

Stage du: 07/04/2025 ~ 12/06/2025



ÉTUDE DE LA PFATP4: UNE POMPE À SODIUM CLÉ DU PARASITE À L'ORIGINE DU PALUDISME

◆ Projet de recherche au Laboratoire d'Innovation Moléculaire Appliquée (LIMA) ◆

RAPPORT DE **STAGE** **2025**

Par
Blaser Davy
L3 Physique Chimie,
Parcours **Chimie**



Tuteur de stage: Docteur Martin Spichty

Équipe: Chimie Théorique et Modélisation Biomoléculaire

Référente de stage: Docteure Irena Deroche

REMERCIEMENTS :

Avant de commencer ce rapport, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à toute l'équipe du Laboratoire d'Innovation Moléculaire et Applications (LIMA) de Mulhouse pour son accueil chaleureux, sa disponibilité constante et la qualité de l'encadrement dont j'ai bénéficié tout au long de ce stage.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Martin Spichty et Monsieur Luca Manciocchi pour leur confiance, leur accompagnement bienveillant, ainsi que pour la richesse et la pertinence des échanges qui ont grandement facilité la réalisation et la qualité de ce travail.

Ce stage a représenté une opportunité unique d'appliquer concrètement les connaissances théoriques acquises au cours de ma formation, tout en me familiarisant avec la recherche scientifique, notamment dans le domaine pointu de la modélisation moléculaire. Il m'a également permis de préciser mes aspirations professionnelles et de mieux définir mon projet de carrière.

Table of Contents

REMERCIEMENTS :	1
INTRODUCTION :	3
CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET ÉTAT DE LA RECHERCHE	4
MATÉRIEL & MÉTHODES :	7
1) Principe de la modélisation moléculaire	7
2) Principe de la dynamique moléculaire	7
3) Préparation du système	8
4) Paramétrisation et lancement des simulations	9
5) Simulation en milieu exclusivement aqueux	9
6) Simulation en milieu membranaire	10
7) Analyse des trajectoires de simulation	10
8) Amarrage moléculaire de la cipargamin	10
RÉSULTATS DES SIMULATIONS ET INTERPRÉTATION PRÉLIMINAIRE	11
1) Construction et analyse des 4 états conformationnels de PfATP4	11
2) Évaluation de la stabilité conformationnelle par RMSD	13
3) Amarrage moléculaire (docking) de la cipargamine sur le modèle E1P-ADP de PfATP4	15
DISCUSSION ET CONCLUSION	17
BIBLIOGRAPHIE	18
ANNEXE	21

INTRODUCTION :

Le paludisme, ou malaria, est une maladie parasitaire transmise par la piqûre de moustiques infectés du genre *Anopheles*. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimerait que cette maladie toucherait 263 M de personnes et provoquerait plus de 597 000 décès¹ en 2023, principalement en Afrique subsaharienne. Le parasite responsable des formes les plus graves est *Plasmodium falciparum* (Pf), un protozoaire intracellulaire dont le cycle de vie complexe et la capacité à échapper au système immunitaire compliquent considérablement le traitement.

Depuis plusieurs décennies, les médicaments antipaludiques ont permis de réduire significativement la mortalité liée à cette infection. Cependant, l'émergence croissante de souches résistantes, notamment aux dérivés de l'artémisinine, représente un défi majeur pour la santé publique mondiale. Dans ce contexte, l'identification de nouvelles cibles moléculaires chez *P. falciparum* est devenue une priorité. Parmi elles figure la pompe à sodium PfATP4, essentielle à la survie du parasite en régulant l'homéostasie intra-parasitaire².

C'est dans cette perspective que la chimie computationnelle, et en particulier la modélisation moléculaire, joue aujourd'hui le rôle d'un outil précieux dans l'étude et la compréhension des mécanismes moléculaires. En combinant les principes de la chimie théorique et la puissance des outils de calcul, cette discipline permet de simuler et d'analyser le comportement dynamique des biomolécules à l'échelle atomique, apportant ainsi des informations précieuses pour la recherche biomédicale et le développement de nouveaux traitements.

Dans le cadre de ma troisième année de Licence en Chimie, j'ai effectué un stage au Laboratoire d'Innovation Moléculaire et Applications (LIMA) à Mulhouse, où l'une des thématiques de recherche concerne la modélisation de biomolécules impliquées dans des processus biologiques ou pathologiques. Ce stage m'a permis d'approfondir mes connaissances en chimie théorique et en biochimie, et de me former à l'utilisation d'outils numériques de simulation.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la stabilité structurale de PfATP4 en fonction de différents ligands (ATP, ADP) et de son environnement (milieu aqueux ou membrane lipidique), afin de mieux comprendre son fonctionnement. Cependant, une observation notable réalisée au cours des simulations a mis en évidence la présence spontanée d'un lipide membranaire à l'entrée du canal sodique, suggérant l'existence d'un "bouchon" lipidique pouvant réguler le passage de sodium au sein de cette pompe. Cette découverte soulève l'hypothèse qu'un inhibiteur pharmacologique pourrait reproduire cet effet de blocage, constituant une stratégie innovante pour perturber le fonctionnement de la pompe et ainsi induire la mort du parasite.

Ce rapport présentera dans un premier temps le contexte scientifique de l'étude. Il décrira ensuite la méthodologie utilisée, les résultats obtenus, leur interprétation, puis proposera des perspectives pour la suite de ces travaux.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET ÉTAT DE LA RECHERCHE

PfATP4 (*Plasmodium falciparum* ATPase de type P) est une enzyme membranaire essentielle du parasite *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme chez l'homme. Comme son nom l'indique, il s'agit d'une ATPase de type P, une famille de pompes ioniques qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour transporter activement des ions à travers les membranes biologiques. Ces enzymes fonctionnent par un mécanisme cyclique bien connu, le cycle de Post-Albers³, caractérisé par l'alternance entre deux états conformationnels majeurs (E1 et E2), et la formation transitoire d'un intermédiaire phosphorylé sur un résidu aspartate conservé (Fig.1)⁴.

Des études expérimentales et pharmacologiques ont montré que PfATP4 fonctionne principalement comme une pompe à sodium (Na^+/H^+ -ATPase). Elle extrait activement les ions Na^+ du cytosol du parasite en échange de protons H^+ , contribuant ainsi à maintenir l'homéostasie ionique et le pH cytoplasmique⁵. Cette fonction est vitale pour le parasite, surtout dans l'environnement ionique des érythrocytes humains, naturellement riches en sodium. L'état conformationnel E1 étant une conformation du canal ouverte vers l'intérieur du parasite laissant le site de coordination du sodium au milieu du canal atteignable par le sodium intraparasitaire. On dit que cet état E1 a une grande affinité pour le sodium car les résidus responsables de la coordination du sodium à l'intérieur de ce canal sont déprotonés, leur conférant un moyen d'attraction essentiel pour attirer le sodium dans ce canal. Tandis que l'état conformationnel E2 est ouvert vers l'extérieur du parasite, permettant ainsi de libérer le sodium préalablement piégé dans le site de coordination en échange de protons⁴. Puis ce cycle se répète afin d'extraire le sodium du parasite.

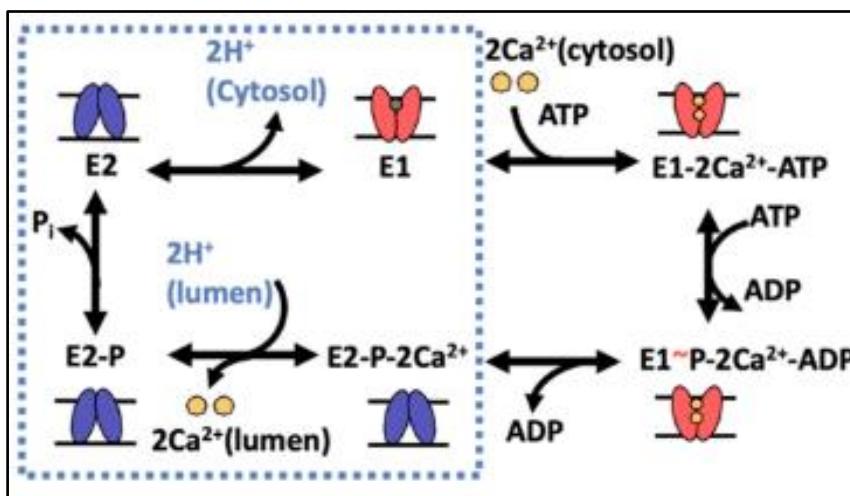


Figure 1 : États conformationnels E1 et E2 dans une pompe à calcium similaire à PfATP4⁴

Cette fonction critique de PfATP4 en fait une cible thérapeutique de choix pour le développement de nouveaux antipaludiques. Des composés prometteurs, comme la

cipargamine (KAE609), ou le SJ733, ont été conçus pour inhiber sélectivement cette pompe, et sont actuellement à des stades avancés d'essais cliniques⁶. Leur mode d'action entraîne une accumulation cytosolique de sodium, provoquant un gonflement osmotique du parasite, une alcalinisation du pH, une désorganisation membranaire, et in fine, la mort de la cellule parasitaire².

Toutefois, malgré ces résultats encourageants, le mécanisme d'inhibition précis reste encore mal élucidé, et des mutations résistantes (notamment G358S)^{5,7}, découvertes en laboratoire, ont déjà été identifiées, posant un défi pour la durabilité de ces traitements.

Sur le plan structural, la compréhension détaillée de PfATP4 a longtemps été limitée par l'absence de données cristallographiques. Ce manque a été partiellement comblé grâce à l'avènement de prédictions basées sur l'intelligence artificielle, notamment via AlphaFold3⁹, une intelligence artificielle développée par DeepMind (Google) qui fournit des modèles 3D de haute qualité de la protéine à partir de sa séquence protéique. En parallèle, des comparaisons structurales avec d'autres ATPases de type P bien caractérisées, comme la pompe à calcium SERCA^{10,11}, ont permis d'extrapoler des modèles de fonctionnement pour PfATP4, en identifiant des domaines homologues tels que N, P, A, et transmembranaires (**ANNEXE**) tout en décrivant les changements conformationnels associés aux différentes phases du cycle catalytique (**Fig.2**).

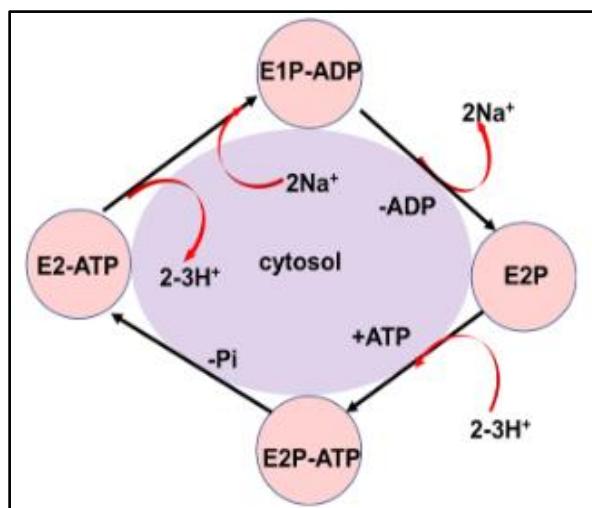


Figure 2 : Cycle catalytique de la PfATP4⁵

Dans ce contexte scientifique en pleine évolution, mon stage s'inscrit dans une démarche de modélisation moléculaire visant à approfondir la compréhension structure-fonction de PfATP4. À partir de modèles de AlphaFold3, plusieurs états fonctionnels de la pompe ont été construits dans des environnements biologiques réalistes (en solution aqueuse ou insérés dans une bicouche lipidique), à l'aide de l'interface web CHARMM-GUI¹². Ces constructions ont permis d'explorer l'impact de l'environnement membranaire et aqueux, de la liaison de ligands ATP ou ADP sur la stabilité des structures, ainsi que d'observer des éléments structuraux

inattendus, comme un lipide membranaire POPC positionné à l'entrée du canal ionique, pouvant potentiellement agir comme un "bouchon" pour cette pompe à sodium.

L'objectif final de cette étude est de combiner des simulations de dynamique moléculaire avec des analyses structurales pour caractériser la dynamique des états conformationnels de PfATP4, évaluer les interactions protéine-membrane et protéine-ligand et identifier un mécanisme ou des cibles potentielles pour de nouveaux inhibiteurs, pouvant bloquer mécaniquement ou fonctionnellement la pompe, à l'image du "bouchon" lipidique observé. Ce travail contribue ainsi aux efforts actuels de conception de nouveaux antipaludiques, en apportant un éclairage mécanistique sur une cible moléculaire aussi essentielle que complexe.

MATÉRIEL & MÉTHODES :

Dans le cadre de ce stage, j'ai mobilisé plusieurs outils informatiques et logiciels spécialisés en modélisation moléculaire, dans l'optique de répondre à la problématique principale : analyser la stabilité structurelle de la protéine PfATP4 dans différents environnements et conditions de liaison tout en étudiant l'effet d'un potentiel "bouchon" lipidique à l'entrée du canal à sodium.

L'environnement de travail principal a été le système d'exploitation Linux, utilisé pour l'exécution des calculs de dynamique moléculaire et des logiciels de modélisation. Ce système est particulièrement adapté à la chimie computationnelle en raison de sa stabilité, de ses performances optimisées pour les calculs intensifs, ainsi que de sa compatibilité avec la majorité des logiciels scientifiques. Il permet également une automatisation efficace via le terminal de commande et l'utilisation de scripts, essentielle pour gérer les envois de tâches sur des infrastructures de calcul haute performance (HPC), comme le centre de calcul de Strasbourg utilisé ici.

1) Principe de la modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire permet de reproduire le comportement des molécules en utilisant des modèles physiques et mathématiques. Elle repose sur la mécanique moléculaire (MM), la mécanique quantique (QM) ou, dans certains cas, un mélange des deux (QM/MM). Dans le cadre de la mécanique moléculaire, chaque atome est représenté comme une particule classique dotée d'une masse, d'une charge partielle et d'un rayon de van der Waals fixe. Les interactions intra- et interatomiques sont décrites à l'aide de fonctions d'énergie dites « additives », telles que des potentiels harmoniques (modélisés comme des ressorts) pour les liaisons covalentes, des termes angulaires pour les angles de liaison, ainsi que des potentiels non liés pour les interactions de type van der Waals et électrostatiques. L'ensemble de ces interactions est calculé via un champ de force, qui détermine l'énergie totale du système en fonction de la position de tous les atomes.

2) Principe de la dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire (MD) permet de simuler l'évolution temporelle d'un système atomique en appliquant les lois classiques de la mécanique newtonienne. En particulier, le mouvement de chaque atome est régi par la deuxième loi de Newton, exprimée par l'équation $F = m \times a$, où 'F' représente la force résultante agissant sur l'atome, 'm' sa masse, et 'a' son accélération. À chaque étape de temps (de l'ordre de la femtoseconde), les forces agissant sur chaque atome sont calculées, puis leurs positions et vitesses sont mises à jour. On obtient ainsi une trajectoire atomique complète, représentant le "film" du comportement moléculaire.

3) Préparation du système

La première étape du travail a consisté à préparer le système moléculaire à simuler. Pour cela, la plateforme web CHARMM-GUI¹² a été utilisée, un outil interactif spécifiquement conçu pour construire des systèmes biologiques complexes destinés à la dynamique moléculaire. CHARMM-GUI permet d'intégrer une protéine, une bicouche lipidique, des ions, un solvant, ainsi que d'autres composants nécessaires, et de générer automatiquement tous les fichiers nécessaires aux moteurs de simulation, comme OpenMM 8.2¹³, utilisé ici.

La structure tridimensionnelle initiale de PfATP4 sans les ligands, avec le ligand ATP et celle avec le ligand ADP a été obtenue via AlphaFold3⁹. Le fichier “.pdb” généré décrivant la position des atomes d'une molécule dans un espace à trois dimensions a été utilisé comme point de départ dans CHARMM-GUI.

Le système a été configuré de manière à refléter au mieux les conditions biologiques et physiologiques. Un pH physiologique de 7,4 a été défini afin de garantir des états de protonation réalistes des résidus. De même pour l'état fonctionnel modélisé (E1P-ADP, E2P, E2P-ATP, E1P-ATP), les ligands ATP ou ADP ont été inclus, ainsi que la phosphorylation de l'acide aspartique 451 dans les conformations phosphorylées (**Fig.2**). Des ponts disulfures ont également été pris en compte lorsqu'ils étaient présents dans la séquence native. Deux types de systèmes ont été construits : un système dans un environnement aqueux uniquement (eau + ions), puis un système dans un environnement membranaire plus représentatif de l'environnement naturel de la protéine.

Dans un second temps, la protéine a ensuite été insérée dans une membrane lipidique bicouche réaliste, composée à 70 % de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), 20 % de 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamine (POPE), 5 % de cholestérol (CHL1) et 5 % de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) qui n'était pas disponible sur CHARMM-GUI et qui a donc été substitué par une forme protonée de ce même lipide et nommé SAPI24, en accord avec les proportions décrites dans la littérature⁵.

L'ensemble a été solvaté dans une boîte d'eau TIP3P¹⁴ de dimension 100x100x200 (Å) contenant une concentration en chlorure de sodium (NaCl) de 0,15 M afin de reproduire l'environnement cellulaire aqueux. Ce solvant joue un rôle essentiel en stabilisant la structure, en assurant des interactions pertinentes comme les liaisons hydrogène, et en évitant les artefacts liés aux charges. Pour simuler une dilution infinie, des conditions périodiques aux limites (PBC) ont été appliquées : la boîte est répliquée dans l'espace pour supprimer les effets de bord, et sa taille a été choisie de manière à éviter toute interaction entre la protéine et ses images périodiques. À l'issue de cette préparation, l'interface CHARMM-GUI a généré un ensemble complet de fichiers d'entrée compatibles avec plusieurs moteurs de dynamique moléculaire.

4) Paramétrisation et lancement des simulations

Une fois le système préparé, les fichiers d'entrée sont modifiés pour définir les paramètres de la simulation. Le champ de force utilisé était CHARMM36m¹⁵, le système est à quantité de matière, pression et température constante donc le type d'ensemble thermodynamique est NPT. La dynamique de Langevin¹⁶ est utilisée pour garder une température constante à 298,15 Kelvin avec un coefficient de friction de 1/ps et la pression constante quant à elle, est maintenu par un barostat de type Monte Carlo¹⁶ qui ajuste le volume de la boîte pour que la pression reste à 1 bar lors de la simulation avec une fréquence de couplage de 0,2 ps. Les interactions électrostatiques à longue distance sont traitées par l'algorithme « Particle Mesh Ewald »¹⁷ (PME) avec une tolérance d'erreur de 0,0005 tandis que les interactions de Van der Waals suivent le modèle de Lennard-Jones¹⁸ et ont été réduites à 0 entre 10 et 12 Å afin de lisser et d'assurer une transition douce à une valeur nulle permettant de négliger les interactions de Van der Waals plus lointaine, dans le but d'éviter les artefacts et de rendre la simulation plus stable. La fréquence d'enregistrement des coordonnées atomiques a été paramétré pour les premières étapes d'équilibration avec un pas de 1 femtoseconde et des contraintes utilisant l'algorithme SHAKE¹⁹ pour les liaisons covalentes avec l'hydrogène, puis un pas de 2 femtosecondes pour le reste de la simulation en divisant par 2 les contraintes à chaque bloc de simulation jusqu'à les retirer totalement.

Les simulations sont ensuite lancées à l'aide de scripts Bash sur le centre de calcul haute performance (HPC) de Strasbourg. Ce centre utilise des cartes graphiques NVIDIA compatible CUDA²⁰ pour accélérer les calculs. La simulation a été divisé en 3 blocs principaux distincts composés chacun de sous-blocs afin de répartir le travail pour s'adapter aux limites de temps de simulation sur le supercalculateur (24h maximum par calcul) et pouvoir relancer facilement une simulation interrompue (ce qui est arrivé bien de nombreuses fois).

Les blocs principaux incluent en premier lieu une minimisation d'énergie qui permet une relaxation du système, suivi d'une étape d'équilibration qui stabilise les conditions de température et pression, pour finir avec l'étape de production qui se traduit par la simulation principale.

5) Simulation en milieu exclusivement aqueux

Pour l'équilibration du système, nous avons suivi un protocole légèrement modifié par rapport à celui proposé par CHARMM-GUI. Une première phase d'équilibration de 0,125 ns a été réalisée en appliquant des contraintes harmoniques sur la protéine, avec des constantes de force distinctes pour les atomes du squelette commençant à $400 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ et ceux des chaînes latérales à $40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$. Cette phase a été suivie par 10 ns supplémentaires, durant lesquels les contraintes sur la protéine ont été progressivement réduites par un facteur de 1024. Les simulations de production ont ensuite été menées pendant 400 ns et un léger potentiel de contrainte a été maintenu sur les atomes du squelette avec une constante de force de

$0.001 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ afin de limiter une rotation globale de la protéine dans la boîte de simulation.

6) Simulation en milieu membranaire

Le protocole standard proposé par CHARMM-GUI a été utilisé pour l'équilibration du système. Une première phase de 1,375 ns a été réalisée avec des contraintes appliquées aux lipides ainsi qu'à la protéine, suivie d'une réduction progressive de ces contraintes sur la protéine. Comme pour la simulation en environnement aqueux, cette phase a été suivie par une phase supplémentaire de 10 ns au cours de laquelle les contraintes sur la protéine ont été diminuées de manière continue. Les simulations de production ont également été effectuées sur une durée totale de 400 ns mais sans aucune contrainte.

7) Analyse des trajectoires de simulation

Chaque simulation produit donc une trajectoire, soit une suite de configurations atomiques successives. Lors de ce stage ces trajectoires ont été analysées à l'aide de logiciels comme VMD²¹ (Visual Molecular Dynamics) et PyMOL²², pour observer visuellement la conformation initiale de la protéine, comment elle se comportait dans le temps, identifier des interactions clés, et extraire des indicateurs quantitatifs.

L'un des indicateurs majeurs utilisés est la RMSD (Root Mean Square Deviation) ou "écart quadratique moyen", qui mesure la distance moyenne entre les positions atomiques d'une structure au cours du temps par rapport à une structure de référence (généralement l'état initial). Cette mesure permet d'évaluer la stabilité de la protéine et de détecter d'éventuels changements conformationnels significatifs. Dans ce stage, la RMSD a été particulièrement utile pour analyser l'influence des ligands (ATP/ADP), du milieu (aqueux ou lipidique) et la présence potentielle d'un "bouchon" lipidique (un lipide POPC obstruant l'entrée du canal à sodium), sur la dynamique de PfATP4.

8) Amarrage moléculaire de la cipargamin

Dans la dernière phase du projet, j'ai été chargé de réaliser l'amarrage moléculaire (docking) de la cipargamine sur l'état le plus réaliste identifié au cours de nos simulations, à savoir l'état E1P–ADP. Cette étape a été réalisée à l'aide de l'outil intégré de docking proposé par CHARMM-GUI, qui exploite plusieurs moteurs de docking reconnus : Smina²³, AutoDock Vina²⁴ et RxDock²⁵ (ANNEXE). La région ciblée pour l'amarrage étant située autour du résidu Glycine 358, connu pour être impliqué dans le mécanisme de résistance à la cipargamine chez *Plasmodium falciparum*⁸

RÉSULTATS DES SIMULATIONS ET INTERPRÉTATION PRÉLIMINAIRE

1) Construction et analyse des 4 états conformationnels de PfATP4

Dans un premier temps, mon travail a consisté en l'étude de la littérature scientifique actuelle pour comprendre les états conformationnels principaux du cycle catalytique de la protéine PfATP4. En me basant sur l'approche décrite dans une publication récente de Rachuri et al. (2025)⁵, j'ai utilisé comme référence la description des structures des 4 états conformationnels du cycle catalytique de PfATP4 : 2Na⁺E1P-ADP, E2P, H3E2P-ATP, et H3E2-ATP (**Fig.2**), 4 structures en milieu exclusivement aqueux et 4 structures en milieu membranaire, donc 8 structures au total. Mon objectif premier étant de reconstruire exactement les 4 mêmes états que dans la publication pour pouvoir comparer mes résultats à ceux de la publication pour ceux dans le milieu membranaire tout en vérifiant, si en milieu exclusivement aqueux, ces 4 mêmes structures seraient relativement stables ou non.

Ces structures ont ensuite été soumises à des simulations de dynamique moléculaire, premièrement dans un environnement uniquement aqueux, en suivant rigoureusement le protocole décrit dans l'article (**cf. Matériel et méthodes**). Les phases d'équilibration ont duré au total environ 1 heure (5 blocs d'une dizaine de minutes), suivi de la phase de production qui a duré environ 320 heures cumulées (10 blocs d'environ 2 heures chacun, suivi de 20 blocs d'une quinzaine d'heures chacun).

À l'issue de ces simulations, et conformément à la publication de référence⁵, nous nous attendions à observer les différents états du cycle catalytique. Cependant, cela n'a pas été le cas. Par exemple, lors de l'analyse de la trajectoire correspondant à l'état E2P, nous avons observé la présence d'un ion sodium dans le site de coordination, au centre de la membrane (**Fig.3**), alors que cette conformation est censée être orientée vers l'extérieur du parasite (état E2). Cette observation peut s'expliquer par le fait qu'AlphaFold3 n'a généré uniquement des conformations E1. Cela suggère que la conformation obtenue dans la simulation est plus proche d'un état intermédiaire de type E1P (**Fig.4**) que d'un état E2 pleinement formé.

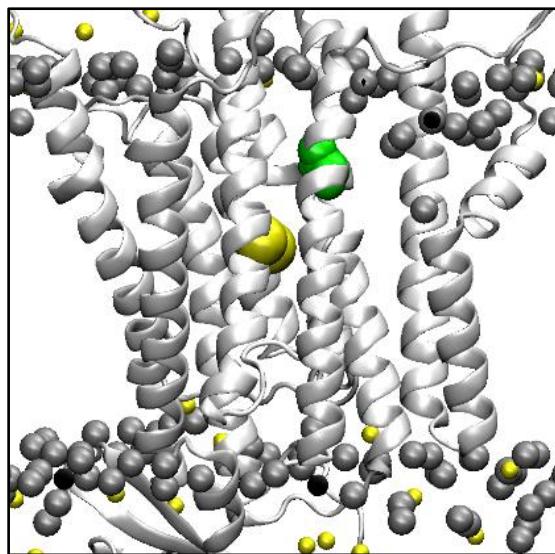


Figure 3 : Présence d'ions sodium dans le site de coordination au centre de la membrane

De manière similaire, dans le cas de l'état E2-ATP, la structure obtenue ne correspond pas exactement à celle décrite dans la littérature. Un point particulièrement surprenant est la présence d'un ion sodium dans le site de coordination, alors que les résidus responsables de cette coordination sont censés être protonés dans cet état. Toutefois, l'entrée du sodium dans le canal ne se produit qu'après un certain temps de simulation, ce qui diffère de l'état E1 dans lequel le site de coordination est initialement déprotoné et donc plus favorable à la liaison du sodium. Cette dynamique suggère un état transitoire de type E1-ATP (**Fig.4**) : une conformation ouverte vers le cytoplasme du parasite, permettant l'entrée éventuelle du sodium, bien que le site ne soit pas encore totalement favorable à cette interaction en l'absence de déprotonation préalable. Le sodium peut donc y pénétrer, mais sans y être fortement stabilisé.

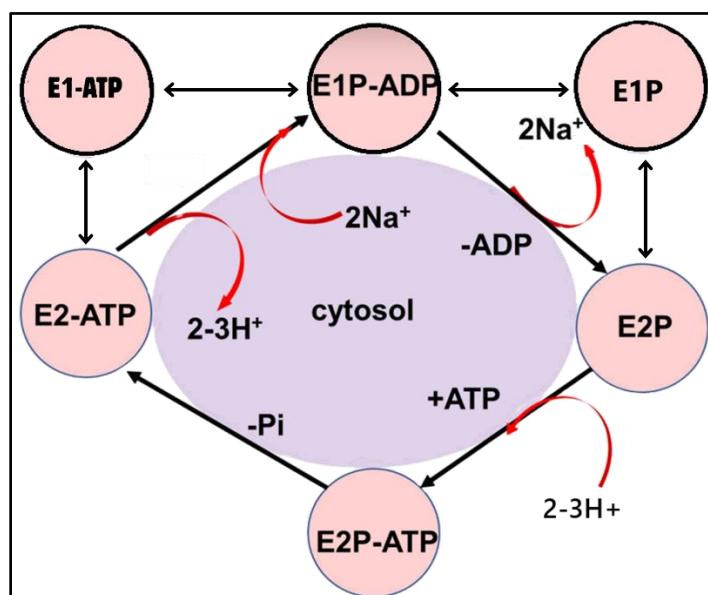


Figure 4 : États intermédiaires obtenus lors des simulations

L'état E2P-ATP protoné prédit par AlphaFold3 ne correspondait à rien de raisonnable. En raison de cette incompatibilité et de l'absence de cohérence avec les données expérimentales disponibles, ce modèle a été jugé non pertinent pour les objectifs de cette étude et a donc été écarté de l'analyse. C'est pourquoi nous avons décidé de le négliger, tandis que l'état E1P-ADP est sensiblement le même que celui de la publication et plutôt réaliste compte tenu de la correspondance à une conformation stable du cycle catalytique, dans laquelle la pompe est phosphorylée mais encore ouverte vers l'intérieur du parasite. À ce stade, le site de coordination des ions est déprotoné, ce qui confère une forte affinité pour le sodium en accord avec nos observations. De plus, la présence résiduelle d'ADP ralentit la transition vers l'état E2P, rendant cet intermédiaire d'autant plus accessible et stable à l'échelle des temps simulés, ce qui sera vérifier ensuite par analyse RMSD.

2) Évaluation de la stabilité conformationnelle par RMSD

Dans la seconde partie de l'analyse, j'ai utilisé VMD²¹ pour visualiser l'avancer de l'ensemble des blocs de simulation et générer un "film moléculaire" permettant de suivre précisément la trajectoire du sodium. Cette approche a permis d'observer que, dans certains états présentant une forte affinité pour le sodium, 3 ions étaient captés pour l'état E1P (dont 1 de manière quasi instantanée), 1 pour l'état E1-ATP, et 2 pour l'état E1P-ADP (dont 1 de manière quasi instantanée), au site de coordination. En parallèle, des analyses RMSD (**ANNEXE**) ont été réalisées et regroupées sur un même graphique (**Fig.5 & Fig.6**) pour évaluer la stabilité structurelle du système en fonction de la présence ou non du ligand, ainsi que l'environnement simulé (dans l'eau ou dans la membrane). Cette comparaison s'est révélée particulièrement intéressante, car les chercheurs expérimentaux étudient souvent ces protéines dans un environnement aqueux, du fait de la complexité pratique et financière à reproduire fidèlement les conditions membranaires en laboratoire. Et nous pouvons constater que nous obtenons un plateau de stabilité moyen aux alentours de 4 Å sur un système simulé de 500 ns. Nous observons une meilleure stabilité que dans la publication de référence (**ANNEXE**).

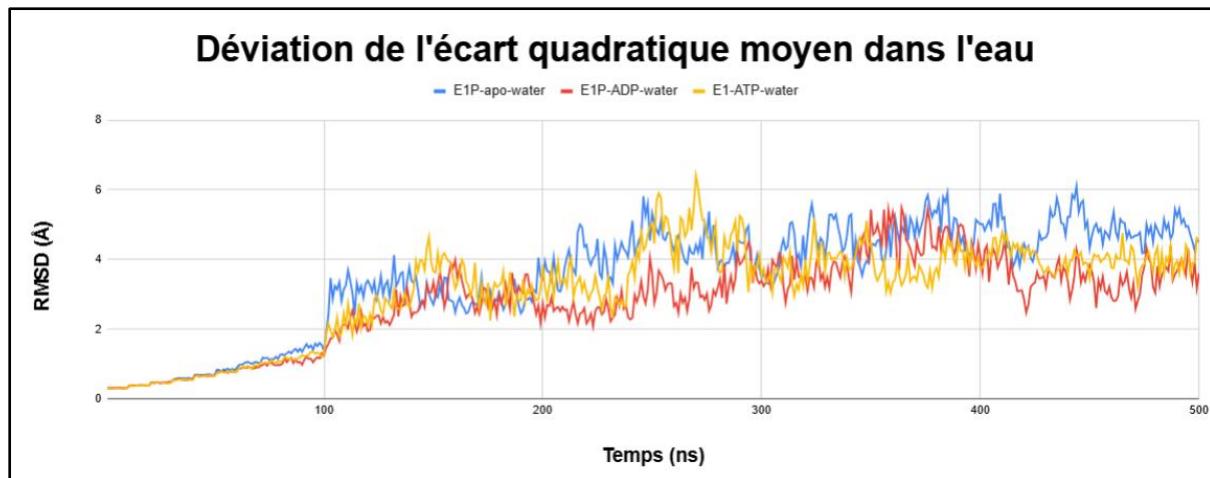


Figure 5 : RMSD des états simulés E1P, E1P-ADP et E1P-ATP de la PfATP4 dans un environnement exclusivement aquueux

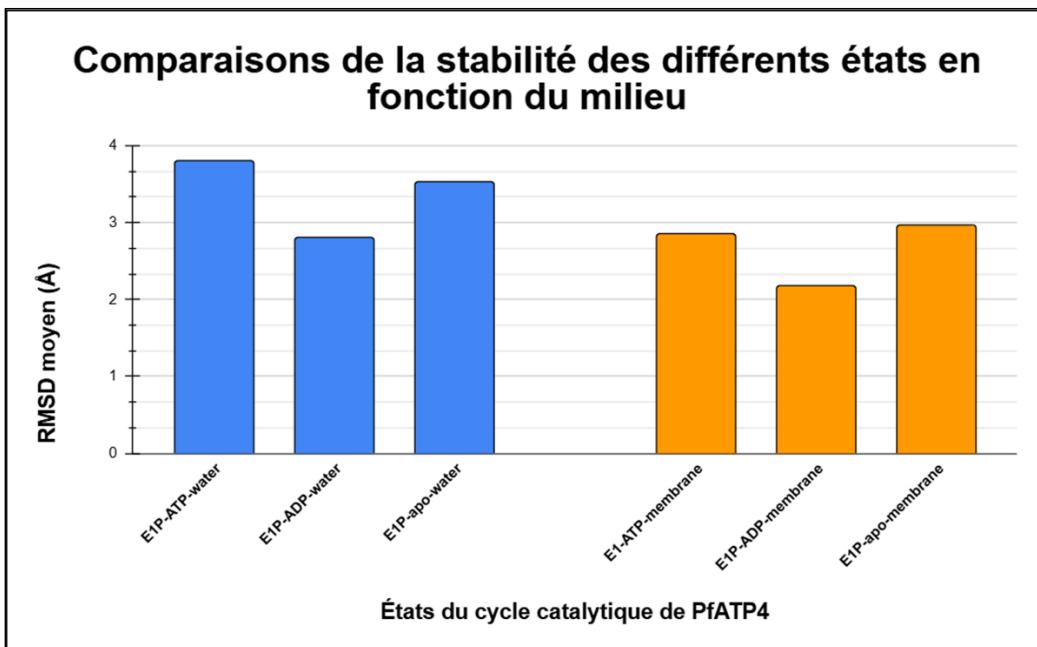


Figure 6 : Tableau comparatif de la stabilité moyenne des états différents états en fonction de leur environnement

Bien que la simulation complète ne fût pas encore achevée, l'analyse de son avancement a révélé un comportement inattendu dans l'environnement membranaire. Alors que le sodium pénétrait rapidement dans le site de coordination dans les simulations en solution, il restait absent de ce site pendant une durée prolongée dans la membrane, y compris dans les états supposés présenter une forte affinité. En explorant cette anomalie, nous avons constaté qu'un lipide de type POPC, placé par accident à l'entrée du canal lors de la construction du système avec CHARMM-GUI, obstruait l'accès au site (**Fig.7**). Une analyse postérieure des trajectoires de dynamique moléculaire a révélé que la molécule de POPC, initialement positionnée à l'entrée du canal au moment de la construction du système via CHARMM-GUI, n'était pas

stable sur le long terme. Au cours de la simulation, cette molécule s'est progressivement déplacée, libérant ainsi l'entrée du canal ionique et permettant l'accès du sodium au site de coordination. Ce lipide était localisé à proximité du résidu Glycine 358 (Gly358), un résidu connu des chercheurs, dont la mutation est connue pour conférer une résistance à la cipargamine chez le parasite⁸, et dont la position pourrait donc jouer un rôle fonctionnel important.

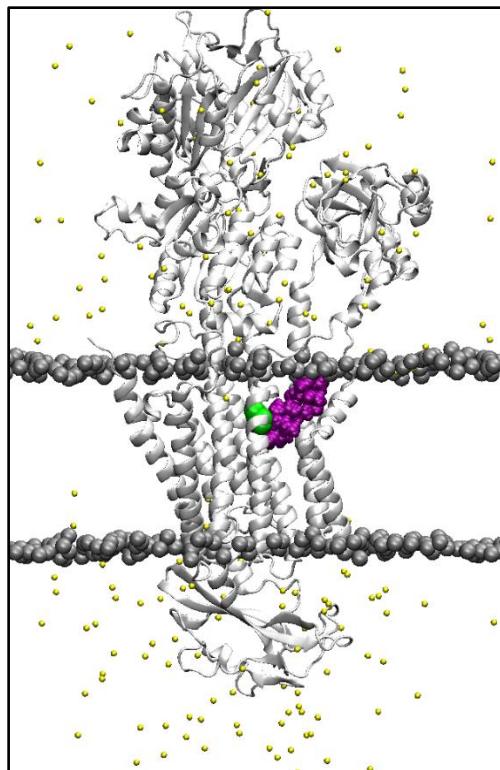


Figure 7 : POPC placé à l'entrée du canal à sodium jouant le rôle de bouchon

Pour vérifier cette hypothèse, une simulation parallèle a été lancée sans ce lipide obstructif. Les résultats ont montré que le sodium entrait alors quasi instantanément dans le site de coordination, comme dans le système en solution, confirmant ainsi l'impact de l'environnement localisé à l'entrée de ce canal sur la dynamique ionique. Ces observations nous ont naturellement conduits à la suite du projet : l'étude de l'amarrage moléculaire (docking) de la cipargamine sur l'état E1P–ADP, identifié comme le plus réaliste au cours de nos analyses.

3) Amarrage moléculaire (docking) de la cipargamine sur le modèle E1P–ADP de PfATP4

Le docking a généré trois poses principales présentant de très bons scores d'affinité. Deux d'entre elles positionnent la cipargamine à l'entrée du canal à sodium (**Fig.8**), dans des orientations légèrement différentes, tandis que la troisième l'implante directement dans le site de coordination (**Fig.9**), ce qui apparaît moins réaliste. En effet, cette dernière pose est plus

éloignée du résidu Gly358, alors que les mutations sur ce résidu sont connues pour altérer significativement l'efficacité du composé, suggérant que le site de liaison fonctionnel est probablement localisé à proximité immédiate de ce résidu.

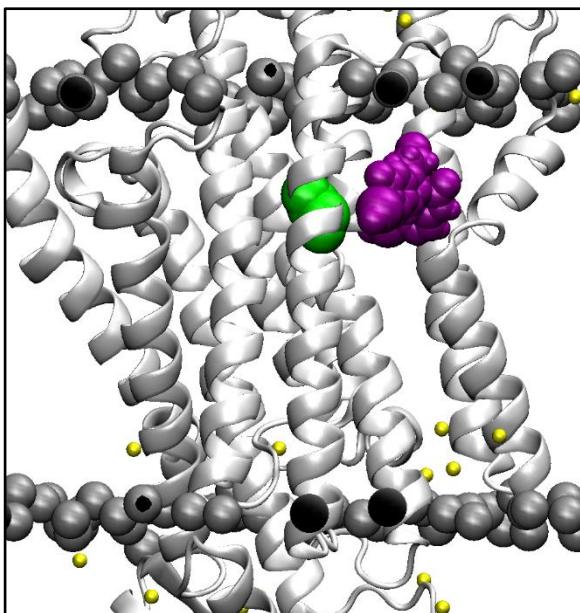


Figure 8 : Cipargamine à l'entrée du canal à sodium

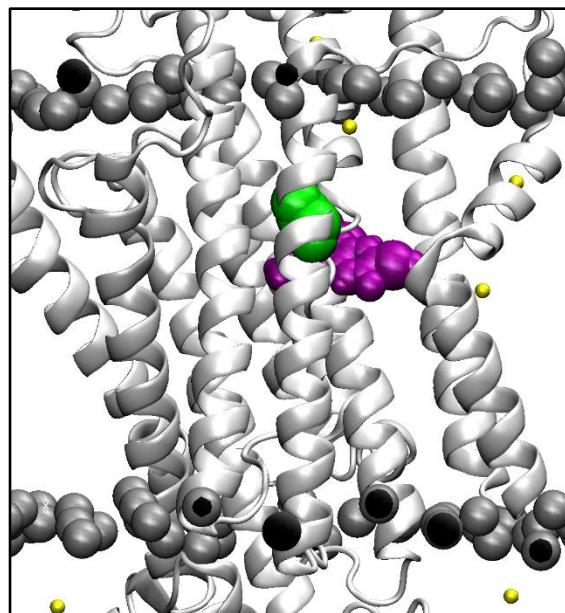


Figure 9 : Cipargamine à l'intérieur du site de coordination

Chacune de ces trois configurations a été soumise à une simulation indépendante, toujours en cours au moment de la rédaction. Néanmoins, l'analyse préliminaire révèle que, dans les trois cas, l'entrée du sodium dans le site de coordination est empêchée. Il reste cependant à déterminer si cela résulte d'un blocage physique de l'entrée du canal par la cipargamine (hypothèse la plus probable), ou si le composé occupe directement le site de coordination, empêchant mécaniquement la liaison de l'ion ou bien si le sodium pourra, après un certain temps, s'immiscer dans le canal.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ce stage a permis d'aboutir à un modèle dynamique fonctionnel de PfATP4, simulé dans différentes conformations et environnements. Ce modèle constitue, à notre connaissance, le premier outil capable de suivre explicitement le transport des ions Na⁺ à travers la pompe, ouvrant ainsi la voie à des études mécanistiques précises sur les états fonctionnels de cette ATPase.

Parmi les observations notables, l'état E1P-ADP s'est révélé stable aussi bien en milieu aqueux qu'en environnement membranaire, avec une stabilité renforcée en présence de l'ADP. Ce point est particulièrement intéressant pour les expérimentateurs, car il suggère que la présence d'un ligand nucléotidique pourrait stabiliser certains états conformationnels *in vitro*, ce qui pourrait orienter la conception d'essais fonctionnels ou de stratégies de cristallisation.

L'introduction de la cipargamine par docking a montré un effet de blocage du canal ionique, mais ce travail met surtout à disposition un cadre de simulation robuste avec lequel il devient désormais possible de tester rationnellement l'impact d'inhibiteurs sur le transport du sodium. Ce modèle servira donc de base pour explorer les effets structuraux et dynamiques de nouveaux ligands, de mutations de résistance ou encore de variations de l'environnement.

Ainsi, ce stage a non seulement enrichi notre compréhension de la fonction de PfATP4, mais il a également jeté les bases d'une plateforme exploratoire pour le développement rationnel d'antipaludiques ciblant cette protéine essentielle.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) *Malaria*. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/malaria> (accessed 2025-06-16).
- (2) Lehane, A. M.; Dennis, A. S. M.; Bray, K. O.; Li, D.; Rajendran, E.; McCoy, J. M.; McArthur, H. M.; Winterberg, M.; Rahimi, F.; Tonkin, C. J.; Kirk, K.; Dooren, G. G. van. Characterization of the ATP4 Ion Pump in Toxoplasma Gondii. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (14), 5720–5734. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006706>.
- (3) Stock, C.; Heger, T.; Basse Hansen, S.; Thirup Larsen, S.; Habeck, M.; Dieudonné, T.; Driller, R.; Nissen, P. Fast-Forward on P-Type ATPases: Recent Advances on Structure and Function. *Biochem. Soc. Trans.* **2023**, *51* (3), 1347–1360. <https://doi.org/10.1042/BST20221543>.
- (4) Espinoza-Fonseca, L. M. Structural Basis for the Function of the C-Terminal Proton Release Pathway in the Calcium Pump. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (7), 3507. <https://doi.org/10.3390/ijms22073507>.
- (5) Rachuri, S.; Nepal, B.; Shukla, A.; Ramanathan, A.; Morrisey, J. M.; Daly, T.; Mather, M. W.; Bergman, L. W.; Kortagere, S.; Vaidya, A. B. Mutational Analysis of an Antimalarial Drug Target, PfATP4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2025**, *122* (2), e2403689122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2403689122>.
- (6) Schmitt, E. K.; Ndayisaba, G.; Yeka, A.; Asante, K. P.; Grobusch, M. P.; Karita, E.; Mugerwa, H.; Asiimwe, S.; Oduro, A.; Fofana, B.; Doumbia, S.; Su, G.; Csermak Renner, K.; Venishetty, V. K.; Sayyed, S.; Straimer, J.; Demin, I.; Barsainya, S.; Boulton, C.; Gandhi, P. Efficacy of Cipargamin (KAE609) in a Randomized, Phase II Dose-Escalation Study in Adults in Sub-Saharan Africa With Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2022**, *74* (10), 1831–1839. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab716>.
- (7) Rachuri, S.; Nepal, B.; Shukla, A.; Ramanathan, A.; Morrisey, J. M.; Daly, T.; Mather, M. W.; Bergman, L. W.; Kortagere, S.; Vaidya, A. B. Mutational Analysis of an Antimalarial Drug Target, PfATP4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2025**, *122* (2), e2403689122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2403689122>.
- (8) Mathews, E. S.; John, A. R. O. Tackling Resistance: Emerging Antimalarials and New Parasite Targets in the Era of Elimination. *F1000Research* August 1, 2018. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14874.1>.
- (9) *AlphaFold*. Google DeepMind. <https://deepmind.google/science/alphafold/> (accessed 2025-06-16).
- (10) Tsunekawa, N.; Ogawa, H.; Tsueda, J.; Akiba, T.; Toyoshima, C. Mechanism of the E2 to E1 Transition in Ca²⁺ Pump Revealed by Crystal Structures of Gating Residue Mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (50), 12722–12727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815472115>.

- (11) *Cryo-EM structures of SERCA2b reveal the mechanism of regulation by the luminal extension tail / Science Advances*. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abb0147> (accessed 2025-05-31).
- (12) *CHARMM-GUI*. <https://charmm-gui.org/> (accessed 2025-06-16).
- (13) 2. *Getting Started — OpenMM User Guide 8.2 documentation*. http://docs.openmm.org/latest/userguide/application/01_getting_started.html (accessed 2025-06-16).
- (14) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- (15) Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Feig, M.; de Groot, B. L.; Grubmüller, H.; MacKerell, A. D. CHARMM36m: An Improved Force Field for Folded and Intrinsically Disordered Proteins. *Nat. Methods* **2017**, *14* (1), 71–73. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>.
- (16) Eastman, P.; Swails, J.; Chodera, J. D.; McGibbon, R. T.; Zhao, Y.; Beauchamp, K. A.; Wang, L.-P.; Simmonett, A. C.; Harrigan, M. P.; Stern, C. D.; Wiewiora, R. P.; Brooks, B. R.; Pande, V. S. OpenMM 7: Rapid Development of High Performance Algorithms for Molecular Dynamics. *PLOS Comput. Biol.* **2017**, *13* (7), e1005659. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005659>.
- (17) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089–10092. <https://doi.org/10.1063/1.464397>.
- (18) Ji, X. Diffusion Model of Lennard-Jones Fluids Based on the Radial Distribution Function. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126* (44), 9008–9015. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c04019>.
- (19) Macuglia, D. SHAKE and the Exact Constraint Satisfaction of the Dynamics of Semi-Rigid Molecules in Cartesian Coordinates, 1973–1977. *Arch. Hist. Exact Sci.* **2023**, *77* (4), 345–371. <https://doi.org/10.1007/s00407-023-00306-0>.
- (20) *CUDA Toolkit Documentation 12.9 Update 1*. <https://docs.nvidia.com/cuda/> (accessed 2025-06-16).
- (21) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33–38, 27–28. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- (22) PyMOL-Ross. *PyMOL Resources*. Biochemistry Computational Research Facility (BCRF). <https://bcrf.biochem.wisc.edu/pymol-resources/> (accessed 2025-06-16).
- (23) *smina*. SourceForge. <https://sourceforge.net/projects/smina/> (accessed 2025-06-16).

- (24) Eberhardt, J.; Santos-Martins, D.; Tillack, A. F.; Forli, S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61* (8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>.
- (25) *RxDock*. rxdock.gitlab.io. <https://rxdock.gitlab.io/> (accessed 2025-06-16).

ANNEXE

```
nstep      = 500000          # Number of steps to run
dt         = 0.002            # Time-step (ps)

nstout     = 1000             # Writing output frequency (steps)
nstdcd    = 50000             # Writing coordinates trajectory frequency (steps)

coulomb   = PME               # Electrostatic cut-off method
ewald_Tol = 0.0005            # Ewald error tolerance
vdw        = Force-switch     # vdw cut-off method
r_on      = 1.0                # Switch-on distance (nm)
r_off      = 1.2                # Switch-off distance (nm)

temp       = 298.15            # Temperature (K)
fric_coeff = 1                 # Friction coefficient for Langevin dynamics

pcouple   = yes               # Turn on/off pressure coupling
p_ref     = 1.0                # Pressure (Pref or Pxx, Pyy, Pzz; bar)
p_type    = membrane           # MonteCarloBarostat type
p_XYMode  = XYIsotropic       # For MonteCarloMembraneBarostat
p_ZMode   = ZFree              # For MonteCarloMembraneBarostat
p_tens    = 0.0                # Sulfate tension for MonteCarloMembraneBarostat (dyne/cm)
p_freq    = 100                # Pressure coupling frequency (steps)

cons      = HBonds             # Constraints method

rest      = no                  # Turn on/off restraints
```

Figure 10 : Exemple de paramétrisation

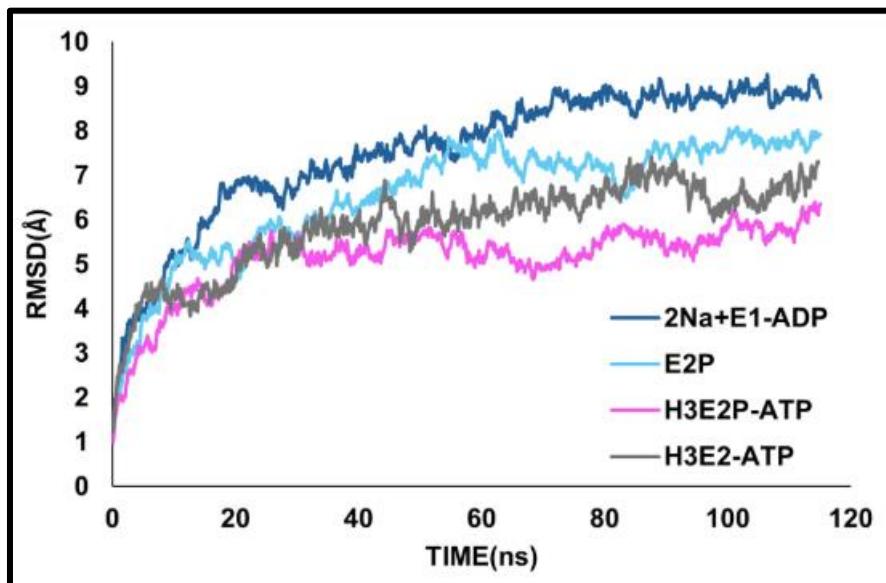


Figure 11 : <https://www.pnas.org/doi/epub/10.1073/pnas.2403689122>

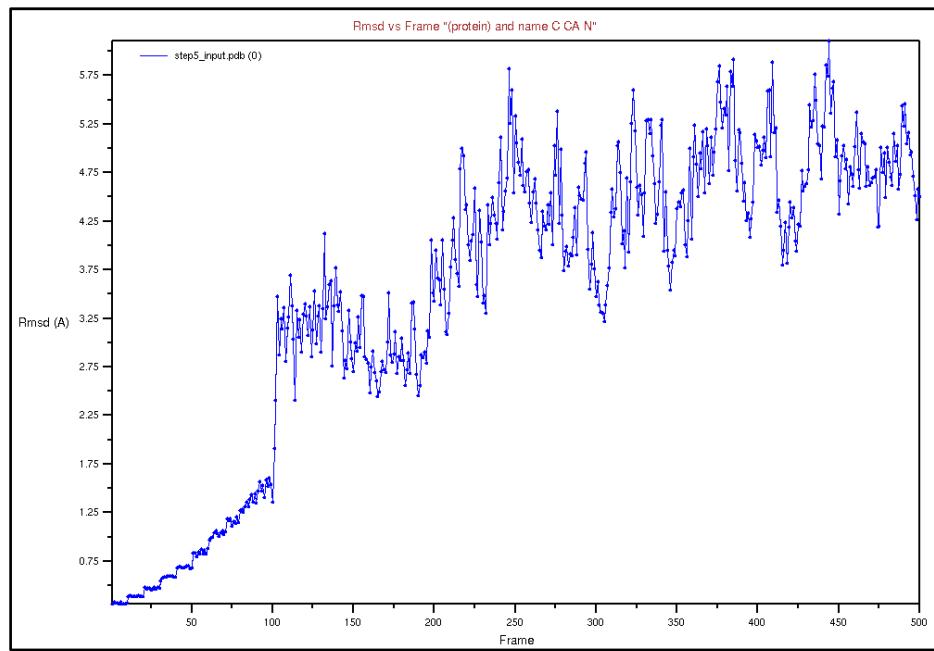


Figure 12 : Tracé RMSD de l'état simulé E1P dans un environnement aqueux

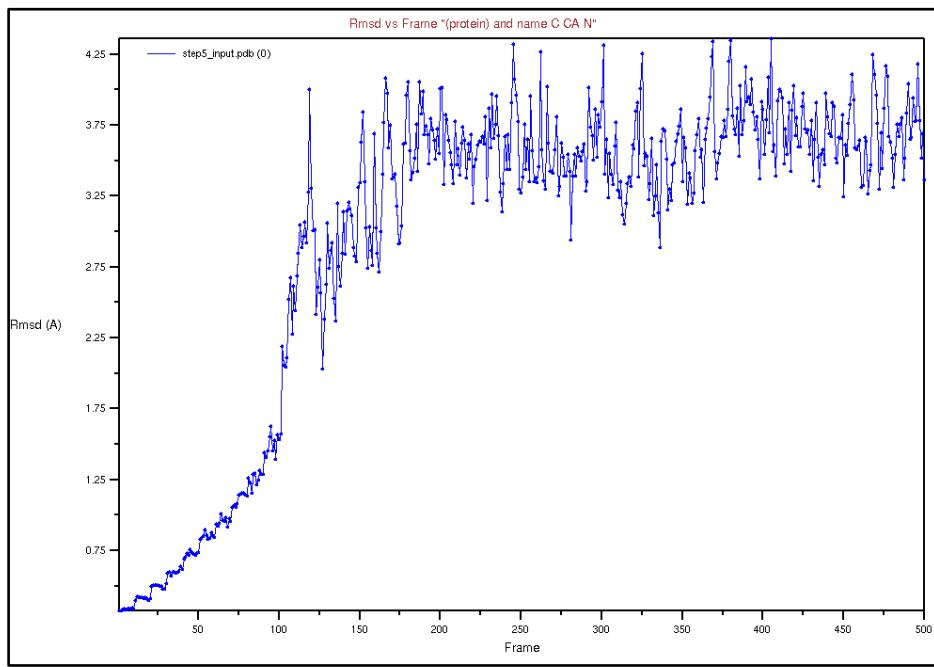


Figure 13 : Tracé RMSD de l'état simulé E1P dans un environnement membranaire

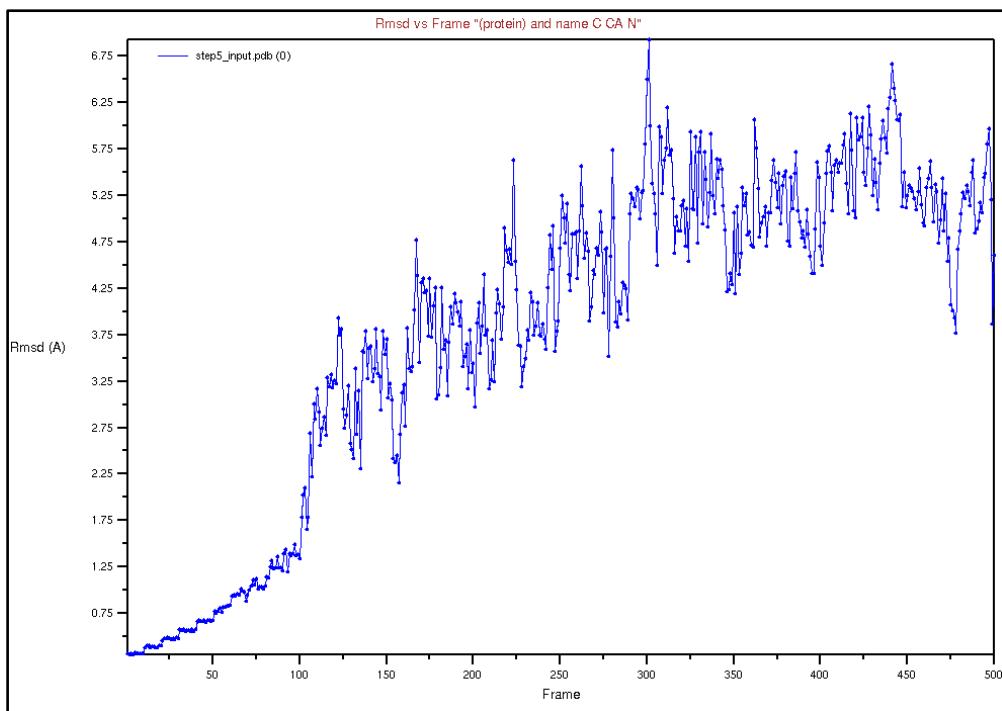


Figure 14 : Tracé RMSD de l'état simulé E2P-ATP dans un environnement aqueux

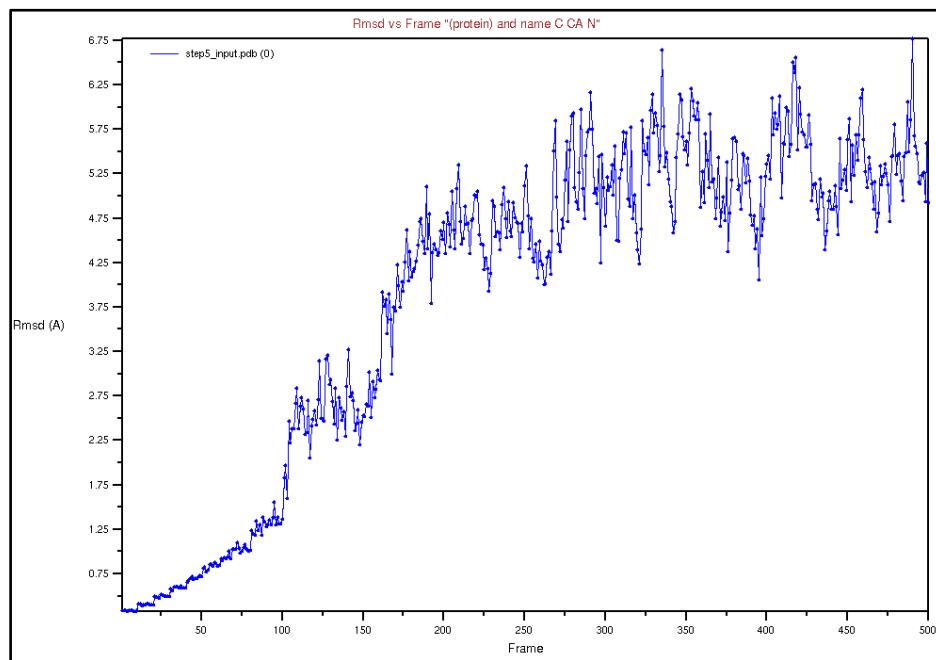


Figure 15 : Tracé RMSD de l'état simulé E2P-ATP dans un environnement membranaire

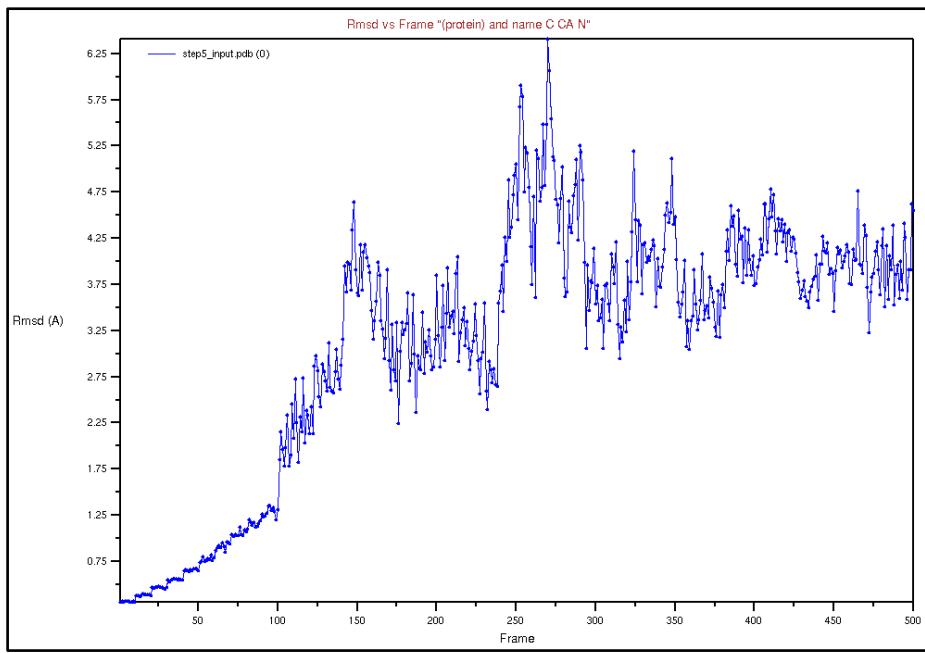


Figure 16 : Tracé RMSD de l'état simulé E1-ATP dans un environnement aquueux

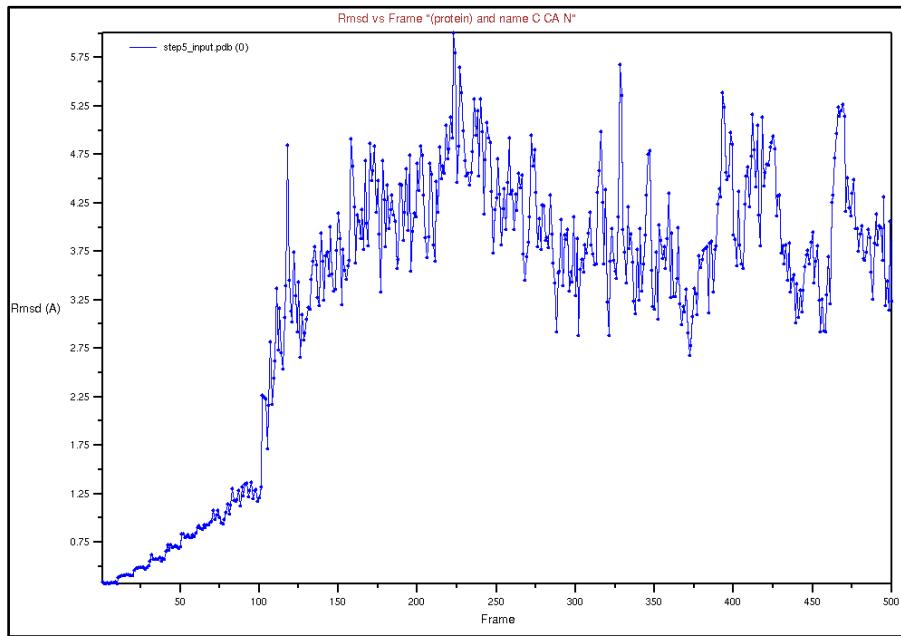


Figure 17 : Tracé RMSD de l'état simulé E1-ATP dans un environnement membranaire

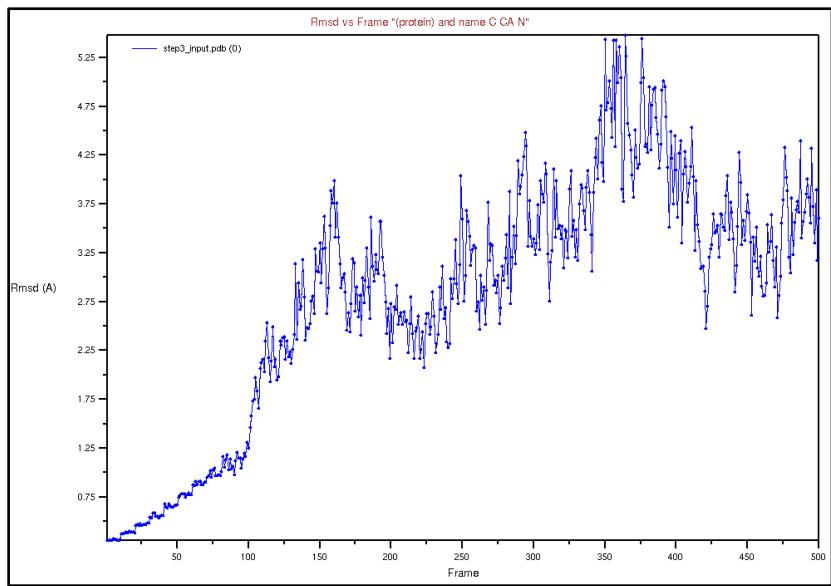


Figure 18 : Tracé RMSD de l'état simulé E1P-ADP dans un environnement aqueux

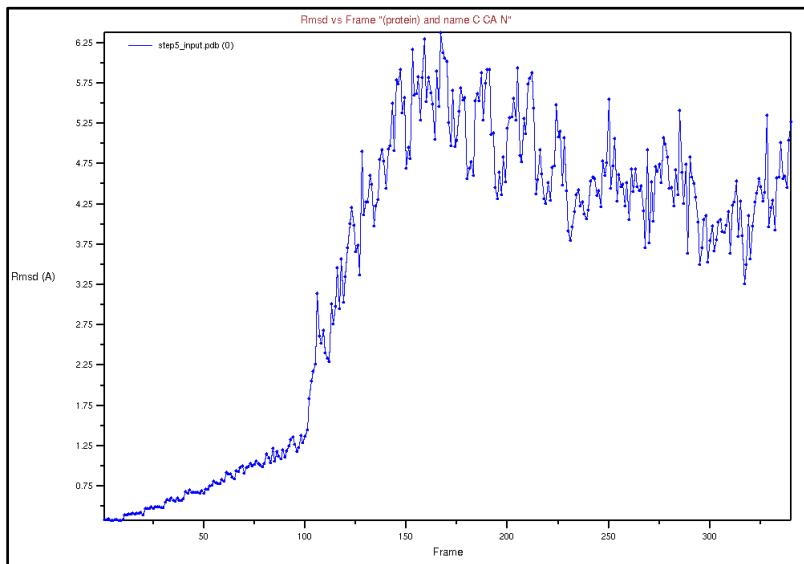


Figure 19 : Tracé RMSD de l'état simulé E1P-ADP dans un environnement membranaire

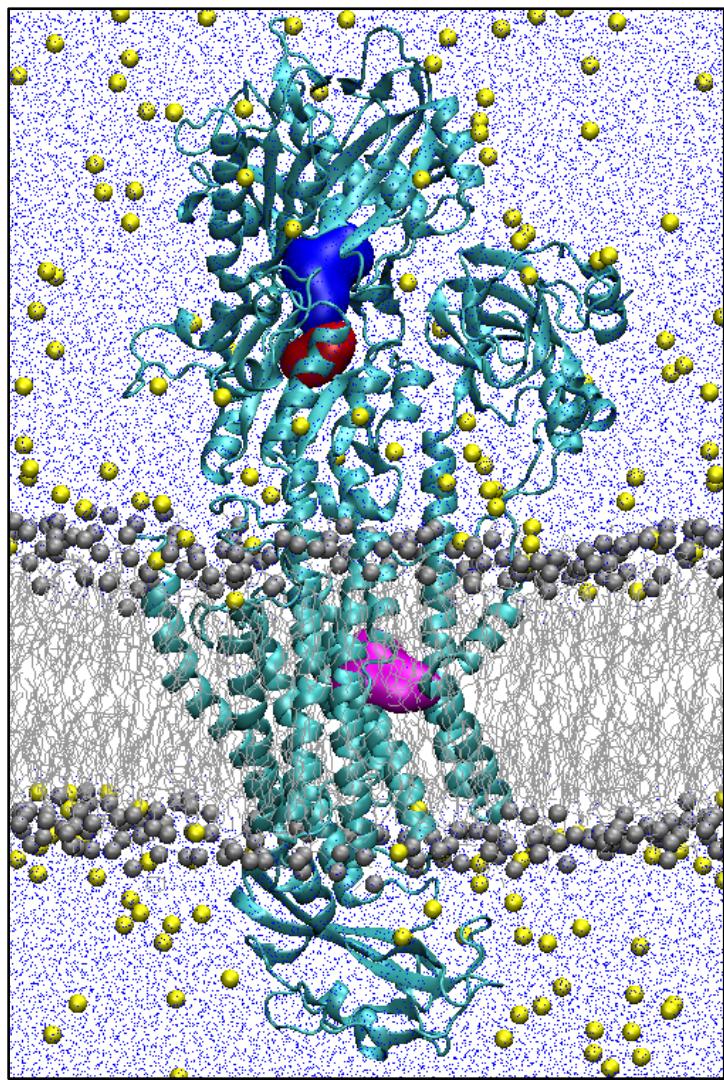


Figure 20: Modèle moléculaire de PfATP4 et ses différents domaines (N : site de liaison du ligand en bleu, P : site de phosphorylation en rouge et A : site de coordination des ions sodium en violet)

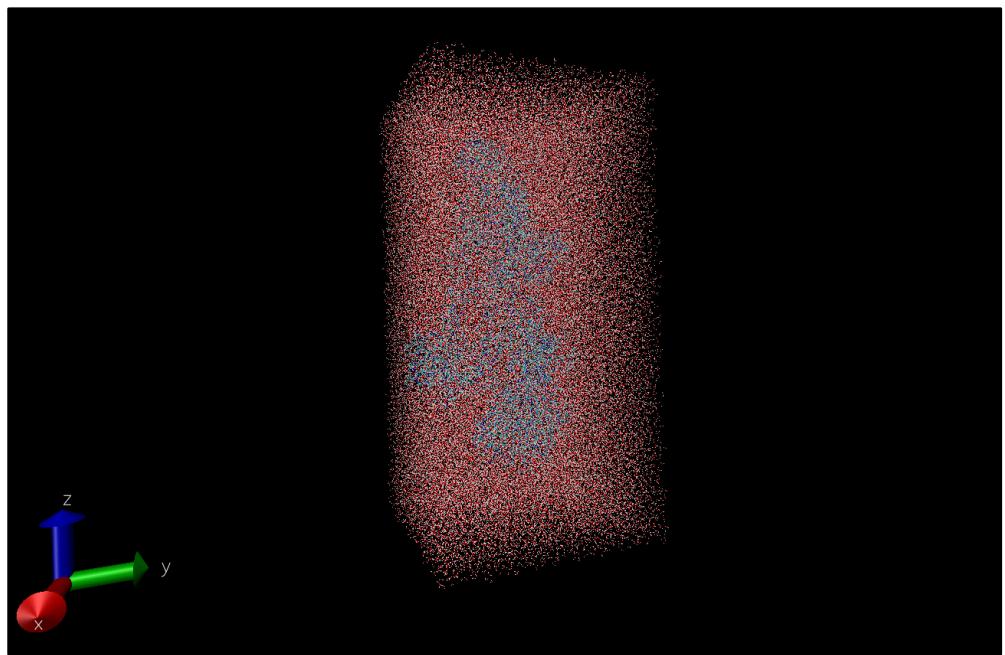


Figure 21 : Modèle de l'état E1P de PfATP4 modélisé dans un environnement purement aqueux (réPLICATION de cette boîte d'eau pour simuler une dilution infinie)

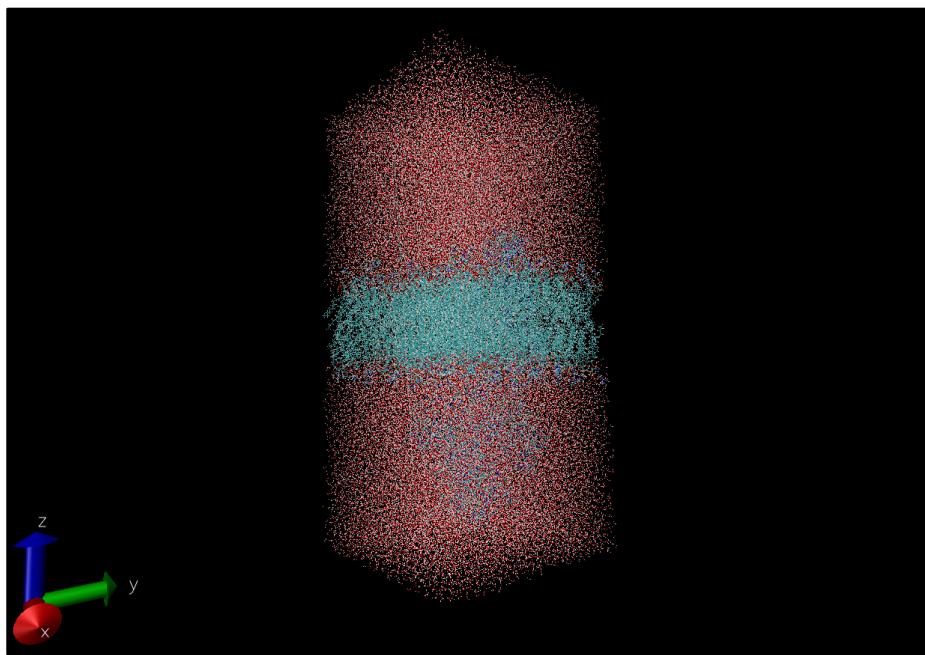


Figure 22 : Modèle de l'état E1P de PfATP4 modélisé dans un environnement membranaire

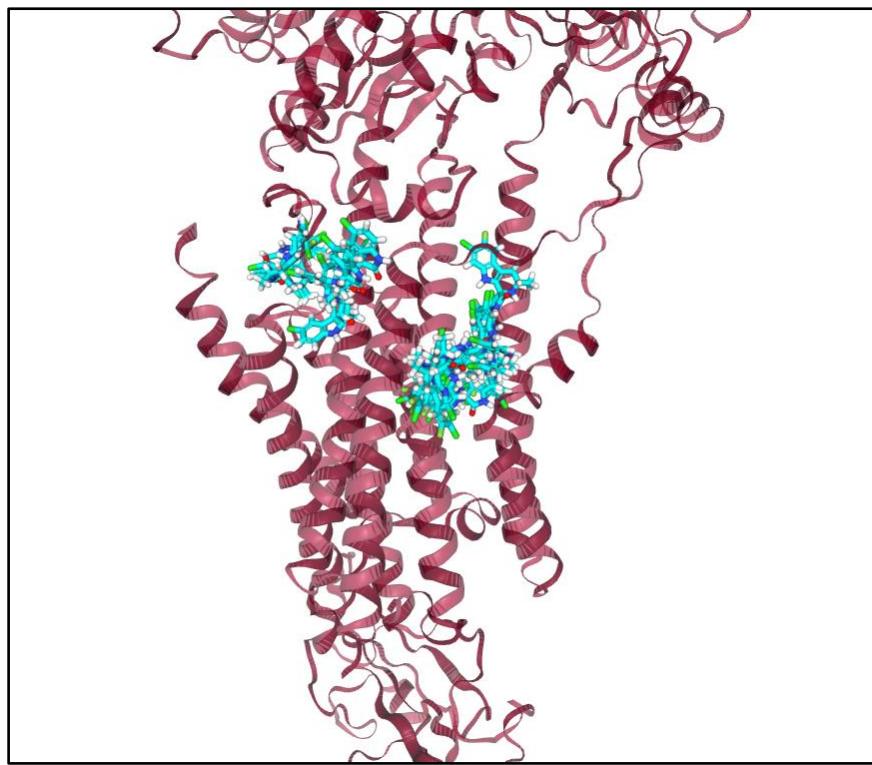


Figure 23 : Résultats du docking de la cipargamine (CHARMM-GUI)

View	Package	Ligand	Model	Score					
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	1	-9.00:Rank01	<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	8	-7.14:Rank08
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	2	-8.80:Rank02	<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	9	-7.01:Rank09
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	3	-8.00:Rank03	<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	10	-6.70:Rank10
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	4	-7.40:Rank04	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	1	-2.02:Rank06
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	5	-7.30:Rank05	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	2	-1.36:Rank10
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	6	-7.20:Rank06	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	3	-2.27:Rank02
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	7	-6.90:Rank07	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	4	-2.15:Rank03
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	8	-6.90:Rank07	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	5	-2.56:Rank01
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	9	-6.80:Rank09	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	6	-1.44:Rank08
<input checked="" type="checkbox"/>	vina	cipargamine.sdf	10	-6.80:Rank09	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	7	-1.69:Rank07
<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	1	-9.02:Rank01	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	8	-1.42:Rank09
<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	2	-8.78:Rank02	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	9	-2.12:Rank05
<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	3	-8.51:Rank03	<input checked="" type="checkbox"/>	rxdock	cipargamine.sdf	10	-2.14:Rank04
<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	4	-7.94:Rank04	Showing 1 to 30 of 30 entries				
<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	5	-7.76:Rank05	Previous				
<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	6	-7.59:Rank06	Next				
<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	7	-7.36:Rank07					
<input checked="" type="checkbox"/>	smina	cipargamine.sdf	8	-7.14:Rank08					

Figure 24 : Tableau de rang(score) du docking de la cipargamine (CHARMM-GUI)