 2. Model for activation of NPPs via PKA-dependent signalling. **(a)** In the simplest scenario, NPPs are directly activated via the cAMP-dependent signalling pathway. In this case, three alternatives are possible. PfPKA, even lacking a PEXEL/HT motif, is exported to the host cytosol and directly phosphorylates at least some of the channel(s). Alternatively, PfPKA could phosphorylate an unidentified parasite substrate, which is then exported to the host cytosol and eventually participates in NPP formation. Finally, although a role for PfPKA-C in the regulation of anion channels seems likely, we cannot exclude the possibility that human PKA-C contributes to induction of anion conductance in *P. falciparum*-infected RBCs. In this scenario, erythrocyte PKA-C would become active, perhaps after a parasite-dependent increase in cAMP levels in the RBC cytosol, and be exported via specific transporters at the *P. falciparum* plasma membrane. **(b)** In a sequential model, a first channel is phosphorylated or modified as described in (a), and once activated, this channel participates in the release of ATP that binds to purinergic receptors (probably P2Y1) in an autocrine manner and subsequently activates the organic osmolyte channel part of NPPs via intracellular signalling. Abbreviations: hPKA, human PKA; PfPKA-C, *P. falciparum* PKA catalytic subunit; PfPKA-R, *P. falciparum* PKA regulatory subunit; PPM, parasite plasma membrane; PVM, parasitophorous vacuole membrane; RBCM, red blood cell membrane; NPP, new permeation pathway.

P. falciparum blood-stage parasites and observed highest activity in schizonts [61]. Like endogenous PKA activity of non-infected RBCs, the parasite enzyme can be stimulated by cAMP and inhibited by protein kinase inhibitor [62]. Repeated attempts to disrupt *pka-c* in *Plasmodium berghei* have failed, indicating a crucial role for the kinase in blood-stage development [49]. Inhibition of PfPKA-C with H89, a not completely specific chemical inhibitor of PKA, or by PfPKA-R overexpression in transgenic parasites consistently ablates intraerythrocytic growth [49,62]. In addition to PfPKA-C and PfPKA-R, parasite nucleotide cyclases [63] and phosphodiesterases [64] also regulate cAMP levels. In spite of its established importance for parasite growth, PfPKA-C endogenous substrates have not been identified. There are some potential PKA substrates in the human erythrocyte and *P. falciparum* proteome (see Table 1 and 2 in the Supplementary Data online), and one can now test the capacity of active recombinant PfPKA-C [65] to phosphorylate peptides derived from them before going on to demonstrate that the endogenous protein is, indeed, phosphorylated by PKA *in vivo*. Recently, a cAMP pathway was shown to regulate exocytosis of apical organelles in *P. falciparum* sporozoites via its major downstream effector, PKA [66]. In mammalian cells, exocytosis is frequently induced by an elevation of intracellular Ca²⁺ levels that are cAMP modulated [67]. Furthermore, an increase in cAMP in *P. falciparum* induces activation of a Ca²⁺ influx pathway from the endoplasmic reticulum and the external medium. In addition, an augmentation in Ca²⁺ initiates an amplification loop via cAMP and PKA to further modulate the Ca²⁺ signal [68].

cAMP-pathway components are involved in the regulation of anion conductance at the erythrocyte membrane [19,45,49]. In uninfected RBCs, anion channels can be

activated by ATP and PKA, and the plasma membrane of *P. falciparum*-infected erythrocytes possesses a spontaneously active anion channel with conductances, pharmacology and selectivity similar to the channel of uninfected RBCs [19]. Importantly, this spontaneous anionic conductance can be inhibited by intracellular dephosphorylation [19,21], addition of recombinant PfPKA-R or PKI (a natural PKA-specific inhibitory peptide) into the patch-clamp pipette during whole-cell recordings, or overexpression of PfPKA-R in transgenic parasites, leading to downregulation of anion conductance of one of the erythrocyte plasma-membrane anion channels that has been previously described at the single-channel level [31]. Overexpression of PfPKA-R could act as a sink for cAMP, thereby reducing available cAMP levels both within the parasite and, eventually, in the erythrocyte cytosol (Figure 2). It seems that PfPKA regulates anionic conductance, either via direct phosphorylation of the channel itself or indirectly, through phosphorylation of accessory or associated proteins that can be of human or parasite origin. The subcellular localization of PfPKA is, therefore, determinant, and this normally depends on its association with PfPKA-R and binding of the regulatory subunit to the A-kinase-anchoring protein (AKAP) anchor protein.

A *Plasmodium* export element/host targeting (PEXEL/HT) motif promotes export of a large number of proteins from the parasite into the host cell [69–71]. PfPKA-R and PfPKA-C do not have a recognizable motif but could still be exported nonetheless. For example, *P. falciparum* glycogen synthase kinase 3 [72] that is exported to Maurer's clefts also lacks recognizable export motifs. If PfPKA is exported to the erythrocyte cytosol and interacts with an AKAP in close proximity to the channels, it could directly activate anionic channel activity by phosphorylation. Previous studies have

already shown that channels can be PKA substrates [73]. Even though activation of anionic conductance is clearly PfPKA related, it cannot be ruled out that it could be mediated via PKA phosphorylation of other proteins, and localization of the different actors (i.e. PfPKA-C, PfPKA-R and AKAP) would be of great interest when deciphering the role of the PfPKA in activating ion channels during infection.

There are several possible hypotheses that might explain the mechanism of the indirect activation of anionic conductance. First, PfPKA-C is exported to the erythrocyte cytosol, where it phosphorylates proteins of human or parasite origin. These proteins could be transporter activators, inhibitors or other members of an intracellular signalling cascade that results in anionic-transport activation (Figure 2). Another possibility is that part of the cAMP produced by the parasite is exported into the host cytosol via a specific transporter and acts directly on host PKA (Figure 2). Thus, after overexpression, PfPKA-R could reduce available cAMP levels, not only within the parasite but also, eventually, in the erythrocyte cytosol because cAMP in infected RBCs is mostly synthesized by the parasite [68]. In this scenario, overexpression of PfPKA-R acts as a cAMP sink, as observed in the case of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5 in mammals [74], thereby reducing overall erythrocyte PKA activity. Overexpression of PfPKA-R consistently leads to anionic conductance inhibition and reduced parasite growth [49]. In all the above hypotheses, PfPKA seems to be a key regulator of *P. falciparum* development and anion transport across the erythrocyte membrane. This pivotal role makes PfPKA a good therapeutic target.

Concluding remarks and future directions

Although some controversy exists regarding whether NPPs are parasite molecules inserted in the RBC membrane or whether the parasite modifies resident erythrocyte transporters and channels, it seems clear that parasite PfPKA plays a key part in regulating one aspect of NPP activity; namely, inwardly rectifying anion transport. PfPKA could regulate anion transport indirectly by phosphorylating some intermediate protein or modulating infected erythrocyte cAMP levels, which subsequently induce NPP activity. However, working on the assumption that the key regulatory role of PfPKA is mediated by direct phosphorylation of a transporter or channel, putative substrates can now be readily tested. In the end, NPPs could be made up of both parasite and erythrocyte transporters and channels.

Acknowledgements

We would like to thank Maria Novatchkova for help in analyzing the *P. falciparum* proteome with the PkaPS predictor. We are grateful to Bernard Monsarrat for making his erythrocyte proteome data available before publication. A.M. received support from an Ile de France postdoctoral fellowship. G.L. received support from the CNRS and from INSERM. S.T., S.E. and G.B. received support from the CNRS and University Pierre and Marie Curie, Paris 6.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.pt.2008.12.005.

References

- 1 Staines, H.M. *et al.* (2001) Perturbation of the pump-leak balance for Na⁺ and K⁺ in malaria-infected erythrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C1576–C1587
- 2 Becker, K. *et al.* (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* 34, 163–189
- 3 Saliba, K.J. *et al.* (1998) Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 273, 10190–10195
- 4 Martin, R.E. and Kirk, K. (2007) Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood* 109, 2217–2224
- 5 Elford, B.C. *et al.* (1985) Selective stage-specific changes in the permeability to small hydrophilic solutes of human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 43–60
- 6 Kirk, K. (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol. Rev.* 81, 495–537
- 7 Lew, V.L. *et al.* (2003) Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* 101, 4189–4194
- 8 Parker, P.D. *et al.* (2004) *Plasmodium falciparum* induces reorganization of host membrane proteins during intraerythrocytic growth. *Blood* 103, 2404–2406
- 9 Ginsburg, H. *et al.* (1983) New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8, 177–190
- 10 Krugliak, M. and Ginsburg, H. (2006) The evolution of the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes – a kinetic analysis. *Exp. Parasitol.* 114, 253–258
- 11 ter Kuile, F. *et al.* (1993) *Plasmodium falciparum*: *in vitro* studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp. Parasitol.* 76, 85–95
- 12 Kirk, K. *et al.* (1999) Transport and trafficking in the malaria-infected erythrocyte. *Parasitol. Today* 15, 355–357
- 13 Kirk, K. *et al.* (1994) Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J. Biol. Chem.* 269, 3339–3347
- 14 Kirk, K. and Horner, H.A. (1995) In search of a selective inhibitor of the induced transport of small solutes in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: effects of arylaminobenzoates. *Biochem. J.* 311, 761–768
- 15 Kirk, K. and Horner, H.A. (1995) Novel anion dependence of induced cation transport in malaria-infected erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 24270–24275
- 16 Desai, S.A. *et al.* (1996) A novel pathway for Ca⁺⁺ entry into *Plasmodium falciparum*-infected blood cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 464–470
- 17 Desai, S.A. *et al.* (2000) A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* 406, 1001–1005
- 18 Cohn, J.V. *et al.* (2003) Extracellular lysines on the plasmodial surface anion channel involved in Na⁺ exclusion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 132, 27–34
- 19 Egée, S. *et al.* (2002) A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Physiol.* 542, 795–801
- 20 Huber, S.M. *et al.* (2002) *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl[−] channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J.* 21, 22–30
- 21 Verloo, P. *et al.* (2004) *Plasmodium falciparum*-activated chloride channels are defective in erythrocytes from cystic fibrosis patients. *J. Biol. Chem.* 279, 10316–10322
- 22 Staines, H.M. *et al.* (2003) Modulation of whole-cell currents in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by holding potential and serum. *J. Physiol.* 552, 177–183
- 23 Staines, H.M. *et al.* (2007) Electrophysiological studies of malaria parasite-infected erythrocytes: current status. *Int. J. Parasitol.* 37, 475–482
- 24 Alkhalil, A. *et al.* (2004) *Plasmodium falciparum* likely encodes the principal anion channel on infected human erythrocytes. *Blood* 104, 4279–4286

- 25 Hill, D.A. *et al.* (2007) A blasticidin S-resistant *Plasmodium falciparum* mutant with a defective plasmodial surface anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1063–1068
- 26 Lisk, G. and Desai, S.A. (2005) The plasmodial surface anion channel is functionally conserved in divergent malaria parasites. *Eukaryot. Cell* 4, 2153–2159
- 27 Baumeister, S. *et al.* (2006) Evidence for the involvement of *Plasmodium falciparum* proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. *Mol. Microbiol.* 60, 493–504
- 28 Ginsburg, H. and Stein, W.D. (2005) How many functional transport pathways does *Plasmodium falciparum* induce in the membrane of its host erythrocyte? *Trends Parasitol.* 21, 118–121
- 29 Ginsburg, H. and Stein, W.D. (2004) The new permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of the infected erythrocyte: comparison of results using different experimental techniques. *J. Membr. Biol.* 197, 113–134
- 30 Staines, H.M. *et al.* (2006) Solute transport via the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells is not consistent with a simple single-channel model. *Blood* 108, 3187–3194
- 31 Bouyer, G. *et al.* (2007) Toward a unifying model of malaria-induced channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11044–11049
- 32 Bouyer, G. *et al.* (2006) Three types of spontaneously active anionic channels in malaria-infected human red blood cells. *Blood Cells Mol. Dis.* 36, 248–254
- 33 Gardner, M.J. *et al.* (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498–511
- 34 Martin, R.E. *et al.* (2005) The 'permeome' of the malaria parasite: an overview of the membrane transport proteins of *Plasmodium falciparum*. *Genome Biol.* 6, R26
- 35 Waller, K.L. *et al.* (2008) Characterization of two putative potassium channels in *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 7, 19
- 36 Ellekvist, P. *et al.* (2004) Molecular cloning of a K⁺ channel from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 477–484
- 37 Kirk, K. *et al.* (2005) *Plasmodium* permeomics: membrane transport proteins in the malaria parasite. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 295, 325–356
- 38 Staines, H.M. *et al.* (2004) Furosemide analogues as potent inhibitors of the new permeability pathways of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 133, 315–318
- 39 Culliford, S. *et al.* (2003) Specificity of classical and putative Cl⁻ transport inhibitors on membrane transport pathways in human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 13, 181–188
- 40 Lisk, G. *et al.* (2006) Specific inhibition of the plasmodial surface anion channel by dantrolene. *Eukaryot. Cell* 5, 1882–1893
- 41 Duranton, C. *et al.* (2004) Organic osmolyte permeabilities of the malaria-induced anion conductances in human erythrocytes. *J. Gen. Physiol.* 123, 417–426
- 42 Duranton, C. *et al.* (2005) Permselectivity and pH-dependence of *Plasmodium falciparum*-induced anion currents in human erythrocytes. *Pflugers Arch.* 450, 335–344
- 43 Huber, S.M. *et al.* (2004) *Plasmodium* induces swelling-activated ClC-2 anion channels in the host erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 279, 41444–41452
- 44 Decherf, G. *et al.* (2004) Anionic channels in malaria-infected human red blood cells. *Blood Cells Mol. Dis.* 32, 366–371
- 45 Decherf, G. *et al.* (2007) Chloride channels in normal and cystic fibrosis human erythrocyte membrane. *Blood Cells Mol. Dis.* 39, 24–34
- 46 Ginsburg, H. (2002) Oxidative permeabilization? *Trends Parasitol.* 18, 346
- 47 Huber, S. *et al.* (2002) Oxidative permeabilization? *Trends Parasitol.* 18, 346
- 48 Lang, F. *et al.* (2004) Channel-induced apoptosis of infected host cells – the case of malaria. *Pflugers Arch.* 448, 319–324
- 49 Mercx, A. *et al.* (2008) *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog.* 4, e19
- 50 Chishti, A.H. *et al.* (1994) Phosphorylation of protein 4.1 in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells. *Blood* 83, 3339–3345
- 51 Magowan, C. *et al.* (1998) *Plasmodium falciparum*: influence of malarial and host erythrocyte skeletal protein interactions on phosphorylation in infected erythrocytes. *Exp. Parasitol.* 89, 40–49
- 52 McCubrey, J.A. and Franklin, R.A. (2006) Reactive oxygen intermediates and signaling through kinase pathways. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1745–1748
- 53 Franklin, R.A. *et al.* (2006) Activation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases as a consequence of oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1807–1817
- 54 Roux-Dalvai, F. *et al.* (2008) Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 2254–2269
- 55 Sprague, R.S. *et al.* (1998) Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *Am. J. Physiol.* 275, H1726–H1732
- 56 Sprague, R.S. *et al.* (2001) Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1158–C1164
- 57 Stumpf, A. *et al.* (2006) Physiological concept for a blood based CFTR test. *Cell. Physiol. Biochem.* 17, 29–36
- 58 Tanneur, V. *et al.* (2006) Purinoceptors are involved in the induction of an osmolyte permeability in malaria-infected and oxidized human erythrocytes. *FASEB J.* 20, 133–135
- 59 Hoffman, J.F. *et al.* (2004) Tetrodotoxin-sensitive Na⁺ channels and muscarinic and purinergic receptors identified in human erythroid progenitor cells and red blood cell ghosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12370–12374
- 60 Ward, P. *et al.* (2004) Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 5, 79
- 61 Li, J. and Cox, L.S. (2000) Isolation and characterisation of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit gene from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109, 157–163
- 62 Syin, C. *et al.* (2001) The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 268, 4842–4849
- 63 Baker, D.A. (2004) Adenylyl and guanylyl cyclases from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *IUBMB Life* 56, 535–540
- 64 Yuasa, K. *et al.* (2005) PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* 392, 221–229
- 65 Sudo, A. *et al.* (2008) Susceptibility of *Plasmodium falciparum* cyclic AMP-dependent protein kinase and its mammalian homologue to the inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160, 138–142
- 66 Ono, T. *et al.* (2008) Adenylyl cyclase alpha and cAMP signaling mediate *Plasmodium* sporozoite apical regulated exocytosis and hepatocyte infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000008
- 67 Borodinsky, L.N. and Spitzer, N.C. (2006) Second messenger pas de deux: the coordinated dance between calcium and cAMP. *Sci. STKE.* 2006, pe22
- 68 Beraldo, F.H. *et al.* (2005) Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J. Cell Biol.* 170, 551–557
- 69 Hiller, N.L. *et al.* (2004) A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306, 1934–1937
- 70 Marti, M. *et al.* (2004) Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306, 1930–1933
- 71 van Ooij, C. *et al.* (2008) The malaria secretome: from algorithms to essential function in blood stage infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000084
- 72 Droucheau, E. *et al.* (2004) *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1697, 181–196
- 73 Dahan, D. *et al.* (2001) Regulation of the CFTR channel by phosphorylation. *Pflugers Arch.* 443 (Suppl 1), S92–S96
- 74 Biswas, K.H. *et al.* (2008) The GAF domain of the cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is a sensor and a sink for cGMP. *Biochemistry* 47, 3534–3543

VU :

Le directeur de thèse

VU :

Le directeur de l'école doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINÉAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le président du jury,