



HAL
open science

Toxoplasma gondii : étude du réseau de nanotubes membranaires de la vacuole parasitophore et des protéines GRA associées

Amina Bittame

► **To cite this version:**

Amina Bittame. Toxoplasma gondii : étude du réseau de nanotubes membranaires de la vacuole parasitophore et des protéines GRA associées. Virologie. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV001 . tel-00548744v2

HAL Id: tel-00548744

<https://theses.hal.science/tel-00548744v2>

Submitted on 4 Apr 2011

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Virologie/Microbiologie/Immunologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Amina BITTAME

Thèse dirigée par **Corinne MERCIER** et
codirigée par **Jean GAGNON**

préparée au sein du **Laboratoire Adaptation et Pathogénie des
Microorganismes, CNRS UMR 5163**
Laboratoire rattaché à l'**École Doctorale Chimie et Sciences du
Vivant**

***Toxoplasma gondii* :** **Etude du réseau de nanotubes membranaires de la vacuole parasitophore et des protéines GRA associées**

Thèse soutenue publiquement le **14 Janvier 2011**,
devant le jury composé de :

Pr. Franck FIESCHI

PR, Institut de Biologie Structurale, Grenoble (Président)

Dr. Bruno ANTONNY

DR, CNRS UMR 6097, Nice (Rapporteur)

Dr. Stanislas TOMAVO

DR, CNRS UMR 8204-INSERM U1019, Lille 2 (Rapporteur)

Pr. Catherine BRAUN-BRETON

PR, CNRS UMR 5235, Montpellier 1-2 (Examinateur)

Dr. Corinne MERCIER

MCU, CNRS UMR 5163, Grenoble (Membre)

Dr. Jean GAGNON

DR, CNRS UMR 5163, Grenoble (Membre)



Remerciements

Au terme de ce travail, j'adresse mes plus vifs remerciements à :

◆ Dr. Corinne Mercier, mon « *Coach* » principal de thèse. Merci Corinne : tu as cru en moi, tu as accepté de m'encadrer durant toutes ces années ; je te remercie de m'avoir permis de mener à bien ce travail malgré toutes les difficultés... Ta rigueur, ta disponibilité, ton perfectionnisme, ta détermination et ta passion pour le projet ont été les clés de la réussite de ce travail. Merci pour toutes tes corrections du manuscrit très tard dans la nuit. Au delà de l'encadrement scientifique, j'ai trouvé en toi une confidente précieuse, avec qui j'ai partagé des moments forts...

◆ Dr. Jean Gagnon, mon deuxième « *Coach* » de thèse. Merci Jean pour ta confiance, ta disponibilité, ta pédagogie, ton agréable caractère. Ton énorme expertise dans le monde passionnant de la biochimie m'a rendu ce travail avec des protéines membranaires plus qu'un plaisir! Merci aussi pour ton écoute, tes encouragements, ton soutien et d'avoir supporté mes humeurs dépressives tout au long de ces années.

◆ Dr. Marie-France Cesbron Delauw, directrice du laboratoire, de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son groupe et pour sa confiance. Merci Marie-France pour vos conseils avisés, vos coups de pouce et votre humanité.

◆ Je remercie chaleureusement tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Un remerciement spécial à mes rapporteurs, Drs. Bruno Antonny et Stanislas Tomavo. Merci à Madame le Pr. Catherine Braun-Breton et Monsieur le Pr. Franck Fieschi d'avoir accepté le rôle d'examineurs.

◆ Je tiens à remercier tous nos collaborateurs, sans qui ce travail n'aurait pas été possible, en particulier Drs. Eric Maréchal, Edgar Gentillhomme, Winfried Weissenhorn, Gregory Effantin, Guy Schoen, Marc Jamin, Nicole Thielens, Aleixei Grichine, Maryse Lebrun et Jean François-Dubremetz.

En espérant n'avoir oublié personne, je tiens à remercier tous les membres du LAPM :

◆ Je commence par le groupe « *Toxo* ». Un merci spécial à Graciane Pêtre, avec qui j'ai partagé le plaisir de travailler sur les protéines GRA et l'énorme chance d'avoir des anticorps fabuleux pour de merveilleux WB! Merci pour ta joie, ton aide et ton amitié précieuse ; Corinne Loeuillet : une autre incroyable amie : merci pour les allers-retours au P3 quand la centri s'arrêtait ! Merci pour les agréables moments passés ensemble autour d'un couscous ou autres...; Cordelia Bisanz : tu m'as épaulée jusqu'à la dernière minute ; merci pour tes gâteaux excellents et ton grand cœur ; Céline Colombani, avec qui j'ai partagé d'agréables moments de détente ; ta zénitude me repose quand la météo du labo est nuageuse! Merci aussi à Bastien Touquet : j'ai beaucoup apprécié ton esprit positif ; Pierre Cavallès : tes interventions scientifiques m'ont toujours été bénéfiques ; merci aussi pour tes astuces informatiques infaillibles ; Delphine Aldebert : merci pour ta gentillesse ; les jumelles Aurélie et Rose-Laurence. Je remercie également les stagiaires Anne, Khady, Vincent, François, Mélanie et Justine : votre participation a permis de faire évoluer ce travail.

Je tiens à remercier, les « *Ex-Toxo* » : Karine Musset, pour ton aide au cours de mon DEA et surtout pour la production des cellules HeLa, pour ta gentillesse et ton amitié durable ; Pauline Ruffiot, Claire Gendrin et Laetitia Travier : pour votre sympathie... la fin de vos travaux était le début de mon aventure de thèse ; Cyrille Botté pour ta bonne humeur : il paraît que ton aventure dans le monde des parasites continue, alors bonne chance!

◆ De l'autre côté du labo, je tiens à remercier Mohamed-Ali Hakimi pour ses conseils et ses encouragements tout au long de ces années. Tes réflexions constructives m'ont stimulée à avancer. Un grand merci à Dominique Canella : t'avoir en voisine de paillasse, un vrai bonheur ! Tes encouragements et les fous rires ont été une vraie dose d'adrénaline pour surmonter les aléas de la thèse. Merci aussi à Céline Sautel, Laurence Braun et Alex Bougdour.

◆ Mes pensées vont à nos amis « *Bactério* » : merci à tous pour votre aide et votre gentillesse. Un merci spécial à Evelyne Coursange, avec qui j'ai entretenu une sincère relation. Merci à Joël Gaffé et Stéphan Lacour pour leur gentillesse et de m'avoir donné la chance de faire des enseignements...

◆ De l'autre bout du couloir, je remercie tout mes amis « *Prion* », Catherine, Chantal, Paul, Camille. Je remercie également Dr. Yahia Chebloune qui m'a beaucoup soutenue et qui de par sa grande expérience, m'a suggéré des pistes pour l'après-thèse...Merci aussi à Bilel et bon courage pour ta thèse...

◆ Merci enfin aux secrétaires du LAPM pour leur bonne humeur.

Dédicaces

A mes très chers parents, Mohamed et Fatima, qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail, toute ma reconnaissance et tout mon amour.

Merci à ma sœur Oumnia, tous mes frères et mes belles sœurs. Un merci spécial à Fawzi et à son épouse Nadia, qui m'ont épaulée et accompagnée lors de mes premiers pas en France! Ce que vous m'avez apporté est énorme! Merci beaucoup!

A mes très chers amis et à toutes les personnes qui me sont très chères...

Amina

Table des matières

Liste de publications	1
Liste des abréviations les plus courantes	1
Avant propos	2
INTRODUCTION	
CHAPITRE I : Le parasite <i>Toxoplasma gondii</i>, agent causal de la toxoplasmose	5
I-1) Découverte du parasite	6
I-2) Phylogénie du parasite	7
I-3) Le cycle parasitaire	8
1) Le cycle sexué	8
2) Le cycle asexué	10
I-4) Polymorphisme génétique de <i>T. gondii</i>	12
♦ Le génotype I	12
♦ Le génotype II	13
♦ Le génotype III	13
I-5) Mise en place de la réponse immunitaire	14
1) Mise en place de la réponse innée	14
2) Mise en place de la réponse adaptative	18
3) Phase chronique - Persistance du parasite	21
I-6) Prévalence de la toxoplasmose	22
I-7) Physiopathologie de la toxoplasmose	24
1) La toxoplasmose, une infection généralement bénigne	24
2) Toxoplasmose provoquée par les souches hypervirulentes	25
3) Influence de l'infection toxoplasmique sur le comportement de l'hôte et lien avec certaines maladies mentales	25
I-8) Diagnostic, traitements et vaccins	26
1) Diagnostic de la toxoplasmose	26
2) Les traitements de la toxoplasmose	26
3) Les vaccins contre la toxoplasmose	27
CHAPITRE II : Mise en place de la vacuole parasitophore	29
II-1) Invasion de la cellule hôte et formation de la VP	31
1) <i>T. gondii</i> , un parasite très mobile	32
2) Phase initiale de l'attachement du parasite à la cellule hôte : rôle des protéines de la membrane plasmique	33
3) Attachement apical du parasite à la cellule hôte : rôle des protéines de micronèmes	34
4) Extrusion du conoïde	37
5) Propulsion dans la cellule hôte grâce au glideosome	38
a) le complexe membranaire interne (IMC) et le réseau sous-pelliculaire	39
b) les microtubules sous-pelliculaires	40
c) Le cytosquelette d'actine	41
d) La myosine	42
e) Le glideosome	42
6) Tri des protéines cellulaires admises dans la membrane de la VP : coopération des protéines de micronèmes et des protéines RON de rhoptries pour former la jonction mobile .	44
a) Les rhoptries	44
b) La jonction mobile	45
7) Formation de la membrane de la VP : rôle des protéines ROP du bulbe des rhoptries	47
II-2) Maturation de la vacuole parasitophore : rôle des protéines de granules denses	49
1) Origine des lipides de la VP	50
a) Lipides acquis à partir de la cellule hôte	50
b) Lipides synthétisés par le parasite	51
♦ Le réticulum endoplasmique	51
♦ La mitochondrie	52
♦ L'apicoplaste	52
c) Exportation de lipides vers la PV	53
2) Structures membranaires caractéristiques de la VP	54
a) La membrane vacuolaire, interface d'échanges entre le parasite et la cellule hôte	54
b) Les extensions de la VP dans le cytoplasme de la cellule hôte	55
c) Les HOST (Host Organelles Sequestering Tubulo-structures)	56
d) Le réseau de nanotubes membranaires (RNM)	57
3) Protéines parasitaires impliquées dans la maturation de la VP	59
a) Les protéines ROP	59
b) Les protéines de granules denses	59
Les protéines GRA	60
♦ Peptide signal N-terminal	60
♦ Domaines hydrophobes	61

♦ Domaines particuliers	61
♦ Modifications post-traductionnelles	61
Ciblage des protéines vers les GD	63
Sécrétion des protéines de GD	64
♦ Sécrétion constitutive	64
♦ Sécrétion régulée	64
Trafic post-sécrétoire des protéines GRA	65
Fonction des protéines GRA	66
Régulation de l'expression des protéines GRA lors de l'enkystement	70
4) <i>Modifications de la cellule hôte suite à la formation de la VP</i>	70
a) Redistribution des microtubules et des filaments intermédiaires contre la VP	71
b) Redistribution des endo-lysosomes	71
c) Redistribution des mitochondries et du réticulum endoplasmique	72
d) Manipulation des voies de signalisation de la cellule hôte	73
II-3) <i>Multiplication intracellulaire des parasites par endodyogénie à l'intérieur de la VP</i>	74
III-4)- <i>Evasion des parasites (egress)</i>	76

CHAPITRE III : Etude des mécanismes de déformation membranaire **78**

III-1) <i>Exemples de microorganismes pathogènes utilisant un système de tubulation membranaire comme support potentiel de pathogénicité</i>	79
1) <i>Utilisation par un virus, des nanotubes membranaires établis entre deux cellules, pour se propager à une cellule non infectée</i>	80
2) <i>Les Salmonella induced-filaments (Sifs) de Salmonella</i>	81
3) <i>Le réseau tubovésiculaire (TVN) de Plasmodium falciparum</i>	84
III-2) <i>Mécanismes de déformation membranaire</i>	86
1) <i>Génération de courbure membranaire dépendante uniquement des lipides de membrane</i>	89
2) <i>Courbure membranaire générée par l'insertion de protéine(s) dans la membrane</i>	90
a) Critères pour l'insertion d'un domaine transmembranaire d'une protéine dans une membrane	90
♦ Insertion spontanée d'une protéine dans les membranes	91
♦ Stabilisation des protéines après insertion	92
b) Génération et maintenance d'une courbure membranaire à l'aide d'une protéine	93
♦ Mécanisme de charpentage (« scaffolding mechanism »)	94
♦ Mécanisme de courbure spontanée locale : « wedging effect »	97
- Insertion d'un segment hydrophobe en épingle dans la membrane	97
- Insertion d'une AAH dans la membrane et notion de senseur de courbure	98

Objectifs des travaux de thèse **107**

RESULTATS

CHAPITRE I : Caractérisation des protéines GRA associées au RNM **110**

I- 1) <i>Etude de la compaction des protéines GRA depuis les GD jusqu'à la VP</i>	111
1) <i>Etude de l'état de compaction des protéines GRA par séparation isopycnique sur gradient linéaire de glycérol</i>	111
a) Profil de sédimentation des protéines GRA de la fraction soluble des granules denses	112
b) Profil de sédimentation des protéines GRA de la fraction vacuolaire soluble	112
c) Bilan comparatif : différentes formes de solubilisation des protéines GRA	114
2) <i>Nature des interactions nécessaires au maintien des complexes de protéines GRA sous forme soluble</i>	115
3) <i>Rôle des lipides dans la solubilisation des protéines GRA</i>	116
I- 2) <i>Caractérisation d'une nouvelle protéine GRA associée au RNM, GRA12</i>	118

ARTICLE N°1 **121**

CHAPITRE II : Spécificité d'adressage des protéines GRA associées au RNM **131**

II- 1) <i>Suffisance du domaine Nter de GRA6 pour l'adressage de la protéine aux membranes du RNM</i>	132
II- 2) <i>Nécessité du domaine Nter de GRA6 pour l'adressage de la protéine au RNM</i>	133
II- 3) <i>Existe-il des affinités du domaine Nter de GRA6 vis-à-vis de certains lipides membranaires ?</i>	133

ARTICLE N°2 **135**

CHAPITRE III : Contribution de GRA2 et GRA6 à la formation du RNM **148**

III-1) <i>Etude des protéines recombinantes</i>	149
III-2) <i>rGRA2 s'associe préférentiellement aux SUVs de 100 nm de diamètre qu'elle déforme en courts tubules membranaires</i>	150
III-3) <i>rGRA6 facilite la formation des tubules membranaires initiés par rGRA2</i>	153

ARTICLE N°3 **154**

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1) Caractérisation des protéines GRA associées au RNM et solubilisation de ces protéines dans la PV avant association membranaire	185
2) Adressage des protéines GRA au RNM : rôle de(s) domaine(s) protéique(s) particulier(s)	189
3) Implication des protéines GRA2 et GRA6 dans la formation du RNM	191
Bilan des travaux présentés dans ce manuscrit	197

MATERIEL & METHODES

CHAPITRE I : Obtention des protéines	200
I-1) Obtention des souches parasitaires exprimant les protéines GRA	200
1) Récapitulatif des souches parasitaires utilisées	200
2) Maintien des souches parasitaires en culture	201
I-2) Obtention des protéines GRA à partir du parasite	201
1) Obtention des protéines GRA à partir de parasites extracellulaires	201
2) Obtention des protéines GRA par fractionnement des produits vacuolaires	202
3) Sécrétion in vitro des protéines granulaires	203
4) Purification de la protéine GRA2-HA-FLAG par affinité sur résine FLAG à partir du parasite ou de la fraction vacuolaire	203
I-3) Séparation isopycnique des protéines GRA purifiées à partir du parasite, sur gradient linéaire de glycérol	
I-4) Obtention des protéines GRA exprimées en bactéries	204
1) Tableau récapitulatif des protéines recombinantes utilisées	204
2) Purification des protéines pUET-GRA par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel puis chromatographie d'exclusion de taille	205
3) Dosage des protéines par la méthode Bradford	206
I-5) Méthodes d'analyse des protéines GRA recombinantes	207
1) Etude de la structure secondaire des protéines recombinantes par dichroïsme circulaire	207
2) Etude de la dispersion des protéines recombinantes en solution par diffusion dynamique de la lumière	207
3) Etude des protéines recombinantes par microscopie électronique à transmission	207
4) SDS-PAGE et détection des protéines par coloration au bleu de Coomassie ou par immunoblot	208
a) Séparation des protéines par SDS-PAGE	208
b) Détection des protéines par immunoblot	208
c) Anticorps utilisés pour la détection des protéines	209
CHAPITRE II : Obtention des lipides, formation et contrôle des Small Unilamellar Vesicles (SUVs)	211
II-1) Obtention des lipides utilisés pour la formation des liposomes	211
1) Lipides commerciaux	211
2) Lipides naturels, obtenus à partir de cellules HeLa, après extraction selon la méthode de Bligh and Dyer (1959)	211
3) Quantification des glycérophospholipides (extraits à partir de cellules HeLa) par méthanolyse puis chromatographie en phase gazeuse	212
II-2) Formation et contrôle des Small Unilamellar Vesicles (SUVs)	213
1) Mélanges de lipides utilisés pour former les SUVs	213
2) Techniques de formation des SUVs par sonication ou par extrudation	214
3) Contrôle de l'homogénéité des SUVs par diffusion dynamique de lumière (DLS) après une étape de chromatographie d'exclusion de taille	214
a) Chromatographie d'exclusion de taille	215
b) DLS utilisant le « DawnEos Enhanced Optical system »	215
4) Contrôle de l'homogénéité des SUVs par DLS utilisant le Zetasizer	216
CHAPITRE III : Méthodes d'études des interactions protéines / lipides	217
III-1) Tests de superposition protéines / lipides (« Fat Blots »)	217
III-2) Tests et analyses de l'association des protéines aux SUVs	218
1) Incubation des protéines avec les SUVs	218
2) Analyse de l'association des protéines aux liposomes par ultracentrifugation puis immunoblot	218
3) Traitements dénaturants des protéines associées aux membranes	218
4) Analyse de l'association des protéines aux SUVs par flottaison dans un gradient de sucrose	219
5) Analyse par Microscopie Electronique à Transmission (TEM) après coloration négative	219

BIBLIOGRAPHIE

Liste de publications

◆ Publications

1- Amina Bittame, Grégory Effantin, Anne Valat, Edgar Gentilhomme, Eric Maréchal, Graciane Pêtre, Pauline Ruffiot, Laetitia Travier, Marc Jamin, Guy Schoen, Winfried Weissenhorn, Marie-France Cesbron-Delauw, Jean Gagnon and Corinne Mercier. **The Toxoplasma GRA2 and GRA6 proteins cooperate to generate membranous nanotubes.** *In preparation*

2- Martin Koethe, Susan Pott, Martina Ludewig, Berit Bangoura, Birte Zöller, Arwid Dauschies, Astrid M. Tenter, Katrin Spekker, Amina Bittame, Corinne Mercier, Karsten Fehlhaber, Reinhard and K. Straubinge. **Prevalence of specific IgG-antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic turkeys determined by kinetic ELISA based on recombinant GRA7 and GRA8.** *Submitted to Veterinary Parasitology.*

3- Claire Gendrin, Amina Bittame, Corinne Mercier and Marie-France Cesbron-Delauw. (2010). **Post-translational membrane sorting of the *Toxoplasma gondii* GRA6 protein into the parasite-containing vacuole is driven by its N-terminal domain.** *International Journal for Parasitology*, 40:1325-1334.

4- Adeline Michelin, Amina Bittame, Yann Bordat, Laetitia Travier, Corinne Mercier, Jean-François Dubremetz and Maryse Lebrun. (2009) **GRA12, a *Toxoplasma dense granule* protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network.** *International Journal for Parasitology*. 39: 299-306.

Chapitre d'ouvrage

- Corinne Mercier, Laetitia Travier, Amina Bittame, Claire Gendrin and Marie-France Cesbron-Delauw. (2010) **The dense granule proteins of *Toxoplasma gondii*.** in "Parasitology Research Trends", Ed.: Olivier De Bruyn and Stephane Peeters. Series: Medicine and Biology Research Developments (Series Editor - Tsisana Shartava, M.D. - Tbilisi, Georgia). Nova Science Publishers. pp. 1-31.

◆ Communications orales

1- Amina Bittame, Gregory Effantin, Edgar Gentilhomme, Eric Maréchal, Marc Jamin, Winfried Weissenhorn, Marie-France Cesbron-Delauw, Jean Gagnon and Corinne Mercier. (2010) **The parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*: characterization of the membrane tubulation mechanism induced by the GRA2 protein.** 22^{ème} Congrès de la Société Française de Biophysique, Architecture & Information de la Structure de la Cellule. Groupes d'Etudes des Interactions Molécules-Membranes-GEIMM14. La Colle sur Loup, France.

2- Amina Bittame, Edgar Gentilhomme, Gregory Effantin, Eric Maréchal, Marc Jamin, Winfried Weissenhorn, Marie-France Cesbron-Delauw, Jean Gagnon and Corinne Mercier. (2010) **The parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*: characterization of the membrane tubulation mechanism induced by the GRA2 protein.** Réunion du « Club Toxo ». Institut Cochin, Paris, France.

3- Amina Bittame. (2009) **The parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*: membrane tubulation induced by the GRA2 protein.** Journée Scientifique du Cluster Infectiologie. EPANI, Isle d'Abeau, France.

4- Amina Bittame. (2009) **Vacuole parasitophore de *Toxoplasma gondii* : tubulation membranaire induite par la protéine GRA2.** Journée de l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant. Institut des Neurosciences de Grenoble.

5- Amina Bittame, Pauline Ruffiot, Laetitia Travier, Edgar Gentilhomme, Paul Erlich, Jean Gagnon, Marie-France Cesbron-Delauw and Corinne Mercier. (2008) **Formation of the *Toxoplasma* vacuolar membranous nanotubular network: GRA2 as a model system.** Réunion du «Club Toxo ». Institut Cochin, Paris, France

◆ Communications par poster

1- Amina Bittame, Edgar Gentilhomme, Gregory Effantin, Eric Maréchal, Marc Jamin, Winfried Weissenhorn, Marie-France Cesbron-Delauw, Jean Gagnon and Corinne Mercier. (2010) **The parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*: membrane tubulation induced by the GRA2 protein.** Journée Scientifique du Cluster Infectiologie. EPANI, Isle d'Abeau, France.

2- Martin Koethe, Berit Bangoura, Susan Pott, Birte Zöller, Martina Ludewig, Arwid Dauschies, Karsten Fehlhaber, Amina Bittame, Corinne Mercier, Marie-France Cesbron-Delauw, Walter Däubener and Reinhard K. Straubinger. (2008) **The usefulness of recombinant antigens derived from *Toxoplasma gondii* in a turkey-specific ELISA.** Toxoplasma Centennial Congress, Rio de Janeiro, Brazil.

3- Amina Bittame, Pauline Ruffiot, Laetitia Travier, Edgar Gentilhomme, Paul Erlich, Jean Gagnon, Marie-France Cesbron-Delauw and Corinne Mercier. (2008) **Formation of membranous tubules: the GRA2 protein of *Toxoplasma gondii* as a model system.** 1st meeting. Fédération Réaumur des Sciences du Vivant, Grenoble, France.

4- Amina Bittame, Pauline Ruffiot, Laetitia Travier, Edgar Gentilhomme, Paul Erlich, Jean Gagnon, Marie-France Cesbron-Delauw and Corinne Mercier. (2008) **Formation of membranous tubules: the GRA2 protein of *Toxoplasma gondii* as a model system.** Journée Recherche en Biologie, UFR de Biologie, Université Joseph Fourier.

5- Amina Bittame, Pauline Ruffiot, Laetitia Travier, Edgar Gentilhomme, Paul Erlich, Jean Gagnon, Marie-France Cesbron-Delauw and Corinne Mercier. (2008) **Formation of membranous tubules: the GRA2 protein of *Toxoplasma gondii* as a model system.** Journée Scientifique du Cluster Infectiologie, Isle d'Abeau, France.

◆ Autre

- **Participation à la rédaction d'un article dans la gazette de la Société Française de Biophysique (SFB). (2010).** Bilan scientifique du 22^{ème} Congrès de la SFB, Architecture & Information de la Structure de la Cellule. Groupes d'Etudes des Interactions Molécules-Membranes-GEIMM14. La Colle sur Loup, France. *Sous presse.*

Expériences d'enseignement

- **Septembre-Décembre 2008 et Septembre-Décembre 2009 : Vacances**

- **64 H de Travaux Pratiques de Biologie Cellulaire. Licence 2.** Département des Licences en Sciences et Technologies (DLST) , Université Joseph Fourier.

- **64 H de Travaux Pratiques de Génétique Microbienne. Licence 2.** UFR de Biologie, Université Joseph Fourier.

Expériences d'encadrement d'étudiants

- **Avril-Juillet 2010** (stage de 8 semaines) : **Co-encadrement** d'une étudiante en deuxième année, à l'école d'ingénieurs Phelma (Systèmes et Microsystèmes pour la Physique et les Biotechnologies), INPG-Minatec, Grenoble.

- **Avril-Mai 2010** (stage de 8 semaines) : **Co-encadrement** d'une étudiante en Licence 3 de Biologie, Université Joseph Fourier

- **Janvier-Mars 2010** (stage de 8 semaines) : **Co-encadrement** d'un étudiant de Master 1 en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université de Franche-Comté.

- **Juin-Juillet 2009** (stage de 8 semaines) : **Co-encadrement** d'un étudiant de Master 1 en Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Joseph Fourier

- **Avril-Mai 2009** (stage de 8 semaines) : **Encadrement** d'une étudiante de Master 1 en Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Joseph Fourier

Animation scientifique

- **2008 et 2009** : Participation à la Fête de la Science.

Stand de l'Institut des Neurosciences de Grenoble. Techniques d'exploration du cerveau : Conception de posters didactiques sur les techniques d'observation des cellules neuronales. Village des Sciences, Place Victor Hugo, Grenoble.

Formations suivies au cours de la thèse

- **Juin 2010** : 13^{ème} Journée Biotechno. Rencontres jeunes chercheurs/entreprises. Présentation des grandes sociétés de biotechnologies de l'agglomération grenobloise. Espace de l'Ouest Lyonnais.

- **Février 2010** : Initiation à la cytométrie en flux. Université Joseph Fourier, UFR de Pharmacie, Grenoble.

- **Février-Juin 2010** : Anglais courant. CNRS, Chambre de Commerce et de l'Industrie, Grenoble.

- **Janvier 2010** : Didactique de l'enseignement supérieur. Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur (CIES), Grenoble.

- **Mai 2009** : Initiation à la microscopie photonique en biologie. UFR de Biologie, Université Joseph Fourier.

- **Mai 2008** : Protéines membranaires et transports. Centre d'Energie Atomique (CEA), Grenoble.

- **Janvier 2008** : Anglais : présentation scientifique, Université Joseph Fourier.

Liste des abréviations les plus courantes

aa : acide aminé

AAH : hélice alpha-amphipathique

DC : dichroïsme circulaire

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DRM : domaine résistant aux détergents

GD : granule dense

GPI : ancre glycosyl phosphatidyl inositol

HOST : tubule de séquestration d'organites de la cellule hôte

IMC : complexe membranaire interne

KO : mutant résultant de la délétion d'un gène

MVP : membrane délimitant la vacuole parasitophore

PI(4,5)P₂ : Phosphatidylinositol (4, 5) bi-phosphate

PVE : extension de la membrane de la vacuole parasitophore dans le cytoplasme de la cellule hôte

RE : reticulum endoplasmique

RNM : réseau de nanotubes membranaires

SPR : résonance plasmonique de surface

LUV : large vésicule lipidique unilamellaire

VP : vacuole parasitophore

Avant propos

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire qui appartient au phylum des Apicomplexa. Il se développe au sein de la cellule hôte (tous les types de cellules de mammifères et d'oiseaux peuvent être infectés), dans un compartiment spécialisé appelé la « vacuole parasitophore » (VP). Ce compartiment constitue l'interface entre le parasite et la cellule-hôte, de qui le parasite dépend pour l'acquisition d'un nombre important de nutriments nécessaires à son développement. L'entrée du parasite dans la cellule hôte, la formation de la VP et le développement du parasite dans la VP sont orchestrés par la sécrétion séquentielle à partir de trois types d'organites de sécrétion spécifiques du phylum, les micronèmes, les rhoptries puis les granules denses (GD).

La VP est caractérisée par trois types de systèmes membranaires : 1) la membrane délimitant la VP, 2) des invaginations de cette membrane sous-tendues par des microtubules cellulaires et 3) un réseau de nanotubes membranaires (RNM) qui connecte les parasites entre eux dans l'espace vacuolaire et qui les connectent également à la membrane vacuolaire. La composition exacte des membranes du RNM est actuellement inconnue. De même, le mécanisme de formation du RNM reste inconnu. Différentes hypothèses, non exclusives l'une de l'autre, ont été émises quant à ses fonctions : 1) il pourrait jouer un rôle structural au sein de la VP afin de faciliter une division synchronisée des parasites ; 2) il pourrait jouer un rôle trophique, en permettant l'import des divers nutriments depuis la cellule hôte ou inversement, en permettant l'export de déchets métaboliques vers la cellule hôte ; 3) il pourrait permettre l'export de protéines parasitaires vers la membrane vacuolaire ou au-delà, dans le cytosol de la cellule hôte et enfin, 4) il pourrait être directement lié à la virulence parasitaire.

Lorsque j'ai commencé ma thèse, 10 protéines regroupées au sein de la famille des protéines GRA, avaient été identifiées comme sécrétées dans la VP à partir des GD, juste après formation de celle-ci. Suite à leur sécrétion dans le compartiment vacuolaire, les 10 protéines GRA avaient été pratiquement toutes détectées aux membranes de la VP (membrane vacuolaire ou ses prolongements membranaires, RNM). Cette localisation membranaire est en accord avec le fait qu'elles présentent dans leur séquence, des domaines d'association membranaire (exemples : hélice alpha-hydrophobe potentiellement transmembranaire dans le cas de GRA6 ou des hélices alpha-amphipatiques dans le cas de GRA2). Néanmoins, que ce soit dans le compartiment granulaire, avant leur sécrétion dans la VP, ou après sécrétion dans la VP, la plupart de ces protéines avaient été décrites comme étant partiellement solubles. La fonction de ces protéines GRA demeure actuellement inconnue. Une approche indirecte basée sur

l'analyse du phénotype de parasites déficients pour l'expression de GRA2 et/ou de GRA6, avait cependant permis de montrer que ces deux protéines sont indispensables à la formation du RNM.

Mon projet de thèse s'est inscrit dans le cadre global de l'étude de la biogenèse de la VP et plus particulièrement, de celle du RNM. Il visait plus précisément, à rechercher comment les protéines GRA sont ciblées aux membranes du RNM et à comprendre quelle est la part des protéines GRA2 et GRA6 dans la biogenèse du RNM.

Dans la première partie de ce manuscrit, je présenterai une introduction au travail effectué, introduction structurée en trois chapitres. Le premier chapitre présentera le contexte biologique de l'étude, c'est-à-dire le parasite *T. gondii* en tant qu'agent pathogène. Le deuxième chapitre introduira les connaissances actuelles concernant la mise en place de la VP et de ses systèmes membranaires, les protéines GRA, leurs particularités et leurs rôles possibles dans la maturation de la VP. Enfin, le troisième chapitre présentera des exemples de systèmes de tubulation membranaire décrits chez des microorganismes pathogènes et précisera l'état actuel des connaissances sur les mécanismes de déformation membranaire. Il amènera à décrire plus en détails, les protéines eucaryotes capables de déformer les membranes, notamment celles faisant appel à des hélices alpha-amphipatiques.

Après avoir rappelé les objectifs du travail sous forme de questions, j'exposerai dans la deuxième partie de ce manuscrit, les résultats de mes travaux de recherche en trois chapitres. Le premier s'attachera à la caractérisation des protéines de GD associées au RNM. Dans ce chapitre, je présenterai l'étude biochimique de l'état de solubilité des protéines GRA depuis les GD jusqu'à leurs membranes cibles, au sein de la VP. Je présenterai également les travaux collaboratifs de caractérisation de GRA12, une nouvelle protéine GRA sécrétée à partir des GD et ciblée aux membranes du RNM (Article N°1). Le deuxième chapitre présentera les travaux collaboratifs visant à déterminer le rôle du domaine N-terminal de GRA6 dans le ciblage de la protéine vers les membranes du RNM (Article N°2). Enfin, le troisième chapitre exposera les résultats concernant la contribution des protéines GRA2 et GRA6 à la formation du RNM. L'approche utilisée a consisté à développer un système minimaliste d'étude *in vitro* des interactions de GRA2 et GRA6 avec les membranes, en utilisant des protéines GRA produites sous forme recombinante chez *Escherichia coli* et un système de petites vésicules lipidiques unilamellaires (SUVs) (Article N°3).

Enfin, dans la troisième partie du manuscrit, je synthétiserai les résultats obtenus, mentionnerai les difficultés rencontrées au cours de ces études et exposerai les perspectives envisagées à la suite de ce travail.

INTRODUCTION

- **CHAPITRE I** : *Le parasite Toxoplasma gondii, l'agent causal de la toxoplasmose*
- **CHAPITRE II** : *Mise en place de la vacuole parasitophore*
- **CHAPITRE III** : *Etude des mécanismes de déformation membranaire*

CHAPITRE I : *Le parasite Toxoplasma gondii, l'agent causal de la toxoplasmose*

Toxoplasma gondii est un protozoaire qui appartient au phylum des *Apicomplexa*. Ce phylum regroupe de nombreux agents pathogènes d'incidence majeure sur les plans médical et vétérinaire (*Plasmodium* responsable du paludisme, *Eimeria* responsable des coccidioses aviaires, etc). *T. gondii* peut infecter tous les animaux à sang chaud, y compris l'homme et les oiseaux, chez lesquels il provoque la toxoplasmose, une des parasitoses humaines les plus répandues dans le monde. Parasite intracellulaire obligatoire, *T. gondii* se multiplie à l'intérieur de la cellule hôte, au sein d'une vacuole parasitophore (VP) qui se forme lors de la phase aiguë de l'infection et qui évolue en un kyste permettant aux parasites d'échapper au contrôle du système immunitaire. Le parasite s'enkyste donc dans les organes où la pression du système immunitaire est la plus faible. Les kystes caractéristiques de la phase chronique de l'infection perdurent pendant toute la vie de l'individu.

Ce premier chapitre a pour objectifs d'introduire l'arrière-plan biologique du travail réalisé pendant ma thèse. Dans ce premier chapitre, je décrirai le parasite *T. gondii*, son cycle de vie, la réponse immunitaire à l'infection, la physiopathologie de la toxoplasmose, les traitements et les pistes actuelles de recherche pour la mise au point d'un vaccin.

I-1) Découverte du parasite

T. gondii a été isolé pour la première fois en 1908, simultanément par Nicolle et Manceaux, à l'institut Pasteur de Tunis, chez un rongeur nord africain, le gondi (*Ctenodactylus gundi*) (Nicolle and Manceaux, 1909) (**Figure 1**) et par Splendore, au Brésil, chez un lapin (Splendore, 1909). Les noms de genre et d'espèce du parasite proviennent de sa morphologie (*toxon* = arc et *plasma* = forme) et du rongeur chez lequel il a été découvert. Par la suite, *T. gondii* a été observé chez de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux mais ce n'est que dans les années 1920, que les premiers cas de toxoplasmose humaine ont été décrits. Les données sur la toxoplasmose et son épidémiologie ont été acquises très progressivement. La mise au point des premiers tests sérologiques dans les années 1940 a révélé la forte prévalence de la toxoplasmose humaine. Le cycle biologique de ce parasite et la compréhension de son mode de transmission n'ont été établis que dans les années 1960 par Hutchison, d'une part (Hutchison, 1965) et par Frenkel et Dubey, d'autre part (Frenkel *et al.*, 1973).



Figure 1. Photo de rongeurs *Ctenodactylus gundi*. C'est l'animal dans lequel le parasite *Toxoplasma gondii* a été découvert pour la première fois. La photo provient du zoo de Wilhelma, Allemagne.

I-2) Phylogénie du parasite

T. gondii est un protozoaire intracellulaire obligatoire appartenant au phylum des Apicomplexa. Ce phylum qui est caractérisé par la présence d'un « complexe apical » permettant l'entrée active du parasite dans les cellules hôtes (Cf. Chapitre II-1-3/4/5), appartient au super-phylum des *Alveolata* (**Figure 2A**) dont la caractéristique principale est la présence de saccules membranaires à l'intérieur de la cellule parasitaire et décrits sous le nom de « complexe membranaire interne » (Cf. Chapitre II-1-5). Le phylum inclut de nombreux pathogènes importants d'un point de vue médical et vétérinaire, tels que *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Sarcocystis*, *Eimeria*, *Babesia* et *Neospora* qui est le plus proche cousin de *T. gondii* (**Figures 2B**).

Au sein des Apicomplexa, *T. gondii* est classé parmi la classe des *Coccidea*, l'ordre des *Eimariida* et la famille des *Sarcocystidae* (Bussieras and Chermette, 1992).

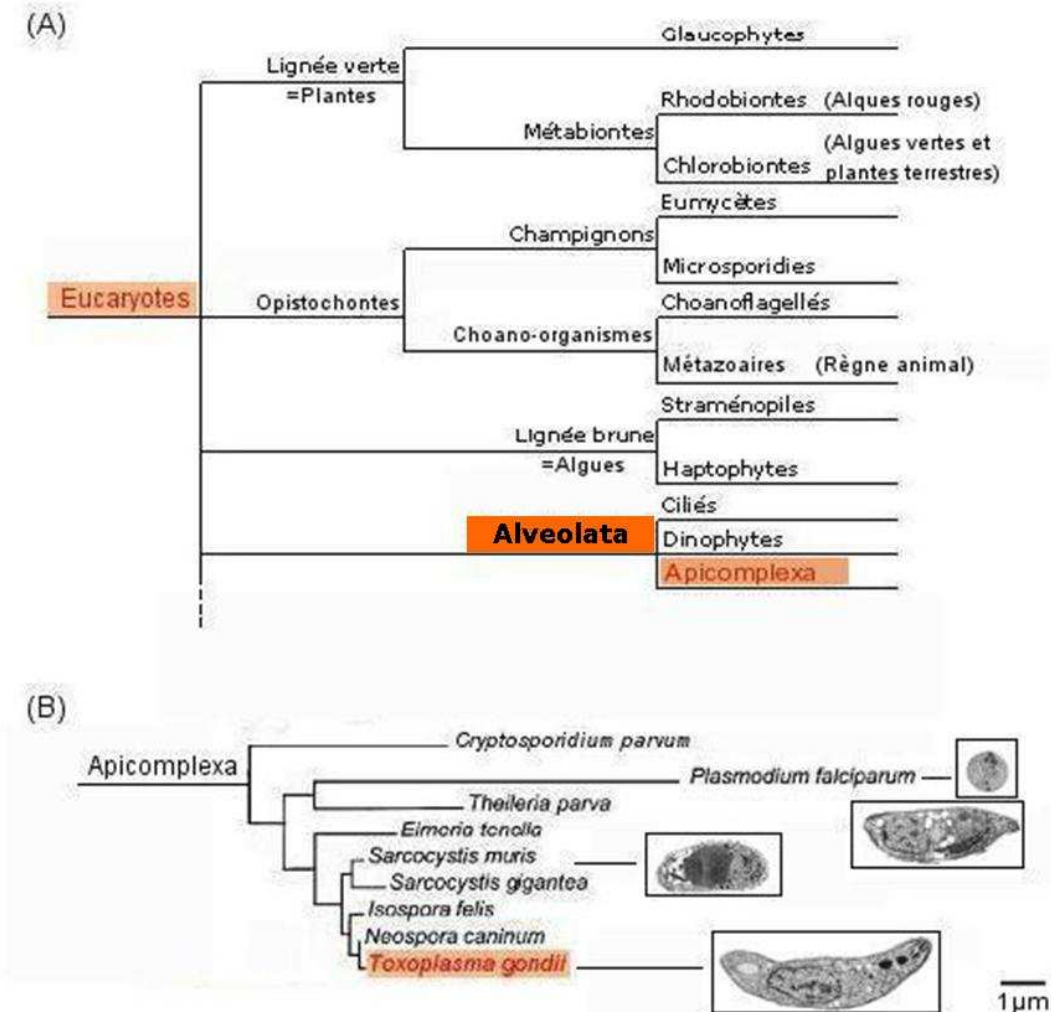


Figure 2. Classification phylogénétique de *T. gondii*. (A) Le graphe place le phylum des *Apicomplexa* parmi les eucaryotes, d'après. (B) Quelques espèces d'*Apicomplexa*, d'après (Zhu *et al.*, 2000). Les images de microscopie électronique proviennent du site <http://morrissettelab.bio.uci.edu>.

De tous les *Apicomplexa*, *Toxoplasma* est celui qui se cultive le plus facilement *in vitro*. Il peut être manipulé génétiquement de façon aisée et son génome est complètement séquencé et en cours d'annotation. Enfin, on dispose de bons modèles animaux pour étudier la physiopathologie de la toxoplasmose. Par ces aspects, *Toxoplasma* (ainsi que *Plasmodium*) constitue de bon modèle d'étude des parasites *Apicomplexa*.

I-3) Le cycle parasitaire

Alors que la plupart des *Apicomplexa* ont une gamme restreinte d'hôtes, *Toxoplasma gondii* se singularise par sa capacité à infecter tous les mammifères à sang chaud, les oiseaux ainsi que l'homme qui constituent ses hôtes intermédiaires. *T. gondii* y développe un cycle évolutif incomplet composé uniquement d'une phase asexuée. Chez l'hôte définitif, le chat et les félidés, *T. gondii* peut par contre, développer un cycle évolutif complet comprenant une phase sexuée et une phase asexuée (**Figure 3**).

1) Le cycle sexué

L'hôte définitif (le chat ou plus généralement, les félidés) s'infecte après ingestion d'oocystes matures souillant la terre, les végétaux ou l'eau douce. Il peut s'infecter également par carnivorerisme, en dévorant de petits rongeurs ou des oiseaux contenant des kystes. Les oocystes et les kystes correspondent à des formes de résistance et de dissémination du parasite car ils protègent les parasites qu'ils contiennent, du milieu extérieur. Les sporozoïtes (contenus dans les oocystes) ou les bradyzoïtes (contenus dans les kystes) évoluent rapidement en tachyzoïtes (stade parasitaire caractérisé par une prolifération et une dissémination rapides). Ceux-ci se différencient ensuite en mérozoïtes dans l'épithélium de l'iléon de l'hôte définitif.

Les mérozoïtes se multiplient par schizogonie, processus au cours duquel les noyaux parasitaires se divisent dans un même cytoplasme avant une fragmentation tardive du cytoplasme. La schizogonie aboutit à la libération d'autant de parasites qu'il y a de noyaux fils formés. Après leur libération, les mérozoïtes se différencient en gamontes (microgamètes mâles et macrogamètes femelles) et initient le cycle sexué.

Les gamontes sont localisés dans les cellules épithéliales de l'iléon, contre les villosités intestinales. Le macrogamète femelle est sphérique et contient un noyau au centre. Le microgamonte mâle est ovoïde ou en forme d'ellipse. Lors de la microgamétogenèse, le noyau du microgamonte mâle se divise et produit 10 à 21 noyaux. Les microgamontes peuvent ainsi produire jusqu'à 21 microgamètes qui utilisent leurs flagelles pour aller à la rencontre des macrogamètes matures. La fécondation des macrogamètes femelles par les microgamètes mâles donne naissance à des oocystes immatures qui sont libérés dans

la lumière intestinale, puis éliminés dans l'environnement par millions, avec les feces du chat. Les oocystes rejetés, immatures car non sporulés, ont une forme sphérique de 12 µm de diamètre. Ils subissent une maturation (sporulation) après leur excrétion dans le milieu extérieur. La sporulation aboutit à la formation de huit sporozoïtes infectieux. Les oocystes sont très résistants en milieu humide, tant aux agents physiques ou chimiques qu'aux bactéries et aux champignons (Dubey *et al.*, 1970).

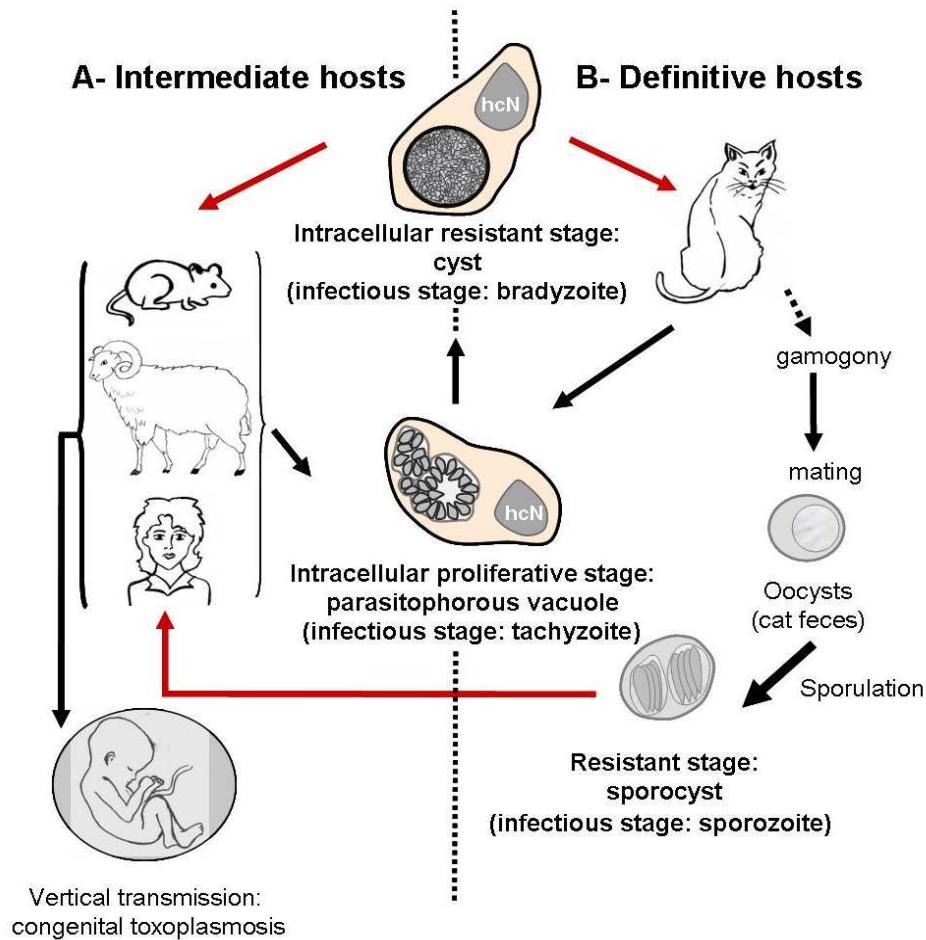


Figure 3. Représentation schématique du cycle de vie de *Toxoplasma*. Les hôtes intermédiaires (animaux à sang chaud) **(A)** sont infectés par la consommation de viandes infectées contenant les formes enkystées de parasites appelés « bradyzoïtes » ou en buvant de l'eau ou en mangeant des légumes contaminés par des oocystes sporulés. Après digestion de la paroi de protection des oocystes ou des kystes, les sporozoïtes ou les bradyzoïtes sont libérés et très rapidement, ils se différencient en formes à dissémination rapide appelées « tachyzoïtes ». Chez les sujets immunocompétents, la réponse immunitaire permettra d'éliminer la plupart de ces parasites. Cependant, quelques tachyzoïtes contenus dans leur VP réussissent à échapper à la réponse immunitaire et se différencient en bradyzoïtes. La vacuole contenant ces bradyzoïtes évolue en un kyste dormant. Si elle n'est pas traitée, la contamination transplacentaire du fœtus en développement par des tachyzoïtes circulants peut entraîner de graves malformations congénitales ou l'avortement. **(B)** Dans l'intestin grêle de l'hôte définitif infecté (le chat), *Toxoplasma* se différencie en gamètes mâles et femelles. La fécondation ne nécessite pas de co-infection par deux souches indépendantes. La fusion des gamètes conduit à la formation d'oocystes qui sont libérés dans l'environnement avec les feces. La sporulation permet la formation de huit sporozoïtes infectieux au sein de chaque oocyste. hcN: noyau de la cellule hôte. Adapté de (Mercier *et al.*, 2010).

2) Le cycle asexué

Chez les hôtes intermédiaires, l'infection se fait essentiellement par voie orale, après l'ingestion soit d'oocystes matures provenant d'aliments souillés, soit de kystes contenus dans des viandes infectées peu ou pas cuites. Après digestion de la paroi des oocystes ou des kystes dans l'estomac et le duodenum, les formes parasitaires infectantes, sporozoïtes ou bradyzoïtes, sont libérées et se différencient rapidement en tachyzoïtes. Ceux-ci se disséminent dans l'organisme par voie sanguine et lymphatique, ce qui correspond à la phase aiguë de la maladie. Capables d'infecter tous les types cellulaires, les tachyzoïtes gagnent les différents tissus tels que les muscles et le système nerveux central. A l'intérieur des cellules, le parasite se multiplie par endodyogénie (Cf. Chapitre II-3), processus au cours duquel deux cellules filles se forment à l'intérieur de la cellule mère. La cellule hôte est ensuite lysée, libérant les tachyzoïtes (**Figure 4-2**). Cette forme est également capable d'infecter le fœtus en cas de contamination primaire d'une femme au cours de sa grossesse. La biologie de ce stade utilisé pour mes expériences, sera détaillée dans le chapitre II de l'introduction.

Cette courte phase proliférative est rapidement contrôlée par le système immunitaire de l'hôte et aboutit à la formation de kystes (**Figures 4-3**) localisés dans les organes les moins accessibles par le système immunitaire (les muscles, le système nerveux central, les yeux, les testicules). Le bradyzoïte est le stade à multiplication ralentie du parasite. Il est globalement semblable en morphologie au tachyzoïte mais s'en distingue par quelques détails ultrastructuraux (noyau plus postérieur que celui du tachyzoïte, richesse en grains d'amylopectine et en micronèmes) (Coppin *et al.*, 2003).

L'élément majeur déclenchant la kystogénèse est une inhibition de l'activité mitochondriale des parasites, sous l'influence de protéines de stress parasitaire induites par différents stimuli tels que l'interféron gamma (IFN- γ), le monoxyde d'azote (NO) et le facteur de tumeur nécrosant alpha (TNF- α) (Cf. Paragraphe I-5-3) (Tomavo, 2001). Observée dès 10 à 15 jours après l'ingestion d'oocystes ou de kystes tissulaires, la formation de kystes contenant les bradyzoïtes marque le début de la phase chronique de la maladie. Ces kystes vont persister pendant le reste de la vie de l'hôte. La transformation du tachyzoïte en bradyzoïte s'accompagne par la modification de la membrane de la VP. Celle-ci s'épaissit par le dépôt d'un matériel granuleux, retrouvé également dans la matrice du kyste, entre les bradyzoïtes. Cette paroi forme une barrière physique, protégeant les bradyzoïtes des défenses immunitaires de l'hôte (**Figure 5**). Le kyste toxoplasmique demeure donc intracellulaire. Il est de structure sphérique, peut atteindre 100 μm de diamètre et peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de bradyzoïtes dont le métabolisme est adapté à une vie quiescente (Tomavo, 2001).

Ces particularités structurales et métaboliques rendent les kystes et donc les bradyzoïtes qu'ils contiennent, inaccessibles aux traitements anti-toxoplasmiques actuels (Dubey, 1998). Les kystes peuvent survivre plusieurs jours à température ambiante et plusieurs mois à 4°C mais ils sont détruits lorsque la température de cuisson d'une viande atteint des températures supérieures à 67°C (Dubey *et al.*, 1990).

Les kystes peuvent se former dans tous les types de cellules mais ils persistent de préférence dans les neurones, les astrocytes, les cellules musculaires et les cellules rétinienne pendant toute la durée de vie de l'hôte. La paroi du kyste peut se rompre à la mort d'une cellule hôte et les bradyzoïtes se retrouvent alors libres dans le milieu extracellulaire. Selon le statut immunitaire de l'hôte, ils seront détruits par le système immunitaire ou réinfecteront des cellules voisines. La persistance des kystes dans l'organisme entretient la réponse immunitaire, notamment cellulaire, qui prévient une réinfection (Dubey, 1997).

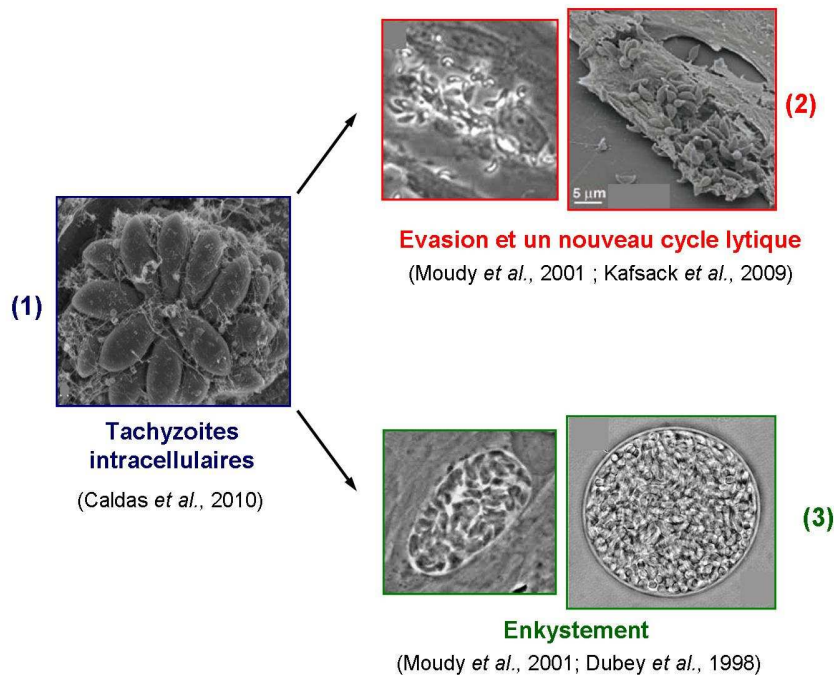


Figure 4. Formes parasitaires retrouvées lors du cycle asexué de *T. gondii* chez l'hôte intermédiaire. **(1)** observation par microscopie électronique à balayage de tachyzoïtes intracellulaires à l'intérieur d'une VP. D'après (Caldas *et al.*, 2010) **(2)** Observation par microscopie à contraste de phase (à gauche) (Moudy *et al.*, 2001) et par microscopie électronique à balayage (à droite) (Kafsack *et al.*, 2009) de tachyzoïtes en cours d'évasion de la cellule. **(3)** Les tachyzoïtes intracellulaires se différencient en bradyzoïtes et la VP évolue en un kyste immature (photo de gauche) puis en un kyste mature (photo de droite) contenant des milliers de bradyzoïtes. D'après (Dubey *et al.*, 1998).

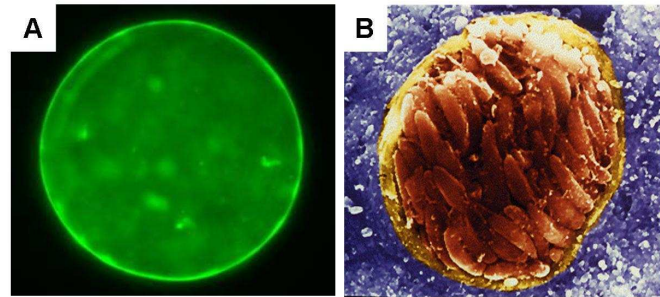


Figure 5. Kystes de *Toxoplasma*. (A) Observation en immunofluorescence indirecte de la paroi d'un kyste issu d'un cerveau de souris infectée depuis deux mois par le toxoplasme (souche Prugniaud). La paroi du kyste est mise en évidence à l'aide de la lectine *Dolichos biflorus* couplée à l'isothiocyanate de fluoresceïne. Photo réalisée par B. Touquet, LAPM, 2010. (B) Observation en microscopie électronique à balayage d'un kyste de cerveau de souris infectée. La paroi du kyste a été partiellement détruite et les bradyzoïtes contenus dans le kyste sont donc visibles. Photo réalisée par D. Ferguson.

I-4) Polymorphisme génétique de T. gondii

Bien qu'une seule espèce, *T. gondii*, soit décrite au sein du genre *Toxoplasma*, plus de 290 isolats (avec données cliniques) ou souches ont bénéficié à ce jour, d'analyses génotypiques. La pathogénicité de ces souches a été définie par l'étude de leur virulence chez la souris, notamment par la détermination des doses minimales de parasites entraînant la mort de 50% ou de 100% des animaux (DL50 et DL100).

Selon l'analyse basée sur les séquences d'introns, la majorité (>95%) des isolats existant se classent en 11 haplotypes, dont 3 types sont prédominants (Khan *et al.*, 2007). Ces 3 types majoritaires ont été regroupés en 3 génotypes principaux équivalents à trois lignées clonales, stables dans le temps et l'espace (types I, II et III). Ces 3 types ne diffèrent génétiquement entre eux, que très peu (moins de 1% de différences génétiques). Les différences entre les principaux types de parasites concernent :

- ◆ la virulence chez la souris. Une souche est considérée comme virulente lorsqu'un seul tachyzoïte introduit par voie intra-péritonéale, entraîne la mort de l'animal en moins de 10 jours (DL100 =1) (Howe and Sibley, 1995, Howe *et al.*, 1996) ;
- ◆ la vitesse de multiplication en culture cellulaire et la possibilité de transformation *in vitro* des tachyzoïtes (formes prolifératives) en bradyzoïtes (formes quiescentes), aboutissant à la formation de kystes ;
- ◆ les capacités de migration et de transmigration à travers les barrières biologiques.

◆ Le génotype I

Il est très rarement isolé. C'est un génotype très virulent pour la souris. La souche RH, que j'ai utilisée pour réaliser les expériences de ma thèse, fait partie de ce génotype. Elle a été isolée par Sabin, en 1941, à partir d'un cas d'encéphalite humaine aigüe (Sabin,

1941). Elle a une DL₁₀₀ de 1 ou 2 tachyzoïtes chez la souris. Les tachyzoïtes se multiplient rapidement *in vitro* et se transforment peu en bradyzoïtes. En conséquence, peu de kystes sont formés *in vitro* ou chez la souris. La capacité de migration et de transmigraton des tachyzoïtes de cette souche à travers les barrières biologiques *ex vivo* est supérieure à celle des tachyzoïtes des types II et III.

◆ Le génotype II

Les souches de type II sont représentées par les souches ME49, 76K ou Prugniaud. Le type II est le type le plus fréquemment isolé lors d'infections humaines puisque 80% des souches issues de toxoplasmoses congénitales humaines en Europe (Ajzenberg *et al.*, 2002) et aux Etats-Unis (Howe and Sibley, 1995 ; Howe *et al.*, 1997) sont de type II. Les parasites de ce type sont moins virulents pour la souris (DL $50 \geq 10^3$ tachyzoïtes).

◆ Le génotype III

La souche VEG en est un exemple. Ce génotype, plus rare, est surtout rencontré chez les animaux. La virulence des souches de type III pour la souris est intermédiaire (DL₅₀ $\geq 10^3$ parasites). Concernant la toxoplasmose humaine, les atteintes congénitales sont possibles mais peu fréquentes.

La plupart des souches répertoriées à l'heure actuelle, sont classées parmi ces trois génotypes issus de la prolifération clonale de trois ancêtres qui dérivent d'un groupe génétique unique (Su *et al.*, 2003). Néanmoins, en plus de ces trois types majoritaires, de plus en plus de souches « atypiques » sont isolées. Certaines, isolées en Guyane française sud-américaine, semblent particulièrement virulentes car des toxoplasmoses symptomatiques et parfois même mortelles, ont été rapportées chez des sujets immunocompétents (Dardé *et al.*, 1998 ; Carme *et al.*, 2002). Le typage génétique de ces isolats a révélé leur grande diversité génétique. Ces souches sont par ailleurs, d'un point de vue phylogénétique, éloignées des souches de type II généralement associées à la pathologie humaine et elles sont plus proches du type I (Loeuillet *et al.*, résultats non publiés ; voir Chapitre I-7). L'hypothèse actuelle serait que les souches guyanaises expriment des facteurs parasitaires impliqués dans leur virulence vis-à-vis de l'homme, ces facteurs étant modifiés ou absents dans les souches archétypales. En plus de ces souches guyanaises, de nouvelles souches très divergentes d'un point de vue génétique ont également été isolées à partir d'animaux, au Brésil (Ferreira Ade *et al.*, 2001 ; 2006 ; Pena *et al.*, 2008). Une variabilité parasitaire génétique similaire à celle observée chez les animaux, a également été décrite chez les humains, au Brésil (Khan *et al.*, 2006 ; Ferreira *et al.*, 2008).

I-5) Mise en place de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire au cours de l'infection par le parasite *T. gondii* est très complexe. Ceci est en grande partie, du à la capacité du parasite à infecter tous les types cellulaires des différents organes, ce qui entraîne une réaction immunitaire tissu-spécifique. D'une façon générale, chez un sujet immunocompétent, la primo-infection par *T. gondii* induit une réponse immunitaire protectrice probablement liée à la persistance de kystes dans certains tissus (muscles, cerveau). Chez les sujets immunodéprimés (sidéens, greffés...), la multiplication et la dissémination incontrôlée des tachyzoïtes peuvent entraîner des lésions graves, voire fatales.

1) Mise en place de la réponse innée

Dès la pénétration du parasite dans l'organisme hôte par voie orale (ingestion de kystes ou d'oocystes), les entérocytes répondent en permettant le recrutement de différents acteurs du système immunitaire qui agissent de concert pour établir une réponse immunitaire résumée très schématiquement ci-dessous (Miller *et al.*, 2009).

- Etant donné que l'infection par *T. gondii* se fait le plus souvent par voie orale, la réponse immunitaire débute localement, dans la muqueuse digestive et plus particulièrement, dans l'épithélium intestinal qui constitue la première barrière de défense de l'hôte (**Figure 6**). Après ingestion de viandes parasitées, les bradyzoïtes contenus dans les kystes sont libérés dans l'intestin. Ils se différencient en tachyzoïtes qui gagnent l'épithélium intestinal et infectent les entérocytes. L'infection des **cellules épithéliales intestinales (IEC)** entraîne leur sécrétion de chimiokines telles que MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1), MIP-1 α ou CCL3 (Macrophage Inflammatory Protein-1 α ou Chemokine (C-C motif) ligand 3), MIP- β ou CCL4 et RANTES (Regulated on Activation and Normally T-cell Expressed and Secreted) et des cytokines telles que l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-6 et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) qui attirent des granulocytes neutrophiles, des macrophages et des cellules dendritiques immatures vers le site d'inflammation (Mennechet *et al.*, 2002 ; Buzoni-Gatel *et al.*, 2008). Les IEC sécrètent également de l'IL-15 et de l'IL-18, nécessaires à l'activation des natural killers (NK).

- **Les cellules NK**, dont l'activation met en jeu la voie de signalisation de STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4) (Cai *et al.*, 2000) et stimulées par l'IL-12, l'IL-15 et le TNF- α (**Figure 6**) (Gazzinelli *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 2009), produisent de l'IFN- γ qui augmente l'activité anti-microbienne des macrophages, des cellules dendritiques et des IEC.

- **Les neutrophiles (Figure 6)** commencent à phagocyter les parasites. Ils libèrent aussi des chimiokines (CCL3 et CCL4) et des cytokines (IL-12) qui à leur tour, attirent des cellules dendritiques immatures, des macrophages et des lymphocytes T. Les neutrophiles aident à la maturation des cellules dendritiques immatures, *via* leur activation par le TNF- α .

- Bien que les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques sécrètent tous de l'IL-12, **les cellules dendritiques (Figure 6)** constituent la source la plus importante de cette cytokine dans le cadre de l'infection par *T. gondii*. Elles jouent un rôle central, *via* leur production d'IL-12, dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T et dans l'évolution vers une réponse adaptative de type Th1 et la production d'IFN- γ . Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette réponse ne sont pas encore entièrement connus. Le récepteur CCR5 (CC-Chemokine Receptor 5) exprimé en surface des cellules dendritiques, reconnaît des antigènes sécrétés par le parasite (Aliberti *et al.*, 2000). Parmi ceux-ci, la cyclophiline-18 (Cy-18) pourrait se lier au CCR5 avec une affinité comparable à celle de son ligand endogène, le CCL4 (CC-Chemokine Ligand 4). La Cy-18 induirait donc la synthèse d'IL-12 par les cellules dendritiques (Aliberti *et al.*, 2003).

- Les macrophages et les neutrophiles reconnaissent spécifiquement *T. gondii* *via* sa profiline (un des Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) du parasite), par le récepteur Toll-Like de type 11 (Toll-Like Receptor 11 ou TLR11) qu'ils expriment à leur surface. L'activation du TLR11 par la profiline passe par la formation d'un homodimère du récepteur, ce qui conduit à l'activation de NF κ B (Nuclear Factor kappa B) et induit une production importante de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'INF- γ et le TNF- α . Ces cytokines contrôlent la prolifération parasitaire en permettant l'initiation de la réponse adaptative *via* les lymphocytes T CD4⁺ (Miller *et al.*, 2009) (**Figures 6-7**). Deux autres types de PAMP de *T. gondii* ont été identifiés : les ancras GPI (GlycosylPhosphatidylInositol) des protéines de la surface parasitaire et TgHSP70 (la protéine de choc thermique de 70 kDa) qui sont les ligands respectifs des TLR2 et TLR4 (**Figure 7**) (Scharton-Kersten *et al.*, 1997 ; Yarovinsky *et al.*, 2005 ; Debierre-Grockiego *et al.*, 2007). Le TLR9, localisé dans les endosomes et le reticulum endoplasmique (RE), est également indispensable à la mise en place de la réaction immunitaire intestinale à *T. gondii* (Minns *et al.*, 2006). En effet, il reconnaît spécifiquement l'ADN parasitaire, active la voie des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases et permet donc également la synthèse d'IFN- γ (**Figure 7**).

- **Les macrophages** sont les cellules les plus importantes lors de la phagocytose. Ils jouent un rôle crucial pour limiter la dissémination du parasite. L'interaction entre les macrophages et les antigènes parasitaires provoque l'induction de la production de TNF α , qui avec l'IFN- γ produit par les NK et les lymphocytes T, induit la production massive de molécules toxiques et réactives comme les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) et

du nitrogène (RNI), molécules qui permettent de détruire les parasites. L'IL-12 et l'IL-18 produites par les macrophages stimulent les cellules NK à produire de l'IFN- γ et à moduler leur cytotoxicité. *Via* l'IFN- γ , les macrophages induisent l'expression de l'IDO (Indoleamine 2,3-DiOxygénase) qui dégrade le tryptophane nécessaire à la croissance et à la dissémination du parasite (Schlüter *et al.*, 1999 ; Suzuki *et al.*, 2000). Enfin, les macrophages jouent un rôle important dans l'élimination des cellules apoptotiques de la zone d'inflammation (Zhang and Mosser, 2008).

- La sécrétion de CCL3 et de CCL4 par les entérocytes attire également **les lymphocytes intraépithéliaux (IEL) (Figure 6)** qui deviennent cytotoxiques pour les entérocytes infectés. Les IEL produisent des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β et l'IL-10. Ces deux cytokines permettent de limiter les dommages inflammatoires causés aux cellules de l'hôte par la réponse immunitaire contre *T. gondii*.

- **Les lymphocytes T $\gamma\delta$** présentent aussi une activité cytotoxique *in vitro* contre les cellules infectées par *T. gondii*. Cette activité cytotoxique est indépendante de la présentation d'antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ils sécrètent de l'IFN- γ , de l'IL-2 et du TNF- α (Subauste *et al.*, 1995).

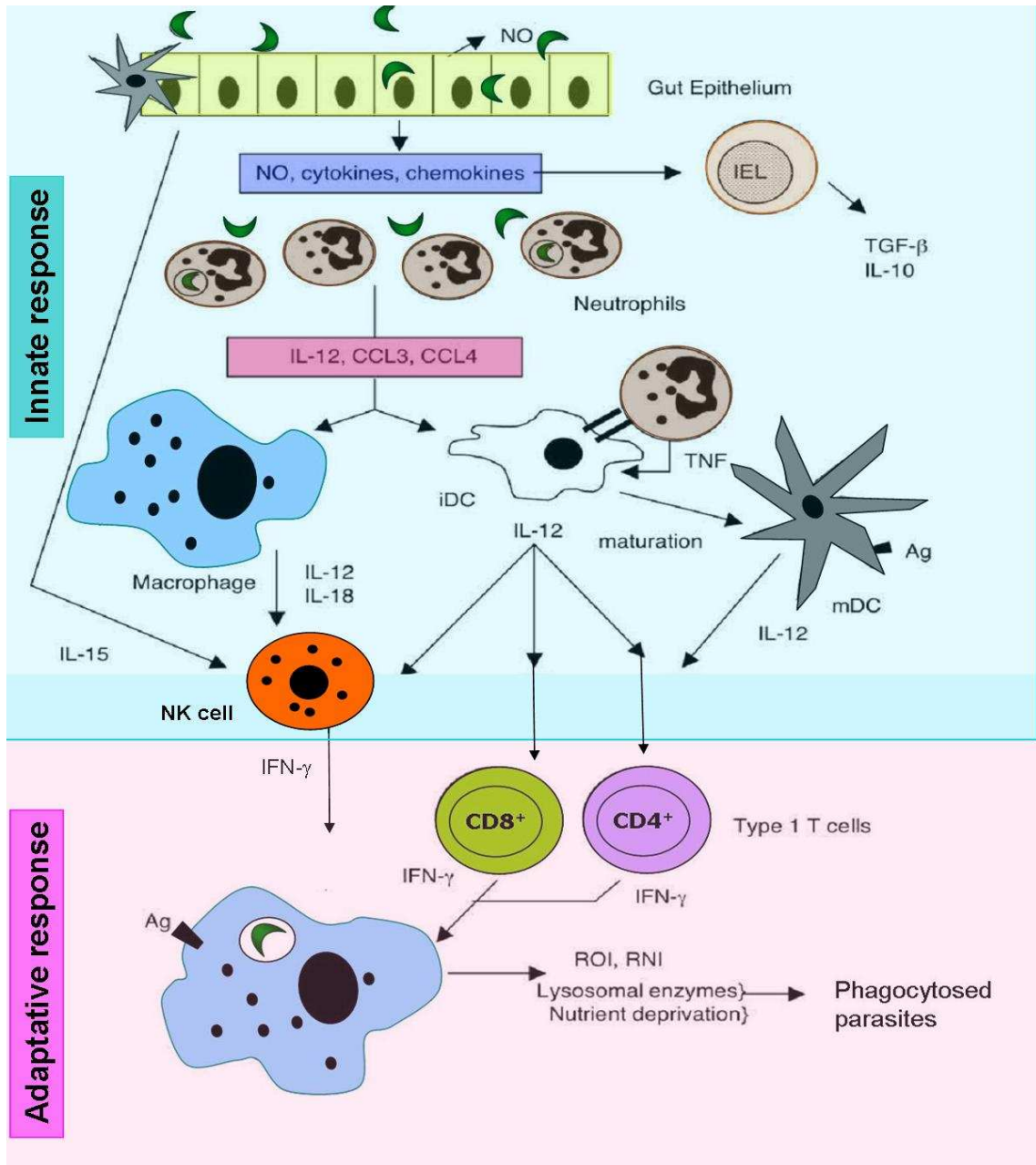


Figure 8. Cascade des événements de la réponse immunitaire suite à l'infection orale par *T. gondii*. Après ingestion de viandes parasitées, les bradyzoïtes contenus dans les kystes sont libérés dans l'intestin. Ils se différencient en tachyzoïtes qui gagnent l'épithélium intestinal et infectent les entérocytes. Ces derniers sécrètent des chimiokines et des cytokines qui attirent les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques immatures (iDC).

- Les neutrophiles commencent à phagocyter les parasites. Ils libèrent aussi des chimiokines (CCL3 et CCL4) et des cytokines (IL-12) qui à leur tour, attirent des iDC, des macrophages et des lymphocytes T. Les neutrophiles aident à la maturation des iDC, *via* l'activation par le TNF- α .

- Bien que les neutrophiles, les macrophages et les iDC sécrètent tous de l'IL-12, les cellules dendritiques matures (mDC) constituent la source la plus importante de cette cytokine dans le cadre de l'infection par *T. gondii*. Les mDC jouent également un rôle central dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T et dans l'évolution vers une réponse adaptative de type Th1 et la production d'IFN- γ .

- Les macrophages sont les cellules les plus importantes lors de la phagocytose. Ils jouent un rôle crucial pour limiter la dissémination du parasite. L'interaction entre les macrophages et les antigènes parasitaires provoque l'induction de la production de TNF α , qui avec l'IFN- γ produit par les natural killers (NK) et les lymphocytes T, induit la production massive de molécules toxiques et réactives comme les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) et du nitrogène (RNI), molécules qui permettent de détruire les parasites. L'IL-12 et l'IL-18 produites par les macrophages stimulent les cellules NK à produire de l'IFN- γ et à moduler leur cytotoxicité, tandis que l'IL-18 et l'IL-15 produites par les entérocytes, induisent la prolifération des NK.

- La sécrétion de CCL3 et de CCL4 par les entérocytes attire également les lymphocytes intraépithéliaux (IEL) qui deviennent cytotoxiques pour les entérocytes infectés. Les IEL produisent des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β et l'IL-10. Ces deux cytokines permettent de limiter les dommages inflammatoires causés aux cellules de l'hôte par la réponse immunitaire contre *T. gondii*. Adapté de (Miller *et al.*, 2009).

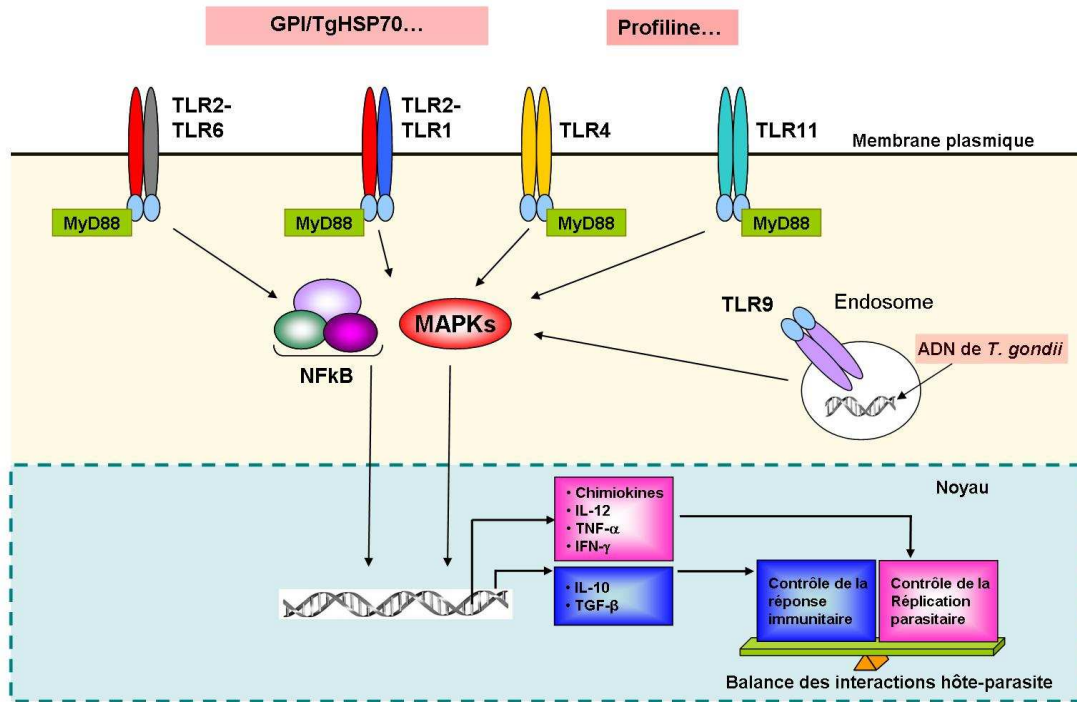


Figure 7. Modèle de la reconnaissance de *T. gondii* par les Toll-like récepteurs. La plupart des cellules de l'immunité innée expriment à leur surface, les TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 et TLR11, qui reconnaissent spécifiquement les PAMPs de *T. gondii*. Parmi les PAMPs, on a identifié à ce jour, la profiline, HSP70 et les protéines GPI-ancrées. Le TLR9 présent dans les endosomes et le reticulum endoplasmique, reconnaît spécifiquement l'ADN parasitaire. La formation d'homodimères de TLR4, TLR9 et TLR11 est suffisante pour l'activation de la voie des MAP kinases ou du NFkB. Par contre, l'activation du TLR2 nécessite la formation d'un complexe TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6. L'activation des TLR provoque l'activation de la production de cytokines pro-inflammatoires *via* la voie dépendante de l'adaptateur MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88) puis la cascade de signalisation des MAP kinases ou du NFkB. Une fois phosphorylé, le NFkB est transloqué dans le noyau où il active la transcription de gènes cibles. Ces gènes permettent l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, le TNF- α et l'IFN- γ , qui contrôlent la dissémination des parasites. Les gènes cibles du NFkB permettent également l'expression de cytokines telles que l'IL-10 et le TGF- β , qui contre-balancent la réponse inflammatoire.

2) Mise en place de la réponse adaptative

L'immunité cellulaire de type Th1 est la composante majeure de la réponse immunitaire adaptative de l'hôte lors d'une infection par *T. gondii*. La mise en place de cette réponse nécessite la présentation de l'antigène par les macrophages ou par les cellules dendritiques, ces dernières pouvant capturer directement des antigènes de *T. gondii* à l'intérieur de la lumière intestinale, grâce à leurs dendrites se prolongeant au travers des jonctions serrées situées entre les cellules de l'épithélium intestinal. Le mécanisme de présentation antigénique requiert la présentation de l'antigène au TCR (T Cell Receptor) exprimé en surface des lymphocytes T ainsi que la co-stimulation des lymphocytes grâce à l'interaction du récepteur CD40 exprimé en surface des lymphocytes avec son ligand, CD40L.

◆ La réponse de type Th1

La résistance à *T. gondii* est étroitement liée à une réponse cellulaire T CD4+ de type Th1 favorisée par l'IFN- γ et l'IL-12 produits après l'activation des NK et des macrophages (Suzuki *et al.*, 1988). Les lymphocytes T CD4+ sont en effet subdivisés en plusieurs sous-populations, dont les Th1 et les Th2. Les cellules de type Th1 produisent de l'IL-2 et de l'IFN- γ tandis que les cellules de type Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-10. Des études ont montré que le contrôle de l'infection par *T. gondii* est le résultat d'une action synergique entre lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Gazzinelli *et al.*, 1991). Les CD8+, activés majoritairement par les protéines de surface du parasite mais aussi par l'IL-2 sécrétée par les CD4+, exercent une activité cytotoxique médiée par la production d'IFN- γ (**Figure 6**).

◆ La réponse de type Th2 : prévention des phénomènes immuno-pathologiques

Les effets de la réponse pro-inflammatoire dépendante de l'IFN- γ peuvent être délétères pour l'hôte. Afin de prévenir ces effets, une réponse immunitaire de type Th2 anti-inflammatoire est mise en place. Cette réponse fait intervenir l'IL-10 et la lipoxine A4.

- l'IL-10 (Figure 10)

Des souris invalidées pour l'IL-10 ne sont pas capables de contrôler la réponse pro-inflammatoire et succombent à l'infection par *T. gondii*, très tôt au cours de la phase aiguë. Elles présentent des infiltrations leucocytaires sévères et des nécroses tissulaires du foie et de l'intestin, ces phénomènes étant le résultat d'une production incontrôlée d'IFN- γ et de TNF- α (Suzuki *et al.*, 2000). La sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T CD4+ (**Figure 6**), sécrétion induite par *T. gondii*, constituerait donc un des mécanismes d'échappement du parasite à la réponse immunitaire de son hôte. Cependant, le rôle direct de l'IL-10 dans la virulence de *T. gondii* ainsi que son implication dans la persistance du parasite est discutée (Wille *et al.*, 2001). En plus de l'IL-10, d'autres cytokines anti-inflammatoires sont en effet également impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire : le TGF- β sécrété par les IEL est impliqué dans le contrôle des pathologies intestinales liées à l'entrée du parasite (Mennechet *et al.*, 2004) ; l'IL-27, sécrétée par les lymphocytes de type Th17, peut aussi inhiber la production de cytokines déclenchant des effets immuno-pathologiques (Villarino *et al.*, 2006).

- La lipoxine A4

Un extrait antigénique soluble du parasite (extrait STAg) induit la synthèse de lipoxine A4 (LXA4) par les macrophages. Cette molécule inhibe la migration des cellules dendritiques, leur production d'IL-12 ainsi que leur expression du CCR5 (Reis e Sousa *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces phénomènes conduit à une paralysie des cellules dendritiques (Aliberti, 2005) (**Figure 8**).

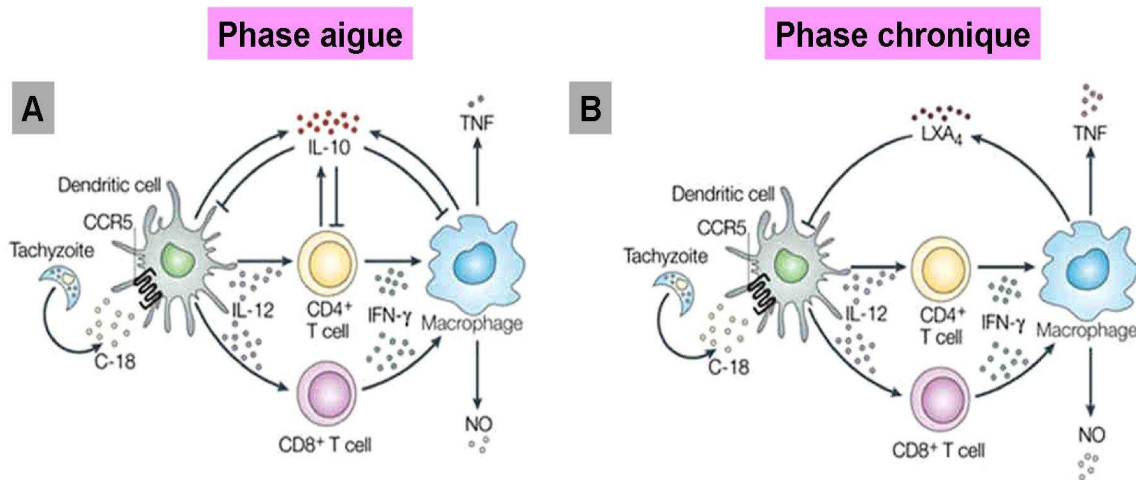


Figure 8. Contrôle de la réponse pro-inflammatoire lors de l'infection par *T. gondii*. (A) Les effets cytotoxiques de la phase aiguë sont contrôlés par la production d'IL-10 au niveau des sites de réplication parasitaire comme le foie et la rate. L'IL-10 régule négativement l'expression des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'activité des cellules dendritiques, des cellules T, des NK et des macrophages. (B) Lors de la phase chronique, la LXA4 est produite et contrôle les réponses induites par les cytokines pro-inflammatoires au niveau des sites où la réplication parasitaire pourrait avoir lieu, tels que le système nerveux central et ce, sans interférer avec l'activité des macrophages. D'après (Aliberti, 2005).

◆ La réponse humorale systémique

La primo-infection par *T. gondii* donne lieu à une production d'anticorps sériques spécifiques, selon une cinétique particulière. Les anticorps jouent un rôle mineur dans la lutte contre le parasite. Cependant, la mémoire immunitaire portée par les lymphocytes B induit la synthèse d'anticorps spécifiques résiduels durant toute la vie de l'hôte.

Chez l'Homme, les immunoglobulines A (Ig A), les Ig E et les Ig M spécifiques apparaissent précocement et marquent la phase aiguë de l'infection. Ces isotypes ne persistent pas. C'est à partir des deuxième ou troisième semaines d'infection que des Ig G sériques spécifiques peuvent être détectées. Elles caractérisent la phase chronique de l'infection et sont sécrétées tout au long de la vie de l'hôte. Chez la souris, les Ig A sécrétoires sont décelées dès la deuxième semaine post-infection et elles persistent pendant au moins 17 semaines. Les Ig G et les Ig M sériques sont détectées avec la même cinétique que celle des Ig A (Chardès *et al.*, 1990).

3) Phase chronique - Persistance du parasite

La chronicité qui résulte de l'infection par *T. gondii* est un trait caractéristique de l'incapacité du système immunitaire à éradiquer le parasite ; elle indique donc la capacité de ce dernier à contourner ou à échapper au système immunitaire. En effet, bien que très efficace, la réponse immunitaire n'est pas suffisante pour éliminer le parasite de l'organisme. L'infection reste latente, sous le contrôle de l'IFN- γ et de l'IL-12. Les anticorps spécifiques, même s'ils ne jouent pas un rôle prépondérant lors de l'infection primaire, contribuent à la mise en place de la réponse protectrice lors d'une éventuelle réinfection (Yap and Sher, 1999). Les formes prolifératives tachyzoïtes échappent au contrôle immunitaire en évoluant vers les formes quiescentes bradyzoïtes, contenues dans des kystes. Un équilibre entre le parasite et l'hôte s'établit donc et peut rester stable durant toute la vie de l'hôte : c'est la phase chronique de l'infection (**Figure 9**).

Le toxoplasme a développé de nombreux moyens pour échapper ou contourner la réponse immunitaire de l'hôte. Il est en effet capable 1) d'interférer avec les voies de signalisation de NF κ B et des MAP kinases ; 2) d'interférer avec la voie d'activation de l'IFN- γ (voie JAK/STAT), notamment en inhibant la transcription de STAT1 (Zimmermann *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007) *via* la protéine ROP16 (Cf. Chapitre II-1-7) (Saeij *et al.*, 2007) ; d'induire l'activation de STAT3 impliqué, comme l'IL-10, dans le contrôle de la réponse inflammatoire ; 4) de réguler négativement l'expression des molécules du CMH de classe I et II à la surface des macrophages infectés, d'où une présentation réduite des antigènes aux lymphocytes T ; 5) de supprimer la production de NO (induit par l'IFN- γ) par les macrophages (Butcher and Denkers, 2002) ; 6) de bloquer l'apoptose des fibroblastes *via* le TNF- α et le NF κ B qui régule l'expression de nombreux gènes anti-apoptotiques tels que certains membres de la famille Bcl-2 (B-cell CCL/Lymphoma 2) (Sinai *et al.*, 2004).

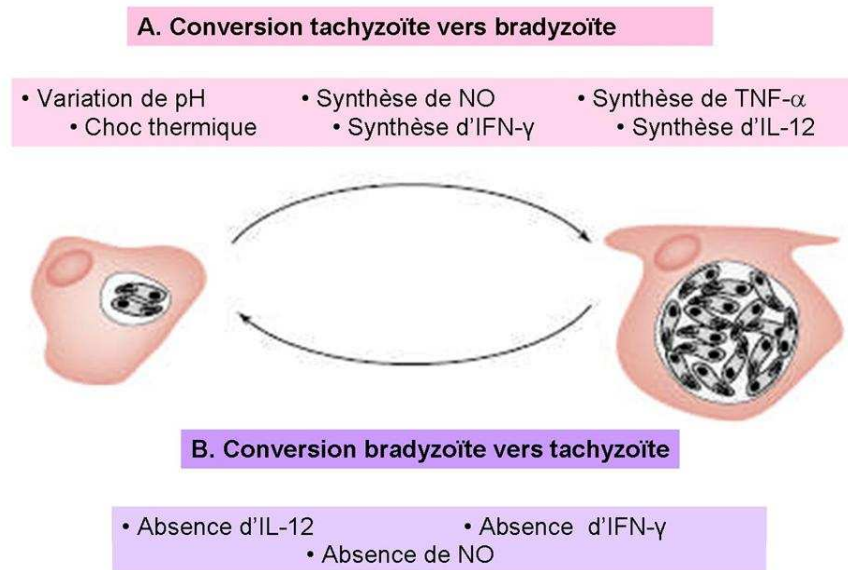


Figure 9. Facteurs immunitaires associés à l'interconversion des formes tachyzoïtes-bradyzoïtes. Le processus de conversion est réversible. La conversion du stade tachyzoïte en stade bradyzoïte est responsable de l'établissement de la phase chronique de la maladie. Adapté de (Lyons *et al.*, 2002).

I-6) Prévalence de la toxoplasmose

T. gondii est un parasite cosmopolite. Des études épidémiologiques chez l'homme et les animaux ont montré sa large distribution géographique et sa prévalence importante. La toxoplasmose affecte environ 30 à 50 % de la population humaine mondiale mais le pourcentage de personnes séropositives pour l'infection toxoplasmique (7 à 80%) varie d'un pays à l'autre, en fonction des groupes ethniques, des habitudes alimentaires et des conditions d'hygiène (Tenter *et al.*, 2000).

L'incidence de la toxoplasmose dans la population générale est difficile à évaluer car l'infection est le plus souvent asymptomatique et ne fait pas l'objet d'une déclaration obligatoire auprès des services de santé. Une prévalence supérieure à 60% est observée au Brésil (Porto *et al.*, 2008), au Mexique, en Indonésie, en Turquie et dans certains pays d'Afrique du nord, notamment au Maroc (**Figure 10**). Une prévalence moins importante (40 à 60%) est observée en Belgique, en Espagne, en Allemagne, en Roumanie et en France (Pappas *et al.*, 2009). Le nombre annuel de nouvelles infections en France, peut être estimé, par modélisation, entre 200 000 et 300 000 avec environ 30 000 à 45 000 cas symptomatiques. La prévention de la toxoplasmose est donc une priorité du programme d'action de l'Institut de Veille Sanitaire.

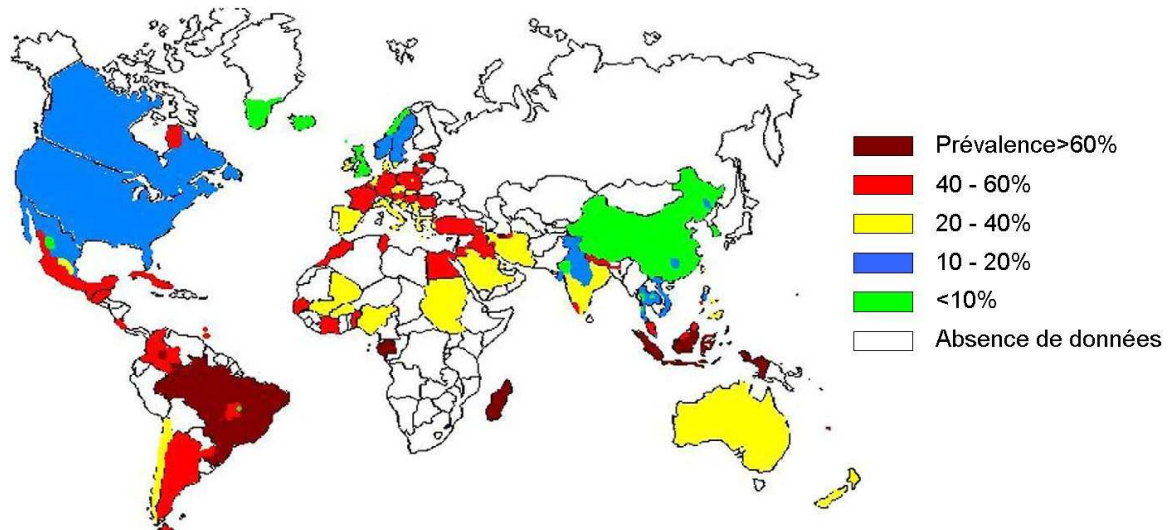


Figure 10. Séroprévalence de *T. gondii* dans le monde. Statistiques réalisées principalement à partir de données provenant de femmes enceintes ou de femmes dont l'âge varie entre 15 et 45 ans. D'après (Pappas *et al.*, 2009).

La toxoplasmose est également un problème de santé vétérinaire car elle affecte un grand nombre d'hôtes intermédiaires, dont les animaux d'élevage (**Figure 11**), sources potentielles de contamination pour l'homme. Chez le mouton et la chèvre, la toxoplasmose est responsable de baisses des performances de reproduction, de résorptions fœtales et de mortalité néonatale (Innes *et al.*, 2007). La séroprévalence mondiale, notamment chez les animaux d'élevage, est difficile à estimer étant donné la variabilité existant entre les pays. Cependant, des études récentes menées par pays ont montré une séroprévalence comprise entre 0 et 3,8% chez les vaches en Malaisie, en Chine et en Inde (Normaznah *et al.*, 2004 ; Yu *et al.*, 2007 ; Sharma *et al.*, 2008). En revanche, la Serbie et l'Iran du Nord présentent des séroprévalences élevées chez les moutons (respectivement 84,5 et 35%) (Klun *et al.*, 2006 ; Sharif *et al.*, 2007). En France, plus de 50% du bétail, en particulier les ovins, est contaminé. De plus, la toxoplasmose est responsable d'avortements chez ces espèces, entraînant de ce fait, des pertes économiques pour les éleveurs (Dubey and Lindsay, 2006 ; Kijlstra and Jongert, 2008). En Uruguay, les pertes économiques dues à l'infection des brebis pendant leur gestation, ont été estimées à 1,4 - 4,7 millions de dollars (Freyre *et al.*, 1999). En Grande-Bretagne, elles ont été estimées à 12 - 23 millions de livres pour l'année 1996 (Bennett *et al.*, 1999).


Animaux	Séroprévalence (%)	Isolement de parasite	Fréquence des kystes
Moutons	35,9	+	
Porcs	6,8	+	
Chèvre	33,4	+	
Gibier	55,8	+	
Chevaux	25,8	+	
Poulets	10,4	+	
Bovins	33,6	-	

Figure 11. Séroprévalence de la toxoplasmose chez les animaux d'élevage en Europe. D'après (Tenter *et al.*, 2000 ; Kijlstra and Jongert, 2008).

En conclusion, au vu de la prévalence importante de la toxoplasmose humaine et animale, la mise au point de traitements et de vaccins contre la toxoplasmose est un enjeu fort et constitue un des objectifs principaux de la recherche anti-toxoplasmique actuelle (Boothroyd, 2009b).

I-7) Physiopathologie de la toxoplasmose

1) La toxoplasmose, une infection généralement bénigne

La toxoplasmose est dans la majorité des cas, une infection bénigne qui se traduit par deux phases :

- la phase aiguë, lors du premier contact entre l'hôte et le parasite (primo-infection), est généralement bénigne. Cependant, la transmission du parasite au fœtus en cas de primo-infection de la mère pendant sa grossesse, peut mener à des lésions oculaires (choriorétinites essentiellement), des atteintes cérébrales et peut aller jusqu'à l'avortement spontané, surtout si la femme s'infecte pendant le premier trimestre de sa grossesse. En médecine vétérinaire, la toxoplasmose congénitale est également responsable de très nombreux cas d'avortements spontanés dans les élevages ovins (Cf. Paragraphe précédent) ;
- la phase aiguë est suivie d'une phase chronique asymptomatique pendant laquelle les kystes contenant les bradyzoïtes n'entraînent pas directement de lésions tissulaires. Cependant, les bradyzoïtes sont susceptibles de se réactiver en cas de déficience du système immunitaire (chimiothérapie anti-cancéreuse, administration de traitements immunosuppresseurs lors d'une greffe (Hill and Dubey, 2002), infection par le virus de

l'immunodéficience humaine (VIH) (Kasper and Buzoni-Gatel, 1998). En absence de traitement, ces réactivations évoluent spontanément vers une encéphalite mortelle.

2) Toxoplasmose provoquée par les souches hypervirulentes

Récemment, il a été mis en évidence en Guyane française, des cas de toxoplasmoses symptomatiques (signes cliniques : fièvre, pneumopathie, défaillance multi-viscérale), voire mortelles chez des patients immunocompétents infectés par ces souches hypervirulentes (Grigg *et al.*, 2001). Encore récente, cette nouvelle forme de toxoplasmose sévère n'est pas encore bien caractérisée chez l'homme.

3) Influence de l'infection toxoplasmique sur le comportement de l'hôte et lien avec certaines maladies mentales

Au cours des dernières années, les études sur le lien potentiel entre la toxoplasmose et les troubles du comportement se sont multipliées, tant chez l'homme que chez l'animal. Le caractère neurotrope de *T. gondii* permet d'envisager qu'il pourrait constituer un facteur de vulnérabilité de troubles mentaux et/ou de changements de comportement.

T. gondii utilise des cellules dendritiques comme cheval de Troie pour passer la barrière hémato-encéphalique et accéder au cerveau de son hôte (Courret *et al.*, 2006 ; Bierly *et al.*, 2008). Il y envahit différents types de cellules dans lesquelles il forme des kystes (Carruthers and Suzuki, 2007). *T. gondii* peut alors modifier le comportement de l'hôte et causer des problèmes neurologiques ou psychiatriques (Holliman, 1997 ; Webster *et al.*, 2006).

Chez les rongeurs, il a été démontré que le toxoplasme influence le comportement de l'hôte de façon à assurer sa survie et accomplir son cycle infectieux (Henriquez *et al.*, 2009). Les rats et les souris infectés par *Toxoplasma* ont en effet moins peur des chats : par exemple, les rats infectés n'évitent plus les zones marquées par l'urine des chats, soit parce qu'ils sont insensibles à l'odeur, soit parce qu'ils oublient leur crainte ancestrale du félin (Holliman, 1997 ; Webster *et al.*, 2006). Cet effet constitue un avantage pour le parasite, qui sera en mesure de se reproduire sexuellement si son hôte est mangé par un chat (Berdoy *et al.*, 2000).

Chez l'homme, plus de 9 % des fonctions cérébrales seraient altérées des suites d'une infection congénitale (Caiaffa *et al.*, 1993). La toxoplasmose chronique, chez un sujet immunocompétent, aurait une influence sur la personnalité, l'humeur, l'estime de soi et l'anxiété, avec une influence plus marquée chez les hommes (Lafferty, 2006 ; Flegr, 2007). L'infection serait également corrélée de façon positive, à une augmentation du taux d'accidents de voiture (risque doublé ou triplé) (Yereli *et al.*, 2006). Enfin, des

données épidémiologiques et des études comportementales et neurochimiques tendent à confirmer l'existence d'un lien étroit entre la schizophrénie et l'exposition de l'hôte à *T. gondii* (Dion *et al.*, 2009). Les personnes atteints de schizophrénie montrent en effet une forte prévalence en anticorps spécifiques anti-Toxoplasma (Mortensen *et al.*, 2007 ; Torrey *et al.*, 2007 ; Henriquez *et al.*, 2009). De plus, les signes cliniques de la schizophrénie semblent apparaître en même temps que les chorioretinites dues à *Toxoplasma* (Carruthers and Suzuki, 2007).

Bien que cette nouvelle thématique d'étude de la toxoplasmose attire de plus en plus de chercheurs, la plupart des études réalisées jusqu'à présent, ne dépasse pas encore le stade descriptif et les mécanismes par lesquels le parasite module le comportement de son hôte sont, à l'heure actuelle, totalement inconnus.

I-8) Diagnostic, traitements et vaccins

1) Diagnostic de la toxoplasmose

En routine, le diagnostic de la toxoplasmose n'est pratiqué que chez les femmes enceintes, en France, en Belgique, en Autriche, en Suède, dans certaines régions d'Italie, de Suisse et d'Allemagne. Le diagnostic peut être établi à partir de différentes méthodes biologiques (inoculation d'un prélèvement à des souris), sérologiques (tests d'agglutination, d'immunofluorescence, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)...), histologiques ou moléculaires (Polymerase Chain Reaction (PCR)). Les techniques sérologiques sont de loin, les plus courantes. Elles visent à dater la contamination en se basant sur la détection des Ig M spécifiques, caractéristiques de la phase aiguë ainsi que des Ig G spécifiques, révélatrices d'une infection plus ancienne. Des tests d'avidité des Ig G permettent également de préciser la date d'infection (Hill and Dubey, 2002). Les diagnostics de la toxoplasmose *via* les outils de biologie moléculaire (PCR conventionnelle, PCR quantitative en temps réel (qPCR), marqueurs microsatellites ...) sont de plus en plus employés parce qu'ils présentent l'avantage d'être rapides, sensibles et moins coûteux (Bessières *et al.*, 2009).

2) Les traitements de la toxoplasmose

Les traitements médicamenteux existants ne sont efficaces que contre les tachyzoïtes, limitant ainsi leur dissémination. Les plus courants combinent l'action d'un antibiotique, la sulfonamide (dont la cible serait la mitochondrie parasitaire), à celle d'un inhibiteur de la synthèse de l'acide folique, la pyriméthamine (perturbant la synthèse des acides

nucléiques parasites). Ces traitements sont très efficaces pour empêcher la multiplication des tachyzoïtes mais ils sont inefficaces sur les kystes. En outre, du fait de l'effet tératogène de la pyriméthamine, elle ne peut pas être prescrite aux femmes enceintes pour qui il n'existe actuellement, qu'un seul antibiotique, la spiramycine.

Les études récentes réalisées sur les voies métaboliques de l'apicoplaste (Cf Chapitre II-2-1) montrent que les voies de biosynthèse lipidique qu'il héberge, pourraient être les cibles de nouveaux traitements antiparasitaires (Bisanz *et al.*, 2006 ; Botté *et al.*, 2008 ; Lim and McFadden, 2010). De même, les ADN parasites plastidial et mitochondrial semblent représenter des cibles potentielles pour développer de nouvelles drogues anti-parasitaires (Sonda and Hehl, 2006 ; Goodman and McFadden, 2007). Une molécule permettant de réprimer l'activité d'une histone déacétylase (HDAC3) produite par *Toxoplasma* (et *Plasmodium*), favorisant la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes (Bougdoor *et al.*, 2009 ; Maubon *et al.*, 2010), constitue aussi un nouveau candidat médicament intéressant. Enfin, des études récentes ont montré que les deux antifongiques fluconazole et itraconazole réduisent le nombre de kystes et le taux de mortalité des souris infectées par le toxoplasme (Martins-Duarte *et al.*, 2010).

3) Les vaccins contre la toxoplasmose

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin contre la toxoplasmose humaine. Par contre, un vaccin commercial, connu sous le nom d'OVILIS® - TOXOVAX (commercialisé par la société INTERVET), est employé avec succès contre l'infection congénitale chez la brebis. Ce vaccin repose sur l'inoculation, juste avant la gestation, d'une souche atténuée de parasites incapables de se différencier en bradyzoïtes (Buxton and Innes, 1995). Ce vaccin n'est cependant pas utilisable chez l'homme car la vaccination par des parasites vivants atténués pourrait entraîner des risques potentiels de réactivation.

La vaccination des chats, hôtes définitifs responsables de la dissémination d'oocystes dans l'environnement, est un autre enjeu majeur des essais de vaccination. Une souche mutante, T-263, ayant perdu sa faculté de former des oocystes, a été développée et testée chez des chatons. Leur vaccination par des bradyzoïtes de la souche T-263 a empêché l'excrétion d'oocystes par 84 % des chatons (Frenkel *et al.*, 1991).

Une autre option est le recours à des parasites irradiés. Des essais sur les souches RH (type I) et Beverley (type II) ont montré qu'elles conservaient leur pouvoir invasif et leurs propriétés antigéniques, tout en ayant perdu leur potentiel de multiplication intracellulaire. La vaccination de souris par l'une ou l'autre de ces souches irradiées conduit à la résistance contre un challenge virulent par la souche RH. En revanche, la vaccination de chatons par la souche Beverley irradiée n'entraîne qu'une inhibition

partielle de l'excrétion d'oocystes après challenge homologue. De plus, la vaccination de chatons par la souche RH irradiée ne limite pas du tout la dissémination parasitaire après challenge par la souche Beverley (Omata *et al.*, 1996).

Les antigènes de surface du parasite (protéines SAG) ainsi que les antigènes sécrétés (protéine GRA et certaines protéines ROP) (Cf. Paragraphes II-1-2, II-1-6 et II-2-3), exprimés sous forme recombinante, seraient de bons candidats pour le développement de vaccins (Zhou *et al.*, 2007 ; Jongert *et al.*, 2009 ; Döşkaya *et al.*, 2009 ; Hiszczyńska-Sawicka *et al.*, 2010 ; Golkar *et al.*, 2007 ; Guionaud *et al.*, 2010). Certains de ces vaccins en sont au stade expérimental sur les modèles animaux et montrent une protection significative (Bout *et al.*, 2002 ; Tarleton, 2005 ; Döşkaya *et al.*, 2009). Récemment des protéines purifiées, associées à un adjuvant, ont été administrées à des chats par voie nasale, entraînant une bonne protection contre l'excrétion d'oocystes, puisque deux chats testés sur trois n'en sécrétaient pas. Ces résultats encourageants restent à confirmer du fait des faibles effectifs par lot d'animaux (Garcia *et al.*, 2007).

L'utilisation de vaccins ADN a été également testée chez les animaux d'élevage et les chats. Le principe de la vaccination ADN consiste à injecter non pas la protéine vaccinale mais l'ADN correspondant (Moiré *et al.*, 2009). L'injection de l'ADN dans un muscle strié aboutit à l'expression de la protéine correspondante dans les myocytes du lieu d'injection. Par exemple, l'immunisation de souris par un mélange de plasmides codant pour GRA4 et SAG1 protège les souris de façon significative contre la phase aiguë de l'infection (75 % de survie), ce résultat étant amélioré par la co-injection d'un plasmide codant pour le GM-CSF (87 % de survie) (Mévélec *et al.*, 2005).

Enfin, en 2004, une demande de brevet pour un nouveau vaccin anti-toxoplasmose utilisant une souche RH mutée par élimination des gènes *MIC1* et *MIC3* (mutant Knocked-out (KO) *MIC1-MIC3*) impliqués dans la virulence parasitaire, a été déposée. Chez la souris, l'immunisation par le KO *MIC1-MIC3* permet d'obtenir une forte réponse humorale et cellulaire de type Th1, avec une protection importante contre la toxoplasmose chronique (plus de 96% de réduction des kystes intra-cérébraux) (Ismael *et al.*, 2006). Ce vaccin confère également la protection contre l'infection congénitale chez la souris (survie de 100% des nouveaux-nés). Une étude réalisée chez 12 brebis séronégatives, vaccinées par voie sous-cutanée par le KO *MIC1-MIC3*, a mis en évidence une protection contre l'avortement dans 90% des cas (Mévélec *et al.*, 2010). Au vu de ces résultats, le parasite atténué KO *MIC1-MIC3* pourrait être commercialisé dès 2012, afin de vacciner les brebis contre la toxoplasmose congénitale.

CHAPITRE II : *Mise en place de la vacuole parasitophore*

T. gondii est capable d'envahir potentiellement tous les types de cellules nucléées des mammifères et d'oiseaux. En tant que parasite intracellulaire obligatoire, il a développé des mécanismes lui permettant d'envahir efficacement une cellule hôte et de survivre à l'intérieur de celle-ci. L'invasion est un phénomène actif et rapide qui aboutit à la création d'une VP isolée du trafic cellulaire et dans laquelle le parasite va pouvoir se multiplier. *T. gondii* est une cellule eucaryote à part entière mais avec des spécialités propres au phylum des Apicomplexa. L'objectif de ce deuxième chapitre d'introduction est de comprendre comment se forme et comment fonctionne la VP. La reconnaissance des récepteurs cellulaires à la surface de la cellule hôte constitue le point de non-retour qui déclenche une cascade moléculaire puissante impliquant les organites de sécrétion de *Toxoplasma* ainsi que son cytosquelette, afin de propulser le parasite dans la cellule hôte, tout en formant la VP. Je détaillerai donc cette cascade d'évènements qui aboutissent à la formation de la PV puis m'attarderai sur ses constituants et sur ce qui est connu du fonctionnement de la VP mature.

Le parasite présente une polarisation marquée, avec une extrémité antérieure effilée et une extrémité postérieure arrondie (**Figure 13**). Il a la forme d'un croissant et mesure 6-7 μm de long et 2-3 μm de large. Il comprend les organites classiques de toute cellule eucaryote (noyau, reticulum endoplasmique (RE), ribosomes (Hager *et al.*, 1999), un appareil de Golgi (Coppens *et al.*, 1999 ; Pelletier *et al.*, 2002), des lysosomes, une mitochondrie unique et il est délimité par une membrane plasmique. Caractéristique commune à tous les *Alveolata* (Cf. chapitre I-2), la membrane plasmique est associée à un complexe membranaire interne (IMC, pour « inner membrane complex »), constitué de deux saccules membranaires étroitement accolés, l'ensemble membrane plasmique et IMC constituant la pellicule. *T. gondii* possède également des organites particuliers,

parmi lesquels un plaste non photosynthétique (l'apicoplaste), une vacuole rappelant celle des cellules végétales (Miranda *et al.*, 2010 ; Van Dooren and Ralph, 2010) ainsi qu'un complexe apical formé d'un conoïde et de trois types d'organites de sécrétion propres au phylum des Apicomplexa, les micronèmes, les rhoptries et les granules denses (GD) (**Figure 12**).

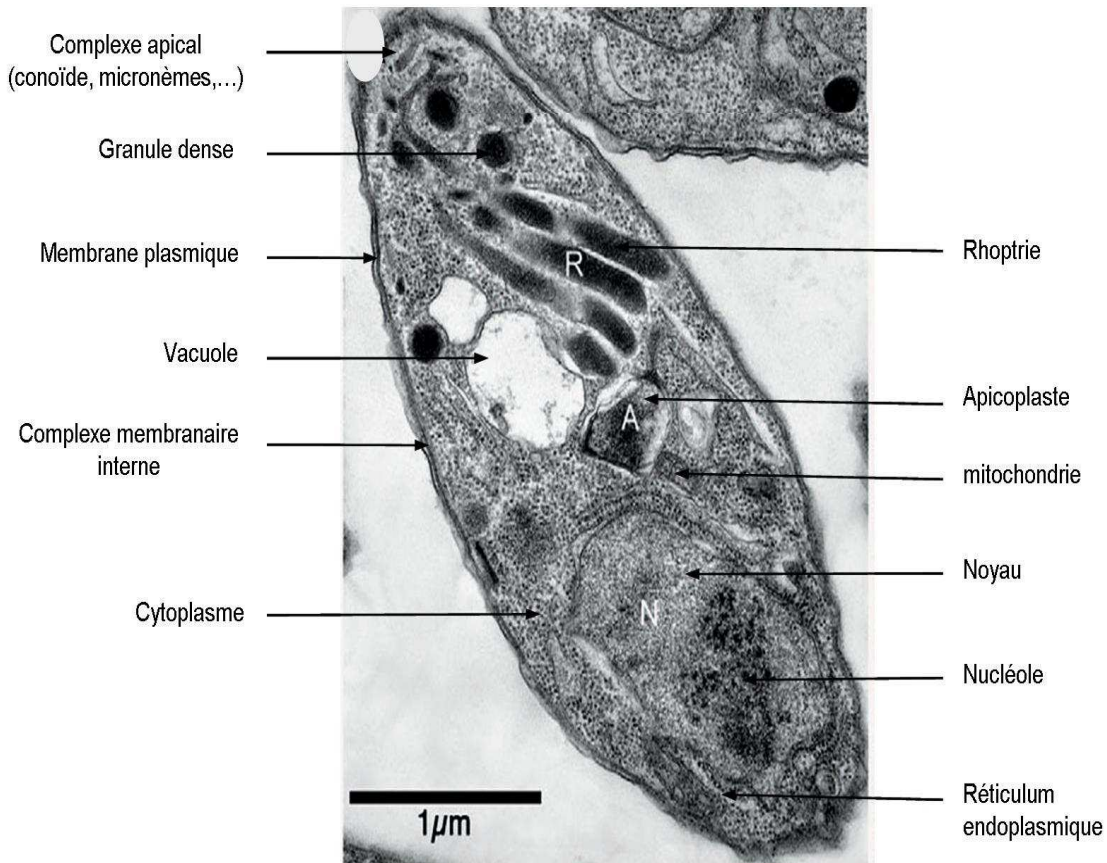


Figure 12. Photo de microscopie électronique à transmission d'un tachyzoïte extracellulaire
Adapté de (Miranda *et al.*, 2010).

Avant d'introduire la VP à proprement parler, je résumerai très brièvement l'état des connaissances sur le génome parasite.

A l'exception de sa division sexuée dans l'intestin du chat et juste avant sa division binaire en deux cellules filles (Cf. Chapitre II-3), le génome de *T. gondii* est haploïde (McLeod *et al.*, 1991).

◆ **Le génome nucléaire** contient 65 Mb d'ADN réparties sur 14 chromosomes dont la taille varie entre 2 et 8 Mb (Sibley and Ajioka., 2008). Les génomes de plusieurs souches parasites représentatives des 3 souches archétypales (ME49 (type II) ; GT1 (type I) ;

RH (type I) ; VEG (type III)), ont été séquencés et sont maintenant en cours d'annotation (<http://www.toxoDB.org>). Le génome nucléaire comporte environ 8 000 gènes dont la majorité ne contient pas d'introns (Xia *et al.*, 2008). Pour la plupart de ces gènes, il n'existe qu'une seule copie. Les analyses bioinformatiques montrent que la machinerie de transcription des Apicomplexa serait rudimentaire (Meissner and Soldati, 2005). L'analyse prédictive du génome révèle que le protéome renfermerait 11% de protéines contenant un peptide signal et 18% de protéines contenant un domaine transmembranaire, ces statistiques étant similaires à celles obtenues à partir de l'analyse protéomique de *Plasmodium falciparum* (<http://www.toxoDB.org> ; Xia *et al.*, 2008).

En plus de son génome nucléaire, *T. gondii* contient deux génomes extra-chromosomiques :

◆ **un génome mitochondrial** (Cf. Chapitre II-2-1) qui contiendrait 34 kb de séquences répétées en tandem codant par exemple, pour le cytochrome B, les sous-unités de la cytochrome C oxydase ainsi qu'un ARN ribosomal fragmenté (Joseph *et al.*, 1989 ; Sibley and Ajioka, 2008) ;

◆ **un génome plastidial** circulaire de 35 Kb (Fichera and Roos, 1997 ; Maréchal and Cesbron-Delauw, 2001 ; McFadden and Waller, 1997 ; Foth and McFadden, 2003), localisé dans l'apicoplaste (Cf Paragraphe II-2-1), et riche en bases A-T (environ 78,4 %) (Cai *et al.*, 2003). Aucun gène ni pseudogène codant pour une protéine de photosynthèse n'y est prédit (Bisanz *et al.*, 2008). Le génome plastidial coderait pour 60 gènes environ, parmi lesquels une ARN polymérase, des gènes ribosomaux (Roos *et al.*, 1999 ; McFadden and Waller, 1997) et des gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras, comme par exemple : *Acp*, *Fab H* et *Fab Z* (Bisanz *et al.*, 2006).

II-1) Invasion de la cellule hôte et formation de la VP

L'entrée active du tachyzoïte dans la cellule hôte est un phénomène très rapide puisqu'elle nécessite moins de 20 secondes. Elle mobilise essentiellement le complexe apical du parasite ainsi que son cytosquelette et son IMC. L'ensemble des processus qui aboutissent à la formation de la VP et qui sont décrits ci-dessous, sont relativement bien conservés chez tous les Apicomplexa. Dans ce chapitre, après avoir rappelé quelles sont les bases de la mobilité parasitaire, je m'attacherai à décrire les organites impliqués dans l'invasion ainsi que les événements moléculaires et cellulaires de l'invasion aboutissant à la formation de la VP, tels qu'ils sont connus actuellement, en les découpant selon les 7

étapes présentées sur la **figure 13**. J'aborderai également les modifications connues de la cellule hôte, suite à la formation de la VP.

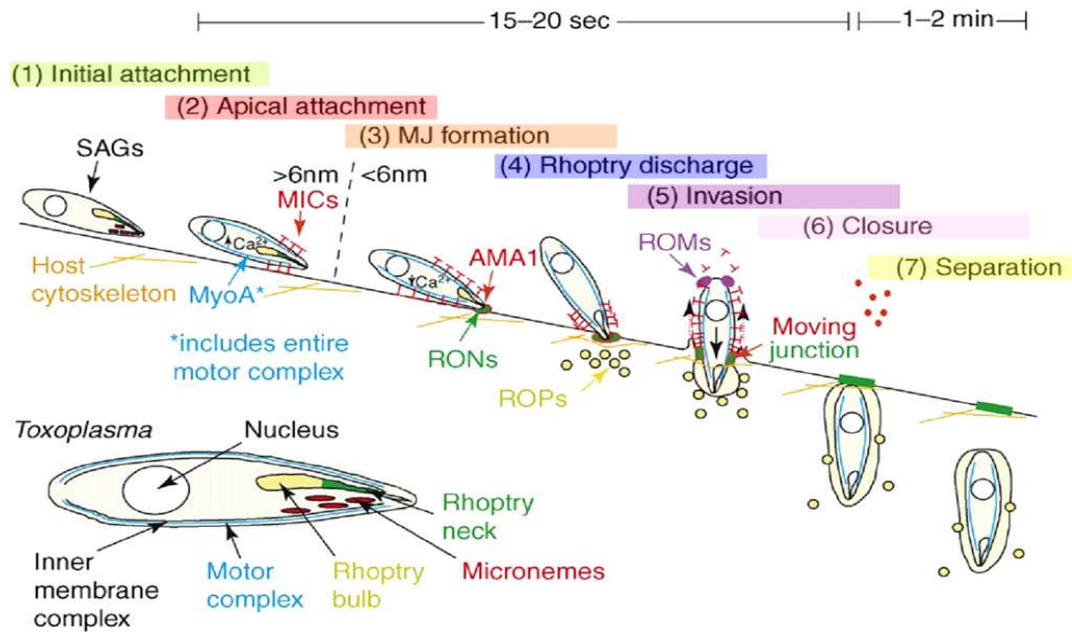


Figure 13. Modèle d'invasion de *Toxoplasma* en 7 étapes. (1) L'attachement initial à la cellule hôte implique la reconnaissance des récepteurs de surface cellulaire par les protéines de surface SAG. (2) Les protéines MIC sécrétées en réponse à un flux de calcium, s'accumulent à la surface du parasite, au niveau apical (en forme de T rouge) et permettent l'attachement du parasite à la cellule hôte. (3) Après l'extrusion du conoïde, la jonction mobile (vert et anneau rouge) se forme avec la sécrétion des protéines RON (vert) qui s'associent à la protéine AMA1 issue des micronèmes (cercles rouges). Une interface d'interaction avec la cellule hôte inférieure à 6 nm et en forme de petit anneau est ainsi créée, c'est la jonction mobile. (4) Les protéines ROP (jaune) sont sécrétées dans le cytoplasme de l'hôte, au niveau du site d'invasion. (5) Le parasite pénètre activement la cellule hôte et pousse (flèches latérales) les MICs transmembranaires et/ou l'anneau AMA1/RON vers la partie postérieure du parasite, en invaginant la membrane de la cellule hôte pour créer la VP. Une ou plusieurs protéases rhomboïdes (ROM) (en violet) clivent et libèrent les MIC de la partie postérieure. (6-7). Alors que le parasite accomplit les étapes 2 à 5 en 15 à 20 s, les dernières étapes, c'est-à-dire la clôture de la VP et sa séparation de la membrane plasmique de la cellule hôte, nécessitent 1 à 2 min. D'après (Carruthers and Boothroyd, 2007).

1) *T. gondii*, un parasite très mobile

Les stades infectieux de *T. gondii* et des autres Apicomplexa sont mobiles. *T. gondii* ne possède pourtant ni cil, ni flagelle et il n'effectue pas de mouvement amoéboïde. Néanmoins, il est capable de se déplacer sur un substrat solide, selon une polarité antéro-postérieure, par un mouvement de glissement appelé « gliding » (**Figure 14**). Ce mode de déplacement, très conservé chez les Apicomplexa, est exceptionnellement rapide, atteignant des vitesses de 20 $\mu\text{m/s}$ *in vitro* (Black and Boothroyd, 2000). Le gliding peut être observé aussi bien *in vitro* qu'*in cellulo*, dans différentes conditions : sur substrat artificiel (**Figure 14B**) ; au cours de la recherche d'une cellule hôte, donc lors des étapes très précoces de l'invasion ; au cours de l'égress des parasites (Cf. Chapitre

II-4) et à travers les différentes barrières cellulaires afin d'assurer la dissémination du parasite dans l'organisme hôte.

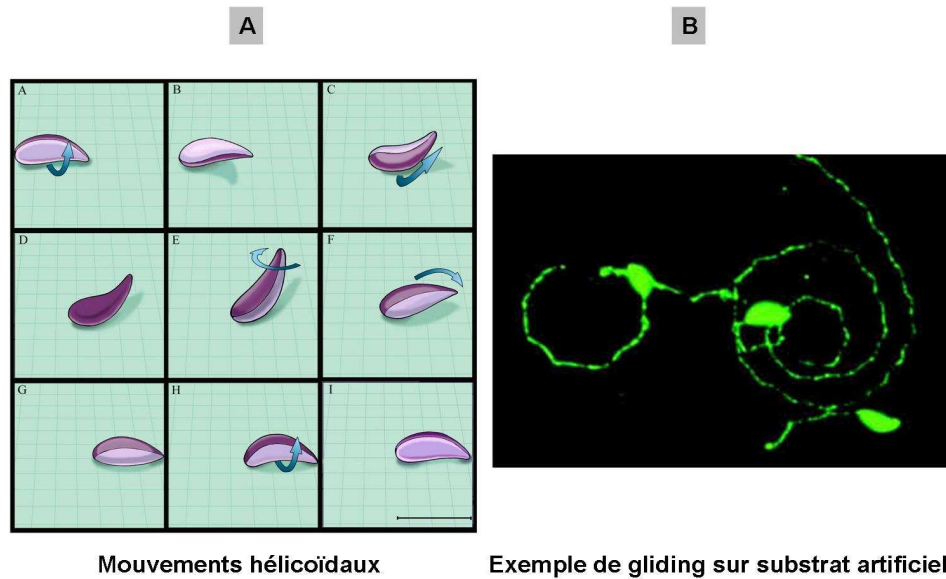


Figure 14. Le gliding de *Toxoplasma*. (A) Schéma des mouvements hélicoïdaux effectués par le parasite. D'après (Hakansson *et al.*, 1999). (B) Visualisation par immunofluorescence, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine de surface SAG1, de la trace laissée par le parasite en mouvement sur une lame de verre recouverte de sérum. D'après (Sibley, 2003).

C'est la pellicule qui abrite la structure responsable de ces mouvements et qui est appelée le «glideosome» (Soldati and Meissner, 2004). Celui-ci est situé entre la membrane plasmique du parasite et l'IMC et il sera décrit en détails dans le chapitre II-1-5.

2) Phase initiale de l'attachement du parasite à la cellule hôte : rôle des protéines de la membrane plasmique

La membrane plasmique de *Toxoplasma* est une bicouche lipidique classique. Elle permet la fixation du parasite sur son substrat ainsi que l'ancrage des protéines du glideosome (Cf. Chapitre II-1-5). Bien que le fractionnement sub-cellulaire de cette membrane plasmique soit possible (Lei *et al.*, 2005), on n'en connaît pas encore la composition lipidique exacte. Elle possède de nombreuses protéines GPI-ancrées associées à des domaines lipidiques résistant aux détergents (DRM) (Azzouz *et al.*, 2006). C'est la famille des protéines SAG qui constitue la famille d'antigènes majeurs de la surface parasitaire (Mineo and Kasper, 1994 ; Crawford *et al.*, 2010). Actuellement, 160 membres environ de la famille des SRS (SAG Related Sequences) ont été identifiés mais la résolution de la structure tri-dimensionnelle n'a été obtenue que pour SAG1, la première protéine

identifiée de cette famille (Crawford *et al.*, 2009). SAG1 constitue d'ailleurs l'antigène majeur de la surface de *Toxoplasma*.

L'attachement de *T. gondii* à sa cellule cible est cycle cellulaire-dépendant. Le taux d'invasion dans les cellules en phase S est en effet largement supérieur à celui observé pendant les autres stades du cycle cellulaire (Grimwood *et al.*, 1996 ; Behnke *et al.*, 2010). Dans un premier temps, le contact entre le parasite et la cellule hôte est établi de manière transitoire, par les protéines SAG (**Figure 13-1**) (He *et al.*, 2002). Ces protéines reconnaissent les glycosaminoglycanes (GAG) présents à la surface de la cellule hôte. Les différentes protéines SAG impliquées sont capables de reconnaître différents types de GAG, ce qui pourrait expliquer en partie, la spécificité d'invasion stade-dépendante qui est observée et pourrait également expliquer le fait que le parasite soit capable d'envahir des types cellulaires très différents (Carruthers and Boothroyd, 2007).

3) Attachement apical du parasite à la cellule hôte : rôle des protéines de micronèmes

Les micronèmes sont de petites structures vésiculaires en forme de bâtonnets, d'environ 250 nm de long et 50 nm de large. Ils sont localisés dans la partie la plus apicale du parasite, juste sous le conoïde. On peut en compter jusqu'à 100 par cellule parasitaire et ils apparaissent denses aux électrons (**Figure 12**).

La composition lipidique de la membrane des micronèmes est inconnue. De même, le protéome est incomplet. Cependant, à ce jour, une trentaine de protéines a été identifiée dans ces organites (Dowse and Soldati, 2004 ; Carruthers *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2004 ; Binder *et al.*, 2008 ; Kawase *et al.*, 2010 ; Kafsack and Carruthers, 2010).

En se basant sur leur structure primaire, les protéines MIC (protéines de micronèmes), très conservées parmi les Apicomplexa, peuvent être classées en deux catégories, les solubles et les transmembranaires. La caractérisation moléculaire des deux catégories de protéines MIC a révélé une conservation frappante de domaines structuraux, souvent présents sous plusieurs copies. Ces domaines présentent de fortes homologues avec des domaines d'adhésion identifiés dans des protéines d'eucaryotes supérieurs (Tomley and Soldati, 2001 ; Carruthers and Tomley, 2008). Ces domaines d'adhésion, impliqués dans les interactions protéines-protéines, protéines-carbohydrates et protéines-GAG ainsi que dans la reconnaissance cellulaire, sont listés sur la **Figure 15** (Dowse and Soldati, 2004 ; Saouros *et al.*, 2005 ; Lebrun *et al.*, 2007 ; Blumenschein *et al.*, 2007). La résolution de la structure tridimensionnelle de quelques unes des protéines MIC ou de certains de leurs domaines ainsi que l'incubation de protéines MIC recombinantes sur des puces à sucres a d'ailleurs permis de démontrer l'interaction par exemple entre MIC1 et MIC13 et l'acide

sialique de certains GAGs (Tonkin *et al.*, 2010 ; Friedrich *et al.*, 2010 ; Blumenschein *et al.*, 2007).

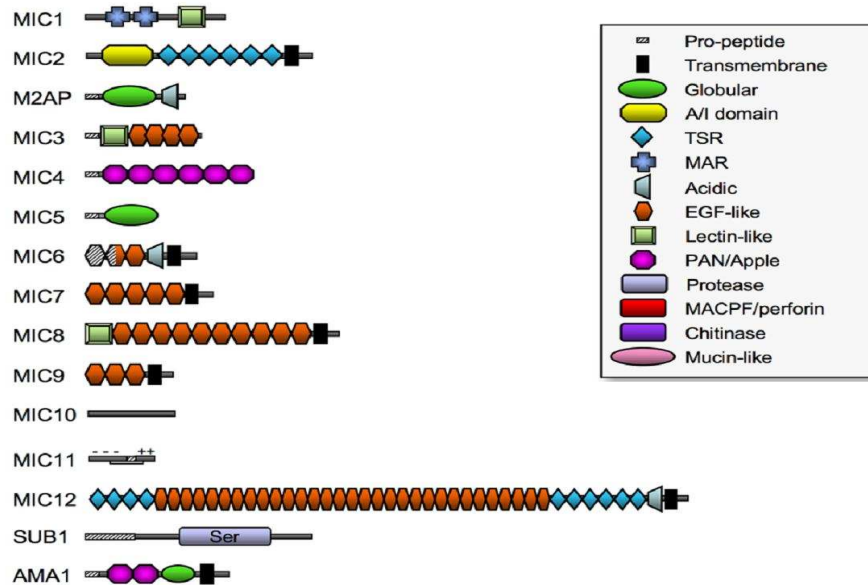


Figure 15. Organisation modulaire des principales protéines MIC identifiées. Les principaux domaines protéiques analogues aux domaines d'adhésion des protéines de cellules des eucaryotes supérieurs, incluent des domaines homologues au facteur EGF (Epidermal Growth Factor), des répétitions thrombospondine (TSR), des domaines intégrine A, des domaines analogues aux lectines, des domaines Apple et/ou des domaines MAR (Microneme Adhesive Repeat) qui lient les oligosaccharides sialylés de la cellule hôte. D'après (Carruthers and Tomley, 2008)

Durant leur trafic entre le RE et les micronèmes, les protéines MIC s'assemblent en complexes et subissent deux étapes de clivage avant d'être activées et sécrétées (Conseil *et al.*, 1999 ; Harper *et al.*, 2006 ; Teo *et al.*, 2007). Une première étape de clivage du propeptide, assuré par une cystéine protéase, peut être la cathepsine L, serait nécessaire au ciblage des protéines vers les micronèmes, leur sécrétion et la formation de complexes MIC. Trois types de complexes de protéines MIC ont été identifiés pendant le trafic jusqu'aux micronèmes (MIC6/MIC1/MIC4 ; MIC2/M2AP et MIC3/MIC8), les protéines transmembranaires MIC2 et MIC6 jouant le rôle d'escorter des protéines solubles qui leur sont associées (Figure 16) (Reiss *et al.*, 2001 ; Jewett and Sibley, 2004 ; Friedrich *et al.*, 2010).

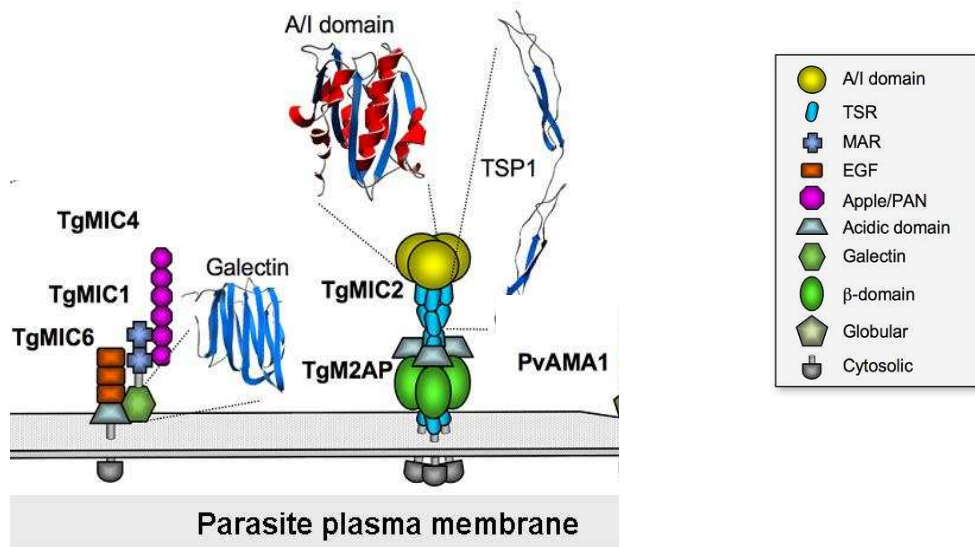


Figure 16. Deux complexes de protéines MIC identifiés jusqu'à présent. Parmi les protéines MIC transmembranaires, seules MIC2 et MIC6 jouent le rôle d'escorter pour le trafic et la sécrétion des protéines MIC solubles qui leur sont associées (M2AP dans le cas de MIC2 et MIC1/MIC4 dans le cas de MIC6). Les domaines protéiques rouges indiquent un repliement en hélice α , les domaines bleus sont en feuillets β et les domaines gris correspondent à des domaines non structurés. La figure montre la prédiction de la distance (en nm) entre les différents complexes de protéines MIC représentés et la membrane plasmique parasitaire. Adapté de (Carruthers and Tomley, 2007).

Lors du processus d'invasion, les protéines de micronèmes sont sécrétées par la partie apicale du parasite, au moment du contact avec la cellule hôte et suite à une élévation transitoire de la concentration intracellulaire en calcium (Carruthers and Sibley, 1999), ce qui induit également l'extrusion du conoïde (Figure 13-2) (Cf. Chapitre II-1-4) (Carruthers and Sibley 1997 ; Soldati *et al.*, 2001). Une fois sécrétées, les MIC transmembranaires adoptent une topologie de type I dans la membrane plasmique du parasite. La protéase SUB1, sécrétée également à partir des micronèmes, semble jouer un rôle clé pour cliver et activer les complexes effecteurs MIC2/M2AP et MIC6/MIC1/MIC4 (Lagal *et al.*, 2010 ; Sheiner *et al.*, 2010), afin de permettre leur attachement aux récepteurs présents à la surface de la cellule hôte (ex : reconnaissance de ICAM1 (IntraCellular Adhesion Molecule 1) et de l'héparine par MIC2) (Brossier and Sibley, 2005 ; Carruthers and Blackman, 2005 ; Brossier *et al.*, 2005 ; Dowse *et al.*, 2005). La diversité des liaisons engagées entre les différents complexes de protéines MIC et les différents récepteurs cellulaires conférerait au parasite, la capacité d'interagir avec un très grand nombre de types cellulaires (Cérède *et al.*, 2005).

Parce que les interactions entre les protéines MIC et les récepteurs cellulaires ne doivent être que transitoires, les complexes de protéines MIC doivent être rapidement désassemblés : c'est le rôle des protéases rhomboïdes à sérine ROM4 et ROM5 de la membrane plasmique parasitaire. Ces protéases cliveraient les domaines transmembranaires de MIC2 et MIC6 à l'intérieur même de la membrane plasmique

parasitaire, libérant ainsi les domaines d'adhésion extracellulaires dans le milieu extracellulaire (Dowse and Soldati, 2004 ; Dowse *et al.*, 2005).

Après leur sécrétion, certaines des protéines de micronèmes telles que AMA1, s'associent à des protéines de rhoptries, notamment à celles du complexe de protéines RON impliqué dans la formation de la jonction mobile (Cf. Chapitre I-6-b). Enfin, d'autres protéines de micronèmes, telles que les perforines, sont impliquées dans le processus d'évasion (egress) des parasites de la cellule hôte (Cf. Chapitre II-4) (Kafsack and Carruthers, 2010).

4) Extrusion du conoïde

Parmi les Alveolata, les Apicomplexa et les Dinoflagellés partagent la caractéristique de contenir un conoïde à leur extrémité apicale. Le conoïde est un cylindre légèrement conique, constitué de microtubules de 26 à 30 nm de long, enroulés en spirale (**Figure 17**) (Hu *et al.*, 2006). Le conoïde est limité à l'avant, par deux anneaux pré-conoïdaux et à l'arrière, par deux anneaux polaires. L'anneau polaire postérieur constitue le centre organisateur des 22 microtubules sous-pelliculaires qui s'étendent le long de la face cytoplasmique de l'IMC et qui donnent sa forme arquée au parasite (Hu *et al.*, 2006). Le conoïde comporte également deux microtubules centraux, étroitement liés l'un à l'autre, et dont l'un des rôles serait de servir de rails de transport aux vésicules de sécrétion lors de l'invasion (Carruthers and Sibley, 1997).

Des traitements de parasites extracellulaires par des détergents conduisent à la purification du cytosquelette parasitaire, ce qui a permis de réaliser l'analyse protéomique du complexe apical. Celle-ci a révélé la présence de nombreuses protéines homologues aux protéines du cytosquelette des cellules de mammifères (Hu *et al.*, 2006 ; Heaslip *et al.*, 2009).

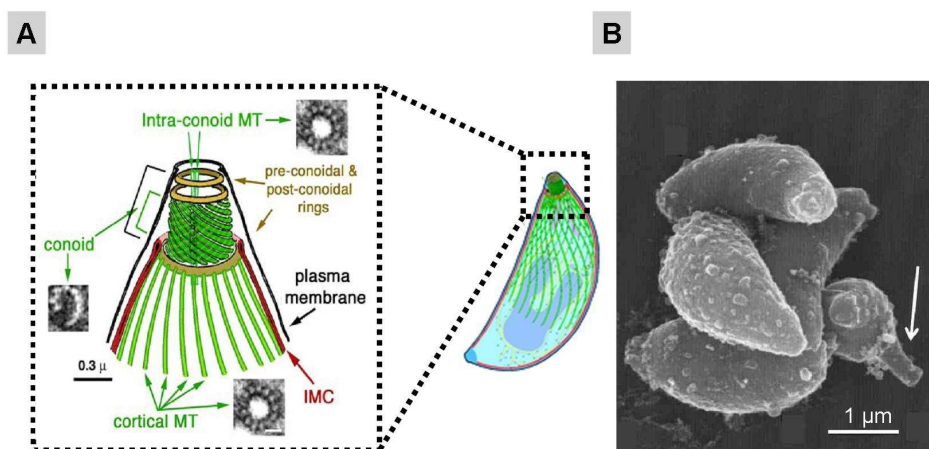


Figure 17. Le conoïde de *T. gondii*. (A) Schéma du complexe apical (encadré) : il comporte deux anneaux pré-conoïdaux à l'avant, et deux anneaux polaires à l'arrière. Les anneaux polaires délimitent le conoïde en forme de cylindre. Le conoïde est constitué de microtubules enroulés en spirale. L'anneau polaire postérieur est le centre organisateur des 22 microtubules qui s'étendent le long de la face cytoplasmique de l'IMC. Echelle : 0,3 µm. Adapté de (Heaslip *et al.*, 2009). (B) Photo de microscopie électronique à balayage qui montre la protrusion du conoïde d'un tachyzoïte traité par un calcium ionophore. La flèche blanche indique un conoïde extrudé. L'échelle est de 1 µm. (Monteiro *et al.*, 2001).

Le conoïde est une structure rétractile qui effectue des mouvements de protrusion et de rétraction (**Figure 17B**). L'extrusion du conoïde peut être stimulée *in vitro*, de façon irréversible, par un flux de calcium induit par l'ionomycine (calcium ionophore) (Mondragon *et al.*, 1996, Monteiro *et al.*, 2001 ; Caldas *et al.*, 2010). De même, elle peut être induite de façon réversible, par un traitement du parasite par l'éthanol, déjà connu pour induire la sécrétion des micronèmes. La cascade d'induction qui conduit à l'extrusion du conoïde passe par l'activation de la phospholipase C, la libération de calcium intracellulaire par des canaux sensibles au phosphatidyl inositol (3) phosphate. Les filaments d'actine ainsi que la myosine du parasite mais pas ses microtubules sont mobilisés. A l'inverse, l'extrusion du conoïde peut être inhibée par un pré-traitement des parasites par des inhibiteurs de sérine-thréonine kinases (Del Carmen *et al.*, 2009). De même, lors de l'invasion, c'est un flux de calcium qui déclenche la protrusion du conoïde. Cette extrusion assurerait une poussée mécanique sur la membrane plasmique de la cellule hôte et constituerait une des étapes initiales dans la formation de la VP. La rétraction du conoïde se fait à la fin de l'invasion et implique les filaments d'actine (Frixione and Mondragon, 1996).

5) Propulsion dans la cellule hôte grâce au glideosome

Pour comprendre la mise en place du complexe protéique du glideosome responsable du déplacement parasitaire par gliding et de l'invasion dans la cellule hôte, il est nécessaire de se familiariser avec le cytosquelette complexe du parasite. Ce cytosquelette est étroitement associé à la pellicule, qu'il est donc nécessaire d'introduire également.

La pellicule est constituée d'un complexe tri-membranaire de 60 nm d'épaisseur, formé d'une membrane plasmique externe et de l'IMC, lui-même constitué de deux membranes très proches l'une de l'autre, résultant de vésicules aplaties (Morrissette and Sibley, 2002) (**Figure 18**). L'IMC, par sa membrane interne, est étroitement associée aux 22 microtubules sous-pelliculaires ainsi qu'à un réseau sous-pelliculaire composé probablement de filaments intermédiaires de 8 à 10 nm de diamètre (Mann and Beckers, 2001) formant un maillage régulier ressemblant à un grillage en deux dimensions (Morrissette *et al.*, 1997). La pellicule, dans son ensemble, joue un rôle structural, en renforçant la structure du parasite, par l'accumulation des bicouches membranaires. Elle sert également de point d'ancrage au glideosome et aux microtubules. Elle jouerait enfin un rôle d'interface pour les échanges métaboliques entre la cellule hôte et le parasite.

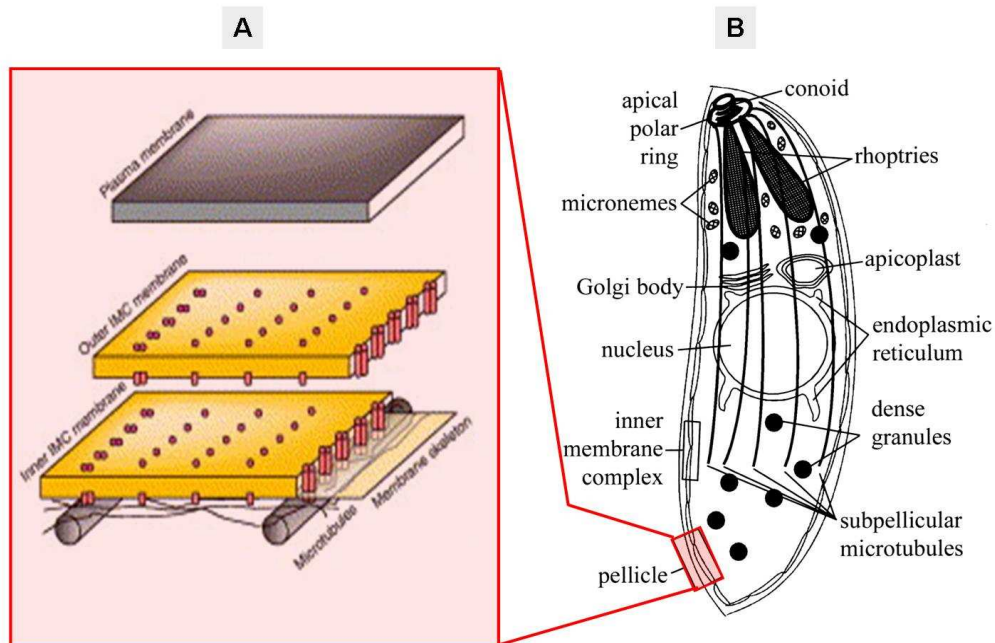


Figure 19. Représentation schématique de l'organisation de la pellicule de *T. gondii*. (B) Schéma illustrant les principales structures internes du tachyzoïte. Adapté de (Morrissette and Sibley, 2002). (A) Agrandissement de la zone de la pellicule encadrée en rouge. (B). La pellicule comprend trois membranes : la membrane plasmique, le complexe membranaire interne (IMC) qui comporte lui-même, deux membranes : la membrane intra- et la membrane extra-cytosolique. Adapté de (Soldati and Meissner, 2004).

a) le complexe membranaire interne (IMC) et le réseau sous-pelliculaire

L'IMC est un réseau membranaire situé à environ 15 nm en dessous de la membrane plasmique. Il est formé par la fusion de vésicules aplaties dont l'origine serait le RE (Vivier and Petitprez, 1969). L'IMC entoure complètement le parasite, sur toute sa longueur, mais il s'interrompt à l'avant, au niveau de l'anneau polaire postérieur, de façon à permettre l'extrusion du conoïde. L'IMC s'interrompt également au pôle postérieur du parasite, au niveau d'un anneau postérieur, structure qui termine l'ensemble du réseau de cytosquelette sous-pelliculaire (Morrissette and Sibley, 2002). Enfin, l'IMC est également interrompu au niveau d'une zone appelée micropore, correspondant à une invagination circulaire de la membrane plasmique, dans la partie antérieure du parasite, juste au dessus du noyau.

L'association entre la membrane plasmique et l'IMC est probablement médiée par des complexes protéiques composés soit d'éléments du glideosome, soit d'autres protéines de l'IMC, soit de protéines du cytosquelette encore non identifiées. Les observations en cryofracture de la membrane de la face cytosolique de l'IMC montrent des rangées

régulières de particules intramembranaires (IMP, IntraMembranous Particles) (Morrissette and Sibley, 2002). Ces particules représenteraient le domaine cytoplasmique de protéines transmembranaires de la membrane interne de l'IMC, protéines qui arrimeraient le réseau sous-pelliculaire de microtubules à l'IMC.

A ce jour, au moins une vingtaine de protéines ont été décrites comme appartenant à l'IMC et associées au cytosquelette, parmi lesquelles GAP50 et GAP45 (« Glideosome Associated Proteins » de 50 et 45 kDa, respectivement) (Lorestani *et al.*, 2010 ; Mann and Beckers, 2001 ; Gilk *et al.*, 2006 ; Bullen *et al.*, 2009). La composition lipidique de l'IMC reste inconnue. On sait cependant qu'il contient des DRM (Azzouz *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2007). La protéine GAP50 s'ancre d'ailleurs dans la membrane externe de l'IMC, par l'intermédiaire de ces DRM riches en cholestérol (Johnson *et al.*, 2007).

b) les microtubules sous-pelliculaires

T. gondii possède deux populations de microtubules : les microtubules du fuseau mitotique, qui permettent la séparation du matériel génétique du noyau lors de la division cellulaire (Cf. Chapitre II-3) et les microtubules sous-pelliculaires (**Figure 19**). Ces 22 microtubules, sensibles uniquement aux inhibiteurs de polymérisation des microtubules de type végétal (ex : dinitroanilines) (Stokkermans *et al.*, 1996), s'étendent depuis l'anneau polaire postérieur du conoïde jusque sous le noyau. Cet anneau polaire postérieur constitue d'ailleurs le centre organisateur de ces microtubules. En effet, l'analyse du protéome du conoïde (Hu *et al.*, 2006) a montré la présence de γ -tubuline, à l'origine de l'anneau γ , structure de base des centres organisateurs MTOC (MicroTubule Organizing Center). La composition protéique des microtubules sous-pelliculaires demeure inconnue. Des données récentes y localisent l'articuline, protéine associée au cytosquelette de nombreux protozoaires (Lemgruber *et al.*, 2009). Le rôle principal de ces microtubules est de maintenir la forme en croissant de la cellule parasitaire, grâce à la tension qu'ils imposent sur la face cytosolique de l'IMC, par l'intermédiaire du réseau sous-pelliculaire de filaments intermédiaires.

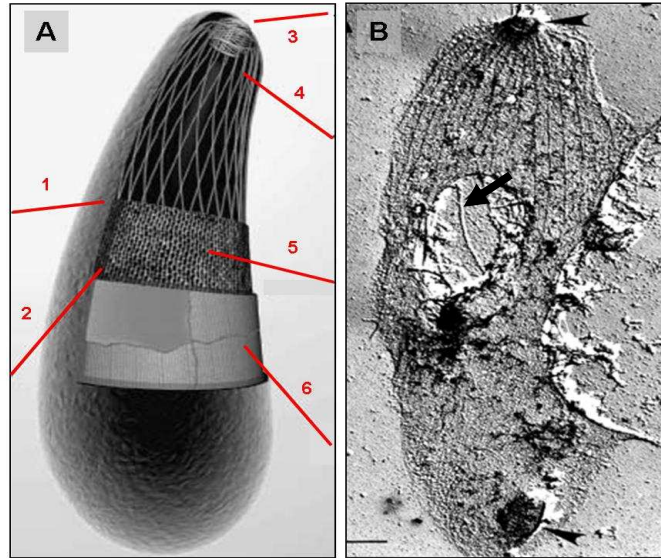


Figure 19. Structure et localisation des principaux éléments de la pellicule et du cytosquelette de *T. gondii*. (A) Schéma de l'organisation de la pellicule et du cytosquelette qui lui est associé. Le réseau sous-pelliculaire, probablement formé de filaments intermédiaires (5), se situe entre l'IMC (6) et les microtubules sous-pelliculaires (4). De courts filaments instables d'actine se forment entre la membrane plasmique et l'IMC (2). La membrane plasmique délimite la périphérie du parasite (1). Le conoïde occupant la partie apicale du parasite est représenté en (3). Photo réalisée par P. Warfer. site web du laboratoire de L.D. Sibley. (B) cliché de microscopie électronique à transmission du réseau sous-pelliculaire purifié (Mondragon *et al.*, 1996). Les anneaux polaires antérieurs et postérieurs (pointes de flèches) ferment ce réseau au niveau du pôle apical et postérieur, respectivement. Le réseau de microtubules sous-pelliculaires (flèche) est intact et encore lié au réseau sous-pelliculaire.

c) Le cytosquelette d'actine

Bien que le rôle de l'actine dans la mobilité du tachyzoïte de *T. gondii* ait été suggéré depuis les années 80 grâce à l'utilisation de la cytochalasine D (mycotoxine inhibant la polymérisation de l'actine), la localisation des filaments d'actine n'avait pas été élucidée car des anticorps spécifiques d'actines hétérologues ne la détectaient qu'exceptionnellement dans le cytoplasme parasite et parce que la phalloïdine, qui stabilise les filaments d'actine, ne permettait pas de les visualiser (Shaw et Tilney, 1999). De plus, des études de fractionnement cellulaire indiquaient que plus de 97% de l'actine était sous forme monomérique (Dobrowolski *et al.*, 1997). Ce n'est que suite à l'utilisation de jasplakinolide, qui stabilise les filaments d'actine et induit sa polymérisation, que ceux-ci ont pu être localisés par microscopie à balayage ou à haute résolution. Les filaments d'actine ont ainsi été localisés entre la membrane plasmique du parasite et l'IMC (Figure 19) (Schatten *et al.*, 2003). L'actine des Apicomplexa, majoritairement globulaire, ne permet d'ailleurs de former que de courts filaments relativement instables (Wetzel *et al.*, 2003). L'utilisation de la microscopie électronique sur le cytosquelette purifié à partir du parasite a également mis en évidence que le réseau sous-pelliculaire qui comprend les filaments intermédiaires et qui est en

association étroite avec la face interne de l'IMC, était aussi composé de filaments d'actine (Mann et Beckers, 2001 ; Patron *et al.*, 2005).

d) La myosine

Trois myosines ont été identifiées et clonées chez *T. gondii* : leur singularité a permis de définir une nouvelle classe de myosines, la classe XIV (Heintzelman et Schwartzman, 1997). Parmi elles, MyoA est très particulière car elle ne possède pas le domaine cou existant dans toutes les autres myosines. MyoA a été co-localisée avec l'actine, dans la périphérie du tachyzoïte, en association, par son domaine queue (Hettmann *et al.*, 2000), avec la membrane plasmique (Dobrowolski *et al.*, 1996). Des inhibiteurs de la fonction ATPasique de MyoA bloquent la mobilité du parasite, prouvant son rôle dans le gliding (Dobrowolski *et al.*, 1996). Des études chez *Plasmodium* ont par contre, montré que MyoA est localisée au niveau de l'IMC, et non au niveau de la membrane plasmique (Bergman *et al.*, 2003). Malgré l'absence de domaine cou, MyoA conserve donc les caractéristiques biochimiques des myosines : elle peut lier l'actine de manière dépendante de l'ATP (Herm-Gotz *et al.*, 2002). C'est un moteur rapide, permettant une avancée du parasite avec une vitesse de 5,2 $\mu\text{m/s}$. Son rôle définitif dans le gliding et l'invasion a ensuite été démontré par la construction de parasites KO conditionnels : les parasites n'exprimant plus MyoA sont incapables de glisser sur un substrat et d'infecter d'autres cellules une fois que leur cellule hôte est lysée (Meissner *et al.*, 2002).

e) Le glideosome

C'est la pellicule qui abrite le «glideosome», c'est-à-dire le complexe moléculaire associé à MyoA et responsable des mouvements du parasite (Soldati and Meissner, 2004). A la base de ce concept, l'idée était que pour que l'actine et la myosine puissent générer la force nécessaire au gliding et à l'invasion, elles devaient être associées à l'IMC d'une part et aux récepteurs cellulaires et à la membrane plasmique parasitaire d'autre part, d'où l'idée de rechercher les partenaires protéiques de MyoA (Opitz and Soldati, 2002).

Le glideosome (**Figure 20**) est donc localisé entre la membrane plasmique du parasite et l'IMC : il est ancré par la protéine GAP50 (Cf. Chapitre II-1-5), dans la membrane externe de l'IMC et par le complexe MIC2-M2AP (Cf. Chapitre II-1-3), dans la membrane plasmique parasitaire (Foth *et al.*, 2006). Le domaine C-terminal intra-parasitaire de MIC2 est arrimé au glideosome par l'intermédiaire de l'aldolase, elle-même liée à l'actine. L'ancrage de cet assemblage à GAP50 de l'IMC se fait par l'intermédiaire de MyoA, MLC (Myosin Light Chain) et GAP45, elle-même liée à GAP50. C'est donc le complexe GAP50/GAP45/MLC/MyoA qui constitue le glideosome (**Figure 20**). Ce complexe se

forme en deux temps : le complexe soluble MyoA/MLC1/GAP45 cytoplasmique est d'abord recruté dans la membrane externe de l'IMC et se fixe dans un second temps, à GAP50 immobilisée dans les DRM riches en cholestérol (Johnson *et al.*, 2007 ; Gilk *et al.*, 2009).

Lors de l'invasion de la cellule hôte et de la formation de la jonction mobile (Cf. Chapitre II-1-5), l'interaction transitoire, dans la membrane plasmique parasitaire, entre le complexe MIC2-M2AP et le complexe AMA1/RON2/RON4/RON5/RON8 de la jonction mobile permet de déclencher la mobilisation du glideosome et la propulsion vers l'avant du parasite. MyoA, ancrée à l'IMC par MLC1, GAP45 et GAP50, glisse le long des filaments d'actine-F, entraînant les protéines de micronèmes vers la partie postérieure du parasite, ce qui permet à celui-ci de se propulser vers l'avant, à l'intérieur de la cellule hôte.

Le complexe MIC2-M2AP, et notamment MIC2 transmembranaire, joue donc un rôle crucial puisque c'est lui qui permet de transmettre l'information de reconnaissance du récepteur cellulaire *via* le domaine N-terminal extra-parasitaire de MIC2, à l'intérieur du parasite et de déclencher l'activation du glideosome.

L'attachement de la partie N-terminale de MIC2 au récepteur cellulaire constitue donc le point de non retour et de départ des cascades moléculaires permettant l'entrée du parasite dans la cellule hôte et la formation simultanée de la VP.

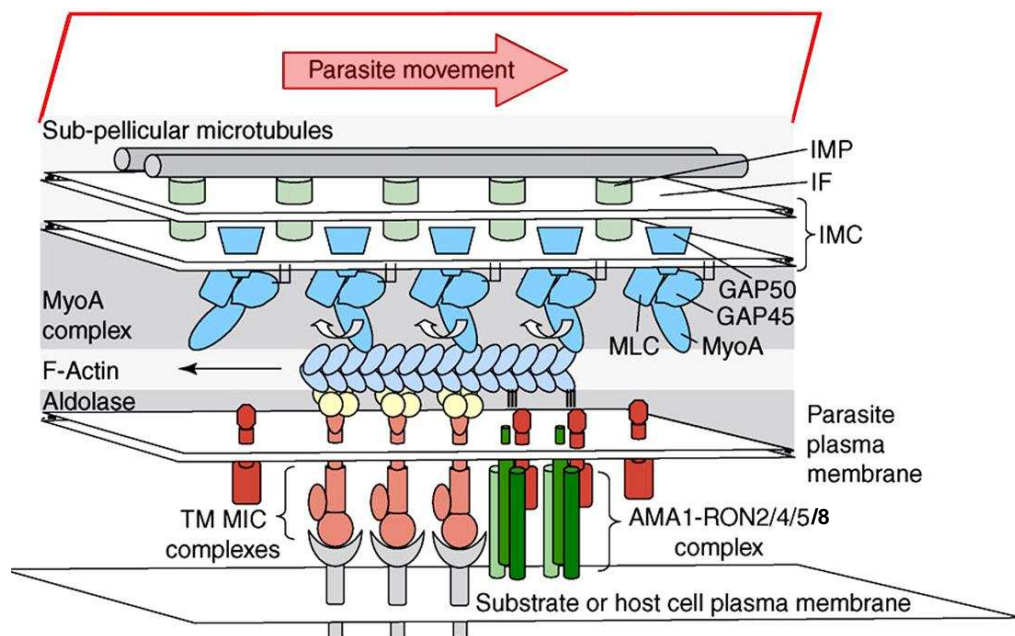


Figure 20. Schéma du glideosome de *T. gondii* et de sa mobilisation pour assurer la propulsion du parasite vers l'avant, lors du gliding ou de l'entrée dans la cellule hôte en vue de la formation de la VP.

Les protéines de micronèmes sont liées aux récepteurs de la cellule hôte et interagissent avec les filaments d'actine (actine-F) *via* l'aldolase. La myosine MyoA, ancrée à l'IMC par MLC1, GAP45 et GAP50, glisse le long des filaments d'actine-F, entraînant les protéines de micronèmes vers la partie postérieure du parasite, ce qui permet à celui-ci de se propulser vers l'avant, à l'intérieur de la cellule hôte. Le complexe AMA-1/RON2/RON4/RON5/RON8 situé au niveau de la jonction mobile ne participe pas au processus d'invasion. IMP, protéines de l'IMC ; IF, filaments intermédiaires ; TM, domaine transmembranaire. D'après (Carruthers and Boothroyd, 2007).

6) Tri des protéines cellulaires admises dans la membrane de la VP : coopération des protéines de micronèmes et des protéines RON de rhoptries pour former la jonction mobile

a) Les rhoptries

Les rhoptries (8-12 chez *Toxoplasma*) constituent le deuxième type d'organites de sécrétion du pôle apical. Ces longs organites (0,25 μm de large et 1-4 μm de long) en forme de massues inversées (**Figure 21**), présentent une partie allongée, le cou, qui traverse le conoïde pour s'aboucher au pôle apical (Dubremetz, 2007). Elles présentent également une partie basale, plus large, le bulbe, situé dans la partie médiane du parasite. La forme de ces organites demeure la même après sécrétion de leur contenu, ce qui les rapprochent des glandes de cellules de mammifères.

La purification des rhoptries a permis d'identifier deux types de composants dans ce compartiment, des protéines et des lipides (sous forme de vésicules présentes dans le bulbe).

L'analyse du lipidome des rhoptries a révélé une richesse particulière en phosphatidylcholine (PC) et en sphingomyéline (SM) (Besteiro *et al.*, 2008). Les analyses préliminaires ont montré qu'elles contiennent également de grandes quantités de cholestérol (Foussard *et al.*, 1991). Le ratio entre cholestérol et phospholipides est proche de celui retrouvé au niveau des rafts lipidiques (1.4 dans les rhoptries ; 1.2 dans les rafts et 0.5 dans les membranes « normales ») (Coppens and Vielmeyer, 2005). Le cholestérol pourrait servir au maintien de la forme des rhoptries car il est présent en très grande quantité dans la membrane limitant les rhoptries (Coppens and Vielmeyer, 2005 ; Besteiro *et al.*, 2008). Il pourrait aussi servir au maintien des courbures membranaires des vésicules observées dans le bulbe des rhoptries.

La purification des rhoptries a également permis l'étude du protéome, constitué d'une trentaine de protéines (Bradley *et al.*, 2005). Il existe deux types de protéines de rhoptries, les protéines du bulbe, appelées ROP, qui interviennent dans la formation de la membrane de la VP (Cf Chapitre II-2-2) et les protéines du cou, appelées RON, qui interviennent dans la constitution de la jonction mobile.

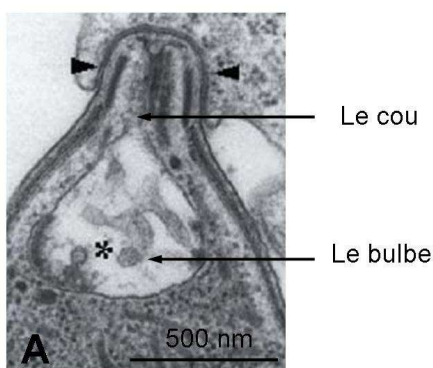


Figure 21. Rhoptries de *Toxoplasma*. Photo de microscopie électronique à transmission d'une coupe longitudinale montrant l'organisation d'une rhoptrie qui vient de sécréter son contenu. Les pointes de flèches indiquent le conoïde du *Toxoplasma* engagé dans la membrane plasmique de la cellule hôte. Adapté de (Dubremetz, 2007)

b) La jonction mobile

La jonction mobile est une zone de contact étroit (<6 nm) entre la membrane plasmique du parasite et celle de la cellule-hôte. Elle est visualisée par une constriction du toxoplasme qui apparaît au pôle apical et qui progresse le long du parasite en cours d'invasion (**Figures 13-3 et 22**).

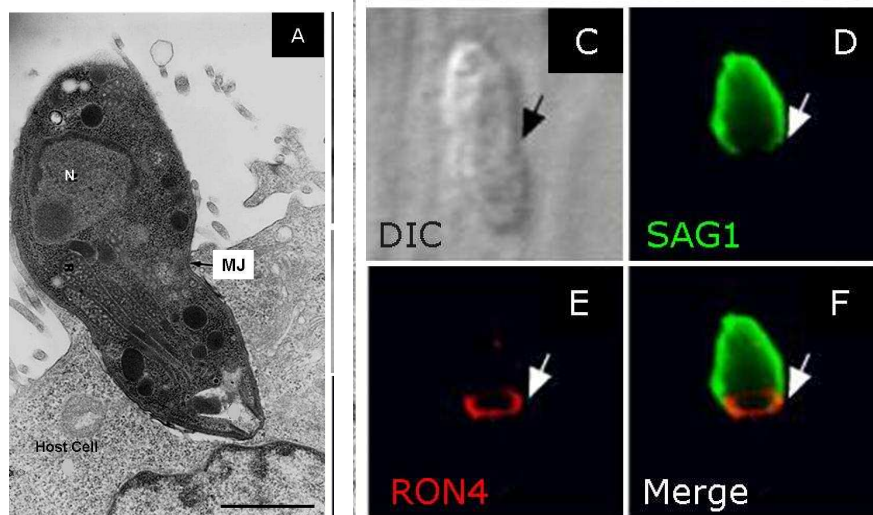


Figure 22. Invasion de la cellule hôte par *T. gondii* et formation de la jonction mobile. (A) Microscopie électronique à transmission qui montre l'invasion *in vitro* d'une cellule HeLa par un tachyzoïte de *T. gondii*. N : noyau, MJ : jonction mobile. Echelle = 1 μ m. D'après (Boothroyd and Dubremetz, 2008). (C), (D), (E), (F) : microscopie confocale montrant la formation de la jonction mobile *in vitro*, suite à l'infection des fibroblastes humains par le toxoplasme. (C) DIC : differential interference contrast (phase). (D) : le signal vert représente le marquage de la protéine SAG1 (protéine de surface du toxoplasme). (E) : le signal rouge représente le marquage de la protéine RON4 (protéine du cou des rhoptries et participant au complexe RON2/4/5/8/AMA1 lors de la formation de la jonction mobile). (F) : superposition de (D) et (E). D'après (Alexander *et al.*, 2005).

L'analyse d'un mutant KO conditionnel de la protéine de micronèmes AMA1 avait permis de mettre en évidence que le parasite est incapable d'extruder son conoïde, de former la jonction mobile et de sécréter le contenu de ses rhoptries alors que la sécrétion des autres protéines de micronèmes restait inchangée (Mital *et al.*, 2005). AMA1 apparaissait donc comme une adhésine secondaire qui consolide le contact entre le parasite et la cellule hôte et initie la cascade qui conduit à la sécrétion des rhoptries. La recherche des partenaires protéiques d'AMA1 a permis d'identifier 4 protéines RON du cou des rhoptries, RON2/4/5/8, sécrétées presque simultanément aux protéines de micronèmes (Alexander *et al.*, 2005 ; Lebrun *et al.*, 2005). Ce complexe soluble de protéines RON se forme dans le cou des rhoptries, puis après sécrétion, AMA1 ancre le complexe dans la membrane plasmique parasitaire alors que RON2 l'ancre dans la membrane de la cellule hôte. Enfin, le modèle actuel (**Figure 23**) (Straub *et al.*, 2009) postule que les protéines solubles RON4/5/8 du complexe AMA1/RON2/4/5/8 sont rattachées au complexe via des liaisons protéines-protéines et qu'elles assureraient la fonction de filtre moléculaire des

protéines de la membrane plasmique de la cellule hôte afin de ne laisser entrer dans ce qui sera la membrane de la VP, que les lipides et les protéines GPI-ancrées (Mordue *et al.*, 1999 ; Charron *et al.*, 2004).

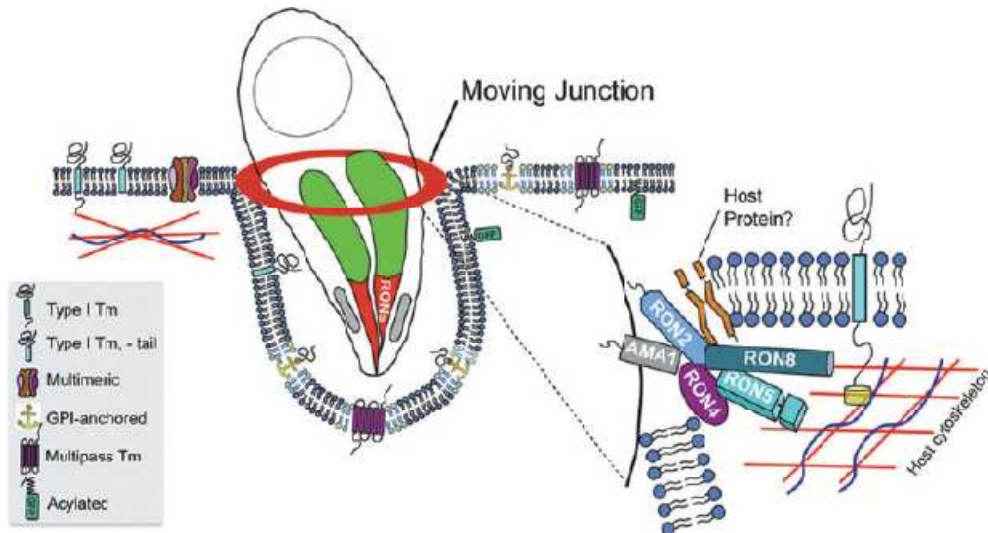


Figure 23. Modèle moléculaire de la jonction mobile de *T. gondii*. Le complexe de la jonction mobile est formé de AMA1 (protéine de micronèmes) et des protéines du cou des rhoptries RON2/4/5/8. Alors qu'AMA1 ancre le complexe dans la membrane plasmique parasitaire, RON2 l'ancre dans la membrane plasmique cellulaire, permettant ainsi le rapprochement des deux membranes. Les protéines solubles RON4/5/8 assureraient le tri moléculaire des protéines de la membrane plasmique de la cellule hôte entrant dans la membrane de la VP. D'après (Straub *et al.*, 2009).

La jonction se déplace en même temps que le parasite se propulse vers l'avant et elle se referme sur le parasite une fois que celui-ci est entré dans la cellule hôte, par fusion de la membrane de l'hôte (Lebrun *et al.*, 2005). La membrane entourant le tachyzoïte se pince alors et se détache de la membrane plasmique de la cellule hôte : le parasite se trouve isolé du cytoplasme de la cellule hôte, à l'intérieur de la VP, dont la membrane est principalement issue de celle de la cellule hôte. Grâce au filtre moléculaire mis en place au niveau de la jonction mobile, la membrane de la VP formée ne possède pas de molécules régulatrices qui gouvernent la fusion endocyttaire, ce qui explique l'absence de fusion de la VP avec les lysosomes (Joiner *et al.*, 1990).

Même si la jonction mobile et le glideosome sont les éléments cruciaux de l'invasion de la cellule hôte conduisant à la formation de la VP, des éléments du cytosquelette de la cellule hôte, pourraient également favoriser l'entrée du parasite dans celle-ci. Le tachyzoïte activerait en effet le complexe Arp2/3 et la cortactine (facteurs de nucléation de l'actine cellulaire), ce qui induirait la réorganisation du cytosquelette d'actine de la cellule hôte pour ancrer la jonction mobile au cytosquelette cellulaire (Gonzalez *et al.*, 2009). De même, les microtubules de la cellule hôte se réorganiseraient autour de la jonction mobile afin d'augmenter la vitesse d'invasion (Sweeney *et al.*, 2010).

7) Formation de la membrane de la VP : rôle des protéines ROP du bulbe des rhoptries

Immédiatement après la formation de la jonction mobile, le contenu du bulbe des rhoptries, compartiment le plus acide de *T. gondii*, est libéré (**Figure 12-4**). Les rhoptries seraient probablement des lysosomes modifiés pour la sécrétion (Ngo *et al.*, 2004). Le bulbe des rhoptries contient en effet des membranes internes et ressemble donc à des corps multivésiculaires (MVB pour Multi Vesicular Bodies) d'origine endosomale. *Toxoplasma* utilise d'ailleurs le système endosomal des protéines de surface (protéines rab et protéines similaires aux protéines COP (coatamer protein complexe) de la surface du système de transport du RE et du Golgi) (Chaturvedi *et al.*, 1999 ; Robibaro *et al.*, 2002 ; Stedman *et al.*, 2003) et des protéines adaptatrices AP-1 (Adapter Protein 1) (Ngo *et al.*, 2003) pour réguler le trafic vésiculaire à partir du trans-Golgi jusqu'aux rhoptries, via un MVB ou un compartiment correspondant aux rhoptries immatures (larges vésicules contenant un matériel dense et hétérogène). Le cholestérol pourrait être impliqué dans l'organisation des MVB et dans le tri et le transport des protéines de rhoptries vers les rhoptries matures. Les rhoptries immatures évoluent en organites matures après la condensation du matériel contenu dans le bulbe et l'élongation de leur pédoncule (**Figure 24**) (Dubremetz, 2007).

En accord avec l'origine golgienne des rhoptries, la biogenèse de leurs protéines est sensible à l'action de la bréfeldine A (Soldati *et al.*, 1998), un inhibiteur du trafic vésiculaire dans les endomembranes. De plus, l'adressage des protéines contenant un domaine transmembranaire et destinées aux rhoptries, est médié par la reconnaissance de motifs tyrosine ainsi que par des signaux di-leucine localisés en C-terminal des protéines. Les protéines solubles de rhoptries, quant à elles, ne contiennent pas de motif tyrosine et aucun système escorteur de protéine transmembranaire n'a pu être mis en évidence. Elles pourraient être transportées à partir du trans-Golgi vers les rhoptries, via les rhoptries immatures, grâce à des cargos de sécrétion. Le transfert des protéines des MVB/pré-rhoptries vers les rhoptries matures semble être régulé grâce à l'ATPase chaperonne VSP4 (vacuolar Sorting Protein 4) (Yang *et al.*, 2004).

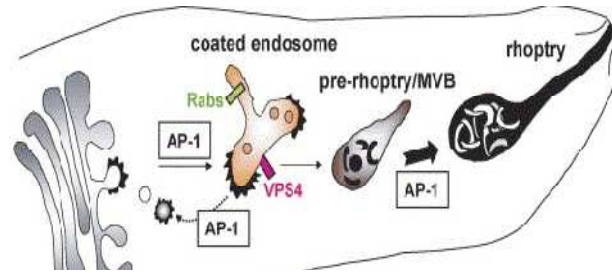


Figure 24. Modèle de la voie de biosynthèse des rhoptries des *Apicomplexa*. La biogenèse des rhoptries est permise grâce au trafic vésiculaire médié par AP-1, généralement associé au mécanisme de tri des lysosomes. Les protéines de rhoptries transitent par la voie endosomale, depuis le réseau trans-Golgien *via* un corps multivésiculaire (MVB) ou rhoptrie immature. La protéine chaperonne VSP4 (Vacuolar Sorting Protein 4) pourrait réguler la dynamique membranaire de la voie endosomale des rhoptries et/ou permettre le transport du cholestérol. Le cholestérol pourrait être impliqué dans l'organisation des MVB et dans le tri et le transport des protéines de rhoptries vers les rhoptries matures. Barre 0.25 μm . D'après (Coppens and Vielemeyer, 2005).

La plupart des protéines du bubble de rhoptries sont synthétisées sous forme de « pro-protéines » et subissent une étape de maturation, grâce à un clivage de leur domaine N terminal, durant leur trafic vers les rhoptries (Bradley and Boothroyd, 2001).

La sécrétion des protéines ROP (Figure 12-4) est consécutive à celle des protéines RON mais le signal moléculaire qui la déclenche, reste inconnu. Elle intervient dans le cytoplasme de la cellule hôte, sous forme de petites vésicules similaires à des exosomes, plus facilement visibles pendant 24 h environ, quand l'entrée du parasite est inhibée par la cytochalasine D, ce qui n'empêche pas la libération des protéines de rhoptries et permet de former des « fantômes » de vacuoles appelés «evacuoles» (Hakansson *et al.*, 2001). Ces petites vésicules s'organisent en longues structures filamenteuses (« beads on a string ») le long des microtubules cellulaires et pourraient contribuer à enrichir la membrane vacuolaire de protéines ROP (ainsi que de certaines protéines de granules denses) (Ravindran and Boothroyd, 2008). La décoration des exosomes par des anticorps anti-protéines ROP montre effectivement que les evacuoles sont capables de fusionner avec la PV (Hakansson *et al.*, 2001) mais cela n'a pas encore été démontré pour les exosomes sécrétés en conditions physiologiques. Seize sérine-thréonine ROP kinases actives seraient prédites dans le compartiment des rhoptries (Peixoto *et al.*, 2010), parmi lesquelles la famille de protéines ROP2/4/5/7/8/18 (Taylor *et al.*, 2006 ; Boothroyd and Dubremetz, 2008) sont ciblées à la membrane de la VP, parfois avec une topologie inversée (cas de la protéine ROP5) (El Hajj *et al.*, 2007b). Parmi ces ROP kinases, ROP2 a longtemps été considérée comme une protéine permettant d'ancrer les mitochondries de la cellule hôte à la membrane vacuolaire. Cependant, un parasite délété du locus *ROP2* (donc des gènes *ROP2a/ROP2b* et *ROP8*) est toujours capable de recruter les mitochondries (Pernas and Boothroyd, 2010). ROP18 est une kinase capable de s'auto-phosphoryler et de phosphoryler ROP2 (El Hajj *et al.*, 2007a ; Qiu *et al.*, 2009). ROP18 est également considérée comme le facteur majeur de virulence des parasites de type I,

capable de réduire la durée du cycle de réplication du parasite dans sa cellule hôte (El Hajj *et al.*, 2007a). Certaines des protéines de rhoptries, en particulier les protéines ROP solubles, sont quant à elles, sécrétées dans le cytoplasme de la cellule hôte (cas de ROP13 par exemple, Turetzky *et al.*, 2010), à partir duquel elles atteignent son noyau. Elles peuvent alors interagir avec des molécules qui régulent des voies de signalisation importantes pour la mise en place de la réponse immune. C'est le cas par exemple de ROP16, qui contient une séquence d'adressage nucléaire et dont l'activité kinase interfère avec les voies de signalisation de l'hôte *via* les molécules STAT3/6, afin d'augmenter sa sécrétion d'IL12 (Saeij *et al.*, 2007 ; Bradley and Sibley, 2007). C'est le cas également de la sérine-thréonine phosphatase de type 2C, appelée PP2C (Parasite-derived Protein Phosphatase 2C) (Gilbert *et al.*, 2007 ; Yamamoto *et al.*, 2009).

II-2) Maturation de la vacuole parasitophore : rôle des protéines de granules denses

Bien que la formation initiale de leur VP soit conduite par le même processus d'invasion active, tous les parasites du phylum des Apicomplexa n'ont pas développé le même type de VP. Celles de *Toxoplasma* et de *Plasmodium*, par exemple, correspondent à deux stratégies différentes de parasitisme intracellulaire. La maturation des VP de *Toxoplasma* et de *Plasmodium* diffère en termes d'architecture et de métabolisme (Mercier *et al.*, 2005 ; Cesbron-Delauw *et al.*, 2008) et s'accompagne de deux modes distincts de multiplication parasitaire : l'endodyogénie pour *Toxoplasma* (Cf. Chapitre II-3) *versus* la schizogonie pour *Plasmodium*.

Une fois refermée sur le parasite, la VP de *Toxoplasma* lui offre protection et nutriments. Elle s'enfonce rapidement dans le cytoplasme de la cellule hôte et migre à proximité du noyau où elle s'immobilise, afin de permettre une synchronisation de la division parasitaire (Cf. Chapitre II-3). La VP de *Toxoplasma* échappe à la reconnaissance et à la fusion avec les endosomes et lysosomes de la cellule hôte (Joiner *et al.*, 1990 ; Mordue *et al.*, 1999 ; Charron *et al.*, 2004). Elle semble donc apparemment coupée des sources potentielles de nutriments que pourraient lui apporter les voies endo- ou exocytaires de la cellule hôte. Toutefois, la VP ne constitue pas un compartiment complètement isolé. Son pH neutre ainsi que la présence d'inhibiteurs de protéases dans le compartiment vacuolaire (Pszenny *et al.*, 2002 ; Morris *et al.*, 2002) suggèrent qu'elle n'est pas un compartiment de dégradation mais plutôt une zone d'interface entre le parasite et la cellule hôte. Cette interface pourrait permettre, *via* différents systèmes membranaires (Cf. Chapitre II-2-2), d'importer divers nutriments nécessaires au développement intracellulaire des parasites à partir de la cellule hôte. A la suite de sa formation, la VP

subit en effet une dernière étape de maturation qui est caractérisée par le développement de 3 systèmes membranaires, les extensions intracytoplasmiques de la membrane vacuolaire (PVE pour « Parasitophorous Vacuole Extensions »), les invaginations de la membrane vacuolaire (HOST) et le réseau de nanotubes membranaires (RNM) qui se développe dans l'espace vacuolaire, entre les parasites. La mise en place de ces systèmes membranaires est corrélée à un troisième événement de sécrétion, à partir des granules denses. Dans ce chapitre, je résumerai les connaissances actuelles sur l'ensemble des événements décrits ci-dessus. Sachant que la mise en place de la VP et de ses systèmes membranaires ainsi que l'augmentation de la surface de la membrane vacuolaire, corrélée à la multiplication parasitaire, demandent au parasite de disposer d'importantes quantités de lipides, je passerai tout d'abord en revue, les connaissances sur l'origine des lipides de la VP ainsi que les principaux lieux de synthèse de lipides identifiés chez le *Toxoplasme*. Il est à noter cependant, que les connaissances dans ce domaine, sont encore fragmentaires.

1) Origine des lipides de la VP

L'isolement de VP matures, dépourvues des parasites qu'elles contiennent et des constituants des cellules hôtes, n'a, jusqu'à présent, jamais été réalisé. L'analyse lipidomique (et protéomique) des différents systèmes membranaires de la VP n'a donc jamais été rapportée. Les quelques études réalisées dans le domaine ont cependant montré que le parasite récupère beaucoup de lipides à partir de la cellule hôte et qu'il en produit lui-même quelques catégories, à partir de son RE, de sa mitochondrie et de son apicoplaste. J'aborderai également les quelques données qui concernent l'export des lipides vers la VP.

a) Lipides acquis à partir de la cellule hôte

Le parasite récupère de nombreux types de lipides depuis la membrane plasmique, les corps lipidiques, le Golgi et les endo-lysosomes de la cellule hôte. Il détourne des phospholipides et des lipides neutres comme le cholestérol ou le ganglioside GM1 (Coppens *et al.*, 2006 ; Nishikawa *et al.*, 2005 ; Charron and Sibley, 2002 ; Martin *et al.*, 2007). Plus particulièrement, le cholestérol semble être récupéré depuis la voie des LDL (Low Density Lipoproteins) (Coppens *et al.*, 2000) *via* les HOST (Cf. Chapitre II-2-2) (Coppens *et al.*, 2006). Les autres lipides sont directement incorporés dans la membrane vacuolaire lors de l'invasion (Coppens and Joiner, 2003 ; Charron and Sibley, 2004). *Toxoplasma* acquiert également des acides gras exogènes et certains précurseurs de glycérolipides tels que la sérine, l'éthanolamine et la choline à partir de la cellule hôte

(Quittnat *et al.*, 2004). Ces précurseurs lipidiques sont internalisés dans le parasite avant d'être métabolisés et incorporés dans des phospholipides complexes. Ils sont ensuite dirigés vers les compartiments spécifiques que constituent la membrane plasmique, le RE, le Golgi, les corps lipidiques ou les rhoptries. Après exportation dans la VP, certains de ces lipides permettent probablement la modification de la composition lipidique de la membrane vacuolaire (Charron and Sibley, 2002 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Bisanz *et al.*, 2006 ; Coppens *et al.*, 2006).

En ce qui concerne les voies de synthèse des phosphoinositides chez *T. gondii*, l'activité enzymatique de la phosphatidylinositol synthase (Seron *et al.*, 2000) et de la phospholipase C (Fang *et al.*, 2006) ont été caractérisées chez *T. gondii*, toutes les deux localisées dans la membrane plasmique du parasite. On sait également que le parasite est capable de synthétiser du PI à partir de précurseurs internalisés à partir de la cellule hôte (Bisanz *et al.*, 2008). Enfin, au moment de la formation de la VP, il y a recrutement de PI (2) P et PI (3) P d'origine cellulaire à la membrane vacuolaire (da Silva *et al.*, 2009).

b) Lipides synthétisés par le parasite

Le génome de *T. gondii* code pour un certain nombre d'enzymes impliquées dans le métabolisme du carbone et dans le métabolisme des lipides, notamment des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques (cycle TCA), des enzymes de la glycolyse (Polonais and Soldati-Favre, 2010) ainsi que de nombreux transporteurs de sucres. Comme tous les eucaryotes, *Toxoplasma* synthétise des lipides au niveau de son RE. Il utilise également deux autres compartiments, la mitochondrie et l'apicoplaste, pour compléter son arsenal lipidique.

◆ Le reticulum endoplasmique

Le RE du parasite représente l'intermédiaire obligatoire des voies de transport et de sécrétion protéiques vers la membrane plasmique, l'IMC, les organites de sécrétion (micronèmes, rhoptries et GD) mais aussi vers l'apicoplaste. *Toxoplasma* possède de nombreuses protéines orthologues à des protéines impliquées dans la machinerie de translocation du RE des mammifères, telles que COP I et II (Coat Proteins I et II), les SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor), AP-1 (Adaptor pProtein-1) et les protéines Rab (ras-related in Brain) (Chaturvedi *et al.*, 1999). Le RE est également le lieu de la synthèse de nombreux glycérolipides parasitaires : l'acide phosphatidique (PA), la PC, la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI) et le phosphatidylglycérol (PG) (Bisanz *et al.*, 2006). Cette synthèse se fait grâce

aux acétyltransférases acyl-CoA (acylcoenzyme A) issues de la conversion dans le cytoplasme parasitaire, de l'acyl-ACP de l'apicoplaste en intermédiaires de synthèse de glycérolipides. Les lipides synthétisés sont ensuite stockés dans des corps lipidiques présents dans le cytosol parasitaire. Les acétyltransférases du RE permettent également la synthèse d'esters cholestéryls, lipides neutres les plus abondants des corps lipidiques (Nishikawa *et al.*, 2005). Enfin, l'initiation de la biosynthèse des ancras GPI qui permettent l'ancrage de la plupart des protéines de surface dans la membrane plasmique parasitaire, se fait dans le RE, par le transfert du N-acétylglucosamine sur le PI (Wichroski and Ward, 2003 ; Azzouz *et al.*, 2006).

◆ La mitochondrie

Comme chez de nombreux autres protozoaires, il n'existe qu'une seule mitochondrie (**Figure 12**), très longue et tubulaire (c'est une caractéristique des Alveolata), plus ou moins ramifiée, et délimitée par une enveloppe constituée de deux membranes (Nishi *et al.*, 2008 ; Köhler, 2006). La mitochondrie de *Toxoplasma* comprend une lumière matricielle réduite. La fonction principale de la mitochondrie est métabolique : elle fournit de l'énergie grâce à la synthèse de l'adénosine tri-phosphate (ATP). Il a ainsi été récemment démontré que la phosphorylation oxydative est essentielle pour le maintien du taux d'ATP dans les tachyzoïtes intracellulaires (Lin *et al.*, 2009). L'activité enzymatique du cytochrome C est localisée au niveau de la membrane interne (Melo *et al.*, 2000). La matrice mitochondriale assure l'expression des gènes de l'organite et elle constitue également le lieu de résidence des enzymes de la voie de synthèse FAS I (Fatty Acid Synthesis type I) des acides gras (Coppens, 2006). Plusieurs lipides y sont ainsi synthétisés, comme par exemple le PA, le PG et le cardiolipide (Bisanz *et al.*, 2006).

◆ L'apicoplaste

Une des caractéristiques des parasites du phylum des Apicomplexa, à l'exception notable des cryptosporidies (Zhu *et al.*, 2000), est l'existence d'un plaste vestigial non photosynthétique, indispensable à la survie du parasite, et nommé l'apicoplaste (**Figures 12 et 25**) (McFadden and Waller 1997, McFadden *et al.*, 1996 ; Köhler *et al.*, 1997 ; He *et al.*, 2001 ; Ramya *et al.*, 2007). Ce petit organite, accolé à la mitochondrie, a été initialement décrit pour ses caractéristiques morphologiques, à savoir la présence de 4 membranes le délimitant (**Figure 25**). Son origine végétale n'a été démontrée qu'à la fin des années 1990 : il aurait été acquis lors de l'endosymbiose d'une cyanobactérie ancestrale par une algue rouge, elle-même ensuite endocytée par l'ancêtre des Apicomplexa. Ce double évènement d'endosymbiose expliquerait donc la présence des 4

membranes (Lim and McFadden, 2010). Même si l'apicoplaste possède son propre génome, la majorité des protéines de cet organe sont codées par le noyau. Elles possèdent donc un peptide de transit permettant leur translocation au travers des 4 membranes (Joiner and Roos, 2002 ; Tonkin *et al.*, 2006 ; Kalanon *et al.*, 2009).

L'apicoplaste est vraisemblablement impliqué dans la synthèse d'acides gras par la voie FAS II (Fatty Acids synthesis type II) (Waller and McFadden, 2005 ; Bisanz *et al.*, 2008). Cette voie de synthèse typique des bactéries et des chloroplastes des cellules végétales, semble être indispensable à la survie du parasite (Mazumdar *et al.*, 2006). Les acides gras produits par l'apicoplaste seraient exportés vers le RE (Bisanz *et al.*, 2006) grâce à l'existence de zones de contact entre les deux organites (**Figure 26**) (Tomova *et al.*, 2009).

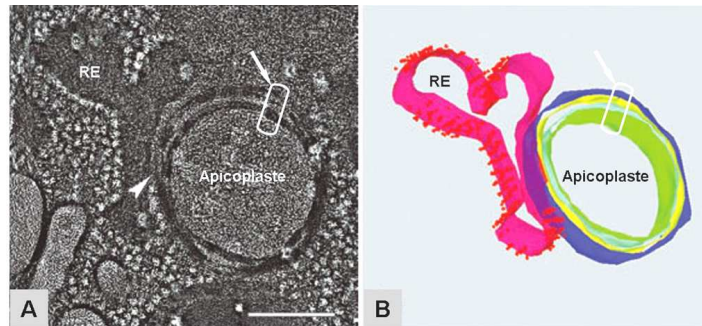


Figure 25. L'apicoplaste de *T. gondii*. (A) Tomographie en microscopie électronique à transmission. Image reconstituée à partir de plusieurs images de sections parasitaires fines (60-70 nm). La photo montre l'existence de zones de contact entre l'apicoplaste et le RE (pointe de flèche). La zone encadrée montre les 4 membranes entourant l'apicoplaste. (B) Photo de modélisation informatique de la figure (A). La barre d'échelle pour les deux images (A) et (B) est de 200 nm. Adapté de (Tomova *et al.*, 2009).

c) Exportation de lipides vers la PV

Peu de choses sont actuellement connues sur les mécanismes du transport des lipides vers la VP. Six transporteurs ABCG (ATP-Binding Cassettes of the G family) viennent d'être caractérisés, parmi lesquels 4 sont localisés au niveau de la membrane plasmique. Ces transporteurs seraient impliqués dans la libération dans l'espace vacuolaire, du cholestérol et de phospholipides (Ehrenmann *et al.*, 2010). De même, le toxoplasme sécrète dans la PV, une enzyme, la LCAT (Lecithin Cholesterol AcylTransferase) similaire à la LCAT des cellules de mammifères, et qui semble être impliquée dans la régulation de l'efflux du cholestérol dans la VP (Ehrenmann *et al.*, 2010).

2) Structures membranaires caractéristiques de la VP

La VP est délimitée par une membrane, la MVP (Membrane de la Vacuole Parasitophore). Cette dernière présente à son tour, deux types d'extensions membranaires : des extensions extra-vacuolaires appelées PVE (Parasitophorous Vacuole Extensions) et des invaginations appelées HOST (Host Organelle Sequestering Tubulostructures) à l'intérieur de l'espace vacuolaire, ces dernières invaginations étant sous-tendues par un microtubule cellulaire (Coppens *et al.*, 2006). A l'intérieur de l'espace vacuolaire, on retrouve enfin un réseau de nanotubes membranaires (RNM) qui relie les parasites les uns aux autres et qui les relie à la MVP (**Figure 26**).

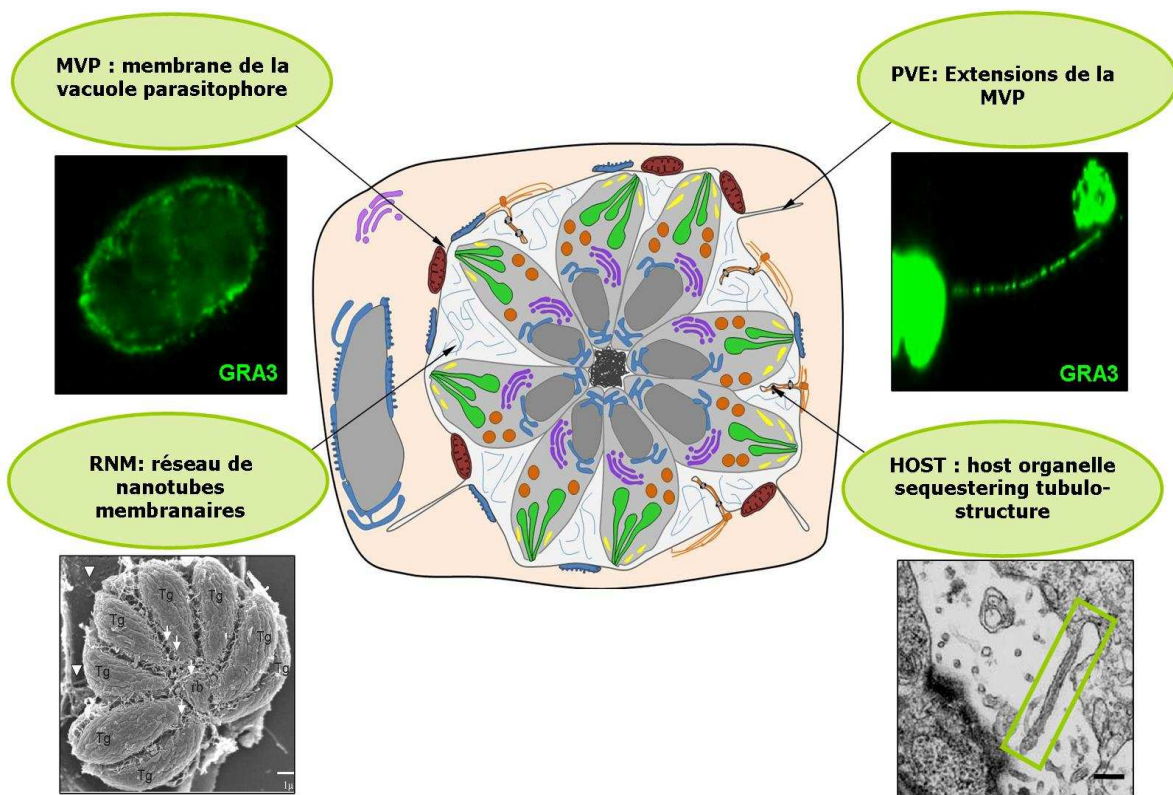


Figure 26. Structures membranaires caractéristiques de la VP de *T. gondii*. La photo de la PVE en haut à droite est tirée de (Mercier *et al.*, 2010) ; la photo illustrant le RNM est une photographie de la VP en microscopie électronique à balayage (en bas, à gauche) extraite de (Magno *et al.*, 2005a) et celle illustrant un HOST (en bas, à droite), est une photo de microscopie électronique à transmission extraite de (Coppens *et al.*, 2006). Les deux photos du haut sont des photos de microscopie photonique à fluorescence après marquage des VP à l'aide d'un anticorps anti-GRA3 spécifique de la MVP.

a) La membrane vacuolaire, interface d'échanges entre le parasite et la cellule hôte

Une fois dans la VP, *T. gondii* est séparé du cytoplasme de la cellule hôte par deux barrières, sa propre membrane plasmique et la MVP (**Figure 26-haut-gauche**). Pourtant, pour assurer son développement intracellulaire, *T. gondii* a besoin d'assurer

des échanges avec le milieu extérieur. Pour cela, il établit d'une part, un trafic de protéines interne au parasite et d'autre part, un trafic sécrétoire vers le cytoplasme et la membrane de la cellule hôte. La MVP délimitant la vacuole joue donc un rôle prépondérant car elle constitue l'interface d'échanges entre le parasite intracellulaire et le cytoplasme de la cellule hôte.

Contrairement aux membranes des phagosomes qui se forment suite aux phénomènes de phagocytose ou de pinocytose chez les cellules eucaryotes, la MVP de *T. gondii* se forme très rapidement lors de l'entrée active du parasite dans la cellule hôte (Sinai, 2008). Son épaisseur est de 13 nm (Magno *et al.*, 2005a). Comme vu précédemment, la MVP est d'origine mixte, car constituée d'une part, de la membrane plasmique de la cellule hôte invaginée lors de l'invasion (Mordue *et al.*, 1999 ; Charron *et al.*, 2004) et d'autre part, de matériel sécrété par les rhoptries puis par les GD (Bradley and Sibley, 2007 ; Boothroyd and Dubremetz, 2008). Très tôt après l'invasion, la MVP permet la sélection puis l'import de nutriments nécessaires au développement du parasite. Les molécules internalisées à partir de la cellule hôte, ont un poids moléculaire inférieur ou égal à 1 400 Da et seraient donc constituées essentiellement de sucres, d'acides aminés, d'ions et de précurseurs de synthèse (Schwab *et al.*, 1994 ; Polonais and Soldati-Favre, 2010). S'il existe des transporteurs ou des pores dans la MVP, ils ne sont pour l'instant, pas identifiés. Les mitochondries et le RE de la cellule hôte, recrutés à la MVP (Cf. Paragraphe II-2-4) (Melo and de Souza, 1997 ; Goldszmid *et al.*, 2009), pourraient également être une source de métabolites mais les échanges de la VP avec ces organites cellulaires n'ont pour l'instant, pas été étudiés.

b) Les extensions de la VP dans le cytoplasme de la cellule hôte

Ces extensions extra-vacuolaires de la MVP (**Figure 26-haut-droite**) (PVE pour Parasitophorous Vacuole Extensions) ont été observées dès les premières études des protéines de GD par immunofluorescence (Dubremetz *et al.*, 1993) mais elles n'ont jamais fait l'objet d'analyses approfondies. Les PVE semblent s'étendre le long de microtubules de la cellule hôte, allant parfois jusqu'au centrosome. Elles peuvent également relier deux ou plusieurs VP au sein d'une même cellule (Coppens *et al.*, 2006 ; Mercier *et al.*, 2010). On peut imaginer que les PVE se forment en partie, à partir des exosomes (« beads on a string ») associés aux protéines ROP et détectés dans le cytoplasme de la cellule hôte dès l'invasion mais si c'est le cas, cela reste à démontrer. La nature exacte et la fonction de ces PVE restent également à déterminer. Elles pourraient être impliquées dans le recrutement des microtubules de la cellule hôte lors de la formation de la VP.

c) Les HOST (Host Organelles Sequestering Tubulo-structures)

La MVP est caractérisée par de profondes invaginations qui s'étendent jusqu'à 1.2 μm de longueur dans l'espace vacuolaire. Ces invaginations contiennent toutes un microtubule central issu de la cellule hôte (**Figure 27**), suggérant une interaction dynamique entre les microtubules de l'hôte et la VP. Ces structures appelées HOST (Host Organelles Sequestering Tubulo-structures) permettent l'accumulation dans la VP, de vésicules d'origine cellulaire (endo-lysosomes) qui permettraient au parasite, de répondre à ses besoins importants en nutriments, notamment en cholestérol. Les HOST sont striés périodiquement d'un manteau de 20 à 25 nm d'épaisseur. Ce manteau abondant est régulièrement espacé et associé à des constriction locales au niveau de leur membrane. Ces constriction, de faible amplitude, ne permettent pas d'assurer un contact physique entre la MVP et le microtubule central du HOST. Celui-ci est en effet séparé de la membrane du HOST par un espace de 15 à 20 nm. Les HOST décorés de leur manteau ont un diamètre total compris entre 95 et 115 nm. La protéine de GD GRA7 est l'un des composants majeurs du manteau protéique décorant les HOST. Ce manteau protéique qui joue le rôle de « garrot » le long des tubules membranaires constituant les HOST, permettrait la séquestration de vésicules d'endocytose d'origine cellulaire, apportant notamment du cholestérol dans la VP (Coppens *et al.*, 2006) (**Figure 27**).

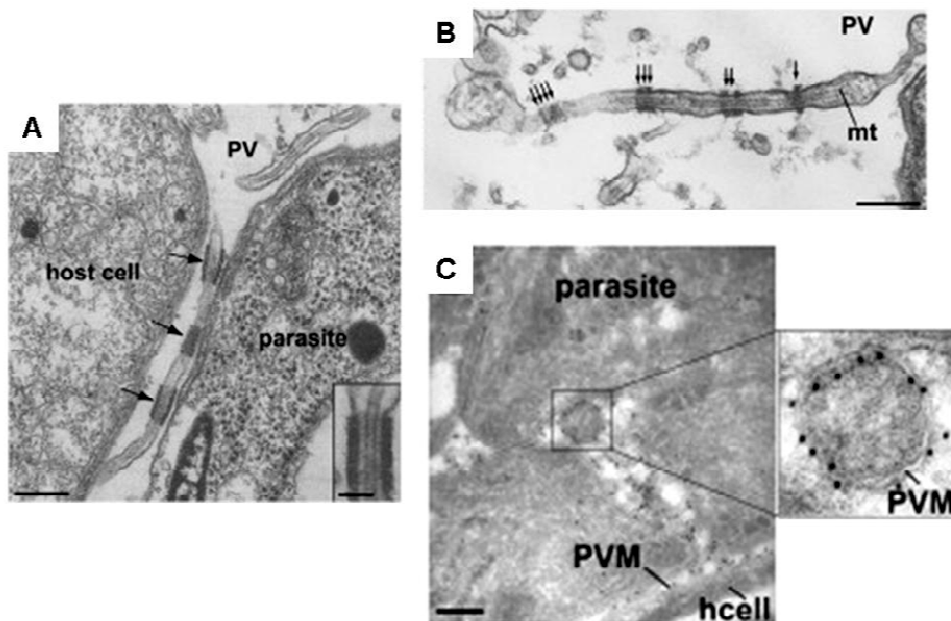


Figure 27. Les HOST. (A) Microscopie électronique à transmission (coupe longitudinale) montrant une invagination de la MVP dans l'espace vacuolaire avec, au centre, un microtubule de l'hôte. PV : vacuole parasitophore. Echelle : 50 nm. (B) Les HOST sont striés périodiquement d'un manteau qui entraîne une légère constriction. Echelle : 150 nm. mt : microtubule ; PV : vacuole parasitophore. (C) Marquage de la protéine GRA7 par immuno-microscopie électronique. La protéine est détectée au niveau de structures vésiculaires, dans la VP. Ces vésicules sont également retrouvées aux extrémités des HOST. PVM : MVP ; hcell : cellule hôte. Echelle : 150 nm. D'après (Coppens *et al.*, 2006).

d) Le réseau de nanotubes membranaires (RNM)

Dans la VP, les parasites sont organisés par un système membranaire particulier appelé réseau de nanotubes membranaires (RNM) (**Figure 28**). Ce dernier se forme durant la première heure d'invasion. A maturité, il est constitué de longs tubules membranaires de 40 à 50 nm de diamètre et qui peuvent atteindre 200 à 500 nm de long. Ces tubules membranaires sont délimités d'une membrane classique et sont décorés d'un petit nombre de particules intra-membranaires. La membrane de ces tubules a une épaisseur d'environ 8 nm (Magno *et al.*, 2005a). Les tubules membranaires du RNM relient les parasites les uns aux autres et les connectent également à la MVP (Sibley *et al.*, 1986 ; 1995 ; Magno *et al.*, 2005a).

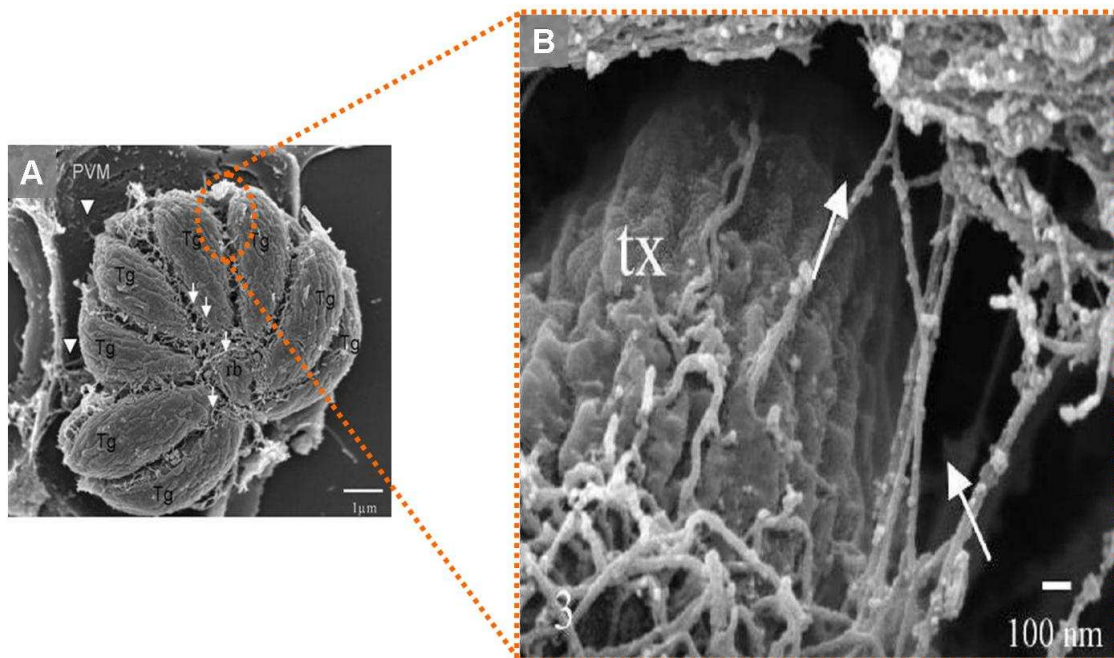


Figure 28. La vacuole parasitophore mature de *T. gondii* et son réseau de nanotubes membranaires. Photos de microscopie électronique à balayage qui montrent **(A)** l'organisation en rosette d'une vacuole à 8 parasites, 24h après l'invasion et **(B)** organisation en 3 dimensions, des tubules membranaires qui forment le RNM (flèches blanches). PVM : membrane vacuolaire ; rb : corps résiduel de division ; Tg ou tx : parasites. D'après (Magno *et al.*, 2005a).

L'origine et les composants tant protéiques que lipidiques du RNM demeurent en grande partie, inconnus. Dans les 10-30 minutes qui suivent l'invasion et la formation de la VP, le RNM apparaît d'abord comme une boule de membranes et des structures multi-lamellaires localisées dans une invagination postérieure de la membrane plasmique du parasite (**Figure 29**) puis il se déploie dans la VP. Il remplit alors progressivement tout l'espace vacuolaire, entre les parasites, espace qui se réduit au fur et à mesure des

cycles de division parasitaire. Le RNM (**Figure 28**) persiste donc tout au long du développement des parasites dans leur VP (Sibley *et al.*, 1995).

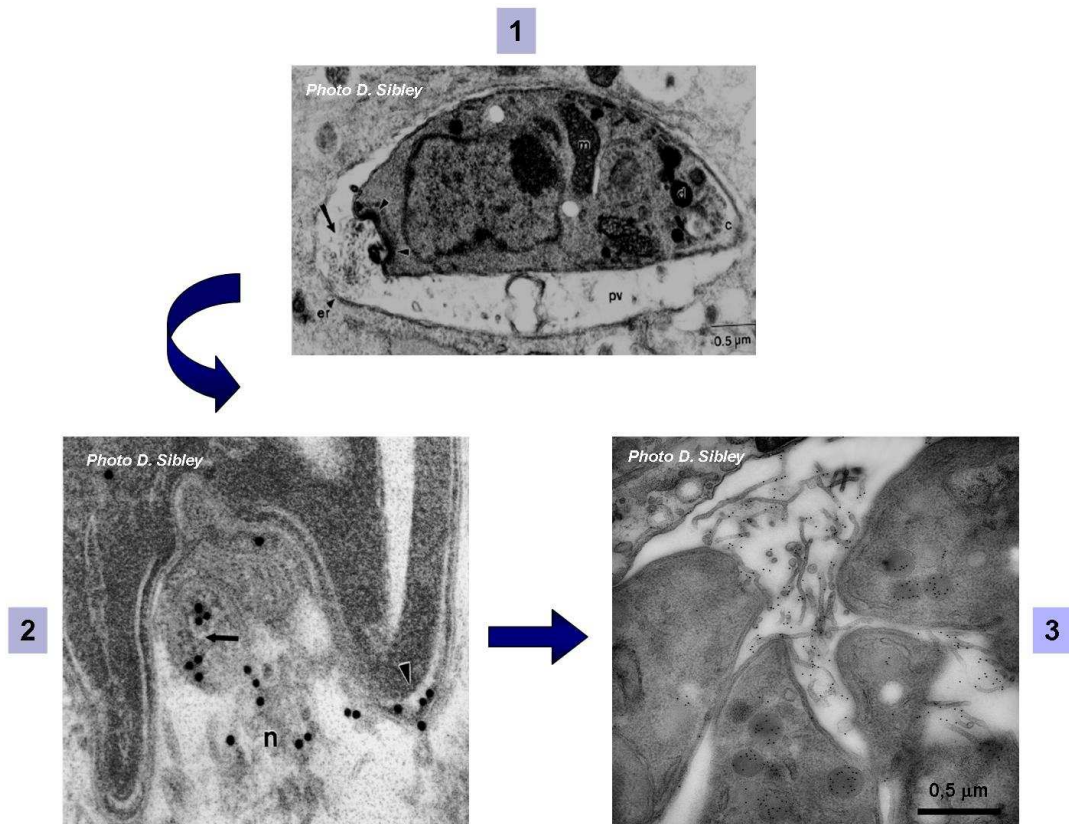


Figure 29. Etapes précoces de la formation du RNM. Photos de microscopie électronique à transmission montrant : **(1)** la mise en place d'un amas de matériel membranaire au niveau de l'extrémité postérieure du parasite (flèche). Ce matériel compacte se déploie petit à petit **(2)** dans l'espace vacuolaire pour former de long tubules membranaires constituant le RNM mature **(3)**. Les photos **(2)** et **(3)** correspondent à un immunomarquage de la protéine GRA2 associée au RNM. Photos D. Sibley.

Différentes hypothèses, non exclusives l'une de l'autre, ont été émises concernant le rôle du RNM. L'une d'entre elles propose qu'il soit impliqué dans la virulence parasitaire. La VP des parasites de type I est en effet caractérisée par un RNM bien développé, comme représenté sur les photos des **figures 28-29**. Au contraire, dans la VP des souches moins virulentes (types II et III), le RNM est remplacé par des vésicules (Sibley *et al.*, 1989). Le RNM serait donc un élément clé de la pathogénicité du parasite. D'autres hypothèses supposent que le RNM jouerait un rôle trophique pour le parasite, en augmentant la surface d'échange avec le cytoplasme de la cellule hôte (Mercier *et al.*, 2005). Le RNM pourrait également jouer un rôle structural pour maintenir et organiser les parasites au sein de la VP (Travier *et al.*, 2008). Le RNM pourrait permettre l'acheminement de complexes de protéines ROP vers la MVP (Reese et Boothroyd, 2009). Enfin, le fait que la majorité des protéines GRA associées au RNM soit retrouvées dans la paroi du kyste (Torpier *et al.*, 1993 ; Ferguson, 2004) suggère qu'il y aurait une

redistribution du RNM contre la MVP, lors du processus de kystogénèse, ce qui est vérifié *in vitro* (Mercier *et al.*, résultats non publiés). Les structures tubulaires et les vésicules observées dans la partie interne de la paroi kystique (Ferguson et Hutchison, 1987) vont dans ce sens. La formation de boules de membranes enroulées à la partie postérieure de certains bradyzoïtes (Sasono and Smith, 1998) peut également laisser supposer qu'une structure RNM-like continuerait à être produite dans la matrice du kyste. Cela suppose donc que le RNM jouerait un rôle structural pour la formation de la paroi kystique.

3) Protéines parasitaires impliquées dans la maturation de la VP

Deux types majoritaires de protéines ont été détectés jusqu'à présent, dans la VP : des protéines ROP et des protéines de GD. Afin de permettre la maturation de la VP néoformée, *Toxoplasma* fait en effet appel à un troisième type d'organites de sécrétion spécifiques au phylum des Apicomplexa, les GD (Dubremetz *et al.*, 1993 ; Carruthers and Sibley, 1997). Dans cette partie, je vais donc présenter en détails, les protéines identifiées comme ciblées dans les membranes de la VP, notamment les protéines de GD, leurs caractéristiques et leurs rôles dans la maturation de la VP (pour revues Mercier *et al.*, 2005 ; 2007 ; 2010).

a) Les protéines ROP

Très récemment, il a été montré que l'association des protéines de la famille ROP2 à la membrane de la MVP fait appel à des hélices α -amphipathiques identifiées dans le domaine N terminal de ces protéines (Reese and Boothroyd, 2010). L'identification d'une protéine ROP (ROP38) au RMN a d'ailleurs permis à cette équipe, d'émettre l'hypothèse selon laquelle le RMN permettrait aux protéines ROP ciblées à la MVP, de transiter dans le compartiment vacuolaire via le RMN (voir paragraphe précédent).

b) Les protéines de granules denses

Les GD sont des structures sphériques d'environ 200 nm de diamètre, qui apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique (**Figure 30**). Ils sont délimités par une membrane unique. On en compte environ 15 par tachyzoïte, dispersés dans l'ensemble du cytoplasme. Contrairement aux micronèmes et aux rhoptries, les GD ne sont pas conservés chez tous les Apicomplexa mais seulement chez ceux qui sont capables de former des kystes (*Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*). Ces organites pourraient résulter de contraintes évolutives permettant une forme de développement intracellulaire

spécialisée, en particulier par la formation d'une VP qui se différencie en paroi kystique lors de la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte (Cf. Chapitre I-3-2) (Cesbron-Delauw *et al.*, 2008, Mercier *et al.*, 2007).

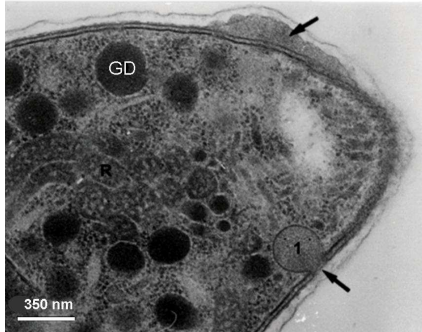


Figure 30. Sécrétion du contenu des GD au niveau de la partie apicale du parasite. GD : granule dense. Les flèches indiquent les zones d'exocytose du contenu des GD dans la VP néoformée. D'après (De Souza, 2005).

Les protéines GRA

Dans cette section, en se référant à (Mercier *et al.*, 2010), je vais tout d'abord présenter la famille des protéines GRA, leur trafic dans le parasite et après sécrétion dans la VP.

A l'exception de quelques protéines présentant de fortes homologues avec des protéines connues et pour la plupart, associées à une activité enzymatique [NTPases (Nucleoside Triphosphate isomerases) (Bermudes *et al.*, 1994 ; Asai *et al.*, 1995), inhibiteurs de protéases (Pszenny *et al.*, 2002 ; Morris *et al.*, 2002 ; Morris *et al.*, 2003), cathepsines C (Que *et al.*, 2007) ou une protéine analogue à l'ostéopontine (Cortez *et al.*, 2008)], la majorité des protéines de GD identifiées à ce jour, ne présente pas d'homologie avec des protéines connues. Suivant la nomenclature proposée par Sibley *et al.* (1991), celles-ci ont été nommées protéines GRA. Parmi les Apicomplexa, des protéines homologues aux protéines GRA n'ont pu être identifiées que chez *Neospora caninum*, parasite du phylum des Apicomplexa et phylogénétiquement très proche de *T. gondii* (Cf. Chapitre I-2).

Les GD n'ayant jamais été encore purifiés à partir du parasite, leur protéome n'a pas encore été réalisé. La famille des protéines GRA comprend au moins 15 protéines, toutes de faible poids moléculaire (20-50 kDa). Elles sont toutes exprimées durant au moins les deux stades tachyzoïte et bradyzoïte, à l'exception de GRA11, décrite comme étant spécifique au stade coccidien (Mercier *et al.*, 2010). L'analyse des prédictions des séquences en acides aminés des protéines GRA a permis d'identifier des motifs et des propriétés potentielles développées ci-dessous.

◆ Peptide signal N-terminal

Toutes les protéines GRA possèdent un peptide signal hydrophobe N-terminal qui les oriente vers la voie de sécrétion des GD (Karsten *et al.*, 1998). Le site prédit de clivage se situe entre les acides aminés 19 et 27, à l'exception des protéines GRA3, GRA6 (Lecordier *et al.*, 1995) et GRA14 (Rome *et al.*, 2008) qui possèdent une région hydrophobe sub-terminale (**Figure 31**). Cependant, le long peptide signal de GRA6 est fonctionnel et permet le ciblage de la protéine vers la VP (Balbeur and Cesbron-Delauw, résultats non publiés).

◆ Domaines hydrophobes

Hormis GRA1 qui est totalement soluble à la fois dans les GD et dans la PV, toutes les protéines GRA comportent au moins un domaine hydrophobe dans leur région centrale ou C-terminale (**Figure 31**). Ce domaine hydrophobe est encadré par deux domaines hydrophiles. Ces domaines hydrophobes sont formés soit de régions prédites en hélices alpha-hydrophobes potentiellement transmembranaires (GRA3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14), soit d'une ou plusieurs hélices α -amphipatiques (GRA2 et GRA9). Ces domaines confèrent une propriété membranaire aux protéines GRA sécrétées dans la VP (Henriquez *et al.*, 2005 ; Mercier *et al.*, 2005 ; Ahn *et al.*, 2005, Rome *et al.*, 2008), à l'exception de GRA4 qui semble s'associer aux membranes de la VP par des interactions protéines-protéines (Labruyère *et al.*, 1999).

◆ Domaines particuliers

L'analyse des séquences en acides aminés et la recherche de motifs spécifiques a permis d'identifier deux « EF-Hands » dans GRA1 (acides aminés 149-180 et 197-223) (**Figure 31**). Ces deux domaines sont en accord avec le fait que la protéine fixe le calcium (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989). Un motif de rétention dans la membrane du RE a été détecté dans la partie C-terminale de GRA3 (Henriquez *et al.*, 2005). Toutefois, chez les parasites délétés du gène *GRA3*, le RE de la cellule hôte est toujours observé en étroite apposition à la MVP (Craver and Knoll, 2007). GRA7 et GRA10 comportent un motif d'adhésion RGD (acides aminés 170-172 et 150-152, respectivement) (Mercier *et al.*, 2005 ; Ahn *et al.*, 2005) mais sa fonctionnalité n'a pas été explorée (**Figure 31**).

◆ Modifications post-traductionnelles

Une des caractéristiques communes aux protéines GRA est l'existence d'une différence entre leur poids moléculaire théorique calculé à partir de la séquence en acides aminés et leur poids moléculaire estimé par SDS-PAGE à partir d'un lysat de tachyzoïtes. Cette différence pourrait être due en partie, à la présence de résidus proline dans la séquence de ces protéines ainsi qu'à des modifications post-traductionnelles. De nombreux sites de

N et O-glycosylation sont prédits dans la séquence en acides aminés des protéines GRA mais peu d'entre elles ont été détectées comme étant réellement glycosylées, hormis GRA2 (Zinecker *et al.*, 1998), GRA4 (Achbarou *et al.*, 1991) et GRA6 (L. Travier, Thèse UJF, 2007). Les seuls glycanes détectés sur les protéines GRA sont des O-glycanes qui seraient additionnés au niveau de l'appareil de Golgi unique de *Toxoplasma* (Golgi constitué de 3 à 5 saccules empilés en avant du noyau (Coppens *et al.*, 1999 ; Pelletier *et al.*, 2002). Les phosphorylations pourraient aussi contribuer à cette différence entre le poids moléculaire apparent et le poids moléculaire théorique des protéines GRA. Des sites potentiels de phosphorylation sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine, sont prédits dans leur séquence mais seules GRA2 (Mercier and Sibley, résultats non publiés), GRA6 (Labruyère *et al.*, 1999) et GRA7 (Dunn *et al.*, 2008) ont été décrites comme étant phosphorylées lors de leur sécrétion dans la VP, alors que la phosphorylation de GRA9 n'a lieu que dans le parasite (Adjogble *et al.*, résultats non publiés) et que GRA1 et GRA5 ne sont pas marquées par le [³²P]-ATP (Mercier and Sibley, résultats non publiés). Les kinases impliquées dans ces modifications n'ont pas été identifiées (Mercier *et al.*, 2005). Des sites potentiels de sumoylation sont également prédits dans la séquence des protéines GRA1, GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9 (L. Travier, Thèse UJF, 2007). La sumoylation pourrait avoir pour rôle, de prévenir une dégradation trop rapide de ces protéines dans la VP.

Espace vacuolaire

GRA1 (23 kDa) 

Réseau de nanotubes membranaires (RNM)

GRA2 (28 kDa) 

GRA4 (40 kDa) 

GRA6 (32 kDa) 

GRA9 (41 kDa) 

Membrane de la VP (MVP), extensions de la VP (PVE)

GRA3 (30 kDa)* 

GRA5 (21 kDa) 

GRA7 (30 kDa)* 

GRA8 (40 kDa) 

GRA10 (36 kDa) 

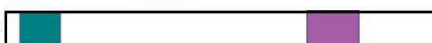
GRA14 (47 kDa)* 



Figure 31. Représentation schématique des domaines protéiques potentiels des protéines GRA. D'après (Mercier *et al.*, 2010).

Ciblage des protéines vers les GD

Peu d'études ont cherché à identifier les domaines potentiellement impliqués dans le tri des protéines vers les GD. A la différence des protéines MIC et ROP, les protéines GRA ne subissent pas de clivage protéolytique durant leur trajet jusqu'aux GD. Le remplacement du domaine hydrophobe central de GRA4 par celui d'autres protéines membranaires a montré que le ciblage des protéines de GD vers ce compartiment semble dépendre de la longueur de leur domaine transmembranaire (Karsten *et al.*, 2004). De plus, des travaux récents menés au laboratoire ont montré que c'est le domaine N terminal de GRA5 qui oriente la protéine vers les GD et qui assure également son ciblage à la MVP (Gendrin *et al.*, 2008). Ces travaux ont permis de proposer le modèle selon lequel les protéines GRA contenant un domaine transmembranaire, entreraient dans la voie de sécrétion au niveau du RE, *via* un appareil de type translocon puis s'associeraient en oligomères dans ce compartiment, les complexes servant à masquer leur domaine transmembranaire. Le bourgeonnement à partir du RE permettrait la formation de microvésicules (protéines complexées à des lipides) qui transiteraient par l'appareil de Golgi puis seraient stockées à l'intérieur des GD (Figure 32) (Gendrin *et al.*, 2008)

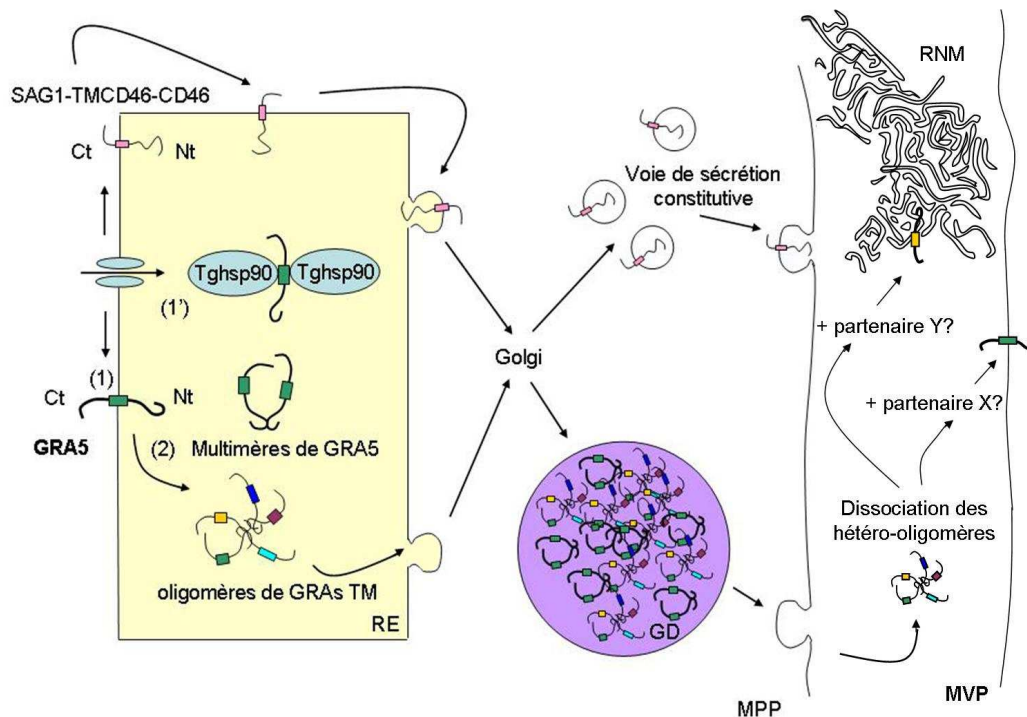


Figure 32. Modèle du trafic post-sécrétoire des protéines GRA. Selon ce modèle, les protéines GRA ayant un domaine transmembranaire, entrent dans la voie de sécrétion au niveau du RE, *via* un appareil de type translocon (1') puis s'associent en oligomères dans le RE (2), les complexes servant à masquer leur domaine transmembranaire. Des microvésicules (protéines complexées à des lipides) pourraient se former par bourgeonnement au niveau du RE, transiteraient par l'appareil de Golgi puis seraient stockées à l'intérieur des GD. La fusion des GD avec la membrane plasmique du parasite (MPP), permet la libération des protéines de GD dans l'espace vacuolaire. Les protéines ainsi libérées interagissent probablement avec d'autres partenaires non encore identifiés et sont ensuite ciblées spécifiquement vers les membranes du RNM ou de la VP. Par contre, les protéines destinées à la membrane plasmique du parasite (MPP), s'insèrent dans la membrane du RE avec une topologie définie (1), transitent éventuellement par le Golgi après leur bourgeonnement à partir du RE et rejoignent la MPP *via* la voie de sécrétion constitutive. RE, reticulum endoplasmique ; GD, granules denses ; MPP, membrane plasmique du parasite ; RNM, réseau de nanotubes membranaires ; MVP, membrane de la VP ; VP, vacuole parasitophore. D'après (Gendrin *et al.*, 2008).

Sécrétion des protéines de GD

La sécrétion à partir des GD peut être observée quelques minutes seulement après l'invasion et la formation de la VP. Elle a lieu au niveau de la partie apicale du parasite, après fusion de la membrane du GD avec la membrane plasmique, probablement au niveau de la suture entre deux plaques de l'IMC (**Figures 19 et 30**) (Dubremetz *et al.*, 1993 ; Carruthers and Sibley, 1997 ; De Souza, 2005). Cette sécrétion qui coïncide avec le développement de la VP et de ses systèmes membranaires suggère que le mécanisme particulier qui permet de réguler la sécrétion des GD est directement lié à la formation de la VP.

Contrairement aux granules sécrétoires des cellules eucaryotes dont le contenu est condensé lors de la maturation du granule, les GD semblent stocker des protéines à la fois sous forme soluble et agrégée (Sibley *et al.*, 1995 ; Adjogble *et al.*, 2004 ; Labruyère *et al.*, 1999 ; Braun *et al.*, 2008). Ce stockage sous deux états pourrait être à l'origine de deux types de sécrétion : la fraction soluble, non agrégée, pourrait être libérée en permanence, de façon constitutive, tandis que la fraction agrégée serait libérée uniquement en réponse à un signal. La régulation de la sécrétion des protéines de GD dépendrait donc directement de leur état d'agrégation.

◆ **Sécrétion constitutive.** La fusion de la membrane des GD avec la membrane plasmique est vraisemblablement aidée ou accentuée par des protéines impliquées dans le transport protéique entre le RE et l'appareil de Golgi, à savoir des petites GTPases de la famille des Rab, des facteurs accessoires solubles de la machinerie NSF (N-ethylmaleimide Soluble Factor), des SNARE/SNAP (Soluble NSF Associated Protein) (Chaturvedi *et al.*, 1999) et ARF-1 (ADP-Ribosylation Factor 1) (Liendo *et al.*, 2001). De plus, la protéine Rab 6 semble réguler le transport rétrograde des protéines de GD vers le Golgi car sa sur-expression empêche la sécrétion des protéines de GD solubles qui sont alors ramenées vers l'appareil de Golgi et le RE (Stedman *et al.*, 2003).

◆ **Sécrétion régulée.** La bréfeldine A, qui bloque la sécrétion constitutive des protéines en provoquant la désorganisation de l'appareil de Golgi, n'a pas d'effet sur la libération des protéines stockées dans les GD (Coppens *et al.*, 1999). Contrairement aux cellules de mammifères où l'événement régulé de fusion des granules avec la membrane plasmique fait suite à une élévation du taux de calcium intracellulaire, chez le toxoplasme, une stimulation par le calcium n'a aucun effet sur la libération du contenu des GD (Chaturvedi *et al.*, 1999) alors qu'elle initie la sécrétion des micronèmes (Carruthers and Sibley, 1999). Par contre, l'incubation de parasites avec du sérum inactivé par la chaleur induit la sécrétion des GD (Darcy *et al.*, 1988 ; Coppens *et al.*, 1999). Cependant, les protéines

sériques les plus communes telles que l'albumine sérique bovine, les IgG, la transferrine et diverses cytokines n'induisent pas la sécrétion des GD (Coppens *et al.*, 1999).

En résumé, la sécrétion du contenu des GD pourrait dépendre de deux mécanismes distincts en fonction du niveau de compaction du matériel granulaire : elle pourrait faire appel soit à un mécanisme constitutif, dépendant de ARF-1, au cours du développement parasitaire intracellulaire (Liendo *et al.*, 2001), soit à un mécanisme régulé par un mécanisme inconnu, totalement indépendant de ARF-1, assurant la sécrétion rapide des protéines de GD au moment où ces protéines sont requises pour constituer une VP fonctionnelle.

Trafic post-sécrétoire des protéines GRA

Toutes les protéines GRA sont sécrétées sous forme soluble dans la VP avant d'être adressées sélectivement vers ses différents compartiments membranaires : soit la MVP (GRA3, 5, 7, 8, 10, 14), soit le RNM qui occupe l'espace vacuolaire (GRA2, 4, 6, 9), soit les HOST (GRA7) (**Figure 33**). En relation avec cette localisation membranaire intravacuolaire, toutes les protéines GRA sont prédites comme contenant un domaine d'interaction membranaire. Comme vu précédemment, ce dernier est constitué soit d'hélice(s) alpha-amphipatique(s) (GRA2 et 9), soit d'une hélice α hydrophobe prédite comme étant transmembranaire (GRA3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 et 14) (**Figure 33**). De plus, parmi les protéines GRA, seules GRA2 et GRA6 avaient été décrites comme associées à la boule de membranes décrite dans l'invagination postérieure du parasite, 10-30 min après la formation de la VP et qui est à l'origine du RNM (Sibley *et al.*, 1995 ; Labruyère *et al.*, 1999) (**Figure 29-2 et 33-2**).

Si le trafic post-sécrétoire des protéines GRA est bien connu, les mécanismes qui les adressent spécifiquement vers tel ou tel type de membrane de la VP, restent obscurs. Dans ce domaine, seuls des travaux récents du laboratoire avaient montré que c'est le domaine N terminal de GRA5 qui oriente la protéine non seulement vers les GD mais aussi vers la MVP après sécrétion. Ces travaux mettent en avant l'hypothèse selon laquelle le domaine N terminal de la protéine pourrait se lier à un co-facteur vacuolaire (actuellement inconnu), après sécrétion dans la VP, afin de permettre l'exposition de son domaine transmembranaire et son insertion membranaire. Alternativement, le domaine N terminal de GRA5 pourrait reconnaître des déterminants raftés de la MVP, ce qui permettrait également son ciblage et son insertion dans la MVP (Gendrin *et al.*, 2008).

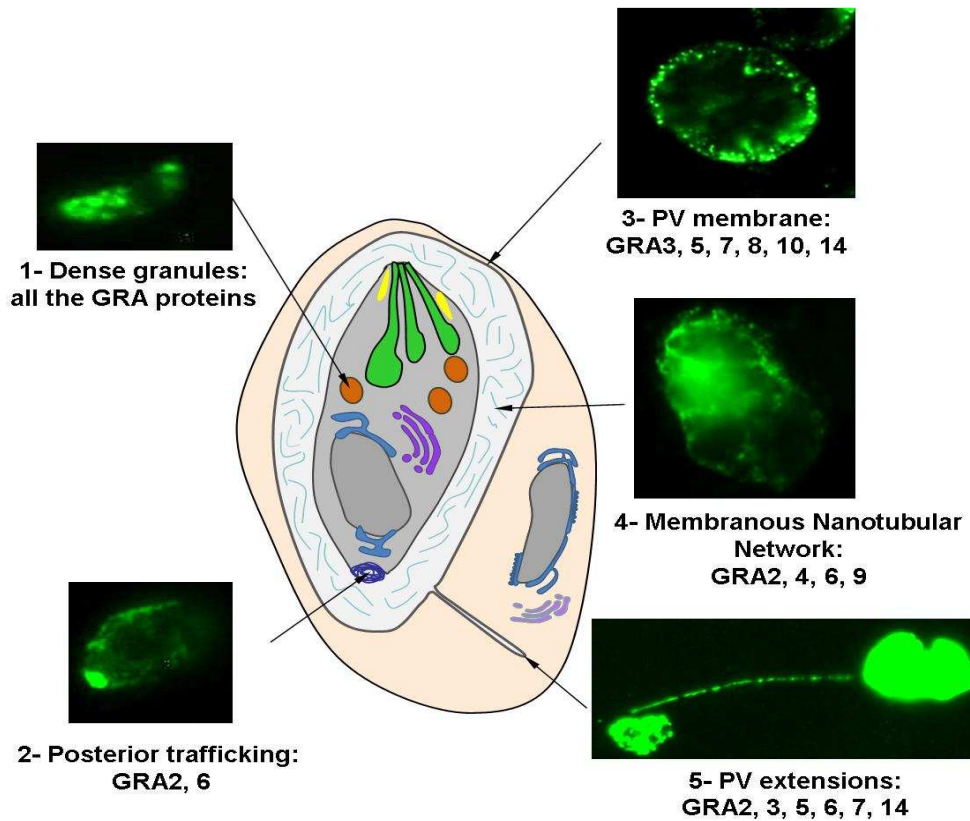


Figure 33. Spécificité d'adressage des protéines GRA vers les différents compartiments membranaires de la VP. D'après (Mercier *et al.*, 2010).

Fonction des protéines GRA

Comme vu précédemment, la sécrétion des protéines GRA coïncide avec la biogenèse de la VP et du RNM, avec lequel certaines protéines GRA (GRA2, 4, 6 et 9) s'associent de façon durable (Charif *et al.*, 1990 ; Sibley *et al.*, 1995 ; Mercier *et al.*, 1998a ; Travier *et al.*, 2008 ; Labruyère *et al.*, 1999 ; Lecordier *et al.*, 1995 ; Adjogble *et al.*, 2004), suggérant peut être, l'implication de ces protéines dans son processus de formation. Puisque leur fonction n'a pas pu être suggérée par l'analyse de leur séquence en acides aminés, l'approche retenue pour étudier la fonction des protéines GRA est la construction de parasites mutants déficients pour l'expression d'un ou de plusieurs gènes *GRA*, grâce à un double évènement de recombinaison homologue au locus, évènement qui remplace le gène à invalider par un marqueur de sélection. L'analyse de tels mutants KO a montré que la protéine GRA2 est l'effecteur principal du mécanisme de tubulation membranaire à l'origine de la formation du RNM. En effet, la délétion du gène *GRA2* dans une souche de type I, résulte en une disparition totale du RNM (**Figure 34**) et en une désorganisation complète des parasites au sein de la VP (Mercier *et al.*, 2002 ; Travier *et al.*, 2008). En outre, il a été montré que ce sont les 3 hélices α -amphipatiques centrales de GRA2

associées à son domaine N-terminal hydrophile qui sont les domaines indispensables à la formation du RNM (Mercier *et al.*, 2002 ; Travier *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que les parasites invalidés pour *GRA2* sont moins virulents chez la souris (Mercier *et al.*, 1998b).

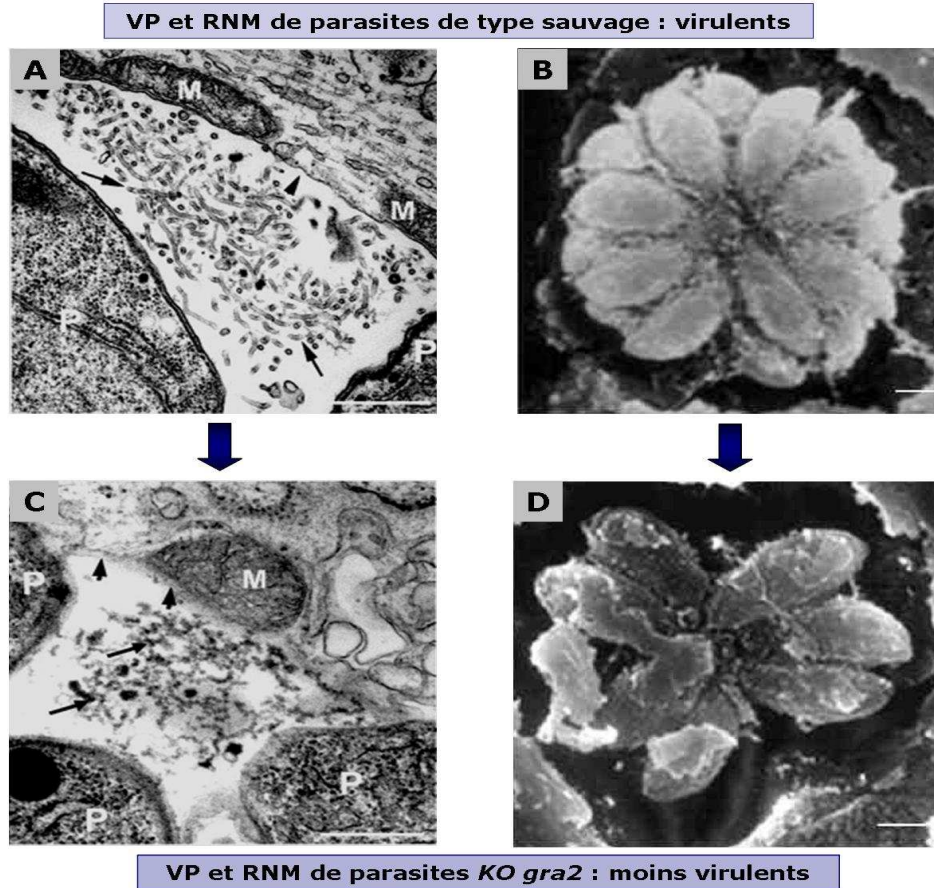


Figure 34. Photos de microscopie électronique à transmission et à balayage montrant l'effet de la délétion du gène *GRA2*. (A) et (B) Photos de vacuoles issues de parasites de type sauvage. Dans une VP, les parasites sont étroitement liés les uns aux autres par le RNM et les vacuoles sont organisées en rosettes. (C) et (D) Les parasites *KO gra2* génèrent une VP dépourvue de RNM, dans laquelle ils sont complètement désorganisés. La délétion de *GRA2* entraîne l'asynchronie de la division parasitaire. M : mitochondrie de la cellule hôte ; P : parasite. D'après (Mercier *et al.*, 2002 ; Travier *et al.*, 2008).

Comme observé pour *GRA2*, la délétion du gène *GRA6* du génome parasitaire de type I conduit également à une perte de l'architecture tubulaire du RNM (Mercier *et al.*, 2002). Celui-ci est remplacé par de petites vésicules dans la VP mature, même si des enroulements membranaires sont encore observés au pôle postérieur du parasite peu après l'invasion (Figure 35B). La délétion de *GRA2* affecte justement l'accumulation de *GRA6* au niveau du pôle postérieur du parasite, là où le RNM se met en place (Figure 35A). De ces observations, il avait donc été conclu que *GRA2* semblait être l'effecteur principal de l'organisation tubulaire du RNM tandis que *GRA6*, en interagissant avec *GRA2* dès sa sécrétion dans la VP, permettrait de stabiliser dans le temps et l'espace, les

tubules membranaires induits par GRA2, afin de former le RNM mature (Mercier *et al.*, 2002).

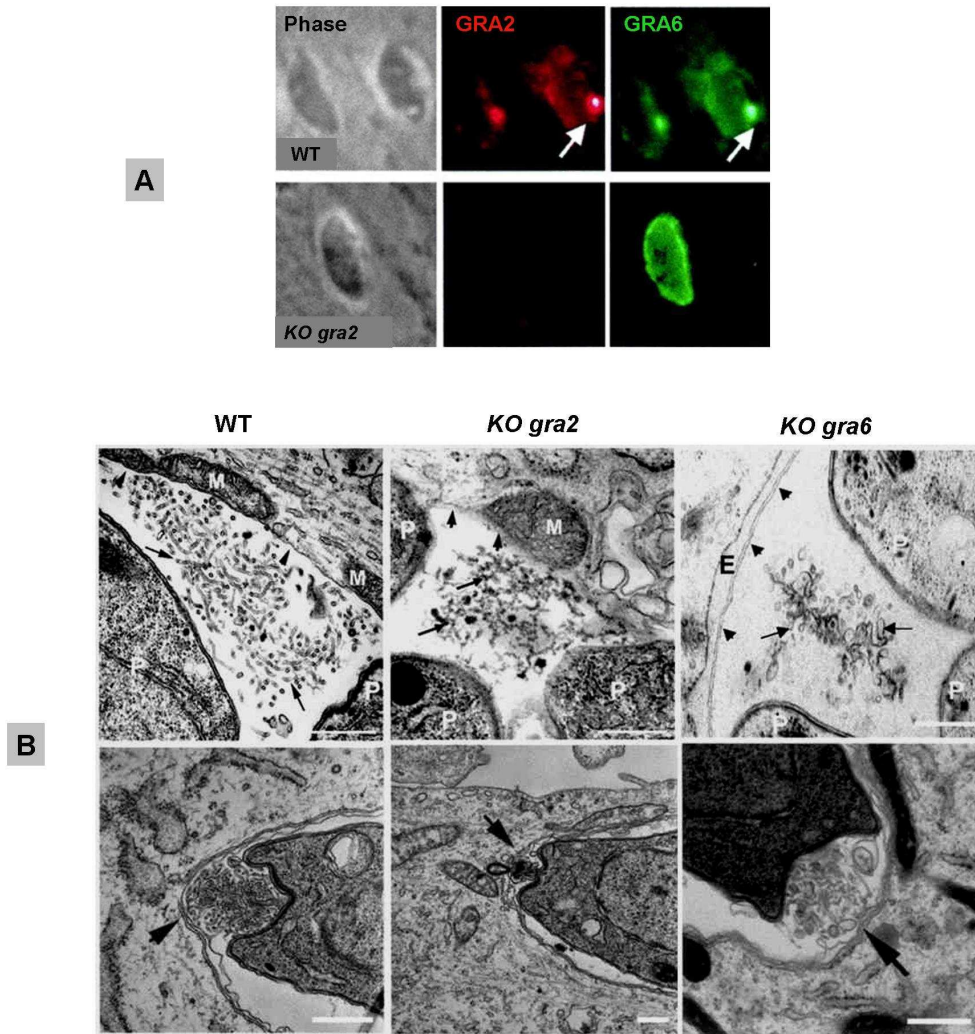


Figure 35. Rôle de GRA2 et de GRA6 dans la formation du RNM. (A) Effet de la délétion de *GRA2* sur le trafic postérieur post-sécrétoire de GRA6. Photos d'immunofluorescence indirecte montrant que la délétion de *GRA2* entraîne la perte de la localisation de GRA6 au niveau de la partie postérieure du parasite, durant la première heure suivant l'invasion. (B) GRA2 semble initier la formation du RNM et GRA6, le stabiliser. Photos de microscopie électronique à transmission montrant que l'absence de GRA2 ou de GRA6 se traduit par une perte de l'architecture tubulaire du RNM. Photos du haut : les nanotubes du RNM mature sont remplacés soit par un matériel agrégé (*KO gra2*), soit par de petites vésicules (*KO gra6*). Photos du bas : alors que la délétion du gène *GRA2* se traduit par la disparition complète du matériel membranaire observé à la partie postérieure du parasite durant la première heure, la perte de *GRA6* ne semble pas influencer sur la mise en place de ces membranes qui pourtant, ne peuvent plus se déployer (photos du haut). M, mitochondrie de l'hôte ; E, reticulum endoplasmique de l'hôte ; P, parasite ; WT, parasite sauvage. Echelle : 500 nm. D'après (Mercier *et al.*, 2002).

La délétion de *GRA5* et *GRA7* a également été réalisée dans la souche virulente RH de type I. Alors que la délétion de *GRA5* n'a pas révélé de phénotype particulier (Mercier *et al.*, 2001), les parasites délétés de *GRA7*, forment une VP totalement dépourvue de HOST, ont une croissance réduite lorsqu'ils sont en présence de sérum délipidé et présentent une morphologie très altérée (Figure 36). De plus, sous sa forme

recombinante, GRA7 induit la tubulation de liposomes. L'étude des formes tronquées de GRA7 a montré que c'est le domaine C terminal hydrophobe de la protéine qui est responsable de la tubulation. C'est sous une forme dimérisée que GRA7 induirait la formation de tubules à partir des produits de sécrétion parasitaire *in vitro* et de liposomes (**Figure 37**) (Coppens *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats a permis de proposer que GRA7 serait l'effecteur majeur de la formation des HOST (Coppens *et al.*, 2006).

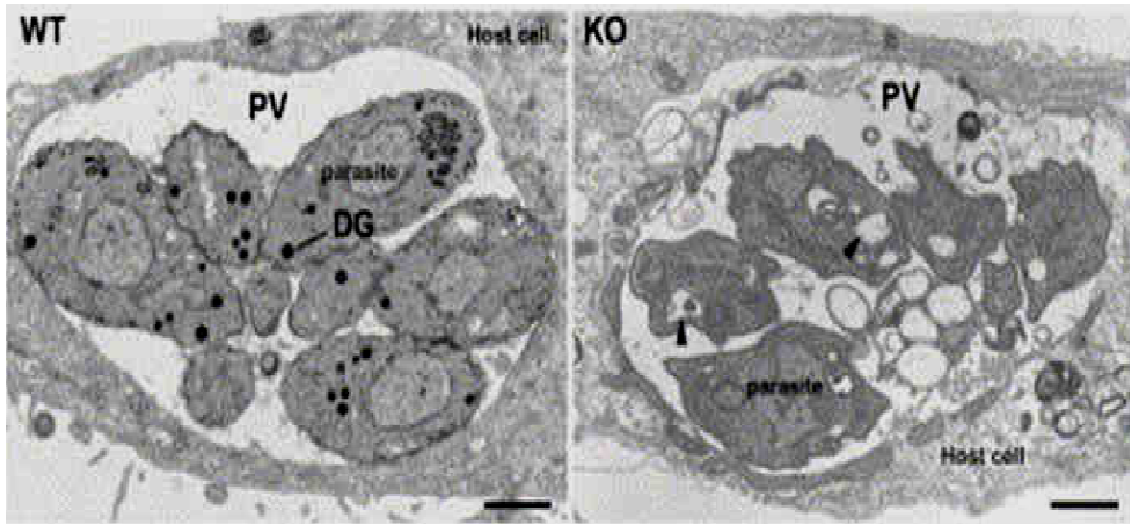


Figure 36. Les parasites délétés de *GRA7* présentent une morphologie altérée en présence de sérum délipidé. Parasites sauvages (WT) et délétés du gène *GRA7* (KO) après 48 heures de croissance en présence de 5 % de sérum délipidé. Les flèches indiquent les structures vacuolisées. Chez les parasites KO, l'absence de DG et d'autres organites denses aux électrons est rapidement observable. Aucun HOST n'est détecté. Echelle : 0.5 μ m. D'après (Coppens *et al.*, 2006).

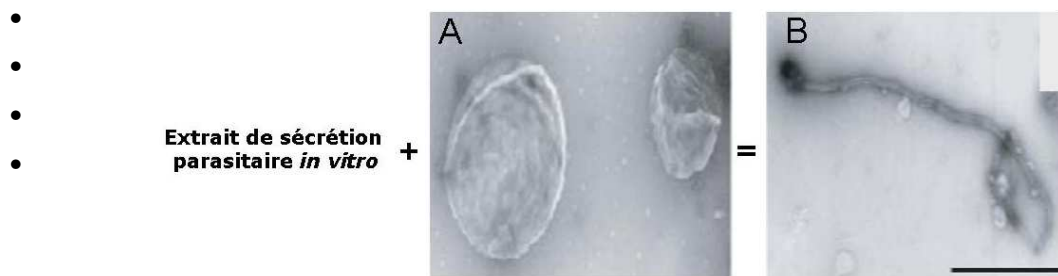


Figure 37. Tubulation de liposomes par le matériel sécrété *in vitro* à partir des toxoplasmes. Photographies réalisées par microscopie électronique à transmission, après incubation du matériel sécrété par les parasites avec de larges liposomes sphériques (A). A la suite de cette incubation, des tubules sont observés (B). Echelle : 300 nm. D'après (Coppens *et al.*, 2006).

Enfin, la délétion du gène *GRA3* a été réalisée dans une souche de type II : aucune altération de la morphologie de la VP n'a été observée ; de même, le RE et les mitochondries de la cellule hôte sont toujours détectés contre la MVP (Craver and Knoll, 2007).

•

- La construction de souches parasitaires KO pour les protéines GRA s'est heurtée jusqu'à présent, au fait que chez *Toxoplasma*, la double recombinaison homologue au locus se produit avec une fréquence très rare. La construction récente d'une souche de parasites de type I déficiente en Ku80 (protéine qui permet de réparer les extrémités non homologues d'ADN) (Fox *et al.*, 2009 ; Huynh *et al.*, 2009), devrait permettre de générer plus facilement une souche KO pour chacune des protéines GRA identifiées. L'analyse de leur phénotype fournira peut être des informations intéressantes sur leur fonction.

Régulation de l'expression des protéines GRA lors de l'enkystement

La plupart des études sur les protéines de GD ont été réalisées au stade tachyzoïte. Or, lors de l'infection chronique, la VP se transforme rapidement en un kyste intracellulaire (Cf. Chapitre I-3-2). Toutes les protéines GRA continuent d'être détectées dans les GD des parasites enkystés mais l'expression des NTPases est par contre réduite (Nakaar *et al.*, 1999 ; Ferguson *et al.*, 1999). De plus, l'analyse sur puce à ADN de la régulation de l'expression des protéines GRA lors du processus d'enkystement montre que les gènes *GRA1*, *GRA5* et *GRA8* sont régulés négativement au cours du développement puisque leur ARNm est réprimé. Par contre, les taux d'ARNm codant pour *GRA2*, *GRA3*, *GRA4*, *GRA6* et *GRA7* restent stables (Cleary *et al.*, 2002). Malgré l'absence d'ARN transcrit, *GRA1* et *GRA5* sont pourtant toujours détectées dans le kyste (*GRA1* dans la matrice kystique et *GRA5*, dans la membrane externe du kyste) et les bradyzoïtes. Les protéines *GRA2* et *GRA6* se retrouvent dans la paroi du kyste (Torpier *et al.*, 1993 ; Ferguson, 2004). Les protéines *GRA4* et *GRA8* ne sont par contre, pas retrouvées dans les kystes mais demeurent dans les GD des bradyzoïtes (Ferguson, 2004). Ces résultats laissent supposer que la sécrétion de *GRA4* et *GRA8* s'arrête dès le début de la formation des kystes ou que les protéines sont modifiées lors de l'enkystement, ce qui se traduirait par la perte de la réactivité des anticorps spécifiques (Mercier *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données laisse supposer que l'expression des protéines GRA est régulée au cours de l'enkystement mais les mécanismes de cette régulation restent inexplorés.

4) Modifications de la cellule hôte suite à la formation de la VP

On ne connaît pas encore beaucoup de choses concernant les interactions établies entre la VP et la cellule hôte. On sait cependant, que la formation de la VP s'accompagne d'événements moléculaires importants dans la cellule hôte.

a) Redistribution des microtubules et des filaments intermédiaires contre la VP

Dès 4 à 6 heures après l'infection, les microtubules de la cellule hôte commencent à entourer la VP et 24 heures après l'invasion, la VP mature est complètement incluse dans un réseau de microtubules cellulaires et de filaments intermédiaires, notamment de vimentine (**Figure 38A**) (Andrade *et al.*, 2001 ; Sehgal *et al.*, 2005 ; Halonen and Weidner, 1994 ; Coppens *et al.*, 2006 ; Walker *et al.*, 2008 ; Plattner and Soldati-Favre, 2008 ; da Silva *et al.*, 2009). Par contre, les microfilaments d'actine restent inchangés une fois la VP mise en place (Coppens *et al.*, 2006 ; Laliberté and Carruthers, 2008). Comme vu précédemment, les microtubules cellulaires qui entourent la VP se raccourcissent et pénètrent dans de profondes invaginations de la membrane vacuolaire pour constituer les HOST (Coppens *et al.*, 2006). Les centrosomes ou MTOC des cellules infectées se détachent de l'enveloppe nucléaire et s'associent également à la VP. Les extensions membranaires de la membrane vacuolaire (PVE) dans le cytosol de la cellule hôte pourraient en assurer le recrutement.

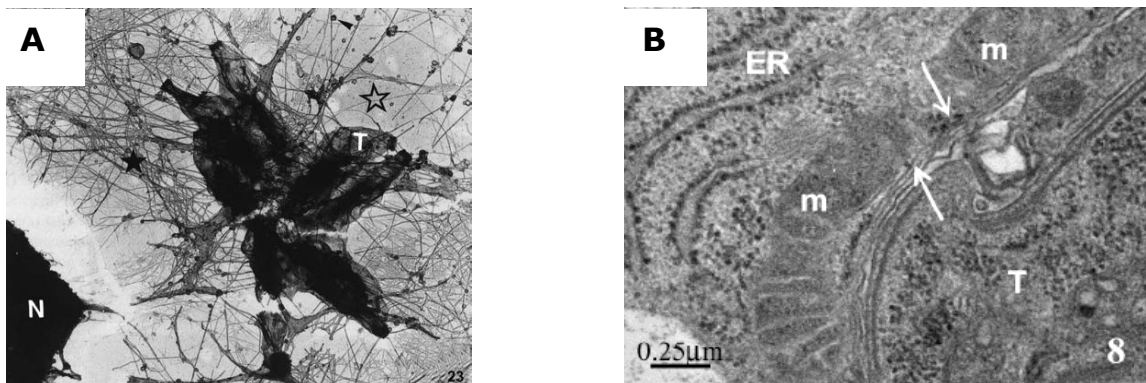


Figure 38. Recrutement des microtubules et du RE cellulaires autour de la PV de *T. gondii*. (A). N : noyau de la cellule hôte ; T : parasite. D'après (De Souza, 2005) (B) Cliché de microscopie électronique à transmission. M : mitochondrie de la cellule hôte. ER : réticulum endoplasmique de la cellule hôte. T : parasite. D'après (Magno *et al.*, 2005b).

b) Redistribution des endo-lysosomes

Les structures endo-lysosomales de l'hôte distribuées autour de la VP, sont souvent associées aux microtubules, en contact direct avec la MVP ou avec les HOST. Elles sont également détectées dans l'espace vacuolaire et pourraient être récupérées à des fins trophiques, plus particulièrement pour importer des lipides, des précurseurs de lipides ou des dérivés lipidiques (Coppens *et al.*, 2006).

c) Redistribution des mitochondries et du réticulum endoplasmique

Les mitochondries et le RE de la cellule hôte sont recrutés contre la membrane de la VP (Schatten and Ris, 2004 ; De Melo and De Souza, 1997 ; Magno *et al.*, 2005b) (**Figures 38B-39**). Ce recrutement se fait par un processus dynamique médié par les microtubules et les protéines moteurs cytoplasmiques de la cellule hôte telles que la kinésine (Sinai *et al.*, 1997). Très récemment, il a été rapporté qu'il existe des connections intimes entre la VP et les organites de la cellule hôte, notamment des fusions entre la PV et le RE (Goldszmid *et al.*, 2009) mais les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette interaction ne sont actuellement pas connus. La protéine du bulbe des rhoptries ROP2, dont la région N-terminale mime la séquence d'import mitochondriale, pourrait être transloquée au-delà de la membrane externe des mitochondries de l'hôte et être impliquée dans la rétention des mitochondries contre la MVP (Sinai and Joiner, 2001 ; Dubremetz, 2007). En effet, l'annulation de la synthèse de ROP2 par l'utilisation d'ARN anti-sens entraîne des anomalies morphologiques de la VP, avec absence de recrutement des mitochondries de la cellule hôte. Par contre, la VP est toujours associée au RE de la cellule hôte (Sinai *et al.*, 1997; Magno *et al.*, 2005b, Romano *et al.*, 2008 ; Mercier *et al.*, 2010 ; Pernas and Boothroyd, 2010). Suite à la formation de la VP, l'appareil de Golgi cellulaire, normalement localisé dans la région péri-nucléaire grâce aux microtubules centrosomaux, est fragmenté en petites unités à la surface de la VP. Par contre, les peroxyosomes de l'hôte ne semblent pas être altérés suite à l'infection par le toxoplasme (Coppens *et al.*, 2006).

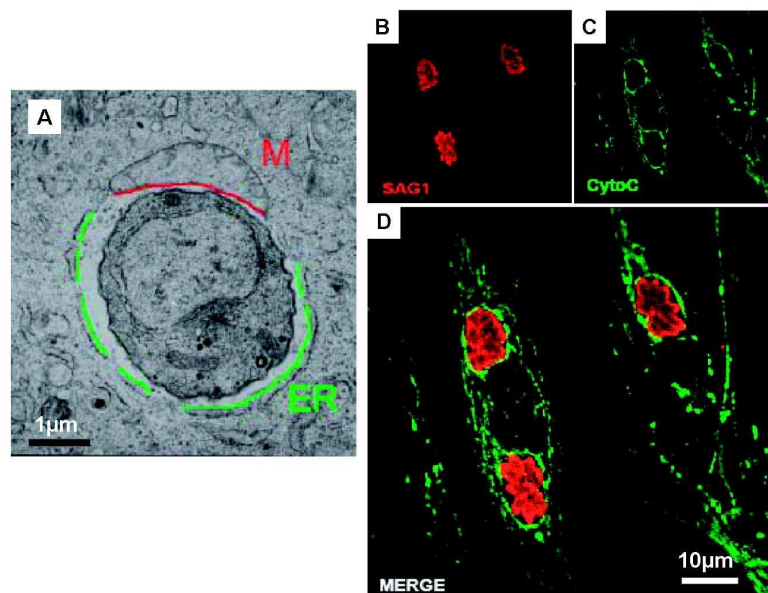


Figure 39. Redistribution des mitochondries et du RE de la cellule hôte autour de la VP. (A) Microscopie électronique à transmission montrant une VP (4h post-invasion) entourée par le RE de la cellule hôte (traits verts) et par une mitochondrie (trait rouge). **(B), (C) et (D).** Microscopie confocale montrant le recrutement massif des mitochondries de la cellule hôte autour de 3 VP. Les VP sont visualisées à l'aide d'un anticorps anti-SAG1 (protéine de surface du toxoplasme) (rouge) et les mitochondries, à l'aide d'un anti-cytochrome C (vert). D'après (Nelson *et al.*, 2008).

d) Manipulation des voies de signalisation de la cellule hôte

Suite à son entrée dans la cellule hôte, *T. gondii* est capable de manipuler de nombreuses de ses voies de signalisation en contrôlant son activité transcriptionnelle, ce qui pourrait être à l'origine, du moins en partie, des modifications décrites ci-dessus (**Figure 40**). Il permet entre autres, de contrôler le taux de cytokines produites par l'hôte ; il prévient l'apoptose de la cellule infectée, probablement *via* la kinase ROP38 ainsi que d'autres facteurs qui contrôlent les fonctions mitochondriales et interfèrent avec les voies des caspases 3, 7, de la phosphatidylinositol kinase 3 (PI3k) ainsi qu'avec celle du NF- κ B (Peixoto *et al.*, 2010 ; Carmen and Sinai, 2007 ; Plattner and Soldati-Favre, 2008 ; Laliberté and Carruthers, 2008). La formation de la VP s'accompagne également du recrutement séquentiel à la MVP, de protéines IRG (Immunity-Related GTPases) impliquées dans la résistance à *T. gondii* de type II, chez la souris. Ces protéines induites par l'IFN- γ contribuent à la lyse de la MVP, à la mort du parasite et donc à la protection de la souris. Des résultats récents ont cependant montré que lors d'une infection par une souche de type I, le recrutement des IRG à la MVP est atténué et que les kinases ROP16 et ROP18 ainsi que la protéine ROP5 ne sont pas individuellement impliquées dans cette diminution du recrutement des IRG (Khaminets *et al.*, 2010). De plus, très récemment, Melo et collaborateurs ont montré que la formation de la VP entraîne une accumulation massive autour de la VP, de UNC93B1. Cette protéine membranaire polytopique, localisée dans le RE de la cellule hôte, s'associe spécifiquement aux acteurs de l'immunité innée tels que le TLR3, TLR7, TLR9 et le TLR 13. UNC93B1 pourrait donc être un candidat potentiel dans le contrôle de la résistance à l'infection par *T. gondii* en interférant avec le trafic des ligands de ces TLR à partir du RE jusqu'aux endolysosomes (Melo *et al.*, 2010).

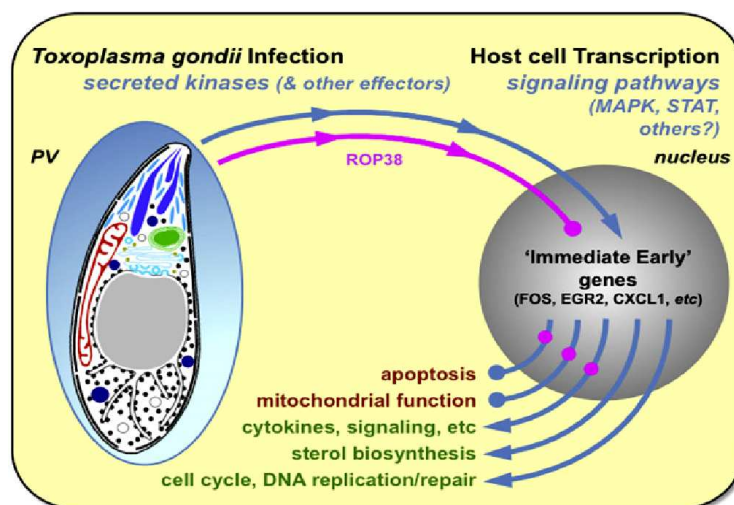


Figure 40. Schématisation de la manipulation de la machinerie de transcription de la cellule hôte suite à la formation la VP. D'après (Peixoto *et al.*, 2010).

II-3) Multiplication des parasites par endodyogénie à l'intérieur de la VP

Une fois installé dans sa cellule hôte et ayant établi des connections métaboliques avec celle-ci, le tachyzoïte entame des cycles de réplication par un processus appelé endodyogénie. Étant la forme proliférative principale de *T. gondii*, le tachyzoïte (type I) se multiplie 3 à 4 fois par 24 h. Cette phase mène à la production exponentielle d'environ 128 à 356 parasites dans une seule VP (2^n parasites pour n cycles). Les parasites continuent de se multiplier de façon synchronisée, jusqu'à réception d'un signal émanant du parasite ou de l'hôte, informant probablement le parasite que l'encombrement maximal du cytoplasme de la cellule hôte est atteint. En fonction de la réponse immunitaire de l'hôte, la conséquence sera soit l'enkystement, soit l'évasion du parasite de la cellule hôte (Cf. Chapitre II-4) avant la recherche d'une nouvelle cellule cible.

La division par endodyogénie constitue une particularité de quelques espèces du phylum des Apicomplexa, dont *Toxoplasma*, puisque la grande majorité des parasites de ce phylum se multiplient par schizogonie. L'endodyogénie permet la formation, à l'intérieur de chaque parasite, de deux cellules filles, grâce à la réplication des chromosomes suivie d'une mitose et d'une duplication des organites parasitaires (**Figure 41**). La division parasitaire implique un remodelage membranaire avec une intense production de lipides membranaires, une fission synchronisée des organites dupliqués comme la mitochondrie et l'apicoplaste ainsi qu'une duplication orchestrée des compartiments membranaires connectés au système endomembranaire.

L'appareil de Golgi est le premier organite à se diviser par fission médiane. Il forme deux complexes au dessus du noyau ([Pelletier et al., 2002](#)). La portion antérieure de l'IMC et les microtubules sous-pelliculaires apparaissent dans les cellules filles, sous la forme de dômes au dessus du noyau (**Figure 41B**) ([Pelletier et al., 2002](#)). Sans qu'il y ait condensation des chromosomes, le noyau prend la forme d'un fer à cheval dont les extrémités se glissent dans les structures en forme de dômes formées par les IMC fils (**Figure 41C**). L'IMC et les microtubules s'étendent vers la partie postérieure et entourent le noyau qui se divise en deux ([Hu et al., 2006](#) ; [Morissette and Striepen, 2002](#)). Les cellules filles s'accroissent jusqu'à atteindre la taille de la cellule mère. L'IMC de la cellule mère disparaît progressivement et la membrane plasmique de la cellule mère devient celle des cellules filles. La division des parasites s'accompagne de la formation d'un corps résiduel de division (residual body) qui relie la partie postérieure des tachyzoïtes fils dans la VP. Ce corps résiduel est issu du reste de la membrane plasmique de la cellule mère (**Figure 41D**). Il contient les restes de la mitochondrie, du

RE, des micronèmes et des rhoptries de la cellule mère. Si la cellule hôte est suffisamment plate, par exemple dans un fibroblaste, au fur et à mesure de leurs divisions, les parasites s'organisent à l'intérieur de la VP, en une rosette contenant un nombre pair de parasites.

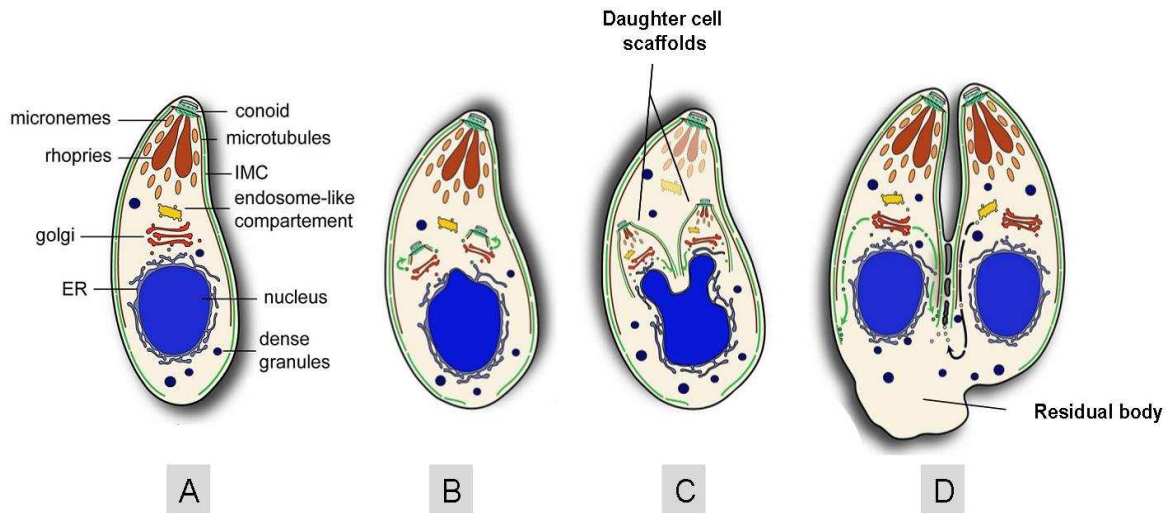


Figure 41. Représentation schématique de la division des tachyzoïtes par endodyogénie. (A) Après environ 4 heures à l'intérieur de la cellule, le parasite commence à se diviser. Le volume de la cellule mère augmente et les organites sécrétoires apicaux commencent à se décomposer. (B) Les deux IMC fils contiennent déjà l'appareil de Golgi et l'apicoplaste divisés, ainsi que les rhoptries et les micronèmes immatures. (C) Le noyau de la cellule mère avec le RE qui l'entoure, commence à s'étendre et à envahir l'échafaudage des deux cellules filles. La mitochondrie de la cellule mère qui entoure presque complètement les deux cellules filles, est un des organites qui se divisent en dernier. (D) À la fin du processus d'endodyogénie, les deux cellules filles restent attachées par ce qu'on appelle le corps résiduel de division (residual body) qui contient les restes de la mitochondrie, du RE, des micronèmes et des rhoptries de la cellule mère. Adapté de (Agop-Nersesian *et al.*, 2010).

La synchronisation de division des parasites fait appel à de nombreux acteurs protéiques indispensables tout au long du processus de division et qui interviennent aussi bien au niveau du pôle apical qu'au niveau du pôle basal (Anderson-White *et al.*, 2010). Parmi ces protéines, on retrouve principalement les protéines de l'IMC, parmi lesquelles la protéine MORN1 (Membrane Occupation and Recognition Nexus 1). Cette dernière joue un rôle primordial, notamment lors la séparation des cellules filles. En effet, l'analyse récente du phénotype d'un *KO MORN1* montre que les parasites mutants sont complètement asynchrones et que la séparation des cellules filles ne s'achève pas (Figure 42) (Morrissette and Sibley, 2002 ; Hu *et al.*, 2006 ; Lorestani *et al.*, 2010). MORN1 rentrerait dans la constitution d'un anneau protéique qui couliserait depuis le pôle apical jusqu'au pôle postérieur des cellules filles pour former leur IMC (Hu *et al.*, 2006). De même, les protéines Alp1 (Actin-Like Protein1) et Rab 11B (Rab-GTPase) semblent jouer un rôle important lors de la formation de l'IMC des cellules filles, en permettant le transport de vésicules golgiennes jusqu'à l'IMC naissant des cellules filles (Gordon *et al.*, 2010 ; Agop-Nersesian *et al.*, 2010).

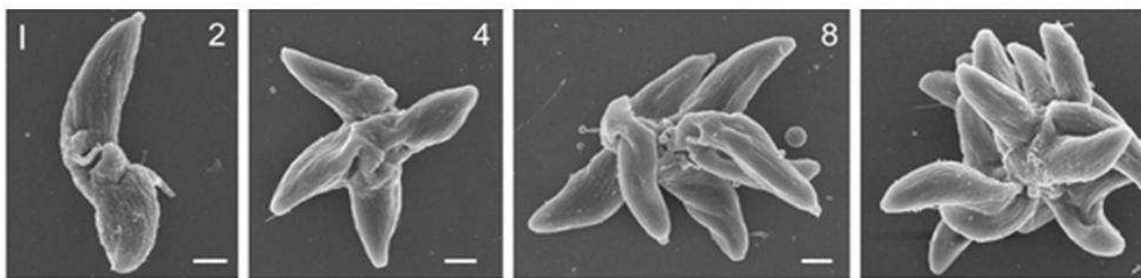


Figure 42. Exemple de l'implication de MORN1 dans l'endodyogénie. Observation par microscopie électronique à balayage du phénotype des parasites *KO MORN1*. Les parasites sont complètement désorganisés mais ils restent liés les uns aux autres, au niveau du pôle postérieur, un peu comme des frères siamois. Les chiffres 1-16 indiquent le nombre de parasites après chaque cycle d'endodyogénie. D'après (Lorestani *et al.*, 2010).

II-4)- Evasion des parasites (egress)

Après 6 à 8 cycles d'endodyogénie, 64 à 256 tachyzoïtes sortent de la cellule hôte et sont capables d'infecter les cellules environnantes. La perméabilité de la membrane de la VP augmente avec le développement des parasites, entraînant une augmentation de la concentration calcique vacuolaire. Cette augmentation rapide et transitoire du calcium intra-vacuolaire suit une déplétion du taux de potassium de la cellule (Moudy *et al.*, 2001). L'augmentation du taux de calcium intracellulaire s'accompagne d'une activation transitoire des NTPases parasitaires, de la sécrétion des protéines de micronèmes, dont une perforine (PLP1) qui provoquera la rupture de la MVP (Kafsack *et al.*, 2009 ; Kafsack and Carruthers, 2010). Juste avant la rupture de la MVP, les parasites auparavant immobiles, s'activent, étendent leur conoïde (Caldas *et al.*, 2010) et sont libérés de la cellule (**Figure 43**). Juste avant l'egress, l'aldolase ainsi que les autres enzymes de la glycolyse se relocalisent en périphérie du parasite, entre l'IMC et la membrane plasmique, ce qui permet d'une part, l'interaction de l'aldolase avec le glideosome et d'autre part, une production optimisée d'ATP pour la reprise de la mobilité parasitaire (Pomel *et al.*, 2008). Lors de la sortie de la cellule hôte, les parasites traversent d'abord la MVP *via* une jonction mobile différente de celle qui permet l'entrée dans la cellule hôte car cette jonction est toujours formée des protéines RON mais elle est dépourvue de la protéine AMA1. Le parasite traverse ensuite successivement le cytoplasme puis la membrane plasmique de la cellule hôte, provoquant des lésions irrémédiables de celle-ci (Sibley, 2003 ; Black and Boothroyd, 2000). Il est à noter que les éléments du cytosquelette de la cellule hôte, notamment des filaments d'actine participent activement à l'évasion des parasites car le blocage de ces filaments par un traitement à la cytochalasine D provoque une inhibition totale de la sortie des parasites (Caldas *et al.*,

2010). Enfin, une fois sortis, les tachyzoïtes vont aller infecter d'autres cellules et accomplir un nouveau cycle lytique.

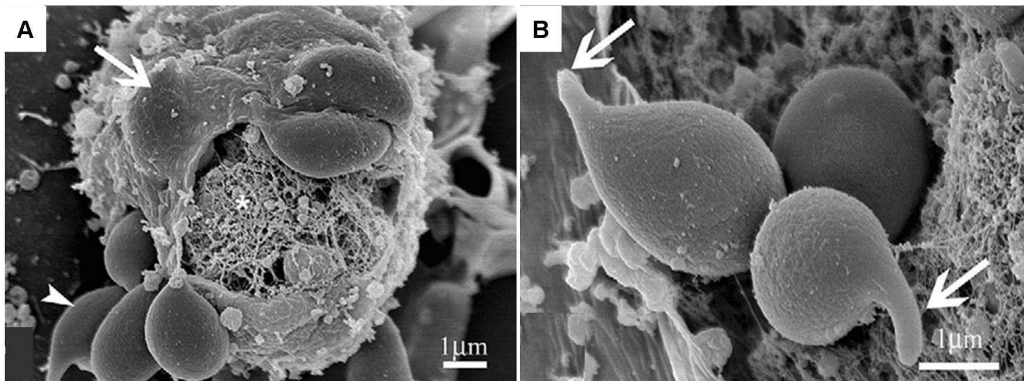


Figure 43. Microscopie électronique à balayage de tachyzoïtes sortant de la VP. (A) Des tachyzoïtes s'apprêtent à sortir de la cellule : certains apparaissent sous la membrane plasmique de la cellule (flèche blanche) et d'autres sont déjà à l'extérieur (pointe de flèche blanche). L'étoile indique les endroits de rupture de la membrane plasmique de la cellule hôte. **(B)** Groupe de parasites sortant de la cellule hôte et présentant un conoïde extrudé (flèches blanches). D'après (Caldas *et al.*, 2010).

CHAPITRE III : Mécanismes de déformation membranaire

Tout être vivant dépend d'une manière ou d'une autre, de membranes. Ces dernières déterminent la frontière des cellules en formant l'interface entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur. Elles entourent également les compartiments intracellulaires, tels que les lysosomes, les mitochondries,... D'une manière générale, les membranes biologiques sont des structures mobiles, du fait de leurs grandes capacités à s'adapter aux contraintes biologiques environnantes et à remodeler l'architecture membranaire en fonction des besoins de la cellule. La compréhension des mécanismes de courbure membranaire et de formation de tubules membranaires est donc une question centrale en biologie. Elle fait l'objet d'intenses recherches à l'interface entre la biologie cellulaire, la biochimie et la biophysique. En effet, la genèse de membranes courbées est par exemple, le point de départ de la formation des compartiments cellulaires qui sont au centre des mécanismes de synthèse, de modification, de tri et de trafic des protéines (membranes du RE, des saccules golgiens, du système endomembranaire). Les mécanismes qui régissent la dynamique membranaire sont très complexes et font intervenir différents acteurs cellulaires protéiques et lipidiques, agissant par différents moyens pour déformer les membranes.

Depuis quelques années, un nouveau type de déformations membranaires a été rapporté : il s'agit de tubules membranaires utilisés ou induits par des microorganismes pathogènes. Ces tubules membranaires, qui incluent le RNM de *T. gondii* (Cf. Chapitre II

de l'introduction) sont, pour la plupart, très peu caractérisés mais ils pourraient constituer des supports majeurs de la pathogénicité des microorganismes concernés.

Dans ce chapitre, je décrirai tout d'abord brièvement les exemples de phénomènes de tubulation membranaire observés jusqu'ici, chez les microorganismes pathogènes, que ce soient dans le cadre de l'infection par des virus, des bactéries ou des parasites. Puis j'essaierai de résumer les principaux modes de tubulation membranaire décrits dans la littérature ainsi que les protéines et les lipides mis en jeu, leurs caractéristiques et leurs conséquences sur les membranes. Ces informations nous seront en effet utiles pour essayer de comprendre les bases du phénomène de la tubulation membranaire responsable de la formation du réseau de nanotubes membranaires de la vacuole parasitophore de *T. gondii*, fil conducteur de ma thèse.

III-1) Exemples de microorganismes pathogènes utilisant un système de tubulation membranaire comme support potentiel de pathogénicité

De nombreux microorganismes pathogènes intracellulaires obligatoires ont développé des stratégies finement régulées pour échapper au contrôle de leur développement par la cellule hôte et pour assurer leur cycle infectieux. Une de ces stratégies est l'utilisation de tubules membranaires établis entre une cellule infectée et une cellule saine (cas du VIH), le développement de nanotubes membranaires à partir de la vacuole dans laquelle ils se développent, vers le cytoplasme hôte (cas de *Salmonella* et *Plasmodium*) ou le développement de tubulaires membranaires au sein de la vacuole dans laquelle ils se multiplient (cas de *Toxoplasma*). La fonction de ces tubules membranaires n'est pas toujours connue. Ils pourraient permettre l'acquisition de nutriments à partir de la cellule, l'injection de molécules toxiques dans le cytosol cellulaire ou encore la manipulation du cytosquelette de la cellule hôte. Ces tubules membranaires qui vont être détaillés ci-après, constitueraient donc une stratégie potentielle de pathogénicité propre à ces microorganismes (remarque : le développement du RNM de la VP de *T. gondii*, qui a fait l'objet du paragraphe 2-2 du chapitre II de l'introduction, ne sera pas repris dans ce chapitre).

1) Utilisation par un virus, des nanotubes membranaires établis entre deux cellules, pour se propager à une cellule non infectée

Dans le cadre du développement et du maintien de l'intégrité d'organismes multicellulaires, la communication entre les cellules peut se développer sur de courtes distances, selon différents moyens, parmi lesquels on comptabilise les synapses chimiques, les jonctions gap et les plasmodesmes. Un autre mode de communication, sur de plus longues distances, a été mis en évidence en 2004. Il passe par la formation *de novo*, de nanotubes membranaires entre deux ou plusieurs cellules, comme par exemple des cellules en culture PC12 (cellules neurales de phéochromocytome de rat) ou des cellules HEK (Human Embryonic Kidney). Les structures formées, appelées « tunneling nanotubes » (TNT), ont un diamètre de 50 à 200 nm et peuvent atteindre une longueur égale à plusieurs fois le diamètre de la cellule qui leur a donné naissance. Ces structures contiennent de l'actine filamenteuse mais ne contiennent pas de microtubule. L'utilisation de marqueurs fluorescents observés en vidéomicroscopie a révélé que de petites vésicules et des composants de la membrane plasmique des cellules impliquées dans la formation des TNT peuvent être transportés le long de ces tubules membranaires (Rustom *et al.*, 2004). Le même type de nanotubes a été observé par microscopie confocale, entre des cellules du système immunitaire, à savoir des cellules B humaines transformées par le virus Epstein Barr et des cellules NK du sang périphérique humain ou entre des macrophages humains ou murins (**Figure 44**). Les nanotubes générés peuvent réunir plusieurs cellules, s'étendre à une vitesse de 0,2 $\mu\text{m/s}$, sur une distance moyenne de 30 μm et être observés pendant plus de 15 minutes. Ils se créent lors du désengagement des cellules impliquées dans une synapse immunologique transitoire et permettent le transport de protéines du CMH de classe I (ancrées dans la membrane plasmique par une ancre GPI) exprimées à la surface de l'une des deux cellules impliquées dans la synapse, vers la seconde cellule (Önfelt *et al.*, 2004 ; Önfelt and Davis, 2004 ; Hurtig *et al.*, 2010).

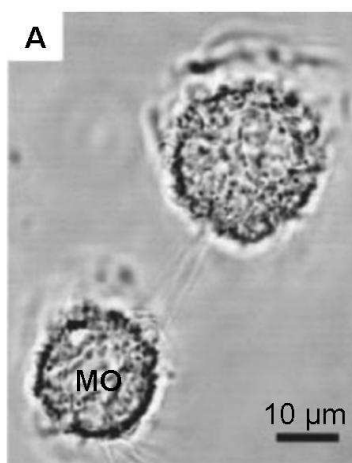


Figure 44. Nanotubes membranaires induits entre deux macrophages primaires humains. Photo de microscopie confocale. Echelle : 10 μm . D'après (Önfelt *et al.*, 2004).

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un virus de la famille des Rétrovirus à ARN. Ce Lentivirus est connu pour infecter les cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques, provoquant l'altération progressive des fonctions immunitaires. Sachant que certaines données suggèrent que le VIH pourrait se propager d'une cellule à l'autre sans passer par le milieu extracellulaire, il a été suggéré que ces nanotubes membranaires pourraient être mis à profit par le virus afin d'assurer sa transmission intercellulaire. En effet, le transit de particules virales a été observé par vidéo microscopie confocale, lors de la co-incubation de lymphocytes T infectés par un VIH exprimant un marqueur fluorescent, avec des lymphocytes sains (**Figure 45**) (Sowinski *et al.*, 2008). Reste à prouver cependant que ce phénomène observé *in vitro* est capable de se produire également *in vivo*, chez l'être humain. Il est possible que d'autres virus empruntent également les nanotubes membranaires inter-cellules pour se propager d'une cellule à l'autre mais à notre connaissance, cela n'a pas encore été rapporté dans la littérature.

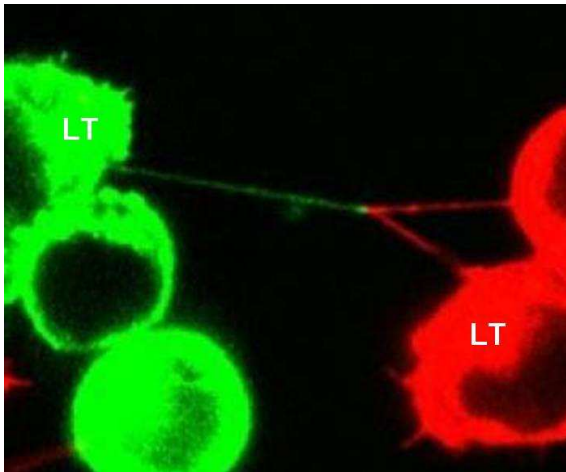


Figure 45. Utilisation des nanotubes membranaires générés entre un lymphocyte T infecté et un lymphocyte non infecté par le VIH. Photo de microscopie confocale permettant de visualiser les nanotubes membranaires établis entre des cellules T (lignée Jurkat) en co-culture, certaines étant marquées au DiD (rouges) et d'autres, exprimant une ancre GPI étiquetée avec la GFP (vert). D'après (Sowinski *et al.*, 2008 ; Hurtig *et al.*, 2010).

2) Les *Salmonella induced-filaments (Sifs)* de *Salmonella*

L'espèce *Salmonella enterica* regroupe plus de 2 000 serovars de bacilles gram -, très proches sur le plan génétique, mais dont les spécificités d'hôtes (l'homme et les animaux) sont variables et causent des pathologies variées qui vont de gastroentérites plus ou moins sévères à la fièvre typhoïde. Le modèle d'étude des interactions moléculaires hôte-pathogène est *S. typhimurium*, bactérie faiblement pathogène pour l'homme. La virulence de la bactérie dépend de sa capacité à envahir des cellules hôtes non phagocytiques par un processus de replis membranaires (« membranes ruffles ») et de s'y développer dans un phagosome modifié connu sous le nom de « *Salmonella*-containing vacuole » (SCV) (Steele-Mortimer, 2008).

La biogenèse de la SCV est un processus dynamique qui peut être découpé artificiellement en trois phases par souci de simplification : 1) stade SCV précoce (**Figure 46A**) pendant les 30 premières minutes post-infection (P.I.) ; 2) stade SCV intermédiaire, juxta-nucléaire, entre 30 minutes et 5 h P.I. et enfin, 3) stade SCV tardive au-delà de 5 h P.I. A ce stade, la bactérie commence à se multiplier dans une SCV juxta-nucléaire et entourée de microtubules et de filaments d'actine de la cellule hôte. C'est à partir de ce stade, qu'est observé le développement de « filaments induits par Salmonella » ou Salmonella-induced filaments (Sifs) (**Figure 46BE**). Les Sif sont des structures membranaires filamenteuses, très dynamiques, qui commencent à se développer à partir du stade SCV tardive (**Figure 46C**) et qui continuent à s'accroître pendant environ 9 heures pour former un réseau dans tout le cytoplasme de la cellule infectée (**Figure 46E**). Il faut noter que les Sif peuvent être observés dans plusieurs types cellulaires infectés *in vitro* par Salmonella mais qu'ils n'ont jamais été observés *in vivo* (Steele-Mortimer, 2008).

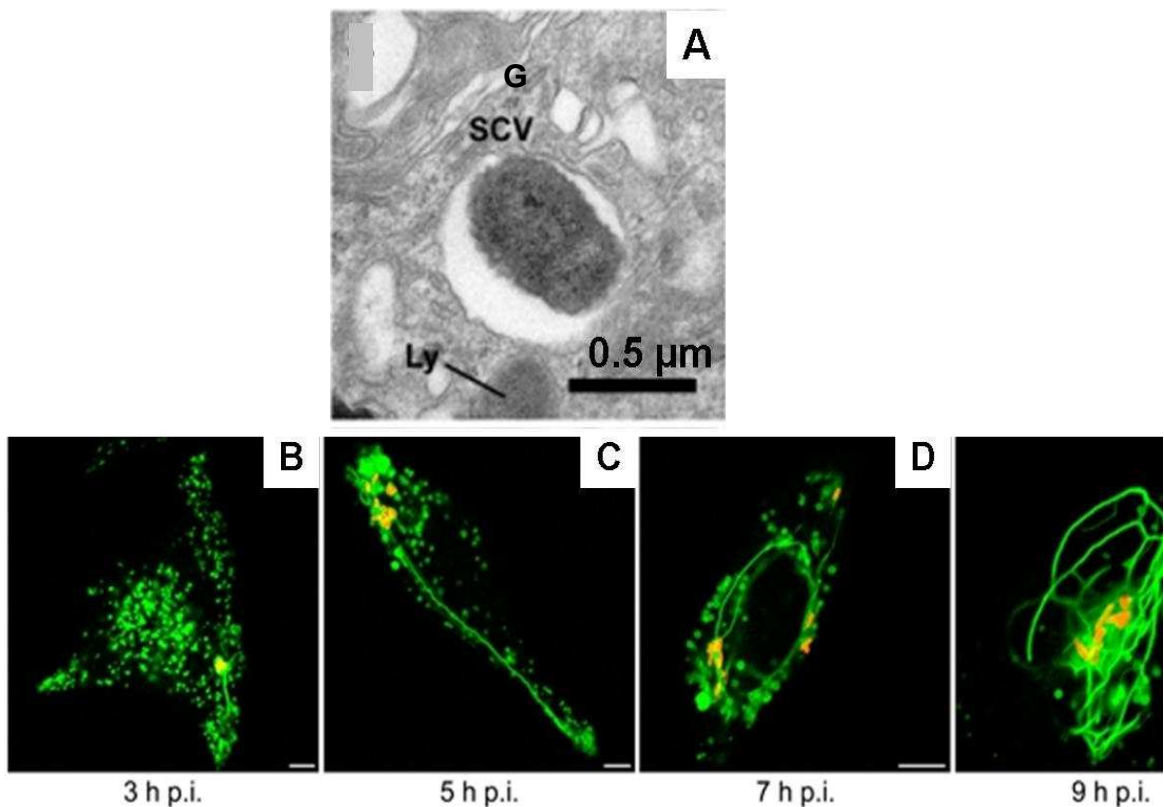


Figure 46. SCV et Sif de Salmonella. (A) Photo de microscopie électronique à transmission d'une SCV précoce contenant la bactérie Salmonella. La SCV se retrouve à proximité de l'appareil de Golgi (G) et d'un lysosome (Ly) de la cellule hôte, avec lequel elle ne fusionne pourtant pas. D'après (Schroeder *et al.*, 2010). (B – E) Photos de microscopie confocale montrant la cinétique de formation du réseau tubulaire formé par les Sifs dans une cellule HeLa infectée par Salmonella. Les cellules HeLa utilisées expriment transitoirement la protéine de fusion NPC1-eGFP (Niemann Pick Type C protein - Enhanced Green Fluorescent Protein), marqueur de l'endosome tardif/lysosome (marquage vert). Elles ont été infectées par des bactéries *S. enterica*, serovar *typhimurium* SL1344, exprimant la protéine fluorescente mCherry (rouge). Les temps indiqués sous les photos indiquent le nombre d'heures après l'infection. Barre d'échelle = 1 μm. D'après (Drecktrah *et al.*, 2008).

La définition des trois stades de la SCV correspond à son acquisition séquentielle de protéines membranaires du système endolysosomal. Dans un premier temps, la membrane de la SCV précoce est enrichie par les marqueurs de l'endosome précoce (par exemple, Rab 5 ou le récepteur à la transferrine). La transition entre la SCV précoce et la SCV intermédiaire est marquée par le remplacement progressif des marqueurs de l'endosome précoce par ceux de l'endosome tardif et peut-être, des lysosomes (Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 (LAMP1), vATPase). La SCV tardive dont le pH s'acidifie, s'accrole au noyau de la cellule hôte, dans la région proche du MTOC des microtubules (Vinh *et al.*, 2010).

Bien qu'il y ait débat sur le fait de savoir si *Salmonella* bloque ou pas la fusion de la SCV avec les lysosomes, le fait que des effecteurs de ses deux systèmes de sécrétion de type III (Type III Secretion System 1 et 2 ou T3SS 1 et T3SS 2) soient requis pour établir une niche intracellulaire hospitalière, ne fait aucun doute. Le T3SS 1 est induit alors que la bactérie est encore extracellulaire. Il sert à transloquer des effecteurs dans la cellule hôte de façon à promouvoir l'invasion de la bactérie. Lorsque la bactérie devient intracellulaire, l'expression des composants du T3SS 1 est réduite progressivement au profit de celle des effecteurs du T3SS 2 qui eux, médient les étapes de la maturation de la SCV, en particulier le recrutement de la SCV au noyau de la cellule hôte, la formation d'un réseau d'actine autour de la SCV et l'extension antérograde des Sif le long des microtubules cellulaires. Les Sif sont associés à des marqueurs de l'endosome tardif tels que Rab7 et à des glycoprotéines du lysosome (Stein *et al.*, 1996). Le rôle des Sif dans la virulence de *Salmonella* n'est pas encore clairement élucidé. Une des hypothèses est que l'extension de filaments membranaires à partir de la SCV permettrait d'augmenter son volume et de favoriser la multiplication des bactéries. D'autres hypothèses tendent à proposer que les Sif permettraient d'exporter des protéines capables d'interagir avec des éléments de la cellule hôte (Bakowski *et al.*, 2008). La protéine SifA constitue un exemple des effecteurs du T3SS 2 impliqués dans l'interaction avec les microtubules de la cellule hôte (Drecktrah *et al.*, 2008). Cette protéine est essentielle à la formation des Sif (Schroeder *et al.*, 2010). SifA est directement responsable du recrutement et de l'activation d'autres protéines cellulaires telles que les kinésines (Boucrot *et al.*, 2005) et des protéines de la famille des Rho GTPases (**Figure 47**) (Ohlson *et al.*, 2008 ; Vinh *et al.*, 2010). Elle serait donc directement responsable de l'extension des Sif le long des microtubules de la cellule hôte (Vinh *et al.*, 2010). Néanmoins, le mécanisme par lequel cette protéine induirait la tubulation de la membrane de la SCV pour former le réseau filamentueux de Sif reste totalement inconnu.



érie est internalisée dans une VP précoce caractérisée par la présence de protéines LAMP, vATPase et Sif. La motilité actinocytoplastique est initiée et les Sif rétrograde dynéine (bleu) et le noyau et pour étendre les Sif et pour le recyclage. D'après (Steele-

3) Le réseau tubovésiculaire (TVN) de Plasmodium falciparum

Parmi le phylum des Apicomplexa, le genre Plasmodium constitue un pathogène d'importance médicale majeure qui affecte 300 à 500 millions de personnes de par le monde. Première parasitose au rang mondial, la malaria est responsable chaque année, de deux millions de morts. Plasmodium partage avec Toxoplasma, le mécanisme d'invasion active dans la cellule hôte (mécanisme décrit notamment dans le chapitre II de l'introduction) et le fait qu'il se développe au sein de cette cellule, dans une VP. Cependant, alors que Toxoplasma est capable d'envahir tous les types de cellules nucléées, dans son hôte intermédiaire humain, Plasmodium se limite à l'invasion des hépatocytes et des érythrocytes. Peu de choses sont actuellement connues sur la mise en place de la VP dans l'hépatocyte. L'infection d'un globule rouge par un mérozoïte de Plasmodium est bien caractérisée. Elle conduit à la mise en place d'une VP dans laquelle le parasite se développe, en passant par les stades successifs « anneau » (ring), trophozoïte puis schizonte. L'individualisation des mérozoïtes fils dans le schizonte

conduit à la libération de 24 parasites, 48 heures P.I., dans le cas de *Plasmodium falciparum*, l'espèce la plus pernicieuse de Plasmodium.

La VP induite par Plasmodium dans l'érythrocyte, se caractérise dès le stade ring, par le développement d'un réseau de tubules membranaires appelé réseau tubovésiculaire (TVN pour TuboVesicular Network) (**Figure 48**) (Lanzer *et al.*, 2006 ; Przyborski *et al.*, 2003).

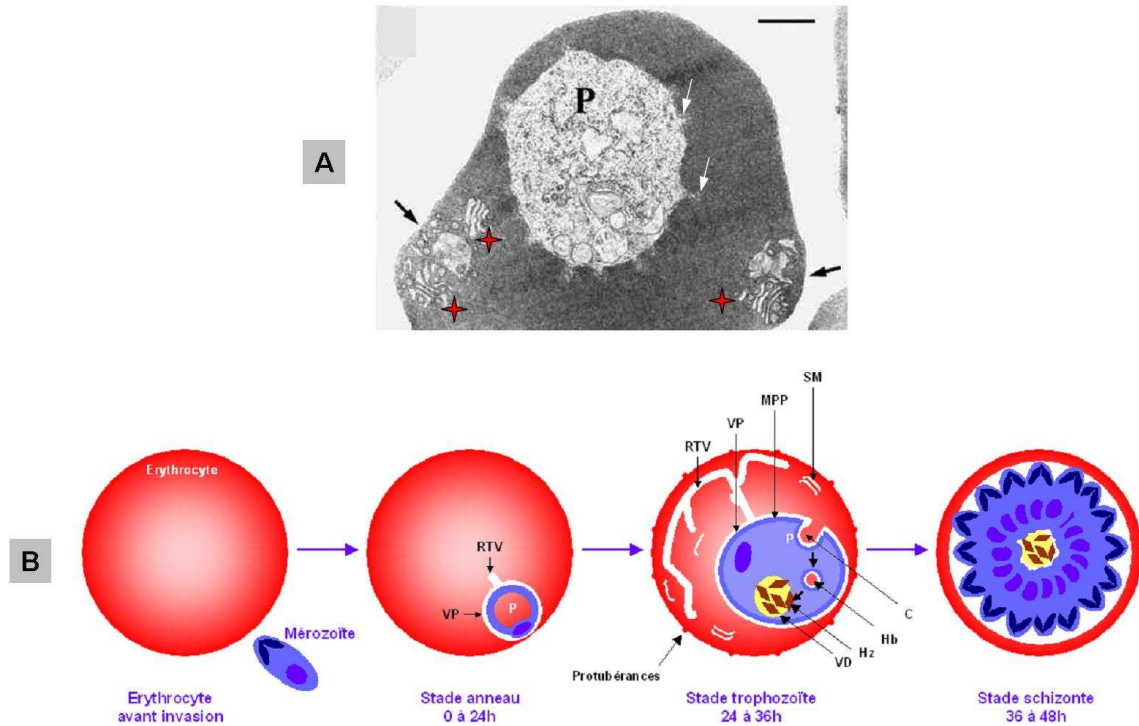


Figure 48. Le TVN de *Plasmodium*. (A) Erythrocyte infecté par un trophozoïte de *Plasmodium falciparum*. De courts tubules sont détectés dans le prolongement de la MVP (flèches blanches) et les clefs de Maurer (étoiles rouges) sont visibles dans le cytoplasme du globule rouge, sous les protubérances de surface ou knobs (flèches noires). P, parasite. Echelle : 500 nm. D'après (Wickert *et al.*, 2003). (B) Schématisation des étapes de la formation de la VP et du TVN. Dès son entrée dans le globule rouge, *Plasmodium falciparum* met en place une quantité considérable de membranes permettant son développement intra-érythrocytaire, du stade anneau au stade trophozoïte puis au stade schizonte. Lors de ce processus, il induit notamment la formation d'une VP qui le sépare du cytoplasme de la cellule hôte et au sein de laquelle il se développe. Le TVN se met en place dès le stade anneau. Par ailleurs, un intense trafic vésiculaire d'hémoglobine entre le compartiment cytoplasmique érythrocytaire et la vacuole digestive du parasite se met en place. Au stade schizonte, les futurs mérozoïtes se développent et leur individualisation requiert la production d'une importante quantité de nouvelles membranes pour la reproduction de leurs organites et la formation des nouveaux parasites. P, parasite ; RTV, réseau tubulo-vésiculaire ; VP, vacuole parasitophore ; MPP, membrane plasmique parasitaire ; SM, Structures de Maurer ; C, Cytostome ; Hb, hémoglobine ; Hz, hémozoïne (produit de la dégradation de l'hémoglobine) ; VD, vacuole digestive. D'après (Haldar *et al.*, 2002).

Le TVN est constitué de deux types de projections membranaires dans le cytoplasme de l'érythrocyte : de courts et larges tubes qui prolongent la membrane vacuolaire ainsi que les clefs de Maurer (**Figure 48**). Ces dernières sont des structures aplaties qui s'étendent jusqu'à la membrane plasmique de l'érythrocyte (Lauer *et al.*, 1997 ; Haldar *et al.*, 2005). Les clés de Maurer jouent un rôle essentiel en tant que compartiment intermédiaire dans le trafic des protéines parasitaires exportées vers la membrane

plasmique du globule rouge (Lanzer *et al.*, 2006 ; Tilley *et al.*, 2008). Certains compartiments des clés de Maurer sont d'ailleurs connectés au feuillet interne de la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire, tandis que d'autres semblent connectés à la membrane de la VP (Frischknecht and Lanzer, 2008). Les projections membranaires de la membrane vacuolaire restent assez mal caractérisées et peu de protéines y sont par exemple, localisées. Le rôle du TVN dans son ensemble, serait d'augmenter la surface d'échange avec la cellule hôte, de récupérer des nutriments à partir de la cellule hôte, principalement des composants lipidiques de rafts de la membrane plasmique érythrocytaire (Lauer *et al.*, 2000). Le TVN pourrait aussi participer à la synthèse de certains lipides tels que la sphingomyéline (Tamez *et al.*, 2008). Enfin, le TVN pourrait constituer l'équivalent fonctionnel du réseau *trans*-golgien des cellules de mammifères et pourrait notamment contribuer à l'export de protéines parasitaires au delà de la membrane de la VP, vers la surface du globule rouge et plus particulièrement, vers les structures protubérantes de la surface de l'érythrocyte (« knob »), structures responsables de la fixation des érythrocytes infectés à l'endothélium des vaisseaux sanguins (Cooke *et al.*, 2004 ; Van Ooij and Haldar, 2007).

D'une manière générale, les systèmes de tubulation membranaire caractéristiques des microorganismes pathogènes décrits ci-dessus ne dépassent pas à l'heure actuelle, le stade descriptif. Les mécanismes permettant la biogenèse de ces structures restent totalement inconnus. C'est pourquoi nous allons retourner vers la cellule eucaryote où l'apport de la biologie structurale des protéines ainsi que l'utilisation de systèmes biomimétiques de membranes nous permettent maintenant de commencer à mieux comprendre ces phénomènes très complexes de tubulation membranaire.

III-2) Mécanismes de déformation membranaire

Dans les cellules eucaryotes, chaque organite a une forme particulière. Certains de ces organites comme les lysosomes ou les peroxysomes, sont relativement sphériques mais d'autres ont des formes plus complexes. Par exemple, les mitochondries forment un réseau tubulaire ; le RE est un réseau de saccules membranaires interconnectés et l'appareil de Golgi est constitué d'une pile de feuillet membranaires perforés. D'une manière générale, quel que soit la forme de l'organite ou de la cellule, les membranes qui les constituent sont dynamiques et présentent différents types de formes membranaires (**Figure 49**) (Suetsugu *et al.*, 2010). La dynamique membranaire permet le plus souvent, de changer la forme de la membrane en condition stable ou au cours des différents processus vitaux d'une cellule tels que le mouvement, la division ou la

croissance. De nombreux compartiments membranaires ont également la capacité de fusionner avec des vésicules provenant d'un autre compartiment, ce qui permet d'assurer le trafic vésiculaire. Pour tous ces événements de la vie de la cellule, le remodelage des membranes implique la génération de courbures membranaires (McMahon and Gallop 2005 ; Zimmerberg and Kozlov, 2006 ; Shibata *et al.*, 2009). Les plus importantes sont observées principalement, dans les sections tubulaires les plus étroites, au niveau des bords des saccules membranaires ou encore dans les vésicules de transport. À l'inverse, les membranes de faible courbure comprennent les feuillettes formant le RE ou l'appareil de Golgi.

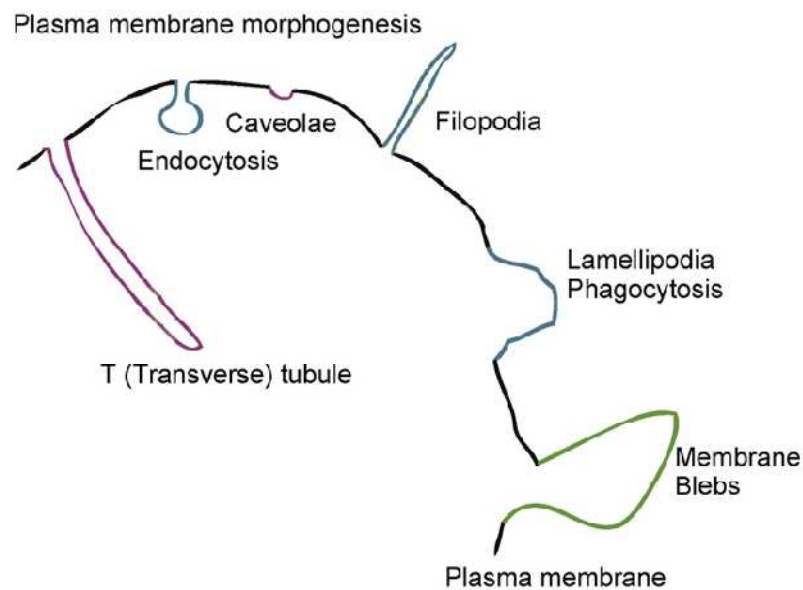


Figure 49. Représentation schématique des différentes déformations possibles à partir de la membrane plasmique. La morphologie d'une membrane plasmique est caractérisée d'une manière générale, par deux formes, des protrusions ou des invaginations membranaires. Les protrusions incluent les filopodes, les lamellipodes et les bourgeons (blebs) ; les invaginations incluent les vésicules à clathrine formées au cours de l'endocytose, les caveola et les tubules-T spécifiques des muscles. D'après (Suetsugu *et al.*, 2010).

La forme des membranes peut varier au cours de la vie de la cellule, soit sans altération de la topologie membranaire (exemples : une membrane plate peut subir une flexion ou un tubule peut être tiré à partir d'une membrane plate (Shibata *et al.*, 2009), soit suite à un remodelage de la topologie membranaire. C'est le cas notamment des phénomènes de fusion ou de fission membranaire. Un tubule membranaire du RE peut par exemple, fusionner avec un autre tubule (Shibata *et al.*, 2009). De plus, lorsqu'une membrane (plasmique) se courbe, elle peut le faire dans deux directions, soit vers l'extérieur de la cellule ou vers les têtes polaires des lipides, on parle alors de courbure positive, soit vers l'intérieur de la cellule ou vers les chaînes carbonées des lipides, ce qui définit une courbure négative (**Figures 50-51**).

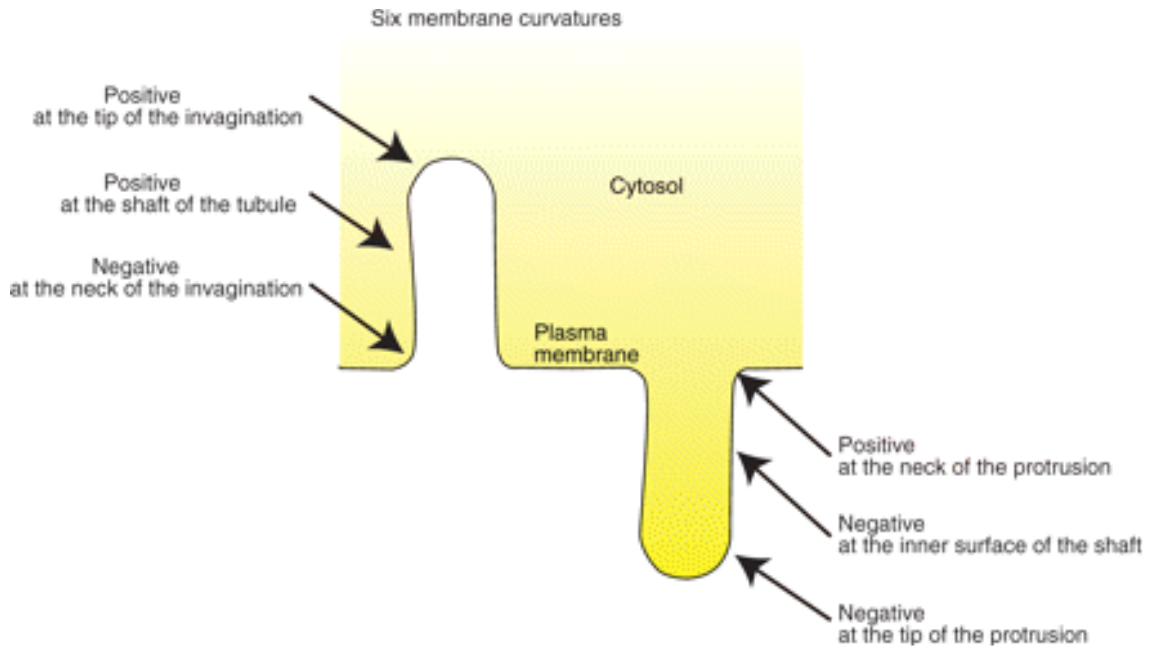


Figure 50. Courbures positives et négatives d’une membrane plasmique. D’après (Suetsugu *et al.*, 2010).

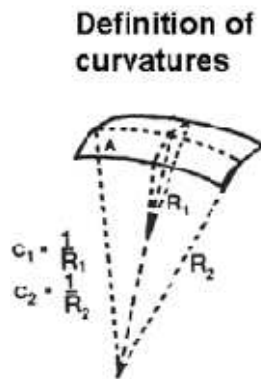


Figure 51. Définition de la courbure d’une membrane. La forme d’un petit élément de surface de la membrane est caractérisée par deux lignes qui s’appuient sur la surface, sont mutuellement perpendiculaires et ont une forme d’arc circulaire dont les rayons sont R1 et R2. Les courbures principales de cette surface sont définies par $c_1 = 1/R_1$ et $c_2 = 1/R_2$, c_1 et c_2 pouvant être positif ou négatif. L’énergie de la membrane dépend des combinaisons des courbures principales de la membrane, c’est-à-dire de $J=c_1 + c_2$ et de $K = c_1 \times c_2$. D’après (Campelo *et al.*, 2010).

De nombreux paramètres entrent en jeu pour créer la courbure initiale des membranes (pour revue : Zimmerberg and Koslov, 2006), parmi lesquels une composition particulière en lipides, une asymétrie de ces lipides et enfin, l’insertion de protéines (Matsuo *et al.*, 2004 ; Sonnino *et al.*, 2007 ; Zimmerberg and Koslov, 2006 ; Fuertes *et al.*, 2010).

Dans ce chapitre III de l’introduction, j’essaierai de passer en revue ces différents paramètres. Même s’ils font actuellement l’objet de recherches très actives, les

mécanismes qui régissent la spécificité des formes caractéristiques de chaque membrane cellulaire, notamment *via* l'insertion de protéines dans la membrane ainsi que les paramètres qui gouvernent la formation de courbures membranaires, sont loin d'être bien élucidés. Avant de passer en revue les mécanismes de déformation membranaire répertoriés à l'heure actuelle, il convient de rappeler que les expériences réalisées dans ce domaine utilisent des membranes artificielles simplifiées, c'est-à-dire soit des SUV (« small unilamellar vesicles » : vésicules unilamellaires d'un diamètre inférieur à 50 nm), des LUV (« large unilamellar vesicles » : diamètre compris entre 50 et 200), soit des GUV (« giant unilamellar vesicles » : vésicules unilamellaires géantes qui peuvent aller jusqu'à un diamètre de plusieurs dizaines de μm).

1) Génération de courbure membranaire dépendante uniquement des lipides de membrane

Une courbure modérée spontanée peut être générée dans une membrane artificielle, uniquement en adaptant la composition en phospholipides qui la constituent (Bacia *et al.*, 2005 ; Baumgart *et al.*, 2003 ; Lopez-Montero *et al.*, 2005) (**Figure 52**). Dans certains cas, des tubules membranaires peuvent même être générés à partir de liposomes composés uniquement de lipides (Stowell *et al.*, 1999).

Dans les membranes cellulaires, les bicouches de lipides tendent à rester plates car la formation d'une courbure requiert de l'énergie. Néanmoins, une répartition asymétrique des lipides entre les deux feuilletts est également possible, grâce au phénomène de flip-flop des lipides (passage des lipides d'un feuillet de la membrane à l'autre). Ce phénomène est naturellement lent. Il est facilité par des transporteurs de lipides tels que les flippases (passage des lipides du feuillet externe vers le feuillet interne), les floppases (transport des lipides du feuillet interne vers le feuillet externe) et les scramblases (transport bi-directionnel). Ces protéines sont donc très importantes pour générer l'asymétrie locale dans la répartition des lipides membranaires à l'origine de la courbure membranaire initiale. Cette courbure pourra, dans un second temps, être modifiée et renforcée par des protéines senseurs de courbure membranaire (Cf. chapitre III-2-2) (McMahon and Gallop, 2005 ; Ernst *et al.*, 2010 ; Devaux *et al.*, 2008).

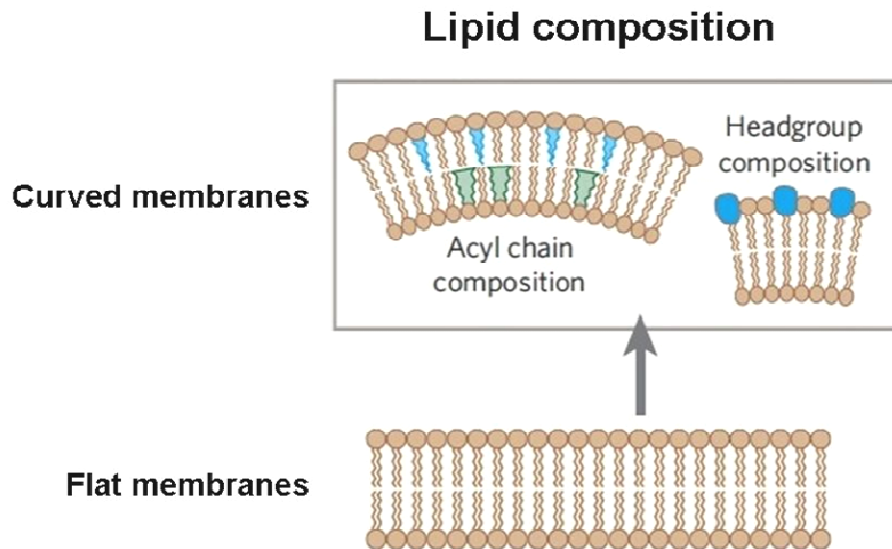


Figure 52. Influence de la composition en lipides d'une membrane sur sa courbure. D'après (McMahon and Gallop, 2005).

2) Courbure membranaire générée par l'insertion de protéine(s) dans la membrane

Les processus d'insertion et de stabilisation d'une protéine dans une membrane impliquent différents paramètres : 1) des acides aminés particuliers qui vont interagir avec différentes portions de la bicouche ; 2) les énergies des interactions au sein de la protéine elle-même et 3) les interactions entre la protéine et la bicouche lipidique. Dans la plupart des cas, le processus d'insertion de la protéine dans une membrane est assisté par une machinerie protéique. Néanmoins, il peut également se produire de façon spontanée. Enfin, une fois insérée dans une membrane, la protéine nécessite une deuxième étape de stabilisation dans la bicouche, ce qui implique des réarrangements variés.

Avant de passer en revue les mécanismes connus actuellement pour générer une courbure membranaire à l'aide d'une protéine, je rappellerai donc tout d'abord les paramètres nécessaires à l'insertion des protéines dans une bicouche lipidique.

a) Critères pour l'insertion d'un domaine transmembranaire d'une protéine dans une membrane

La condition de base pour qu'une protéine s'insère dans une membrane, est qu'elle possède un segment d'hydrophobicité générale suffisante pour s'accommoder de l'environnement apolaire du cœur hydrophobe de la bicouche lipidique. Ce segment doit être suffisamment long pour traverser la bicouche lipidique. Un segment de 20 acides aminés (aa) en conformation hélicoïdale (conformation la plus courante) est juste assez long pour traverser le cœur hydrocarboné d'une bicouche lipidique typique (Popot and Engelman, 1990). Cependant, à ce modèle simplifié, peut être ajoutée la prise en compte de l'inhomogénéité de la bicouche (Wimley and White, 1996). Comme la membrane n'est pas un environnement homogène, la probabilité d'insertion ne dépend pas uniquement de l'hydrophobicité globale du domaine transmembranaire (TMD). Elle dépend également de la localisation de chacun des résidus individuellement au sein du TMD (Hessa *et al.*, 2005). Que le processus soit assisté ou non, il semble que l'insertion d'une protéine dépende essentiellement du bilan énergétique du processus. L'effet hydrophobe, qui permet l'insertion des résidus apolaires dans le cœur de la bicouche, va contribuer à abaisser la barrière d'énergie nécessaire à l'insertion. La translocation de segments hydrophiles à travers la membrane va, au contraire, aller à l'encontre de ce processus.

◆ Insertion spontanée d'une protéine dans les membranes

L'insertion d'une protéine dans une membrane peut se faire de manière spontanée et sans apport d'énergie, comme cela est décrit pour l'annexine B12 sur la **Figure 53**. Dans ce cas, le changement partiel de conformation de la protéine lui permet de s'adsorber transitoirement en surface d'une membrane courbe puis dans un second temps, d'insérer son hélice α -amphipatique (AAH pour amphipatic α -helix) dans la bicouche lipidique (Fischer *et al.*, 2007). Le processus est essentiellement basé sur des interactions hydrophobes entre la protéine et la membrane. Un mécanisme similaire a été démontré *in vitro*, pour de multiples protéines aux propriétés variées mais qui partagent celle de s'insérer de façon post-translationnelle. Parmi ces protéines, on note en plus de l'annexine B12, les toxines bactériennes, des protéines de manteau de phage, des protéines de thylakoïdes et le cytochrome B5 (Zakharov *et al.*, 1998 ; Kiefer and Kuhn, 1999 ; Mant *et al.*, 2001 ; Ladokhin *et al.*, 2002 ; Brambillasca *et al.*, 2005). Néanmoins, il reste à démontrer que ce mécanisme d'insertion est également capable de se produire *in vivo*. En effet, il a été montré au contraire, que certaines des protéines citées ci-dessus utilisent une machinerie de translocation pour leur insertion (Samuelson *et al.*, 2000).

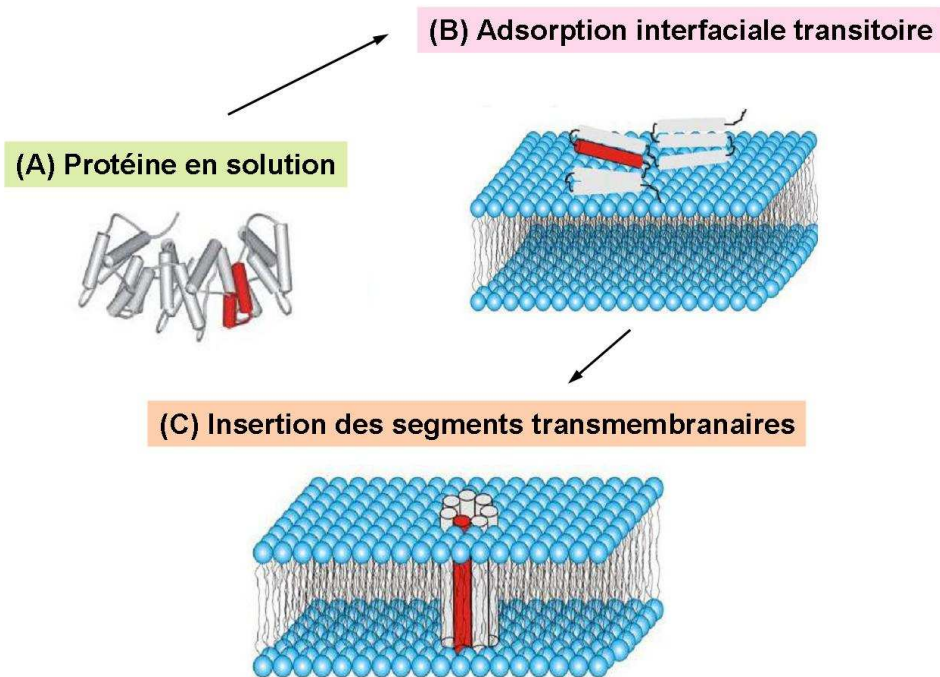


Figure 53. Processus d'insertion spontanée de l'annexine B12. (A) La protéine est sous forme monomère en solution : les régions rouges ont une structure en hélice-boucle-hélice. (B) La protéine s'adsorbe à l'interface de la bicouche lipidique car elle subit un changement de conformation qui transforme les deux hélices rouges en une seule hélice amphipatique continue. (C) La protéine transfère ses segments hydrophobes et amphipatiques dans la bicouche lipidique, ce qui lui permet de s'insérer. D'après (Fischer *et al.*, 2007).

◆ Stabilisation des protéines après insertion

Lors de son insertion dans la membrane ou tout de suite après, la protéine doit trouver une conformation stable, native, ce qui nécessite souvent le réarrangement des segments insérés de la protéine. Ce processus semble faire intervenir plusieurs types d'interactions : 1) des forces non spécifiques de la bicouche lipidique agissant sur la conformation de la protéine ainsi que des forces de la protéine agissant sur la structure membranaire ; 2) des interactions entre hélices, voire entre protéines, au sein de la bicouche (Lee, 2004).

La composition en lipides de la membrane peut déterminer le devenir des protéines en cours d'association, puisqu'elle peut affecter non seulement l'efficacité de translocation et la topologie de la protéine dans la membrane, mais également sa stabilité, son assemblage en complexes oligomériques et son activité (Schneider and Toulmay, 2007). Les lipides peuvent également agir comme des co-facteurs d'un grand nombre de protéines. Certains sont en effet nécessaires pour l'insertion de protéines ; d'autres, pour leur stabilisation et leur fonctionnalité dans la membrane (Ernst *et al.*, 2010).

b) Génération et maintenance d'une courbure membranaire à l'aide d'une protéine

La courbure d'une membrane est générée en résultat d'interactions complexes entre des protéines de membranes, des lipides, et les forces physiques qui sont appliquées à la membrane. Les mécanismes hypothétiquement impliqués sont peu nombreux. La revue de Zimmerberg et Kozlov ([Zimmerberg and Kozlov, 2006](#)) analyse en détails, les mécanismes supposés de déformations membranaires et leur pertinence biologique. Zimmerberg et Koslov ([2006](#)) ont également démontré que la genèse de membranes courbées requiert une énergie substantielle qui ne peut être apportée que par des protéines. En effet, les protéines sont capables de changer la courbure des membranes en appliquant des forces sur la surface membranaire. Les protéines réduisent ainsi les tensions générées par la seule asymétrie des lipides ([Zimmerberg and Koslov, 2006](#)). Il ressort de cette analyse, que les déformations importantes des membranes ne peuvent être générées que :

- par la formation d'inhomogénéités dans la membrane, suite à l'insertion d'une protéine produisant un effet sur la courbure locale (« bending mechanism » par « wedging effect») (**Figure 54B**),
- par une force imposée de l'extérieur, comme la constriction par un manteau de protéines (mécanisme de charpentage ou de « scaffolding ») (**Figure 54A**)
- ou par des forces de traction ou de poussée exercées par le cytosquelette ([Roux et al., 2002](#)) (**Figure 54C**).

Les recherches actuelles tendent donc à étudier les protéines impliquées dans la détection et/ou la genèse et le contrôle de la courbure des membranes. On peut noter à ce propos, que ces recherches sont souvent limitées par le manque d'informations concernant la structure tridimensionnelle des protéines liées aux membranes. Enfin, il a été récemment postulé que l'insertion d'une AAH et même plus généralement encore, que l'insertion d'un segment hydrophobe dans le plan d'une bicouche lipidique pourrait être un processus universel employé par les protéines cytosoliques pour initier la courbure membranaire ([Drin and Antonny, 2010](#) ; [Madsen et al., 2010](#) ; [Bhatia et al., 2010](#)).

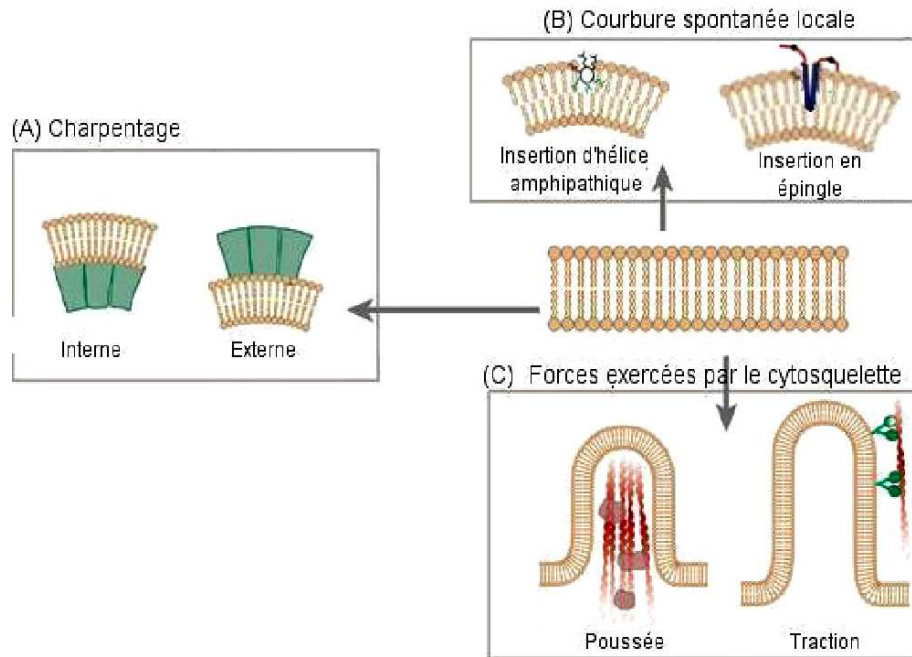


Figure 54. Mécanismes de génération de courbure membranaire et de déformations membranaires. (A) Mécanisme de charpentage externe ou interne à la membrane. **(B)** Mécanisme de courbure spontanée locale par l'insertion d'une AAH ou d'un segment hydrophobe en épingle. **(C)** Mécanisme de traction ou de poussée par le cytosquelette. D'après (McMahon and Gallop, 2005).

Je vais donc développer ci-dessous, au travers d'exemples de protéines répertoriées dans les différentes catégories, les mécanismes de déformation membranaire induits par le « charpentage » (**Figure 54A**) et la courbure spontanée locale, provoquée notamment par l'insertion d'une AAH (**Figure 54B**). Les déformations membranaires induites par le cytosquelette (tubules membranaires tirés à partir d'une membrane plate, grâce à l'attachement du tubule à un moteur moléculaire progressant le long d'un microtubule ou tubules membranaires formés grâce à leur attachement à l'extrémité d'un filament d'actine en cours de polymérisation) ne seront par contre, pas abordées dans ce chapitre.

♦ Mécanisme de charpentage (« scaffolding mechanism »)

Dans ce mécanisme de courbure membranaire, c'est la forme intrinsèque relativement rigide et concave d'une protéine qui permet d'exposer une surface d'interaction courbe à la bicouche membranaire. Cette structure rigide s'appose à la membrane par des interactions électrostatiques auxquelles participent de nombreux résidus basiques présents sur la face concave (Bhatia *et al.*, 2010). La protéine agissant par scaffolding, contraint la membrane et lui impose sa courbure. Cela implique que les composants du manteau protéique forment une structure incurvée, de rigidité suffisante pour contrer la tendance de la membrane à revenir à son état initial de courbure. Le manteau doit également avoir une

forte affinité pour la membrane : l'énergie de liaison protéine-membrane doit être supérieure à l'énergie de courbure de la membrane.

Les protéines connues pour agir *via* ce mécanisme sont nombreuses. Elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires qui incluent la fission des vésicules synaptiques, l'endocytose, la maintenance de la polarité cellulaire, la régulation du cytosquelette d'actine, la fusion entre deux cellules, la fusion de vésicules de sécrétion, le couplage excitation-contraction, l'apoptose et la suppression de tumeurs (Madsen *et al.*, 2010). Elles comprennent :

- les complexes protéiques COPI, COPII (Beck *et al.*, 2009 ; Fath *et al.*, 2007) ;
- les complexes de clathrine ainsi que les adaptateurs qui permettent d'induire la courbure sphérique nécessaire à la formation des vésicules de transport (Marsh and McMahon, 1999 ; Kirchhausen, 2000),
 - les dynamines (**Figure 55A**). Les protéines de la famille des dynamines s'assemblent en hélices (en présence ou en absence de lipides) et peuvent s'associer aux membranes, en liant les phosphoinositides, procurant une forme cylindrique aux membranes (Takei *et al.*, 1995 ; Hinshaw and Schmid, 1995 ; Sweitzer and Hinshaw, 1998) ;
 - les protéines de la super famille des protéines contenant un domaine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) (**Figure 55B**). Ces protéines, assemblées en homodimères, présentent une structure concave chargée positivement et formée par leurs domaines BAR. La super famille des protéines à domaine BAR regroupe en fait, les protéines contenant un domaine N-BAR (domaine BAR associé à une AAH N-terminale), un domaine F-BAR présentant une face moins incurvée que le domaine N-BAR (**Figure 56**) ou encore un domaine I-BAR de structure convexe et induisant donc une courbure négative dans les protrusions cellulaires (Dawson *et al.*, 2006 ; Ren *et al.*, 2006 ; Frost *et al.*, 2008 ; Ahmed *et al.*, 2010 a ; b ; Saarikangas *et al.*, 2009). Le modèle généralisé à tous les membres de la superfamille est que la face concave du dimère BAR se lierait à une membrane de courbure adéquate par le biais d'interactions électrostatiques. Nous verrons un peu plus loin, que ce modèle est actuellement rediscuté. De plus, ces protéines ont fréquemment des sites de liaison à des lipides particuliers, les phosphoinositides.
 - les protéines contenant un domaine IMD (**Figure 55C**). Le domaine IMD (IRSp53/MIM domain) présente une surface incurvée mais en direction opposée à celle des domaines BAR. Les domaines IMD sont donc capables de générer des déformations membranaires mais de topologie inverse à celles des domaines BAR : les domaines BAR génèrent des invaginations vers l'extérieur des liposomes ou des cellules, tandis que les domaines IMD génèrent des protrusions vers l'intérieur (Mattila *et al.*, 2007 ; Millard *et al.*, 2007 ; Suetsugu *et al.*, 2006).

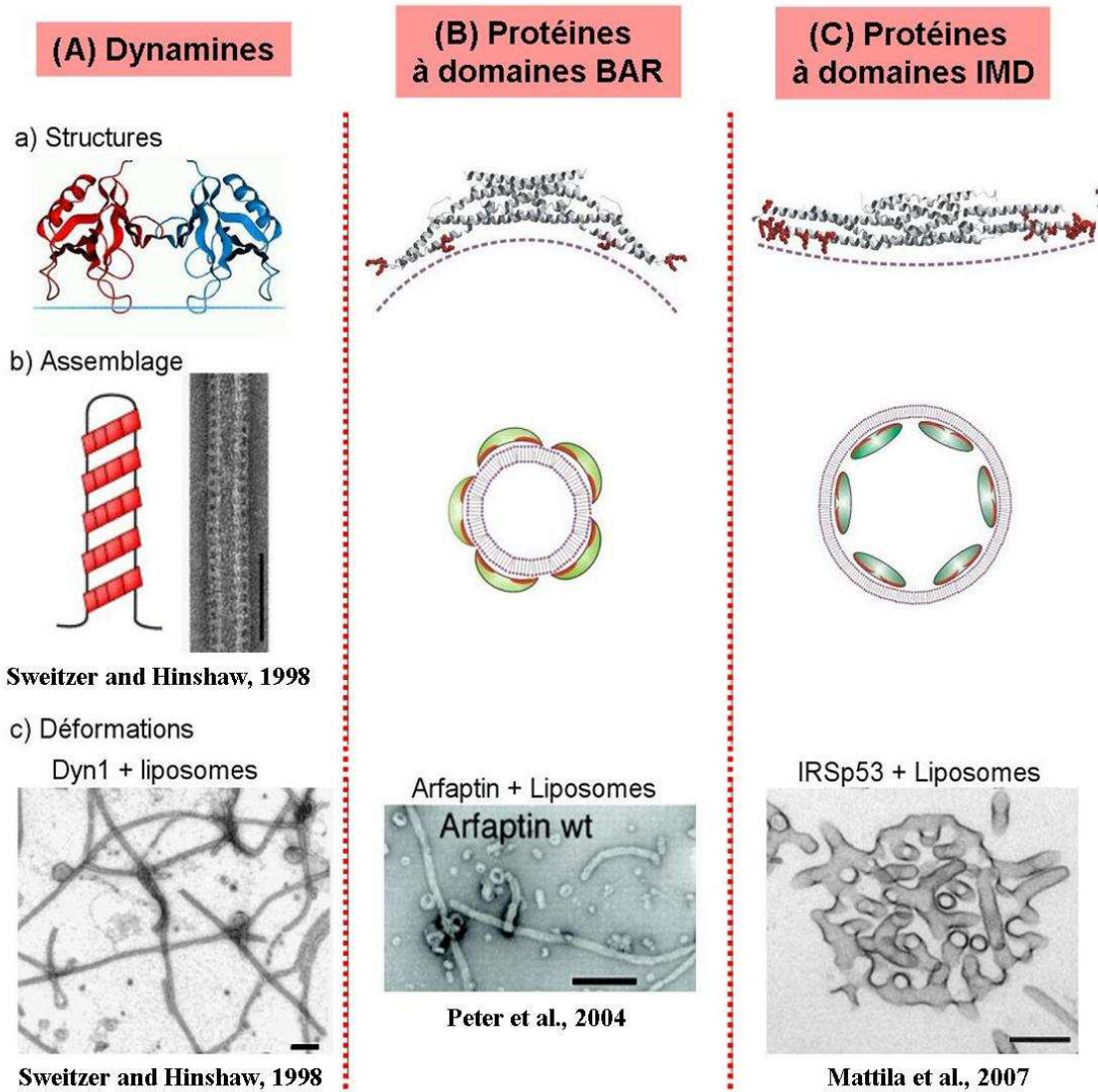


Figure 55. Courbure générée par le mécanisme de charpentage. (A) Charpentage par les protéines de la famille des dynamines. (B) Charpentage par les protéines à domaine BAR. (C) Charpentage par les protéines à IMD. **a)** Les dynamines, tout comme les protéines à domaines BAR et IMDs, doivent s'assembler en dimères pour que leur courbure apparaisse. **b)** Lorsqu'elle s'oligomérisse autour d'une membrane, la dynamine s'assemble en hélice (barre d'échelle : 100 nm), tandis que les domaines BAR et IMDs forment des anneaux impliquant 4 domaines, donc 8 protéines. **c)** L'insertion de ces protéines dans des liposomes, en l'absence d'autres facteurs, déforme drastiquement leurs membranes. Les photos illustrent les invaginations tubulaires en présence de dynamine-1 ou en présence d'arfaptine et les protrusions tubulaires en présence d'IRSp53. Barres d'échelle : 300 nm. D'après (Lomize *et al.*, 2006 ; Mattila *et al.*, 2007 ; Farsad and De Camilli, 2003 ; Sweitzer and Hinshaw, 1998 ; Peter *et al.*, 2004).

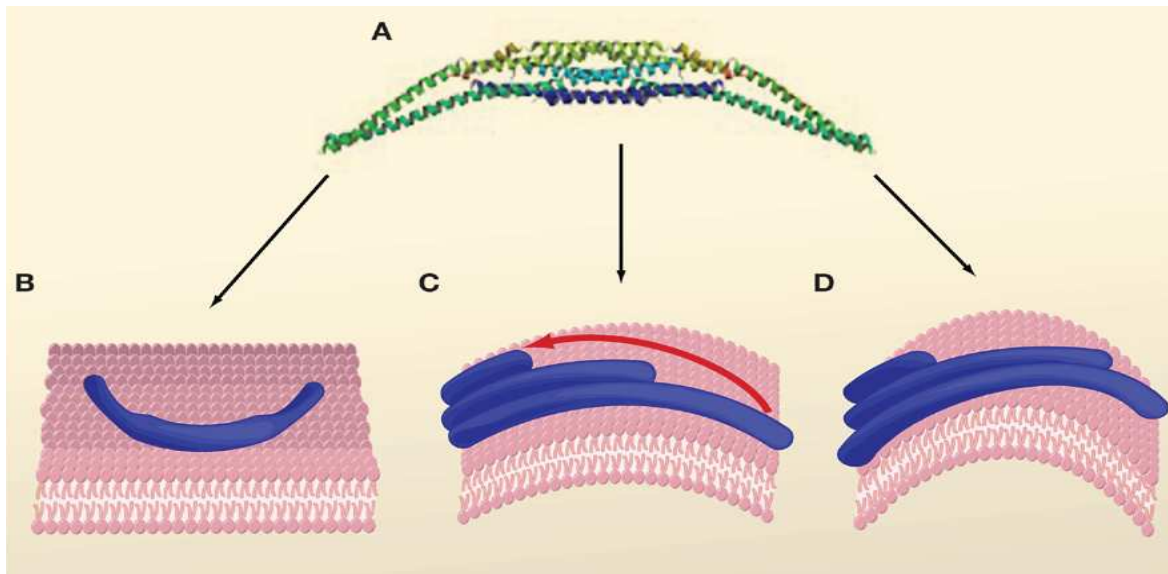


Figure 56. Torsion du domaine F-BAR et ses conséquences sur la courbure de la membrane. (A) Représentation en ruban de l'architecture du domaine F-BAR. (B) Liaison d'un dimère de F-BAR sur le côté rigide d'une membrane. (C) Le retournement de dimères de F-BAR sur la membrane, crée une forme cylindrique. Les dimères interagissent au travers de domaines opposés, de sorte que les chaînes de dimères s'enroulent en hélice le long de la ligne symbolisée par la flèche rouge, imposant ainsi une forme cylindrique et non héli-cylindrique. (D) Torsion du domaine F-BAR : le domaine F-BAR n'est plus orienté selon l'arc de courbure maximum comme dans (C). Cependant, la courbure de la ligne d'attachement entre le F-BAR et le cylindre est conservée, ce qui donne sa forme caractéristique et définitive au F-BAR. D'après (Frost *et al.*, 2008).

◆ Mécanisme de courbure spontanée locale : « wedging effect »

Deux types de structure ont été décrits comme induisant la courbure spontanée locale de la membrane, les segments hydrophobes en épingle à cheveux et les AAH.

- Insertion d'un segment hydrophobe en épingle à cheveux dans la membrane

L'insertion de segments hydrophobes formant une "épingle à cheveux" (hairpin) dans la membrane, agit comme un coin (« wedge ») enfoncé dans la membrane et peut provoquer la déformation de cette membrane (Figure 54B). Cet effet « wedging » est décrit pour les protéines de la famille des réticulons (Rtn4a/NogoA, DP1/Yop1p) impliquées dans la formation du RE après mitose. Ces protéines ont pour point commun, de posséder un domaine conservé d'environ 200 aa qui incluent deux longs segments hydrophobes qui, chacun, forment une hairpin dans la membrane (Voeltz *et al.*, 2006). Les réticulons génèrent les tubules du RE en utilisant deux mécanismes coopératifs : l'insertion hydrophobe (« wedging effect ») ainsi que le « scaffolding mechanism » (Figure 57) (Hu *et al.*, 2008 ; Shibata *et al.*, 2008).

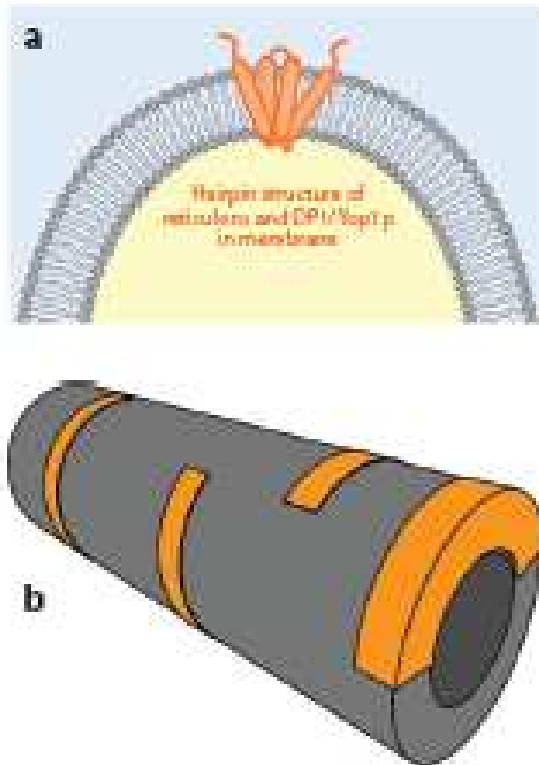


Figure 57. Wedging et scaffolding par les réticulons et DP1/Yop1p. (A) La région conservée des protéines contient deux longs segments hydrophobes qui forment chacun, une structure en épingle à cheveux dans les membranes. Cette structure en double hairpin pourrait agir comme un coin qui courbe la membrane. (B) les réticulons et DP1/Yop1p forment également des homo- et des hétérooligomères qui pourraient servir de structure de charpente arquée (en orange) autour du tubule membranaire (en gris). D'après (Shibata *et al.*, 2009).

- Insertion d'une AAH dans la membrane et notion de senseur de courbure

Un des mécanismes majeurs de déformation des membranes repose sur l'insertion partielle (interfaciale) et réversible d'une AAH (Shibata *et al.*, 2009). La courbure membranaire est maximale lorsque l'hélice ne s'enfonce que jusqu'au premier tiers de l'épaisseur de la membrane, ce qui correspond à peu près à l'interface entre les têtes polaires des lipides et les chaînes hydrocarbonées (Campelo *et al.*, 2008). Trois paramètres physiques majeurs régissent l'insertion d'une AAH, non structurée en solution, dans une bicouche lipidique : 1) l'hydrophobicité moyenne de l'AAH (H), 2) sa charge globale (Z) et 3) son moment hydrophobe (μH) (regroupement des résidus hydrophobes). De ce fait, trois types d'évolution de l'AAH peuvent être envisagés suite aux perturbations locales de l'environnement membranaire :

A) si l'hydrophobicité moyenne H de l'AAH augmente et si le μH reste constant, l'avidité de l'hélice pour les lipides membranaires augmente et l'hélice s'insère donc sans être structurée ;

B) si par contre, μH augmente alors que H reste constant, le domaine concerné de la protéine se structure en AAH et s'insère dans les membranes, du fait de la ségrégation des résidus non polaires d'un côté de l'hélice et des résidus polaires de l'autre ;

C) enfin, s'il y a une augmentation de la charge globale nette Z de l'hélice, on obtient une meilleure interaction de la protéine avec les lipides membranaires chargés négativement, via des interactions électrostatiques principalement (Drin and Antonny, 2010).

Comme pour les segments hydrophobes en épingle, l'insertion d'une AAH dans la partie supérieure d'un feuillet membranaire agit comme un coin inséré dans le feuillet, ce qui perturbe la compaction des têtes polaires des lipides et résulte en une déformation locale (**Figure 54B**). De telles AAH sont décrites dans de nombreuses protéines impliquées dans des événements de trafic. Citons par exemple le domaine ENTH (Epsin N-Terminal Homology) de l'epsine (Ford *et al.*, 2002) : sous sa forme soluble, l'epsine présente un site de reconnaissance spécifique pour le phosphoinositide $PI(4,5)P_2$. L'association de la protéine à ce phospholipide induit un changement de conformation, permettant l'exposition de son AAH qui s'insère alors comme un coin, dans le feuillet externe de la membrane, ce qui induit une inhomogénéité de ce feuillet et la courbure locale de la bicouche (**Figure 58A**). Des AAH agissant par un mécanisme similaire ont également été décrites dans des petites protéines G telles que Sar1p (Lee *et al.*, 2005 ; Horvath *et al.*, 2007) (**Figure 58B**). Le mécanisme d'insertion de l'AAH a été particulièrement bien étudié *in vitro* pour diverses protéines telles que l'epsine ou la protéine Sar1p (**Figure 58**) mais là encore, la relevance *in vivo* est moins facile à démontrer (Ford *et al.*, 2002 ; Horvath *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2005).

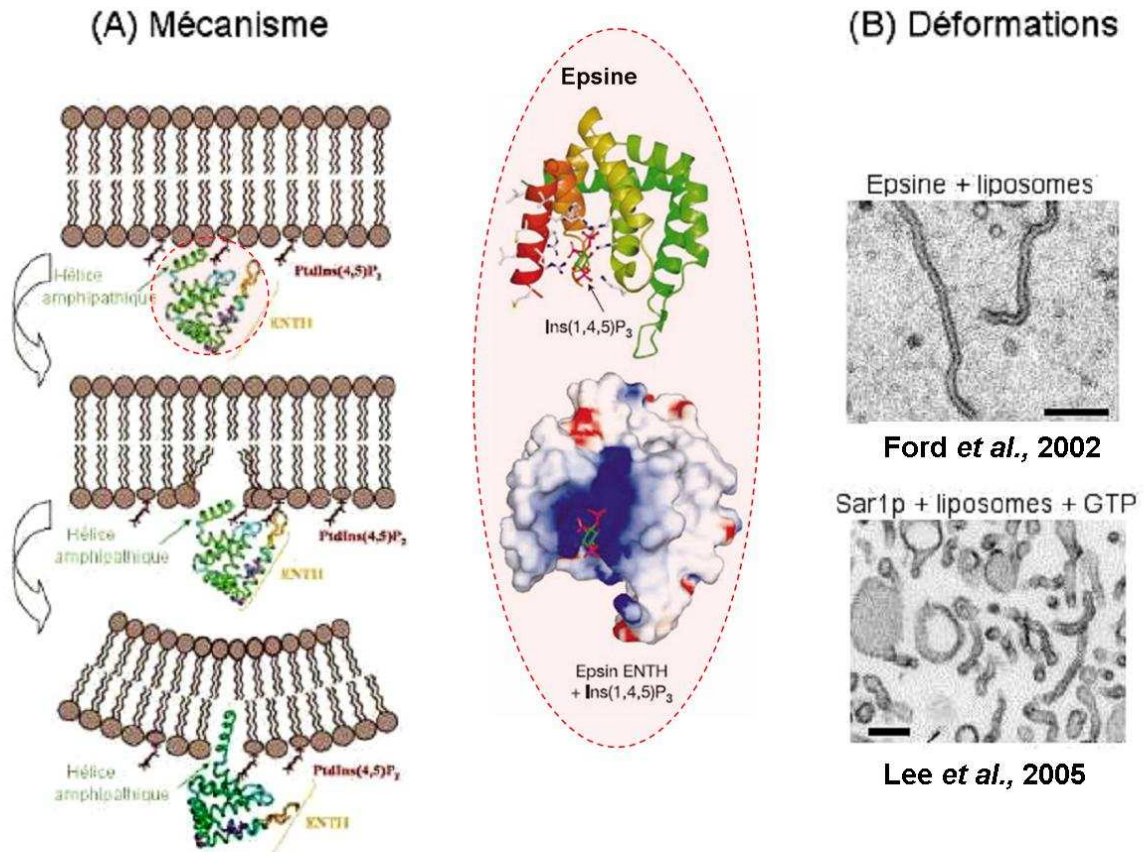


Figure 58. Exemples de courbure membranaire spontanée locale induite par insertion d'une AAH. (A) Exemple de l'épsine. L'épsine, sous sa forme soluble, a un site de reconnaissance spécifique pour le phosphoinositide PI(4,5)P₂. L'association de la protéine à ce phospholipide induit le changement de conformation permettant l'exposition de son AAH qui s'insère comme un coin, dans le feuillet externe de la membrane, induisant ainsi une inhomogénéité de ce feuillet et la courbure locale de la bicouche. **(B)** Invaginations tubulaires de liposomes dues à l'insertion de protéines contenant une AAH, l'épsine et Sar1p. Barres d'échelle : 100 nm. D'après (Horvath *et al.*, 2007 ; Ford *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2005).

Comme cela a été exposé précédemment, le domaine BAR est une structure rigide, présentant une face concave chargée positivement qui s'appose à la membrane par des interactions électrostatiques (Bhatia *et al.*, 2010). Cependant, des expériences de liaison à des liposomes de différents diamètres ont montré que le domaine BAR de l'amphiphysine se lie de préférence aux liposomes de courbure importante (diamètre de 50 nm) plutôt qu'à ceux de courbure modérée (diamètre de 300 nm) : le domaine BAR de l'amphiphysine est donc un senseur de courbure membranaire.

De façon surprenante, des expériences récentes menées sur des liposomes immobilisés, ont montré que 1/ le mécanisme de détection de la courbure membranaire par les domaines BAR ne dépend en fait ni de la forme concave du dimère BAR, ni de la charge négative de sa face concave et 2/ que l'ensemble des membres de la superfamille BAR (N-BAR, F-BAR et I-BAR) se lie aux membranes de courbure importante avec la même préférence (Bhatia *et al.*, 2009). Si la courbure du dimère et les charges ne sont pas importantes pour la détection de la courbure membranaire par les domaines BAR, alors

comment la détectent-ils ? Certains domaines BAR (exemples de l'endophiline ou de l'amphiphysine) possèdent une AAH d'une trentaine d'aa en N-terminal. Ces domaines BAR renforcés ont été regroupés au sein du groupe des N-BAR (Gallop and McMahon, 2005 ; Masuda *et al.*, 2006 ; Bhatia *et al.*, 2010 ; Farsad *et al.*, 2001 ; Bhatia *et al.*, 2009 ; Peter *et al.*, 2004 ; Itoh and DeCamilli, 2006). En bloquant les défauts de compaction des lipides par une pré-incubation avec une molécule amphiphile qui a la forme d'un lyso-lipide, la sensibilité à la courbure des domaines N-BAR est abolie presque complètement, vraisemblablement parce que le défaut de compaction des lipides a été réduit (Bhatia *et al.*, 2009). Ces expériences tendent donc à prouver que la détection de la courbure membranaire par les domaines BAR dépendrait de l'insertion de motifs amphipatiques dans un défaut de compaction des lipides au sein de la membrane : la « crête hydrophobe » du N-BAR qui dépasse de leur face concave, en s'insérant entre les lipides, leur permet d'affermir leur liaison à la membrane (Madsen *et al.*, 2010). C'est par ce mécanisme alliant la présence d'un domaine BAR et d'une AAH N-terminale que l'amphiphysine (Figure 59) ou l'endophiline déforment les gros liposomes en tubules membranaires et induisent la tubulation de membranes cellulaires lorsque la protéine y est sur-exprimée (Farsad *et al.*, 2001 ; Takei *et al.*, 1999). Il est cependant à noter que certaines protéines à domaine BAR (exemple de l'Arfaptin) ne contiennent aucune AAH et sont cependant capables de former des tubules membranaires ; d'autres, dont l'AAH a été enlevée par mutagénèse dirigée, sont toujours capables de déformer efficacement des membranes (exemple du domaine BAR de l'amphiphysine) (Peter *et al.*, 2004).

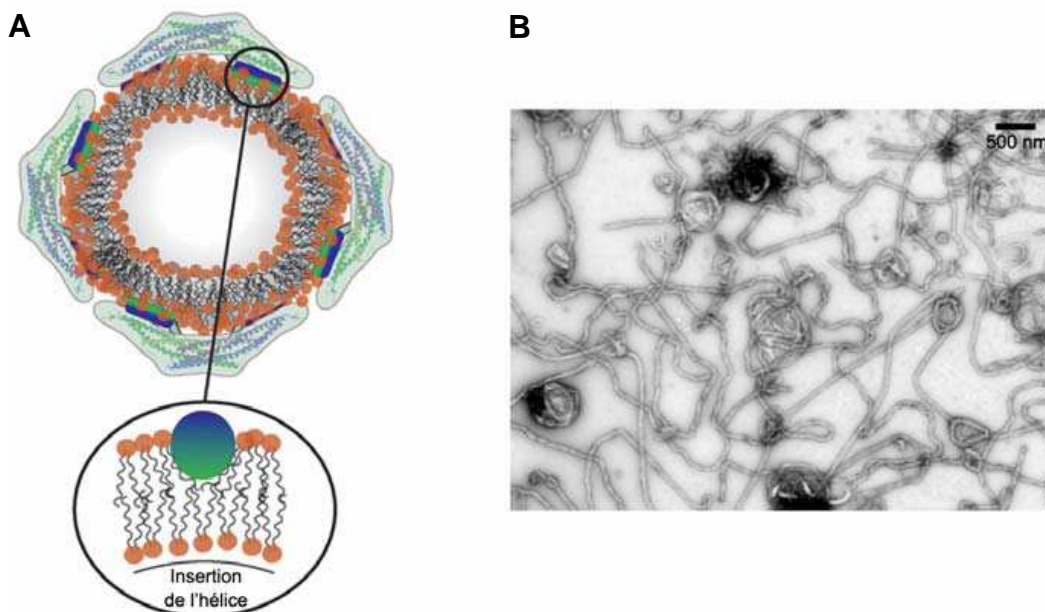


Figure 59. Le domaine N-BAR « fort » de l'amphiphysine induit la courbure membranaire. (A) L'insertion de l'AAH N-terminale de l'amphiphysine dans le feuillet externe de la membrane agit comme un coin et écarte les lipides, provoquant la courbure membranaire. **(B)** Le cliché de microscopie électronique montre l'effet de tubulation de l'amphiphysine sur des liposomes. D'après (Gallop and Mac Mahon, 2005 ; Takei *et al.*, 1999).

Les AAH ne sont donc pas impliquées uniquement dans l'ancrage des protéines dans les membranes et la déformation de ces membranes en tubules, elles sont également maintenant considérées comme des senseurs de courbure membranaire, du fait de leur grande capacité à sentir les défauts de compaction des lipides d'une membrane. Les données récentes de la littérature tendent à montrer que la détection et l'induction de la courbure membranaire sont en fait des variations d'un même mécanisme : les AAH de l'endophiline et de l'amphiphysine, connues pour tubuler les membranes lorsqu'elles sont employées à concentration importante (Farsad *et al.*, 2001 ; Takei *et al.*, 1999), sont également des senseurs de courbure lorsqu'elles sont employées à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Hatzakis *et al.*, 2009 ; Bhatia *et al.*, 2009). L'insertion des aa hydrophobes de l'hélice dans le feuillet supérieur d'une membrane réduit le défaut de compaction des lipides. Cette capacité a conduit à identifier au sein des protéines modifiant la courbure des membranes, les motifs ALPS (Amphipathic Lipid Packing Sensor) (Antonny *et al.*, 2005 ; Drin and Antonny, 2010). Le domaine ALPS est constitué d'une AAH d'une trentaine d'aa s'organisant en cylindre dont la face polaire présente presque exclusivement des résidus polaires non chargés (sérine, thréonine et glycine). En contre-partie, le domaine ALPS est pauvre en acides aminés chargés. Or, une membrane courbée, c'est-à-dire qui présente des défauts de compaction de ses lipides, favorise le repliement des aa du domaine ALPS en hélice alpha. Les défauts de compaction des lipides permettent alors la pénétration des résidus hydrophobes (leucine, phénylalanine, tryptophane) du motif ALPS entre les chaînes carbonées des phospholipides du feuillet externe de la membrane (**Figure 60**). L'adsorption des motifs ALPS aux membranes est favorisée par les lipides contenant une tête polaire de faible volume et des chaînes carbonées insaturées (Antonny *et al.*, 1997). Certains motifs ALPS peuvent néanmoins contenir des résidus chargés positivement (**Figure 60, « cationic ALPS »**) ou négativement (**Figure 60, « ALPS/class A2 »**). Ces motifs ALPS particuliers ont la capacité de se lier à une membrane plate, soit *via* un long domaine chargé supplémentaire, soit *via* des interactions électrostatiques locales.

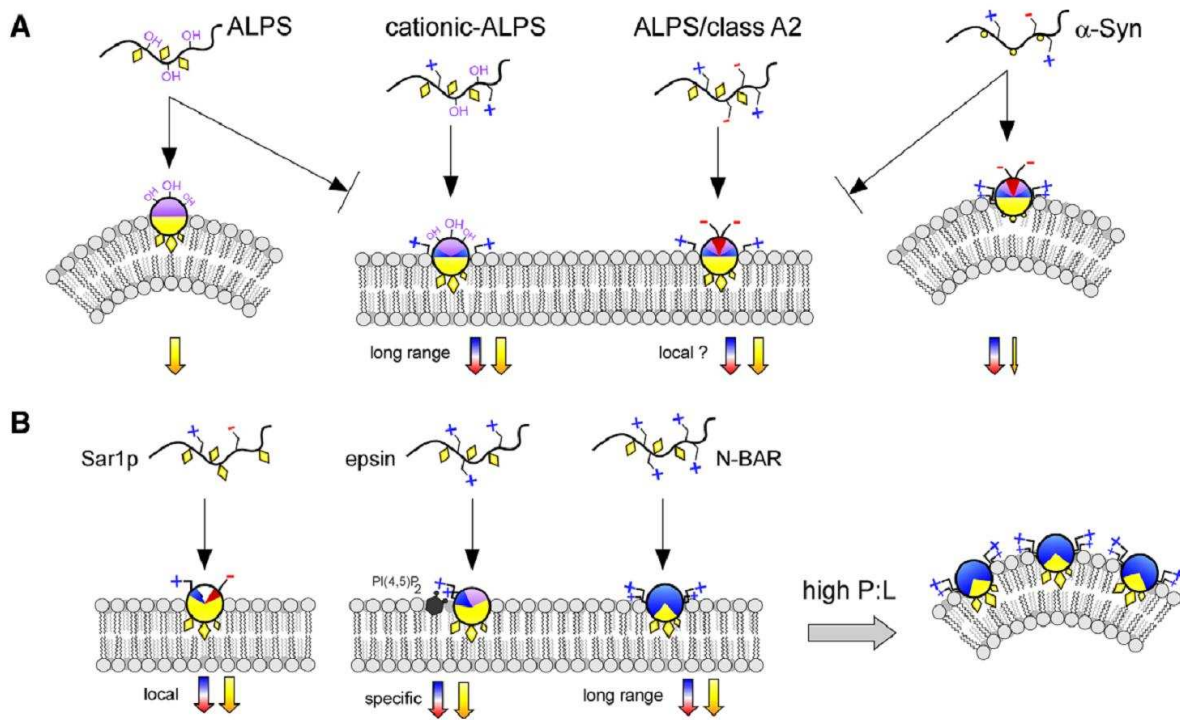


Figure 60. Divers modes de reconnaissance de la courbure membranaire par les protéines contenant un motif ALPS. Dans ces modèles, les membranes sont considérées comme contenant des lipides chargés négativement. **(A)** le motif ALPS lie uniquement les membranes courbées *via* l'insertion de résidus hydrophobes (losanges jaunes) entre les chaînes acyl des lipides. La présence de résidus chargés positivement (cationic ALPS) ou négativement (ALPS/class A2) dans le motif ALPS lui permet de se lier à une membrane plate soit *via* un long domaine chargé supplémentaire, soit *via* des interactions électrostatiques locales. Les quelques résidus hydrophobes de l' α -synucléine (α -Syn) (cercle jaune) et sa face polaire zwiterionique dépendent à la fois de la courbure membranaire et de la charge des lipides. **(B)** Exemples d'insertion, dans des membranes plates, de protéines contenant une AAH capable de changer la courbure membranaire : Sar1P, le domaine N-BAR et l'epsine. Ces protéines interagissent avec les membranes, *via* des interactions hydrophobes et électrostatiques (l'epsine interagit avec le PI(4,5)P₂). A des ratios protéines/lipides élevés (« high P:L »), la courbure est induite par l'insertion en coin de la protéine et l'effet que ceci engendre sur les lipides de la bicouche. La contribution des interactions hydrophobes et électrostatiques dans l'interaction avec les lipides est illustrée par la flèche jaune ou bleue ou rouge, respectivement. D'après (Drin and Antonny, 2010).

Il existe encore une autre catégorie d'AAH dont les propriétés physico-chimiques sont à l'opposé de celle du motif ALPS et qui pourtant, semblent reconnaître également la courbure membranaire. Ce type d'AAH a été décrit dans l' α -synucléine, connue pour son implication dans la maladie de Parkinson. Cette protéine neuronale, liant les vésicules synaptiques et ayant un rôle important dans la plasticité neuronale et dans le contrôle de la libération des vésicules de neurotransmetteurs (Varkey *et al.*, 2010), contient une AAH remarquable du fait de plusieurs alignements de résidus identiques tout au long de l'hélice (**Figure 61**) (Jao *et al.*, 2008 ; Drin and Antonny, 2010). Même si l' α -synucléine présente une face polaire zwiterionique, elle constitue un excellent senseur de courbure membranaire et un effecteur potentiel de tubulation membranaire, les quelques résidus

hydrophobes de l'hélice et sa face polaire zwiterionique reconnaissant à la fois, la courbure membranaire et la charge des lipides (**Figures 60-61**).

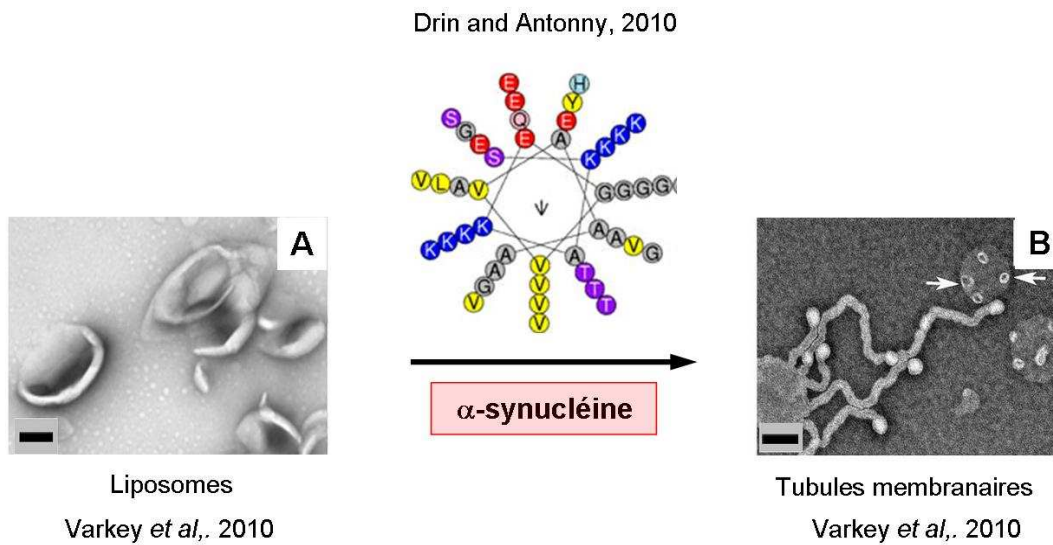


Figure 61. Représentation schématique de l'AAH de l' α -sinucléine et de son effet tubulogénique sur les membranes. Codes couleurs de l'AAH: en jaune, les résidus hydrophobes ; en violet, les sérines et les thréonines ; en bleu, les résidus basiques ; en rouge, les aa acides ; en gris, les alanines ; en bleu clair, les histidines. La flèche orientée vers le bas indique le moment hydrophobe. Barres d'échelle : 100 nm. D'après (Varkey *et al.*, 2010 ; Drin and Antony, 2010).

Parmi le très large répertoire des protéines contenant une/des AAH, en plus des ALPS, on peut encore noter les protéines SpoVM et divIVA de *Bacillus subtilis* (**Figure 62**) (Drin and Antony, 2010). La protéine SpoVM est spécifiquement recrutée sur la membrane externe des spores, larges structures endomembranaires d'environ 1 μm de diamètre et dérivées de la membrane plasmique du *Bacillus*. La protéine est en effet capable de reconnaître une courbure membranaire caractéristique de certaines étapes de la sporulation de *Bacillus subtilis* : SpoVM est capable de faire la différence entre la courbure positive, nécessaire à son insertion dans la membrane externe de la spore, et la courbure négative de la membrane interne des spores. L'interaction repose sur une AAH de 26 aa qui exerce un effet discriminant de reconnaissance de la courbure de la membrane (Ramamurthi *et al.*, 2009 ; Drin and Antony, 2010 ; Bhatia *et al.*, 2010). L'AAH contient pourtant une proline (**Figure 62, proline en vert**), résidu considéré comme étant très défavorable au repliement des aa en hélice. Néanmoins, cette proline s'avère très importante car sa mutation en alanine abolit le recrutement spécifique de SpoVM à la membrane de la spore. Le mécanisme de reconnaissance de la courbure membranaire de la spore et le rôle de cette proline ne sont pas encore déterminés. Suite à son insertion dans la membrane, SpoVM déclenche l'assemblage des protéines du manteau formant l'enveloppe des spores (Ramamurthi *et al.*, 2009). La protéine divIVA,

quant à elle, est impliquée dans la division cellulaire. Elle se localise au niveau de la membrane plasmique de la bactérie en cours de cytokinèse et au niveau des pôles, c'est-à-dire au niveau des membranes courbées négativement. La liaison de la protéine aux membranes dépend d'une AAH conservée dans les différentes souches de *Bacillus* et dont la face polaire zwitterionique est inversée, les résidus acides de l'hélice se plaçant à l'interface avec la membrane alors que les résidus basiques sont en crête (**Figure 62**). Le mécanisme d'insertion de l'AAH dans la membrane reste inconnu (Lenarcic *et al.*, 2009 ; Ramamurthi and Losick, 2009).

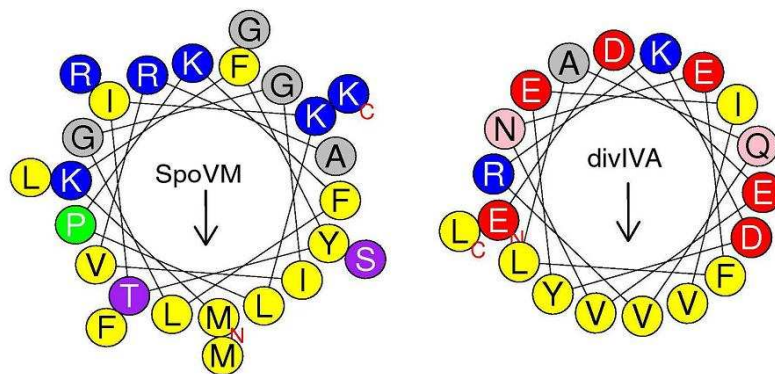


Figure 62. Représentation schématique des AAH des protéines SpoVM et divIVA de *Bacillus subtilis*. Codes cloueurs : en jaune, les résidus hydrophobes ; en violet, les sérines et les thréonines ; en bleu, les résidus basiques ; en rouge, les aa acides ; en rose, les asparagines et les glutamines ; en gris, les alanines. La flèche orientée vers le bas indique le moment hydrophobe. D'après (Drin and Antonny, 2010).

Comme nous l'avons vu dans le cas des N-BAR ou des réticulons, les deux types de motifs ou de protéines induisant une courbure membranaire, par « scaffolding » et par « wedging », agissent souvent de concert pour générer un tubule membranaire ou une vésicule à partir d'une membrane plate. De plus, la plupart des protéines impliquées dans la déformation initiale d'une membrane et/ou dans sa tubulation, ont une affinité pour les phosphoinositides et en particulier, pour le PI(4,5)P₂, avec lequel elles interagissent *via* une AAH (Lemmon, 2008). Enfin, les protéines qualifiées de « senseurs de courbure », sont maintenant reconnues comme étant des protéines membranaires pour lesquelles la forme courbée d'une membrane est un motif de reconnaissance en soi, indépendamment de la composition en lipides et en protéines de la membrane. La liaison aux lipides d'une protéine sensible à la courbure est donc une propriété qui dépend de la densité en sites de liaison sur la membrane courbée plutôt que d'une plus grande affinité de ces protéines pour les membranes courbées. La liaison d'une protéine aux membranes dépendante de la courbure dépend en effet uniquement de l'insertion asymétrique d'aa hydrophobes dans la membrane (Madsen *et al.*, 2010). Ce mécanisme général implique donc

l'insertion de chaînes alkyl dans la bicouche lipidique, ce qui veut dire qu'en plus des protéines contenant un domaine BAR ou une AAH, les protéines myristoylées, palmitoylées ou qui portent une ancre GPI, sont également prédites pour être des senseurs de courbure membranaire (Madsen *et al.*, 2010 ; Bhatia *et al.*, 2010). Néanmoins, comme nous l'avons vu, parmi les senseurs de courbure, on compte les protéines qui ont la particularité de contenir une ou plusieurs domaines ALPS non structurés en solution mais qui, lorsqu'ils sont amenés au contact d'une surface membranaire très courbée, forment une AAH, grâce à l'insertion des aa hydrophobes de l'hélice dans la bicouche membranaire (Drin *et al.*, 2007). Il apparaît donc de plus en plus, que les AAH sont des motifs protéiques très simples et très flexibles qui permettent une interaction faible et réversible avec les membranes, par leur capacité de détection des défauts de compaction des lipides, ce qui leur permet de se concentrer dans les membranes fortement courbées.

Objectifs des travaux de thèse

Mon projet de thèse s'est inscrit dans le cadre global de l'étude de la fonction des protéines GRA dans la biogenèse de la VP, compartiment intracellulaire qui présente de nombreux types de structures membranaires. Je me suis plus particulièrement intéressée au réseau intravacuolaire de nanotubes membranaires (RNM) qui relie les parasites entre eux et à la membrane délimitant la PV, en essayant d'apporter des éléments de réponse à trois questions majeures :

- **comment les protéines de GD interagissent-elles avec les membranes du RNM ? En particulier, comment ces protéines sont-elles capables d'exister dans la PV, à la fois sous un état soluble et membranaire, alors qu'elles contiennent dans leur séquence en aa, des domaines d'interaction avec les membranes ?**
- **quelle est, dans la VP, la spécificité de l'adressage des protéines GRA aux membranes du RNM ?**
- **sachant que GRA2 et GRA6 avaient été montrées de façon indirecte, comme étant indispensables à la mise en place d'un RNM mature dans la VP, quelle est la contribution de ces protéines dans la biogenèse des membranes du RNM ?**

1- Afin de comprendre pourquoi des protéines présentant des domaines d'association membranaire dans leur séquence en aa, sont capables d'exister dans le compartiment vacuolaire sous forme soluble puis de s'associer aux membranes, je me suis intéressée dans un premier temps, par des approches biochimiques, à l'état de compaction des protéines GRA dans les différents compartiments, c'est-à-dire dans les GD (avant sécrétion), puis dans l'espace vacuolaire (après sécrétion). Dans le cadre de la caractérisation des protéines GRA associées au RNM, j'ai également contribué à la caractérisation de GRA12, une protéine de GD récemment identifiée comme étant ciblée au RNM. J'ai plus particulièrement recherché l'existence d'interactions entre GRA12 et GRA2, dans les membranes du RNM.

2- Dans le cadre de la détermination de la spécificité d'adressage des protéines GRA vers les membranes du RNM, en prenant l'exemple de la protéine GRA6, nous avons essayé de déterminer le(s) domaine(s) de la protéine requis à la fois pour la spécificité d'adressage de la protéine vers le RNM et pour son association aux membranes du RNM. J'ai plus particulièrement recherché si le domaine N-terminal hydrophile de la protéine, identifié comme étant l'élément majeur du ciblage aux membranes du RNM, est capable d'interagir avec des lipides.

3- Dans le cadre de l'étude du rôle des protéines GRA2 et GRA6 dans la formation du RNM, la difficulté résidait dans le fait qu'il existe actuellement, très peu de données sur la composition en lipides et en protéines, sur le mécanisme de formation et sur la fonction du RNM dans la VP.

Lorsque j'ai commencé mes travaux de thèse, nous savions, par l'utilisation d'une approche indirecte, que GRA2 et GRA6 sont indispensables à la formation du RNM. Comme la purification de vacuoles matures et du RNM par des approches conventionnelles de biochimie est jusqu'à présent, impossible, nous avons entrepris une approche biochimique *in vitro*, utilisant des vésicules lipidiques unilamellaires et des protéines produites sous forme recombinante. Ce système simplifié d'étude des interactions protéines-membrane nous a permis d'aborder dans un premier temps, l'étude de l'interaction de GRA2 avec les membranes et l'étude de son effet sur les membranes. Dans un deuxième temps, nous avons exploré le rôle de GRA6, seule ou en co-incubation avec GRA2, dans la formation des membranes du RNM.

RESULTATS

- **CHAPITRE I : *Caractérisation des protéines GRA associées au RNM***
- **CHAPITRE II : *Spécificité d'adressage des protéines GRA associées au RNM***
- **CHAPITRE III : *Contribution de GRA2 et GRA6 à la formation du RNM***

CHAPITRE I : *Caractérisation des protéines GRA associées au RNM*

Dans un premier temps, je me suis intéressée à l'étude de l'état de compaction des protéines GRA depuis leur stockage dans les GD jusqu'à leur insertion dans les différents compartiments vacuolaires et plus particulièrement, dans les membranes du RNM. Cette question a été abordée par une approche biochimique, *via* des expériences de séparation isopycnique sur gradient linéaire de densité de glycérol. Ces expériences ont été réalisées à partir d'extraits protéiques solubles issus de parasites ainsi que d'extraits solubles de protéines parasitaires de cellules infectées, protéines assimilées aux protéines solubles vacuolaires.

Je présenterai dans un deuxième temps, les travaux de caractérisation d'une nouvelle protéine de granules denses, GRA12, travaux réalisés en collaboration avec M. Lebrun (UMR 5235-Université Montpellier 2). Cette étude s'est intéressée tout d'abord au trafic de GRA12 qui est sécrétée à partir des GD puis s'associe aux membranes du RNM. Ces travaux s'étendent ensuite à la recherche d'éventuelles interactions entre GRA12 et GRA2, une autre protéine clé associée au RNM.

I- 1) Etude de la compaction des protéines GRA depuis les GD jusqu'à la VP

1) Etude de l'état de compaction des protéines GRA par séparation isopycnique sur gradient linéaire de glycérol

Les protéines GRA présentes dans les GD et dans la fraction soluble de la VP ont été obtenues par fractionnement sub-cellulaire de parasites extracellulaires d'une part, et de cellules infectées d'autre part.

Les deux formes des protéines GRA ont été obtenues de la manière suivante :

◆ les protéines parasitaires stockées dans les GD ont été obtenues par lyse de parasites extracellulaires, par chocs thermiques. Les extraits obtenus ont tout d'abord été fractionnés à basse vitesse (2 000 g) en un culot (Low Speed Pellet ou LSP_{par}) et un surnageant (Low Speed Supernatant ou LSS_{par}), puis le surnageant a été ultracentrifugé à haute vitesse (100 000 g pendant 1h) afin de séparer le culot (High Speed Pellet ou HSP_{par}) de la fraction ultrasoluble (High Speed Supernatant ou HSS_{par}) qui correspond à la fraction soluble des granules denses (**Figure 63A**).

◆ les protéines vacuolaires ont été obtenues par rupture de la membrane plasmique de cellules infectées de 24 heures, par passage au travers d'aiguilles de 23, 25 puis 27 G et élimination des parasites par centrifugation à basse vitesse. L'extrait protéique obtenu a subi une ultracentrifugation à haute vitesse (100 000 g pendant 1h) afin de séparer le culot (High Speed Pellet ou HSP_{vac}) de la fraction ultrasoluble (High Speed Supernatant ou HSS_{vac}) (**Figure 63B**).

Afin de caractériser les différents états de compaction des protéines GRA dans les GD d'une part, puis après leur libération dans la VP d'autre part, nous avons mis en œuvre une approche biochimique basée sur la séparation isopycnique des protéines dans un gradient linéaire de densité de glycérol. Ce procédé a été développé au laboratoire par P. Ruffiot, au cours de ses travaux de thèse ([P. Ruffiot, thèse UJF, 2007](#)). Il consiste à déposer l'extrait à analyser à la surface d'un gradient linéaire de concentration croissante d'une molécule non réactive, ici le glycérol. L'ensemble est centrifugé à haute vitesse jusqu'à l'équilibre, c'est-à-dire jusqu'à stabilisation des structures lipidiques et protéiques à leur densité isopycnique. Par ce moyen, les protéines se répartissent en fonction de leur densité, sur l'ensemble du

gradient dont on récupère ensuite le contenu en une série de fractions (pour plus de détails, voir la **Figure 70** et le paragraphe correspondant de la section Matériel & Méthodes).

a) Profil de sédimentation des protéines GRA de la fraction soluble des granules denses

L'analyse du profil de sédimentation des protéines GRA dans la fraction parasitaire soluble (HSS_{par}) montre que toutes les protéines GRA analysées s'équilibrent à des densités comprises entre 1.01 et 1.06. Plus précisément, on peut regrouper les protéines analysées en deux catégories :

1) les protéines dont la densité est comprise entre $d = 1.01$ et 1.025 . Ce regroupement comprend toutes les protéines analysées (GRA1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) (**Figure 63C**) ;

2) les protéines GRA3 et GRA7 qui sont également détectées à des densités supérieures à 1.025 (**Figure 63C**).

Ces résultats suggèrent que dans le parasite (GD), il existerait deux types de complexes de protéines GRA : un complexe de protéines de faible densité, comprenant toutes les protéines analysées ici et un autre complexe, de densité plus élevée, comprenant au moins GRA3 et GRA7. Une fraction de ces deux protéines existerait donc dans les GD, dans un état de compaction plus important que celui de la plupart des autres protéines GRA testées.

b) Profil de sédimentation des protéines GRA de la fraction vacuolaire soluble

L'analyse du profil de sédimentation des protéines GRA de la fraction vacuolaire soluble (HSS_{vac}) révèle que toutes les protéines GRA testées sont retrouvées à des densités plus faibles que celles observées dans le parasite (**Figure 63D**), soit des densités comprises entre 1.01 et 1.035.

Seule la protéine GRA1 présente dans la VP, un comportement similaire à celui observé dans le parasite (voir le gradient de la fraction HSS_{par} pour comparaison, **Figure 63C**). A nouveau, seules GRA3 et GRA7 se distinguent des autres protéines puisqu'elles sont retrouvées à des densités un peu supérieures ($d < 1.01$ à $d = 1.03$ pour GRA3 et $d < 1.01$ à $d = 1.035$ pour GRA7), (**Figure 63D**).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que dans la VP, les protéines GRA ont une densité inférieure à celle observée dans le parasite et qu'il existerait donc deux types de complexes

protéiques, un complexe comprenant toutes les protéines GRA analysées ici ainsi qu'un second complexe, comprenant GRA3 et GRA7.

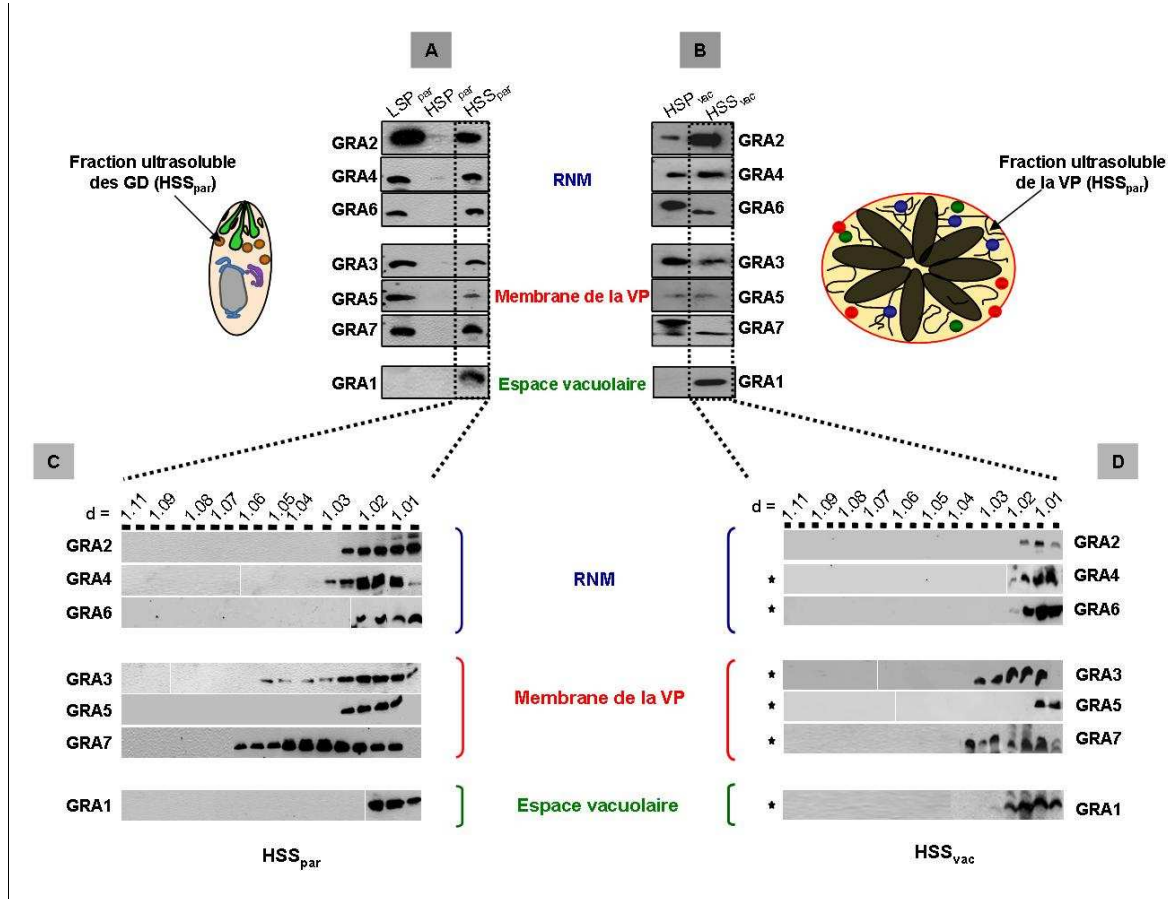


Figure 63. Obtention des extraits ultrasolubles contenant les protéines GRA à partir des parasites extracellulaires et de cellules infectées puis analyse des protéines GRA par séparation isopycnique sur gradient linéaire de glycérol. Les extraits ont été obtenus soit par lyse de parasites extracellulaires (A), soit par rupture de la membrane de cellules infectées (B). Ces extraits ont été centrifugés à 2 500 g pendant 10 min afin de sédimenter les plus gros débris (LSP). Le surnageant a ensuite été séparé par ultracentrifugation à 100 000 g, pendant 1h, en un culot (HSP_{par} ou HSP_{vac}) et une fraction ultrasoluble (HSS_{par} ou HSS_{vac}). Des quantités de 1.10⁷ équivalents-parasites des fractions LSP, HSP et HSS ont été analysées par immunoblots révélés par les anticorps spécifiques des protéines GRA (A et B). Les fractions ultrasolubles de granules denses (HSS_{par}) (A) et de la VP (HSS_{vac}) (B) ont été déposées séparément sur un gradient linéaire de glycérol, puis centrifugées jusqu'à l'équilibre (100 000 g, 17h). Les contenus des gradients ont été collectés par fractions de 500 µl. Les fractions ont été pesées puis analysées par immunoblots à l'aide des anticorps spécifiques des protéines GRA. Les étoiles placées à gauche de la figure D signifient que les protéines ont été précipitées avant l'analyse par immunoblots.

c) Bilan comparatif : différentes formes de solubilisation des protéines GRA

Afin de faciliter la comparaison des résultats obtenus pour les protéines GRA granulaires et vacuolaires, un tableau résumant ces résultats a été réalisé (**Figure 64**). Il rassemble les résultats des deux profils de sédimentation pour chacune des catégories de protéines GRA testées.

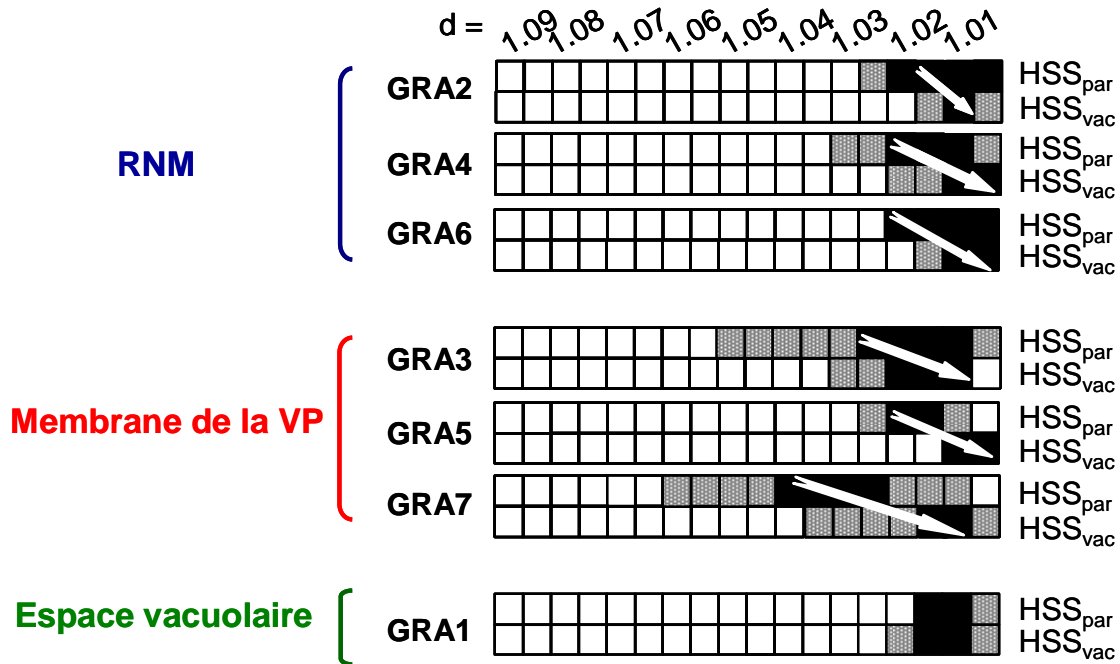


Figure 64. Evolution des profils de sédimentation des fractions solubles des protéines GRA dans le parasite (HSS_{par}) et après sécrétion dans la VP (HSS_{vac}). Les résultats obtenus sur la **Figure 61C-D** ont été représentés sur un diagramme de répartition. Les cases de couleur noire correspondent aux signaux les plus intenses alors que les cases de couleur grise correspondent aux signaux d'intensités plus faibles.

En comparant les profils de sédimentation des protéines GRA dans les fractions solubles du parasite et de la VP (**Figure 64**), il apparaît que :

- ◆ seule la protéine GRA1 (protéine décrite comme soluble dans le parasite et dans la VP) garde le même comportement avant et après sécrétion ;
- ◆ la fraction HSS_{vac} se caractérise par des densités isopycniques faibles pour toutes les protéines GRA analysées. Leur faible densité pourrait indiquer qu'elles existeraient probablement sous forme de monomères ou de petits assemblages ;

♦ la densité des protéines GRA analysées, hormis celle de GRA1, diminue en passant du compartiment granulaire au compartiment vacuolaire. Cette diminution de densité isopycniqne est plus marquée pour les protéines GRA3 et GRA7. Elle pourrait correspondre à un changement progressif de conformation des protéines GRA, suite à leur sécrétion dans un environnement propice à leur insertion dans les membranes, depuis leur forme agrégée dans les GD jusqu'à une forme moins complexe, susceptible d'interagir avec les membranes vacuolaires.

2) Nature des interactions nécessaires au maintien des complexes de protéines GRA sous forme soluble

Les résultats précédents indiquent que les protéines GRA forment dans la fraction soluble des GD, des complexes de plus haute densité que ceux qu'elles forment dans la fraction soluble de la VP.

Afin de rechercher comment évoluent les interactions établies entre les protéines GRA entre le compartiment soluble des GD d'une part, et le compartiment soluble de la VP d'autre part, des tests de solubilisation de ces protéines ont été réalisés sur des extraits protéiques obtenus après induction de la sécrétion parasitaire *in vitro*, selon le protocole standard d'incubation des parasites en présence de 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF), ([Darcy et al., 1988](#) ; [Coppens et al., 1999](#)). Les extraits de protéines GRA secrétées *in vitro* sont en effet supposés représenter un état de compaction intermédiaire entre leur forme de stockage dans la fraction soluble des GD et leur forme secrétée dans la fraction soluble de la VP.

Les produits de sécrétion obtenus après 3 h d'incubation des parasites à 37°C, ont été centrifugés à 100 000 g, pendant 1 h, puis le culot obtenu a été traité soit par l'Urée 6M, agent chaotrope perturbant les liaisons de type hydrogène et hydrophobe, soit par le détergent non ionique Nonidet-P40 (NP-40) qui permet de rompre les liaisons de type hydrophobe, soit par le Tris 50 mM, pH 8 en tant que contrôle.

Les résultats (**Figure 65**) montrent que le traitement par l'Urée solubilise partiellement la protéine GRA4 mais qu'il ne solubilise pas les autres protéines comportant soit un domaine transmembranaire (GRA3, 6 et 7), soit des hélices α -amphipatiques (GRA2) (**Figure 65**). Le traitement par le NP-40, par contre, solubilise majoritairement ou complètement toutes les protéines testées.

Ces résultats montrent que les interactions hydrophobes sont prédominantes et essentielles pour établir les complexes contenant les protéines GRA, les liaisons hydrogène n'étant

importantes que pour GRA4. Bien que prédite comme contenant une hélice α hydrophobe, GRA4 n'a pas un comportement de protéine transmembranaire dans la VP mais elle est associée aux membranes du RNM par le biais d'interactions protéine-protéine, solubilisées par 6M d'urée (Labruière *et al.*, 1999).

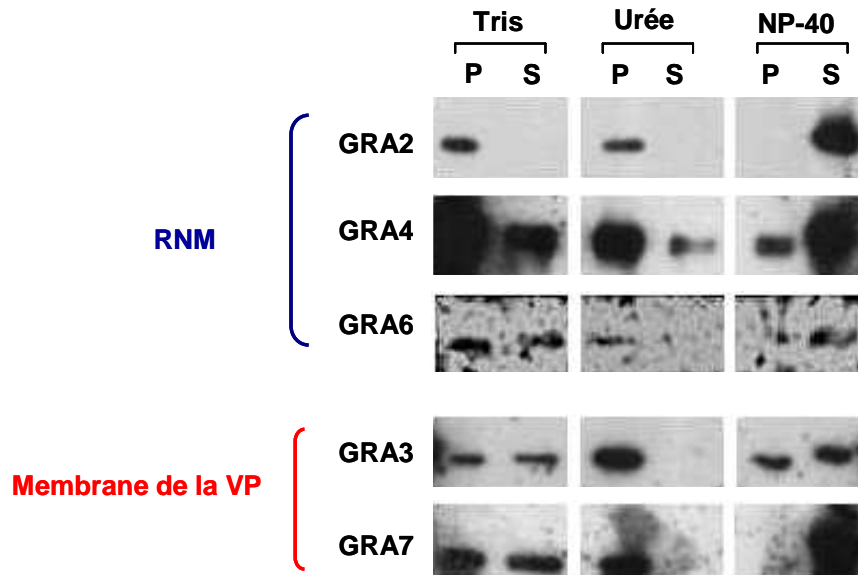


Figure 65. Analyse des protéines GRA secrétées *in vitro* après application de différents traitements dénaturants. Le culot obtenu après ultracentrifugation des produits de sécrétion parasitaire *in vitro* a été traité soit par l'Urée 6M, soit par le Nonidet P-40 (NP-40) 1%, soit par le Tris (contrôle). Les traitements ont été appliqués pendant 30 min, sur glace. Une deuxième ultracentrifugation d'une heure, à 100 000 g, a été réalisée pour obtenir un culot, P, qui contient les protéines non solubilisées par les traitements, et un surnageant, S, qui contient les protéines solubilisées. Toutes les fractions P et S obtenues ont été déposées sur gel (1.10^7 équivalents-parasites par dépôt) et analysées par immunoblot révélé à l'aide des anticorps spécifiques.

Ces résultats nous ont amené à émettre l'hypothèse selon laquelle, au moment de leur sécrétion, les protéines GRA pourraient former des complexes avec des microvésicules ou des micelles lipidiques présentes dans l'environnement vacuolaire, ce qui favoriserait leur solubilisation et conduirait donc à la diminution de densité des complexes, observée à l'aide des gradients linéaires de glycérol.

3) Rôle des lipides dans la solubilisation des protéines GRA

Afin de tester cette hypothèse, j'ai utilisé à nouveau les protéines GRA secrétées *in vitro*, en réalisant une analyse comparative des profils de sécrétion *in vitro* des protéines GRA en présence de SVF complet (D10) *versus* de SVF délipidé (D10-L) (**Figure 66**).

Le contrôle SAG1 (protéine majeure de surface du parasite), est observé avec une faible intensité dans les fractions HSP et HSS (conditions D10 et D10-L), ce qui montre que les parasites ont subi peu de lyse au cours de l'incubation. Ce contrôle valide la comparaison entre les protéines obtenues par incubation en D10 *versus* celles obtenues en D10-L. Alors que les protéines GRA1, 2, 4 sont aussi bien détectées dans la fraction **HSS_{ES} (D10-L)** que dans la fraction HSS_{ES} (D10), les protéines GRA3, 5, 6, 7 qui, toutes, possèdent des régions hydrophobes potentiellement transmembranaires, sont présentes en faible quantité dans la fraction ultrasoluble HSS_{ES}(D10-L) (**Figure 66**, encadrés roses). GRA3, 5, 6, 7 sont cependant présentes dans la fraction sédimentée HSP_{ES} (D10-L). Cela indique que ces protéines sont effectivement sécrétées, mais sous une forme plus propice à leur sédimentation. Les protéines GRA contenant un domaine transmembranaire sont donc affectées par l'absence de lipides dans le sérum lors de leur sécrétion *in vitro* et sans eux, elles semblent être mal solubilisées.

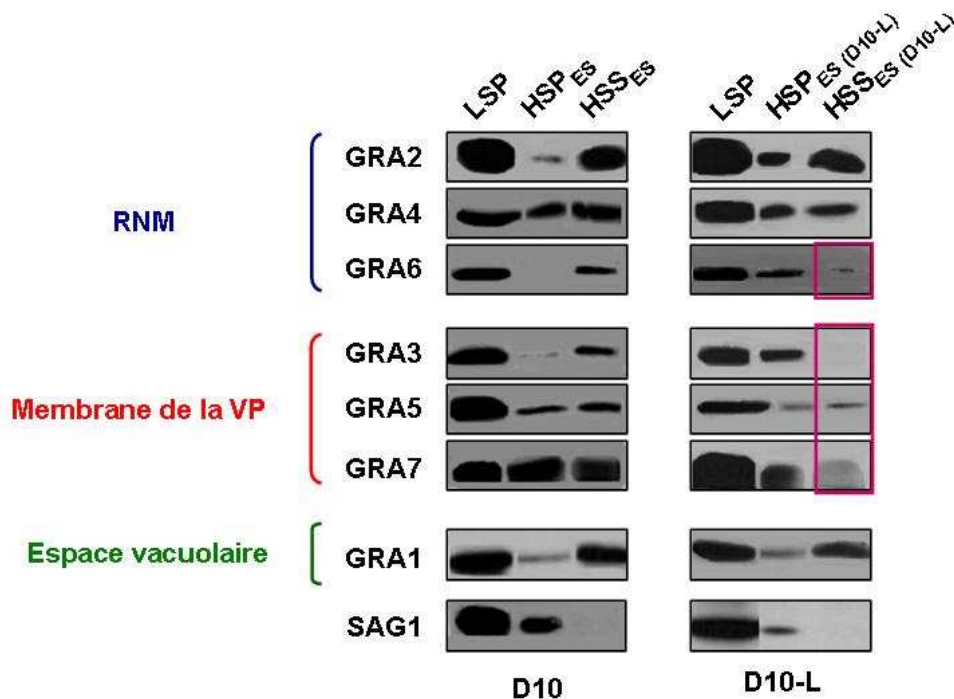


Figure 66. Rôle des lipides dans la solubilisation des protéines GRA sécrétées *in vitro*. Les produits HSS_{ES} et HSS_{ES}(D10-L) ont été préparés selon le protocole standard de sécrétion *in vitro* (Darcy *et al.*, 1988), en milieu complété par 10% de SVF complet (D10) ou en milieu complété par 10% de SVF délipidé (D10-L). Les protéines sécrétées ont été fractionnées par une centrifugation à basse vitesse (2 000 g) (LSP : parasites, organites, etc) puis le surnageant a été fractionné par une ultracentrifugation à haute vitesse (100 000 g, 1h), en un culot (HSP) contenant des agrégats protéiques et un surnageant représentant la fraction ultrasoluble (HSS). Les fractions LSP, HSP et HSS obtenues ont été déposées sur gel ($5 \cdot 10^6$ équivalents-parasites par puits) et analysées par immunoblot à l'aide d'anticorps spécifiques.

Conclusion : Evolution des caractéristiques des protéines GRA au cours de leur trafic depuis la fraction soluble des GD jusqu'à la fraction soluble de la VP

1/ La comparaison menée dans cette partie, sur les formes ultrasolubles des protéines GRA du parasite d'une part, et celles de la VP d'autre part, laisse entendre que toutes les protéines GRA analysées (GRA1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) évoluent depuis une forme dense stockée dans les GD, jusqu'à une forme plus soluble dans la VP, en passant par des formes intermédiaires de solubilisation.

2/ La protéine GRA1 a une densité isopycnique faible et constante, que ce soit dans les produits solubles des GD ou dans ceux de la VP. Ce résultat va dans le même sens que ce qui a déjà été décrit dans la littérature pour cette protéine (Sibley *et al.*, 1995) et conforte donc le comportement ultrasoluble de GRA1 dans les GD et dans l'espace vacuolaire.

3/ La protéine GRA2 du RNM présente également une densité isopycnique relativement constante et assez faible sous les deux formes étudiées. On peut donc supposer qu'elle est disponible en permanence et ne nécessite pas de passer par des formes intermédiaires de dissociation.

4/ Les protéines GRA3 et GRA7, ciblées à la membrane de la VP, se démarquent par leurs densités relativement élevées par rapport à celles des autres protéines GRA testées. On peut donc supposer qu'elles sont dans un état de compaction plus important.

5/ Exception faite de GRA4, les protéines GRA du RNM (GRA 2, 6) ainsi que celles de la membrane délimitant la vacuole (GRA 3, 5, 7), interagissent essentiellement par le biais de liaisons hydrophobes, établies sans doute avec des lipides ou des micelles vacuolaires, ceci afin de stabiliser leur état de compaction intermédiaire et de les maintenir sous forme soluble jusqu'à leur insertion dans les membranes vacuolaires cibles.

I- 2) Caractérisation d'une nouvelle protéine GRA associée au RNM, GRA12

Dans cette deuxième partie du premier chapitre de résultats, je présente les travaux de caractérisation d'une nouvelle protéine de granules denses, GRA12. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec M. Lebrun et A. Michelin (CNRS UMR 5235-Université Montpellier 2).

Lorsque ces travaux ont été commencés, on comptait quatre protéines GRA associées aux membranes du RNM : GRA2, 4, 6 et 9 (Cesbron-Delauw *et al.*, 2008 ; Mercier *et al.*, 2010). Lors de la caractérisation des protéines RON2, 4, 5 et AMA1, associées à la jonction mobile utilisée par le parasite pour se propulser dans la cellule hôte, M. Lebrun avait identifié une nouvelle protéine, TwinScann_0092, co-purifiée avec RON4 ainsi qu'avec les autres

protéines. Cette dernière avait été identifiée lors de l'analyse du protéome des rhoptries (Lebrun *et al.*, 2005) mais sa localisation n'avait pas été clairement déterminée.

TwinScann_0092 est une protéine de 49 kDa (436 acides aminés) qui, selon les prédictions de sa structure secondaire, contient un peptide signal N-terminal (aa 19 - 39) et un domaine transmembranaire hydrophobe central (aa 94 - 115), flanqué de deux domaines hydrophiles N et C terminaux (aa 40 - 93 et aa 116 - 436).

Dans le parasite, TwinScann_0092 a été détectée dans les GD. Une fois sécrétée à la partie apicale du parasite, elle s'accumule transitoirement dans l'espace vacuolaire, au pôle postérieur du parasite (événement déjà décrit pour les deux protéines GRA2 et GRA6), où elle s'associe à la boule compacte de matériel membranaire observée 15-30 min après invasion. Ces membranes se déploient dans l'espace vacuolaire pour former le RNM auquel TwinScann_0092 reste associée. Ces analyses par immunofluorescence et par microscopie électronique à transmission après immunomarquage ont donc révélé que TwinScann_0092 se comporte comme une protéine de GD ciblée au RNM de la VP. Selon la nomenclature proposée par D. Sibley (Sibley *et al.*, 1991), cette protéine a été nommée GRA12.

En plus de sa forme associée aux membranes du RNM, GRA12 est également présente sous une forme soluble, au niveau de l'espace vacuolaire. Pour ma part, je me suis intéressée à l'étude du comportement biochimique de GRA12 dans les membranes du RNM. J'ai montré par des tests de déstabilisation de la protéine associée aux membranes, après traitement par différents agents chimiques, que GRA12 se comporte comme une protéine intégrale de membrane. Elle se lie en effet aux membranes du RNM essentiellement par des liaisons de type hydrophobe.

La plupart des protéines GRA forment des complexes solubles à la fois dans les GD et après sécrétion, dans la fraction soluble de la VP ((Braun *et al.*, 2008) et Résultats, chapitre I-1). Une de mes contributions à ce travail a consisté à rechercher si, au cours de son trafic, GRA12 interagit avec une autre protéine GRA du RNM, GRA2. Pour cela, j'ai utilisé une lignée de parasites (Braun *et al.*, 2008), à partir de laquelle la protéine GRA2-HA-FLAG a été purifiée à partir de la fraction soluble de parasites extracellulaires ainsi qu'à partir de la fraction soluble de la VP. J'ai montré que GRA12 co-purifie avec GRA2, à la fois à partir de la fraction soluble des GD et à partir de la fraction soluble de la VP, ce qui suggère que les deux protéines interagissent dans ces deux compartiments. Par contre, GRA12 ne co-purifie pas avec GRA2 à partir des membranes vacuolaires, ce qui laisse supposer que les deux protéines n'interagissent pas directement dans ce compartiment membranaire. Il ne peut

cependant pas être exclus que GRA2 et GRA12 interagissent de façon indirecte dans les membranes vacuolaires.

Ces travaux sont présentés en détails, dans l'article N°1 intitulé «**GRA12, a Toxoplasma dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network**», publié en 2009, dans la revue «*International Journal for Parasitology*». 39: 299-306.

ARTICLE N°1

Adeline Michelin, Amina Bittame, Yann Bordat, Laetitia Travier, Corinne Mercier, Jean-François Dubremetz and Maryse Lebrun (2009). « **GRA12, a Toxoplasma dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network** ». *International Journal for Parasitology*. 39: 299-306.



GRA12, a *Toxoplasma dense granule* protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network ^{☆,☆,☆☆}

Adeline Michelin ^a, Amina Bittame ^b, Yann Bordat ^a, Laetitia Travier ^{b,1}, Corinne Mercier ^b, Jean-François Dubremetz ^a, Maryse Lebrun ^{4*}

^a *Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, UMR 5205 CNRS, Université de Montpellier 2, CP 107, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France*
^b *Laboratoire Adaptation et Pathologie des Micro-organismes, UMR 5163 CNRS, Université Joseph Fourier Grenoble 1, BP 170, 38042 Grenoble cedex 9, France*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2008

Received in revised form 3 July 2008

Accepted 4 July 2008

Keywords:

Apicomplexa

Toxoplasma gondii

Dense granule

GRA12

Membranous nanotubular network

Parasitophorous vacuole

ABSTRACT

The intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii* develops within the parasitophorous vacuole (PV), an intracellular niche in which it secretes proteins from secretory organelles named dense granules and rhoptries. Here, we describe a new dense granule protein that should now be referred to as GRA12, and that displays no homology with other proteins. Immunofluorescence and immuno-electron microscopy showed that GRA12 behaves similarly to both GRA2 and GRA6. It is secreted into the PV from the anterior pole of the parasite soon after the beginning of invasion, transits to the posterior invaginated pocket of the parasite where a membranous tubulovesicular network is first assembled, and finally spreads throughout the vacuolar space, associated with the mature membranous nanotubular network. GRA12 fails to localise at the parasite posterior end in the absence of GRA2. Within the vacuolar space, like the other GRA proteins, GRA12 exists in both a soluble and a membrane-associated form. Using affinity chromatography experiments, we showed that in both the parasite and the PV soluble fractions, GRA12 is purified with the complex of GRA proteins associated with a tagged version of GRA2 and that this association is lost in the PV membranous fraction.

© 2008 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that belongs to the Apicomplexa phylum and that infects all warm-blooded animals. In immunocompetent hosts, the infection is usually asymptomatic, but when transmitted to the fetus, it may cause dramatic effects, ranging from fetal demise or fetal abnormalities to minimal symptomatic sequelae. In immunocompromised patients, *T. gondii* is essentially responsible for focal encephalitis. Host cell invasion by *T. gondii* is rapid (<10 s) and parasite-driven (Morikaki et al., 1995). It leads to the formation of a new subcellular compartment, the parasitophorous vacuole (PV), in which the parasites settle and multiply. The mechanisms of invasion and installation in the host cell are highly conserved amongst Apicomplexa parasites, involving the sequential secretion from three distinct phylum-specific organelles, namely the micronemes, the rhoptries and the dense granules (Dubremetz et al., 1993; Carnuthers and Sibley, 1997; Lebrun et al., 2007). The initial discharge of micro-

neme proteins (MIC proteins) leads to the gliding motion necessary to invasion and to attachment to the host cell (Soldati and Meissner, 2004). Then, the secretion from the neck of the rhoptries (RON proteins) participates in the formation of the moving junction (Alexander et al., 2005; Lebrun et al., 2005) that corresponds to an intimate contact between the host cell plasma membrane and the parasite plasmalemma (Aikawa et al., 1978). Subsequently, rhoptry bulb proteins (ROP proteins) become associated with the nascent PV membrane or are targeted to the host cell nucleus (Dubremetz, 2007). Dense granule secretion starts during entry of the parasite into the host cell but it occurs mainly at the end of the invasion process, indicating that the dense granule proteins (GRA proteins) are likely involved in intracellular parasite development and multiplication (Cesbron-Delauw et al., 2008). Within the PV, GRA2 and GRA6 contribute to the formation of the network of membranous tubules connected to the PV limiting membrane (Mercier et al., 2002). Other GRA proteins such as GRA3 or GRA1 are targeted, respectively, to the PV limiting membrane (Dubremetz et al., 1993) or remain soluble within the PV space (Sibley et al., 1995).

We have recently characterised a complex of RON proteins (RON2/4/5) (Lebrun et al., 2005) that associates with the micronemal protein AMA1 (Alexander et al., 2005) at the moving junction during invasion. In the course of a more complete characterisation of the moving junction complex by immunofluorescence with an anti-

[☆] Non: Nucleotide sequence data reported in this paper are available at the EMBL, GenBank™ and DDBJ data bases under the accession No. JF011096.

^{☆☆} Non: Supplementary material associated with this article.

¹ Corresponding author. Tel.: +33 4671 43455; fax: +33 4671 442 06.

E-mail address: mylebrun@univ-montp2.fr (M. Lebrun).

² Present address: URA CNRS 2172, Institut Pasteur, 75724 Paris, cedex 15, France.

body directed against RON4 followed by mass spectrometry analysis of binding partners, we have identified peptides from a predicted protein annotated B0.m02161 or TwinScann_0092 (www.Toxodb.org). This protein was also identified in the proteome of rhoptries although its localisation was not precisely determined (Bradley et al., 2005). In the present study, we show that this protein is a GRA that may bind non-specifically to the moving junction complex in vitro. We have named this protein GRA12 according to the nomenclature proposed by Sibley et al. (1991), consecutive to the nine GRA proteins characterised to date (Mercier et al., 2005) and to the GRA10 and GRA11 already deposited in GenBank.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines, bacteria strains and vectors

All the parasite strains were maintained by serial passages in primary human foreskin fibroblasts (HFF) grown in DMEM (GibcoBRL) supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Tachyzoites of the RH *hxprt*– strain of *T. gondii* deleted for hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Δ HX strain) (Donald et al., 1996), Δ GRA2-HXGPT (Travler et al., 2008) and GRA2-HA-FLAG (Braun et al., 2008) were used for this study.

2.2. Antibodies

The antibodies used in this study included an anti-Ty tag monoclonal antibody (mAb) (Bastin et al., 1996), the mAb T5 4H1 specific to RON4 (Lebrun et al., 2005), the mAb C122 specific for AMA1 (Hehl et al., 2000), the mAb TG 1743 anti-GRA1, the mAb TG 17179 anti-GRA2 (Charif et al., 1990), rabbit sera anti-ROP2 (unpublished), anti-recombinant GRA3 (Bermudes et al., 1994), anti-recombinant GRA2, anti-recombinant GRA6 (Labouyère et al., 1999) (both generously provided by L.D. Sibley, Washington University School of Medicine, USA) and a rat serum anti-recombinant GRA12 (see below).

2.3. Molecular cloning and sequence analysis of GRA12

Total RNA was isolated from Δ HX parasites using the RNeasy kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions and cDNA was synthesised using random hexamers and the SuperScript[®] II kit (Invitrogen). The complete predicted open reading frame (ORF) of TwinScann_0092 was amplified using the forward primer ML187: 5'-CCCGGGC TATGAGGGCGATCGTG-3' and the reverse primer ML188: 5'-GCGGC CGCTCAGTTGTGTTGCT-3' (the underlined positions indicate added *Sma*I and *Nco*I sites) and cloned into the pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen) to generate pZBTw92. The 5' end of the mRNA was identified using the SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc.). Nucleotide sequence data of GRA12 are available in the GenBank under the Accession No. ACH87600.

The TwinScann_0092 sequence was analysed using the secondary structure prediction methods available at the Expert Protein Analysis System proteomics server (<http://kr.expasy.org>). Protein sequence alignments were carried out using the ClustalW program (Thompson et al., 1994).

2.4. Production of a recombinant GST-tagged TwinScann_0092 protein in *Escherichia coli* and production of a specific antiserum

In order to produce a recombinant protein (rTw92), the complete TwinScann_0092 protein was produced as a GST fusion protein in *E. coli*. The complete cDNA sequence of TwinScann_0092

was extracted from pZBTw92 by digestion with *Sma*I and *Nco*I, purified and cloned between the *Sma*I and *Nco*I sites of the prokaryotic expression vector pGEX-4T3 (Pharmacia) to generate pGEX-Tw92. Expression of rTw92 in *E. coli* C41 was obtained by induction with 0.5 mM isopropyl 1-thio- β -galactopyranoside for 4 h. The bacterial pellet was dispersed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) supplemented with a complete mixture of protease inhibitors (Roche Applied Science) and cells were broken using a French press (ThermoSpectronic) at 20,000 p.s.i., then centrifuged at 12,000g for 15 min. The fusion protein was purified by electroelution after SDS-PAGE under denaturing conditions. A rat was immunised s.c. with 100 µg of electroeluted rTw92 in FCA and boosted every two weeks with two successive injections of 50 µg of rTw92 in incomplete Freund's adjuvant. Some pre-immune serum was collected prior to the initial injection and the rat anti-rTw92 serum was collected 3 weeks after the final boost and tested for specificity by indirect immunofluorescence assay (IFA) and immunoblot.

2.5. Expression of a Ty-tagged TwinScann_0092 protein in *T. gondii*

The plasmid *prob92ty* was designed to express the complete ORF of TwinScann_0092 under the control of the *T. gondii* tubulin promoter (TUB) and the 3' untranslated region of *sag1*. It was constructed by PCR amplification of the complete ORF from pZBTw92 using both the primers ML206 (5'-AGATCTATGAGGGCGATC-GTGGCATCA-3'; *Bgl*III site underlined) and ML207 (5'-CCTAGGGTTCGTTGCTTGCCAGAG-3'; *Avr*II site underlined), and cloning into the *Bgl*III and *Avr*II sites of *prubmic3M1C3* vector (M. Lebrun, unpublished data). The plasmid *prob92ty* allows the expression of TwinScann_0092 in C-terminal fusion with the Ty tag and it contains an HXGPT selection cassette. The construct was verified by sequencing.

Transfection of parasites was conducted as described previously (Reiss et al., 2001). Over-expression of TwinScann_0092-Ty in Δ HX parasites was obtained by electroporation of 100 µg of *prob92ty* plasmid into Δ HX parasites. After overnight recovery, transfectants were positively selected for the integration of the HXGPT cassette with 25 µg/ml mycophenolic acid and 50 µg/ml xanthine for three passages before cloning by limiting dilution under drug selection. Stable transgenic parasite clones dubbed Tw92-Ty were identified by IFA with anti-Ty antibodies.

2.6. Immunoblotting

Freshly released tachyzoites were boiled in SDS-PAGE sample buffer containing 2- β -Mercaptho-Ethanol (when specifically indicated) and separated on 10% or 12% polyacrylamide gels calibrated with M_r markers (Bio-Rad). Proteins were electro-transferred to nitrocellulose using a semi-dry procedure. Membranes were blocked for 1 h with saturation solution (5% non-fat dry milk in 15 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (TNT)) and incubated overnight with primary antibodies in saturation solution. After washes, the strips were incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse, anti-rat or anti-rabbit IgG (H+L) serum (Pierce) diluted 1:7000 in TNT and stained with BCIP-NBT (Pierce). Detection of the immunopurified proteins and of the fractionated proteins (see below) was performed using peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rat IgG (H+L) serum (Jackson) and signals were detected using the Supersignal ECL system (Pierce Chemical).

2.7. Immunolocalization experiments

For IFAs of intracellular parasites, confluent HFF monolayers were infected for 24 h with Δ HX tachyzoites or Tw92-Ty parasites,

washed in PBS and fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS. After three washes, cells were permeabilised for 10 min with 0.2% Triton X-100 in PBS and blocked for 30 min with 10% FCS in PBS (10% PFCS). The infected cells were incubated for 45 min with primary antibodies diluted in PFCS 2X, washed and then incubated with secondary antibodies (Alexa 594-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa 594-conjugated goat anti-rat IgG (H+L) or Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L), Sigma). For IFA of extracellular parasites, tachyzoites were dried on IFA slides, permeabilised in acetone at -20°C for 10 min, then blocked and incubated with antibodies as above. For IFA of invading parasites, tachyzoites were allowed to sediment on confluent HFF cells at 4°C and warmed for invasion for 2, 5 or 15 min at 37°C . Invasion was stopped and infected cells were fixed by adding an excess volume of 4% paraformaldehyde in PBS. IFA was performed as described above, except that the slides were permeabilised with 0.05% saponin (Sigma). The coverslips were mounted onto microscope slides using Immunomount (Calbiochem). All the observations were performed on a Leica DMRA2 microscope equipped for epifluorescence and images were recorded with a COOLSNAP CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ). Gimp 2.1 was used for image processing. Image acquisition was performed on workstations at the Montpellier RIO Imaging facility.

2.8. Electron microscopy

Infected cells were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde/0.05% glutaraldehyde in 0.2 M NaPO_4 buffer, washed in 10X PFCS, dehydrated in ethanol, infiltrated overnight at -20°C in LR White resin which was then polymerised at 37°C for 5 days. Ultrathin sections were floated successively on 5% milk in PBS containing 0.01% Tween 20 (PBSTM), rat anti-rTb92 serum diluted 1:10 in PBSTM, goat anti-rat IgG (H+L) serum diluted 1:200 in PBSTM, 10 nm Protein A-gold diluted in PBS to an O.D. of 0.05 at 525 nm, with 5×3 min washes in PBS containing 0.01% Tween 20 between each step. Sections were finally stained with 2% uranyl acetate in water and observed with a JEOL 1200EX II electron microscope.

2.9. Gel fractionation experiments

Cell fractionation of overnight-infected cells was carried out as described previously (Sibley et al., 1995). Briefly, following mechanical disruption of host cells by syringing and elimination of intracellular parasites, the soluble fraction (HS3 for high-speed supernatant) was separated from the membrane-associated fraction (HSP for high-speed pellet) by ultracentrifugation for 1 h at 100,000g. The HSP fraction was treated for 30 min on ice with denaturing agents (0.5 M KCl, 0.1 M Na_2CO_3 , pH 11, 6 M urea, 1X Nonidet P-40 (NP-40) or 10X Triton X-114) or with 50 mM Tris pH 8 as a control. After ultra centrifugation for 1 h at 100,000g, equal fractions of pellets and supernatants were analyzed by immunoblot.

2.10. Affinity chromatography purification of GRA2-HA-FLAG from extracellular parasites and from vacuolar fractions

GRA2-HA-FLAG was purified from extracellular parasites and from vacuolar fractions as recently reported (Braun et al., 2008). Briefly, parasite lysates, the soluble fraction (HS3) or the solubilised membranous fraction (HSPsol) (see above) from overnight infected cells were incubated with an 8-FLAG M2 affinity gel (Sigma). After extensive washes with rinsing buffer (20 mM Tris [pH 7.9], 500 mM KCl, 10% glycerol, 0.2 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)), the bound proteins were eluted with the same buffer containing 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FLAG peptide (Sigma). Eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblot.

2.11. Immunoprecipitation

Five hundred million extracellular parasites were solubilised overnight at 4°C in NP-40 lysis buffer (1X NP-40 in NET buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 150 mM NaCl, 4 mM EDTA, 1 mM PMSF) overnight at 4°C under rotary agitation, and then centrifuged for 1 h at 16,000g. The supernatant was collected for immunoprecipitation. The immunosorbent was prepared by incubating 25 μl of antiserum with 25 μl of Protein G-Sepharose 4B (Sigma) for 2 h in 1 ml of NP-40 lysis buffer. The immunosorbent was incubated overnight with *Toxoplasma* lysate under rotary agitation at 4°C . Elution was performed with SDS-PAGE sample buffer.

3. Results

3.1. Analysis of the *Twinscann_0092* amino acid sequence

A combination of 5'RACE and cDNA sequencing were used to determine the complete coding sequence of *Twinscann_0092*. The gene is composed of three exons interrupted by two introns (data not shown). Following the ATG initiation codon of translation, a hydrophobic region of 20 amino acids (positions 20–39) is likely to constitute a potential signal peptide, the cleavage site of which (GA-AD) being predicted between the positions 38 and 39. *Twinscann_0092* is predicted to be a protein of 436 amino acids with a theoretical molecular weight of 47.9 kDa and a calculated pI of 9.2. A second hydrophobic region (94–115) is predicted to constitute a potential transmembrane domain using the TMpred prediction program (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) (Supplementary Fig. S1). No sequence motif was revealed when the *Twinscann_0092* amino acid sequence was scanned using the PROSITE program (<http://www.expasy.org/prosite/>). A portion of the amino acid sequence (35.55–51.1%) is predicted to adopt an α -helix-helical secondary structure using the Garnier (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto.nsp?page=npsa_gor4b.html). Porter (<http://distill.ucd.ie/porter/>) or PolPred (<http://biolin.fsu.edu/academic/polpred/>) programs available at the expasy website, HELICAL WHEEL (http://www-nmr.csbm.rutgers.edu/biolinformatics/Pasteomic_tools/Helical_wheel/) analysis of *Twinscann_0092* did not reveal any parallel amphipathic α -helices. No glycolipid anchor sequence was predicted. A potential site of N-glycosylation and a potential site of sumoylation were predicted at the positions 128 and 147, respectively (data not shown).

Scanning of the GenBankTM non-redundant database failed to reveal any sequence similarity. A search of www.toxodb.org identified three paralogs, 64.m00340, 64.m00341 and 41.m01269. These sequences display around 30% identity with *Twinscann_0092*, with a perfect alignment of four cysteines (Supplementary Fig. S1). The putative 64.m00340 and 64.m00341 genes are tandemly repeated on chromosome 3. BLAST homology searches with ApiDB revealed an homolog gene in the closely related parasite *Neospora caninum*. Data from expressed sequence tags (ESTs) and from proteomic analysis available on the ToxoDB.org web site showed that 64.m00341 and 41.m01269 are expressed in both tachyzoites and bradyzoites. Only one EST corresponding to 64.m00340 was found in tachyzoites. In addition, no peptide was recovered from the proteomic analysis, indicating that 64.m00340 is possibly, if at all, expressed at this stage.

Twinscann_0092, referred to as GRA12, is a GRA which associates with the intravacuolar MNV.

The expression and the subcellular localisation of *Twinscann_0092* were investigated using a rat serum (anti-rTb92) directed against a recombinant *Twinscann_0092* expressed in fusion

with GST in *E. coli*. Immunoblot analysis of whole tachyzoite homogenate in reduced conditions showed a band at a n apparent molecular weight of the expected size (49 kDa) as well as a fainter band of lower intensity (Fig. 1A). In non-reduced conditions, TwinScann_0092 migrated faster (45 kDa) (Fig. 1A). These bands were absent when similar blots were probed with the pre-immune serum (Fig. 1A) or anti-GST serum (data not shown). The subcellular localization of TwinScann_0092 was studied by IFA on extracellular parasites and fully permeabilised (0.2% Triton X-100) intracellular parasites 18 h p.i. In extracellular parasites, the anti-rTw92 serum detected TwinScann_0092 as small dots co-localising exactly with GRA3 (Fig. 2Aa, upper panels [see comment in figure legends]); in contrast, TwinScann_0092 failed to co-localise with the thopytry protein ROP2 (Fig. 2Ab). In intracellular parasites, Tw92 was detected in the PV, co-localising with GRA2 (Fig. 2Ad) but not with GRA3 (Fig. 2Ac). The labelings of TwinScann_0092 in both extracellular and intracellular parasites were not observed when an anti-GST serum or the pre-immune serum were used as controls (data not shown). The localization of TwinScann_0092 in both extracellular and intracellular parasites is typical of that of GRA6. Immunoelectron microscopy of intracellular tachyzoites confirmed the dense granule localisation of the TwinScann_0092 protein (Fig. 2C). More precisely, the co-localization with GRA2 but not GRA3 in the PV suggested that this protein would be associated with the MNN that lies within the PV (Sibley et al., 1995). This association was confirmed by immunoelectron microscopy (Fig. 2D).

In order to verify the specificity of the anti-rTw92 serum, we generated a stable parasite line expressing a C-terminally Ty-tagged TwinScann_0092 protein. Immunoblot analysis of this transgenic parasite lysate using the anti-rTw92 serum showed a profile similar to that obtained for the wild-type parasite lysate, with an additional slower migrating band (Fig. 1B). This band was also detected with the anti-Ty mAb, confirming that it corresponded to the exogenous Ty-tagged version of the protein. Together, these results demonstrated that the 49 kDa band corresponds to the endogenous full-length TwinScann_0092 (Fig. 1B). By IFA on transgenic parasites expressing the Ty-tagged TwinScann_0092 protein, the anti-Ty mAb reacted on the vacuolar

space, with a perfect co-localisation with the staining obtained when using rat anti-rTw92 serum (Fig. 2B).

Together and according to the nomenclature proposed by Sibley et al. (1991), TwinScann_0092 which is a GRA associated with the intravacuolar MNN should be named GRA12.

3.3. GRA12 is transferred to the posterior pocket of the parasite following its secretion into the vacuole

In order to analyse the traffic of GRA12 during or following invasion of the host cell, HFFs were challenged for 2, 5, 10 or 15 min with *AHX* tachyzoites, fixed and selectively permeabilised with 0.05% sodium to gain access to the PV but not to the parasite organelles (Carruthers and Sibley, 1997). Double IFA using the rat serum anti-GRA12 and the rabbit serum anti-GRA2 showed a perfect co-localisation of both proteins (Fig. 3A). They were first localised at the anterior pole 5 min post-invasion (Fig. 3Aa). Ten min post-invasion, they were observed on both sides of the parasite (Fig. 3Ab) and then found concentrated as overlapping dots of fluorescence at the posterior end of the parasite 15 min post-invasion (Fig. 3Ac).

Since GRA12 was first detected by mass spectrometry analysis of proteins retained on an anti-RON4 affinity column and since the protein transiently localises at the posterior end of the parasite within minutes after invasion, in a region where RON4 is detected when the moving junction is pinched off at the end of invasion (Lebrun et al., 2005), double IFA of GRA12 and RON4 was performed during the course of invasion. As expected, when invading parasites were incubated with mAb anti-RON4, the protein was detected at the moving junction during invasion (Lebrun et al., 2005). In contrast, the GRA12 signal remained negative at that stage (Fig. 3Ba), confirming that dense granule secretion occurs later than that of thopytry proteins. Five minutes post-invasion (i.e. after closure of the PV membrane), when RON4 was already detected as a posterior fluorescent dot which corresponds to the residual moving junction, GRA12 was secreted from the anterior pole (Fig. 3Bb). Fifteen min post invasion, the posterior dot corresponding to the residual moving junction (detected with the anti-RON4) did not overlay the dot corresponding to the forming MNN (detected with the anti-GRA12 serum); suggesting that GRA12 and RON4 do not interact (Fig. 3Bc). To definitively exclude the possibility of such an interaction, the rat serum anti-rTw92 was used to immunoprecipitate GRA12; while GRA12 was immunoprecipitated efficiently, none of the proteins of the junctional complex could be detected (Supplementary Fig. S2). Conversely, GRA12 (revealed with the specific rat serum) failed to be detected when RON4 (Supplementary Fig. S2), RON2 or AMA1 (not shown) were selectively immunoprecipitated, showing that GRA12 does not belong to the RON-AMA1 complex and was non-specifically recovered with the moving junction protein complex in our initial proteomic analysis.

Consecutive to the loss of GRA2, GRA6 is still secreted into the PV but fails to be detected at the posterior end of the parasite shortly after invasion (Mendler et al., 2002). To examine whether the loss of GRA2 would affect the posterior trafficking of GRA12, HFF cells were pulse-invaded for 10 min with the *AGRA2-RNG/R7* mutant, fixed, selectively permeabilised and incubated with both the rat serum anti-GRA12 and the rabbit serum anti-GRA6. Similar to what was observed for GRA6, GRA12 failed to be detected at the parasite posterior end (labeled by anti-RON4) following its secretion into the PV (Fig. 3C).

3.4. Following its secretion in the PV, GRA12 partitions as both a soluble and a membrane-associated protein

To analyse the biochemical properties of GRA12 within the vacuolar compartment, HFF cells infected for 18 h were mechanically disrupted in absence of calcium, in order to separate the intracellular

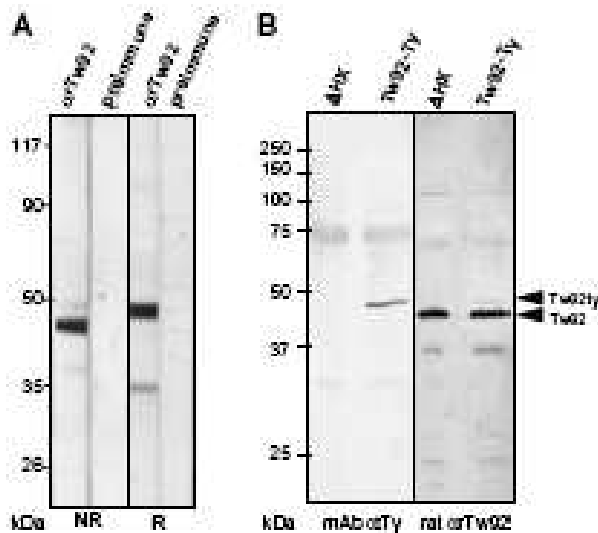


Fig. 1. TwinScann_0092 is a 49 kDa protein. (A) Immunoblot of *AHX* tachyzoite lysate probed with rat serum anti-rTw92 or pre-immune serum, under reduced (R) and non-reduced conditions (NR). (B) Immunoblot of *AHX* tachyzoite lysate and of Tw92-Ty transgenic tachyzoites with the monoclonal antibody (mAb) anti-Ty or the rat serum anti-rTw92, in non-reduced conditions. TwinScann_0092 (Tw92) as well as Tw92-Ty (Tw92Ty) are indicated by arrowsheads.

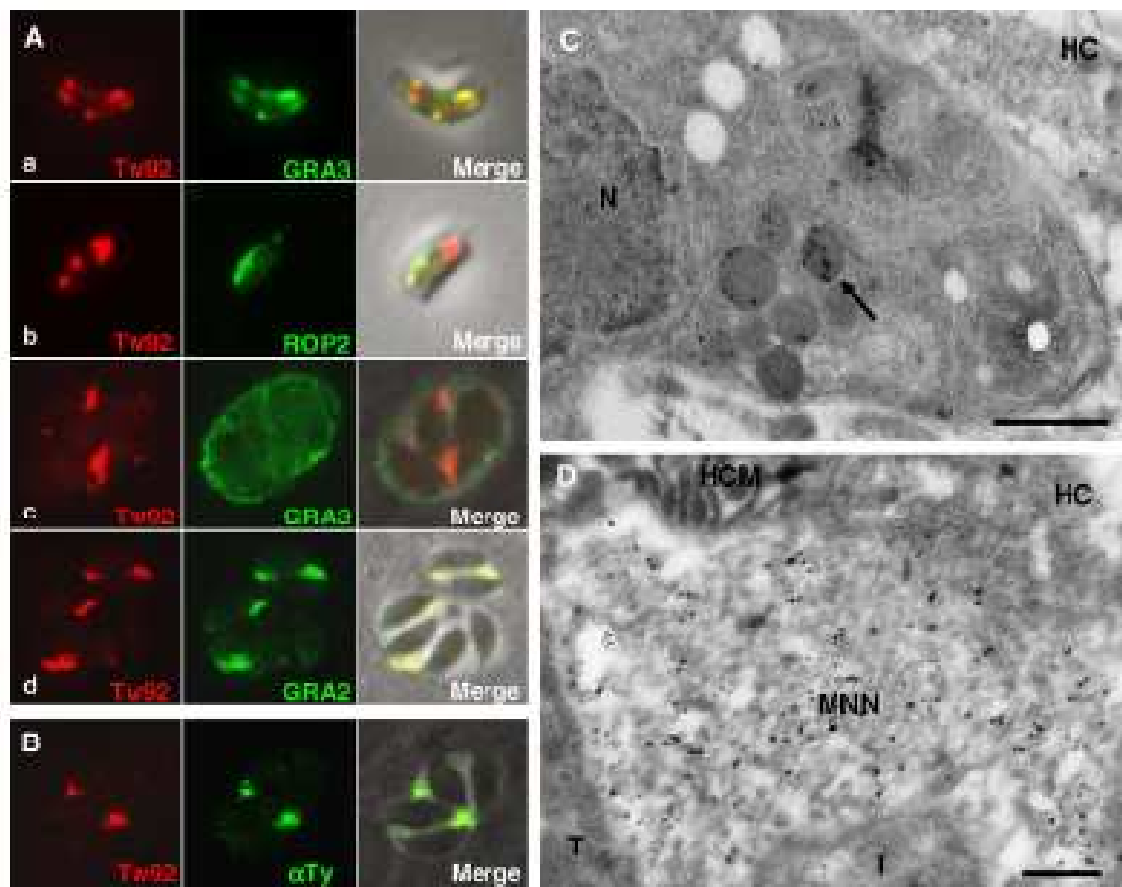


Fig. 2. TwinStam_0092 is a dense granule protein named GRA12. (A) Indirect immunofluorescence assay performed on wild-type extracellular parasites (a and b) or on human fibroblast (HFF) cells infected for 18 h with wild-type parasites (c and d) and incubated with the rat serum anti-Tw92 (a–d), with the rabbit serum anti-GRAs (a and b), with the rabbit serum anti-ROP2 (b) or the rabbit serum anti-GRAs (d). (B) The Ty tagged version of TwinStam_0092 was detected within the vacuolar space using the anti-Ty monoclonal antibody, in perfect co-localisation with GRA12, detected with the rat serum anti-Tw92. (C–D) Immunogold detection of TwinStam_0092 on sections of HFF cells infected overnight with wild-type parasites and incubated with rat serum anti-Tw92. Gold particles were found on dense granules (arrow) and on the membranous reticular network (MNR). HC, host cell; HCM, host cell mitochondrion; N, nucleus; T, tachyzoite. Bar: 0.2 μ m (C), 0.2 μ m (D).

parasites from the vacuolar and host cell membranes. Similar to GRA2 (Sibley et al., 1995) and GRA3, GRA12 was found in both the soluble and the pelletable material while soluble GRA1 (Sibley et al., 1995) fractionated entirely into the HSS fraction (Fig. 4A). To investigate the nature of the interactions established between GRA12 and the vacuolar membranes, the HSP fraction was treated with several destabilizing agents and after high speed centrifugation, the different fractions were analysed by immunoblot. Like both GRA2, which is targeted to the MNR and GRA3 (which is targeted to both the MNR and the PV membrane), GRA12 was completely resistant to solubilisation by 0.5 M HCl and 0.3 M Na_2CO_3 . Like GRA2, GRA12 was mostly resistant to 6 M urea. Similarly to both GRA2 and GRA3, GRA12 was also almost completely solubilised by non-ionic detergents, such as NP-40 and Triton X-114 (Fig. 4B). Together, these results indicated that GRA12 behaves as an integral protein within the membranes of the intravacuolar network.

3.5. GRA12 is associated with GRA2 within the parasite and the PV soluble compartment, but this association is not maintained in the PV membranes fraction

Since most of the GRA proteins identified to date form high molecular weight complexes within the parasite (Braun et al.,

2008), we examined whether GRA12 would form stable associations with other GRA proteins within the dense granules. To this end, GRA2 knock-out parasites stably complemented with an HA-FLAG tagged GRA2 were used to purify GRA2-HA-FLAG by affinity chromatography on the FLAG resin (Fig. 5A, left panel), as previously described (Braun et al., 2008). GRA12 was co-eluted with GRA2-HA-FLAG (Fig. 5A, right panel), indicating that GRA12 may interact with GRA2 or other GRA2-associated proteins. As a control, an unrelated HA-FLAG tagged *T. gondii* protein was purified similarly, and no GRA12 could be found in the corresponding eluate (not shown).

Most of the GRA proteins were recently shown to interact with the PV soluble fraction but surprisingly, most of these interactions are lost consecutive to their membrane association (Braun et al., 2008). Purification of GRA2-HA-FLAG from the PV soluble fraction (Fig. 5B, left panel) led to the detection of GRA12 (Fig. 5B, right panel). By contrast, using the same conditions of stringency as those previously reported (Braun et al., 2008), GRA12 failed to be detected with GRA2-HA-FLAG purified from the solubilised vacuolar membranes (Fig. 5C).

Taken together, these results showed that GRA12 interacts with other GRA proteins in the parasite, that this interaction is maintained after secretion into the vacuole but that it is lost after its post-secretory membrane insertion.

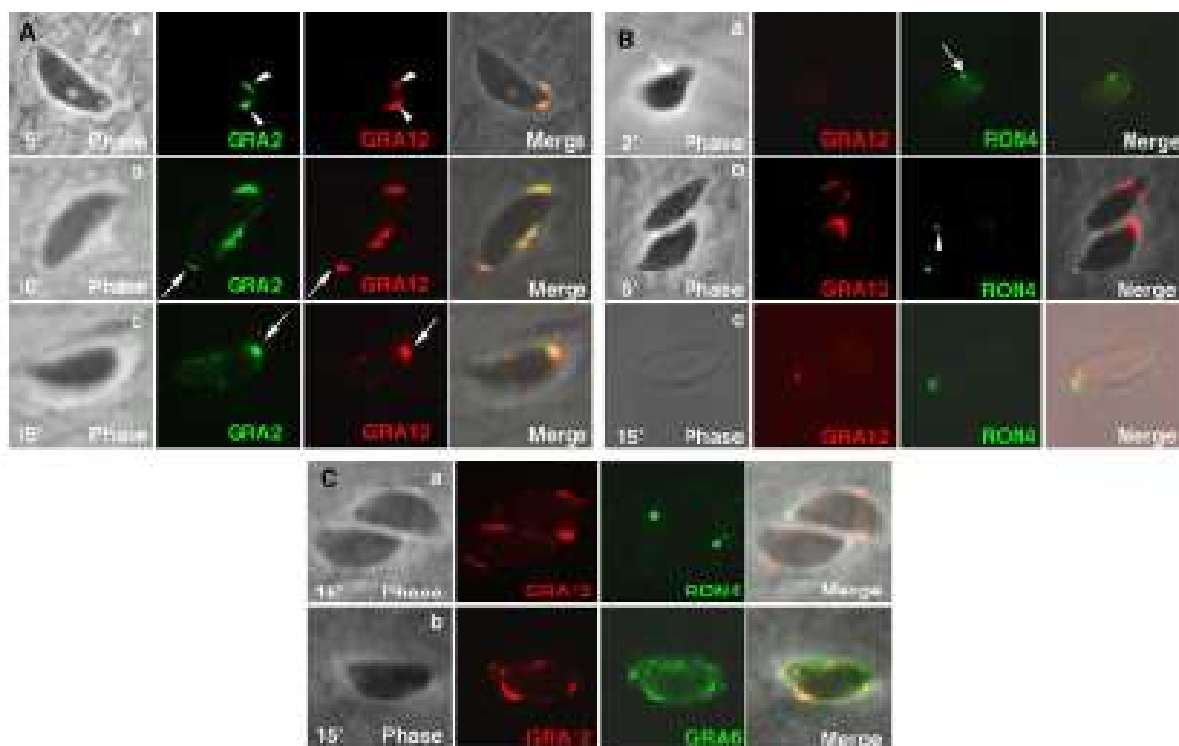


Fig. 3. GRA12 co-localizes to the posterior end of the parasite shortly after invasion. (A) Indirect immunofluorescence assays (IFA) of tachyzoites from tachyzoite (TGT) cells pulse-invasion for 5 min (a), 10 min (b) or 15 min (c) and incubated with both the rat serum anti-rGRA2 and the rabbit serum anti-rGRA1. Arrowheads indicate the anterior pole of the parasite and arrows, the posterior site of fluorescence. (B) Double IFA performed on TGT cells pulse-infected for 2–15 min with both the rat serum anti-rGRA2 and the mAb anti-RON4. RON4 decorates the moving junction (arrow, a) and later, the posterior residual structure from the moving junction (arrowhead, b). Despite their common posterior localization, RON4 and GRA12 did not co-localize (c). (C) Localization of GRA12 in the GRA2-MAGPST strain 15 min post-invasion. Double IFA with the rat serum anti-rGRA12 and the mAb anti-RON4 (a) or with the rat serum anti-rGRA12 and the rabbit serum anti-rGRA6 (b).

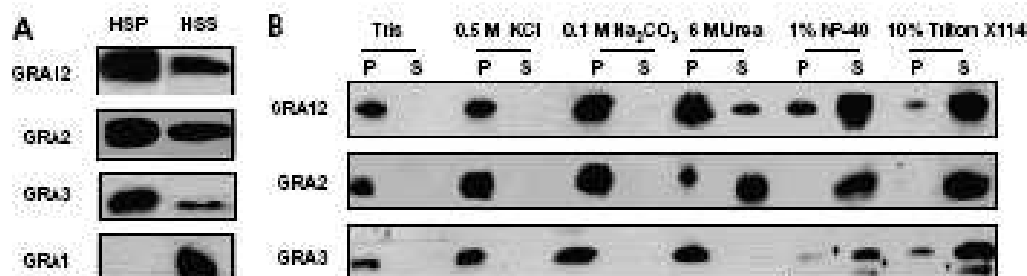


Fig. 4. GRA12 behaves as a basic soluble and non membrane protein in the vacuolar space. (A) Vacuolar proteins were fractionated between a soluble (HSP) and a membrane-associated form (HSS). Membranes were probed with the rat serum anti-rGRA12, the mouse IgG antibody (mAb) anti-rGRA2, the rabbit serum anti-rGRA3 or the mAb anti-rGRA1. (B) The HSP fraction was treated with several agents to stabilizing membrane proteins (0.5 M KCl, 0.1 M Na_2CO_3 , pH 11, 6 M Urea, 1% NP-40 or 10% Triton X-114) or with 50 mM Tris pH 8 as control. Fractions were analyzed by immunoblot using either a rat serum anti-rGRA12, the mAb anti-rGRA2 or the rabbit serum anti-rGRA3.

4. Discussion

The present study identified in *T. gondii* a novel dense granule resident protein that we have named GRA12. Similar to most GRA proteins, GRA12 is a relatively small protein (49 kDa) although it has the highest M_r described so far. It does not show any significant similarity with known proteins except with an ortholog in *Neospora*, the closest Apicomplexa parasite. Three paralogs were found in the *Toxoplasma* genome (64m00340, 64m00341, 41m01269) that display 38.7%, 23.11% and 23.4%

identity with GRA12, respectively. Two of these paralogs (64m00340 and 64m00341) are tandemly repeated on chromosome III. A perfect alignment of four cysteine residues was observed between the four paralogs (Supplementary Fig. S1). This amino acid is under-represented in the other GRA proteins (Merclier et al., 2005). Presence of these cysteines could indicate a disulfide bond-dependent conformation of the protein. Western blot analysis under reduced and non-reduced conditions showed that the cysteines are not engaged in intermolecular disulfide bonds, but the slight shift observed reflects the occurrence of intramolecular

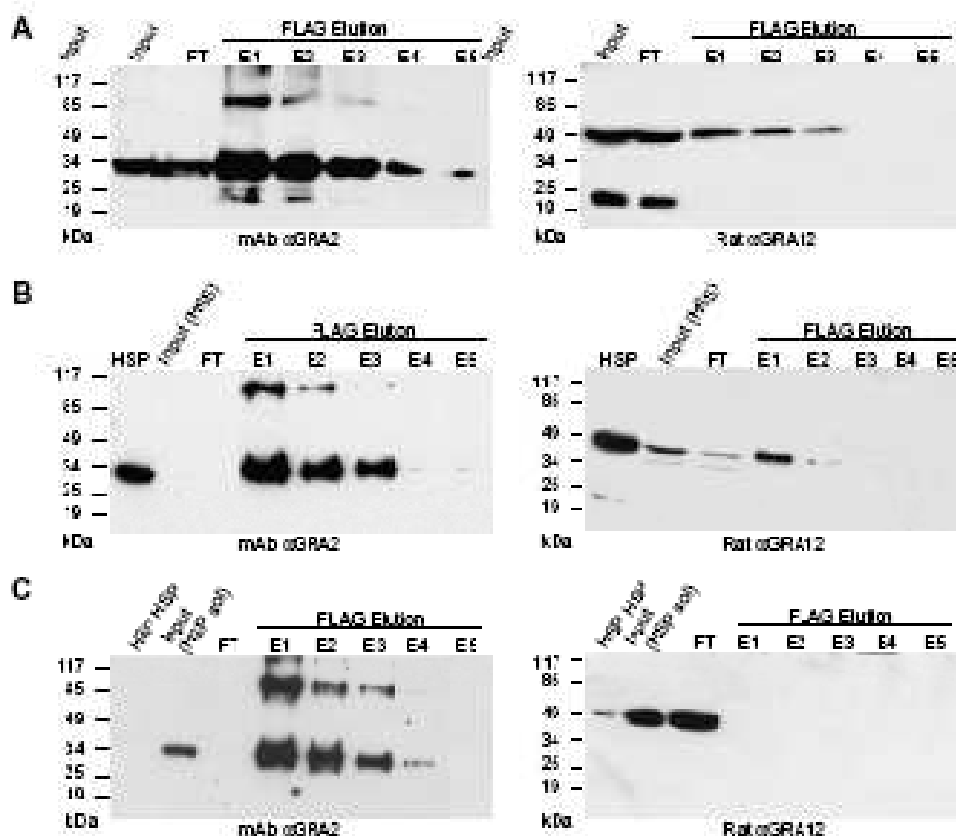


Fig. 5. GRA12 is co-purified with GRA2-3HA-FLAG from both the parasite whole cell extract and from the vacuolar soluble fraction. (A) GRA2-3HA-FLAG was affinity purified with an anti-FLAG M2 affinity column. Proteins that did not attach to the resin were collected (flow through, FT) and proteins linked to the FLAG resin were eluted with the FLAG peptide. The elution fractions (E1–E5) were analysed by immunoblot using the monoclonal antibody (mAb) anti-GRA2 (left column) or the rat IgG anti-GRA12 (right column). (B and C) Cells infected overnight with the non-invasive parasite expressing GRA2-3HA-FLAG were fractionated as indicated in the Section 2. After separation of the vacuolar soluble fraction (HSP) from the vacuolar and host cell membranes (HSP) by ultracentrifugation, the membranes (HSP) were solubilised with 0.5% NP-40. The membranous solubilised fraction (HSPsol) was separated from the membranous insoluble fraction (HSPinsol) and GRA2-3HA-FLAG was purified by affinity chromatography on a FLAG resin from the HSP (B) and from the HSPsol fraction (C). The elution fractions were analysed by immunoblot using the mAb anti-GRA2 (left column) or the rat serum anti-GRA12.

disulfide bonds). Disulfide bonds were described for microneme and surface proteins (Lekatsis et al., 2001; Lebrun et al., 2007), which are involved in multimeric interactions with host ligands. Whether these disulfide bonds are necessary for the function of the protein or for its interactions with specific partners remains to be investigated.

At the end of invasion, GRA12 is secreted from the anterior part of the parasite, which further confirms the findings of others concerning all the GRAs described to date (Cebbron-Delauw et al., 2006) and the direct observation of dense granule exocytosis reported previously (Lerliche and Dubremetz, 1990; Dubremetz et al., 1993). The protein then traffics to the posterior pole of the parasite where the MINN develops in the invaginated posterior pocket within 10–20 min post-invasion. GRA12 is later found associated with this membranous network that unfolds throughout the vacuolar space, forming elongated nanotubes that connect with the PV membrane (Nikolich et al., 1993; Sibley et al., 1993). The fact that GRA12 is found as a posterior dot with GRA1 and GRA6 where the MINN is assembled (Sibley et al., 1993; Labryère et al., 1999) suggests that the protein would also be involved in the genesis of the network, but this will have to be further investigated. We will have to wait for a GRA12 knock-out mutant to decipher

the exact function of GRA12 in MINN formation. Dense granules are distributed throughout the entire parasite body. Secretion at the posterior end, where the MINN forms, would thus be considered a priori. However, fusion of dense granules to the posterior end has never been observed by transmission electron microscopy (TEM), whereas apical lateral secretion has been observed (Lerliche and Dubremetz, 1990). More importantly, 2 min post-invasion, when dense granule proteins are observed on the subapical end of the parasite, the MINN is not yet assembled at the posterior end. Together, these data are not in favour of a bulky posterior expulsion of the MINN containing GRA proteins. How GRA2, GRA6 and GRA12 migrate in a directed manner towards the parasite posterior end soon after secretion thus remains to be investigated.

Using parasites knocked-out for *grm2* and/or *gru6*, GRA2 was shown to play a prominent role in the formation of multivesicular clusters during the initial stage of MINN assembly at the posterior end of the parasite (Mencier et al., 2002). The integrity of the MINN is dependent on the expression of GRA6, the localisation of which at the posterior end requires GRA1 (Mencier et al., 2002). Here we showed that in absence of GRA7, GRA17, similar to GRA6, fails to traffic to the parasite posterior end. These results thus showed that, as for GRA6, the GRA2-induced initial formation

of a cluster of multivesicular vesicles at the parasite posterior end is essential for the localisation of GRA12 to this pocket. Whether GRA12 contribute to the multivesicular vesicular structure organised when GRA6 is missing remains to be established and would need suppressing GRA12 expression in the GRA6KO background.

Following secretion from dense granules, GRA12, like most of the GRA proteins, is detected as both a soluble and a membrane-associated form within the vacuolar space, the latter being predominant. Solubilisation of the membrane-bound fraction was achieved only with non-ionic detergents, showing that GRA12 behaves as an integral membrane protein, GRA12, which is predicted to contain a central hydrophobic alpha-helix similar to GRA1, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7 and GRA8 (Mencier et al., 2005), could thus be associated with the MNN by this central transmembrane domain.

Braun et al. (2008) have recently shown that the GRA proteins interact together within both the parasite and the soluble fraction of the PV and that they form high molecular weight complexes within the parasite. We show herein that soluble GRA12 is also present in the GRA core complex within the dense granules and the PV soluble fraction and that, similar to the other GRA proteins (Braun et al., 2008), this interaction is consequently lost to membrane insertion. It has been postulated that these interactions favor solubility of the GRA proteins in the lumen of the dense granules by sequestering their hydrophobic domains in the interior of the complexes (Braun et al., 2008; Cesbron-Delauw et al., 2005). Upon secretion as soluble proteins, the complexes of GRA proteins are thus likely to dissociate so that specific GRA proteins associate with the PV membrane or the MNN. The fact that GRA12 displays the same “solubility/complex association” versus “insolubility/complex dissociation” as that described for both the GRA7 and GRA5 protein partners (Braun et al., 2008) indicates that this mechanism of solubility by compaction into core complexes is probably common to many GRA proteins.

GRA12 is the third dense granule protein known to be exclusively associated with the network membranes in the PV of *T. gondii*, despite continuity between the MNN and the PV membrane. The reason for this restriction in protein lateral mobility remains unknown, but may be related to a different lipid composition between these two types of membranes (Cesbron-Delauw et al., 2008). Further investigations on the contribution of GRA12 in the MNN genesis may help in understanding the biological significance of this unique organelle at the parasite–host cell interface.

Acknowledgements

Thanks go to I.D. Sibley for the polyclonal antibodies against GRA2 and GRA6, to J.C. Boothroyd for the anti-AMA1 mAb and to K. Musser for cell culture. This work was supported by ANR-06-MINE-024-31.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijpara.2008.07.011.

References

- Abama, M., Miller, L.H., Adams, J., Klotzel, J., 1979. Systemic primary of cerebral parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J. Cell Biol.* 7, 21–32.
- Alexander, D.L., Ward, C.E., Bradley, P., Boothroyd, J.C., 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between dense secretory organelles. *Mol. Pathog.* 1, e11.
- Bahtz, P., Rappachinski, Z., Muchewska, K.L., Gull, K., 1996. A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 229–239.
- Balazadeh, D., Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Jouve, S.A., 2004. Cloning of a cDNA encoding the dense granule protein GRA1 from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69, 247–257.
- Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, Q., Alexander, D.L., Collier, S., Cosentino, C.M., Dunn, J.D., Ferguson, D.J., Huettemann, S., Young, J.P., Boothroyd, J.C., 2005. Genomic analysis of rhogony genes reveals many novel components for host–parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 280, 34245–34258.
- Braun, L., Tavira, I., Kiehl, S., Musser, K., Garcia, L., Mencier, C., Cesbron-Delauw, M.F., 2008. Purification of *Toxoplasma gondii* protein vesicles that they are in complex through the secretory pathway. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157, 13–21.
- Cesbron-Delauw, M.F., Sibley, L.D., 1997. Regulated protein secretion from dense granules organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Int. J. Cell Biol.* 76, 114–123.
- Cesbron-Delauw, M.F., Garcia, C., Tavira, I., Ruffier, P., Mencier, C., 2005. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic* 6, 657–664.
- Chen, H., Dorey, F., Topfer, C., Cesbron-Delauw, M.F., Capoen, A., 1993. *Toxoplasma gondii* characterization and localization of antigens released from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 71, 114–124.
- David, R.C., Casey, S., Ullman, B., Ross, D.S., 1998. Intronless tagging, cloning and expression of the *Toxoplasma gondii* tyrosine–serine–threonine–glutamine phosphatase catalytic domain gene *Grp1* as a selectable marker for stable transfection. *J. Biol. Chem.* 273, 14810–14819.
- Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Mercader, D., Jouve, S.A., 1993. Kinetics and pattern of organelle egress during *Toxoplasma gondii* host–cell invasion. *Parasitol. Res.* 79, 402–408.
- Dubremetz, J.F., 2001. Rhogones are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol.* 9, 841–848.
- Hall, A.B., Leblond, C., Coloe, M.E., Bradley, P.L., Dubremetz, J.F., Cesbron-Delauw, M.F., Boothroyd, J.C., 2000. *Toxoplasma gondii* hemolysin of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect. Immun.* 68, 7078–7086.
- Lafont, S., Rogier, M., Mencier, C., Sibley, L.D., 2000. Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 with the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 132, 311–324.
- Lehman, M., Michelin, A., El Haj, H., Ponsot, J., Bradley, P.J., Hall, H., Dubremetz, J.F., 2005. The rhogony nucleoprotein ROP60 localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol.* 7, 1023–1033.
- Lehman, M., Caruthers, V.B., Cesbron-Delauw, M.F., 2001. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their roles in cell invasion and intracellular survival. In: Viala, I.M., Kim, K. (Eds.), *Toxoplasma gondii: the road to apicomplexan speciation and methods*. Academic Press, London, UK, pp. 265–300.
- Leblond, C., Ferguson, D.J., Crigg, M.E., Camp, M., Boothroyd, J.C., 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii* vacuoles in adherent cells. *J. Parasitol.* 91, 1205–1207.
- Leitch, M.J., Dubremetz, J.F., 1990. Egress of *Toxoplasma gondii* from granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol. Res.* 76, 529–532.
- Mencier, C., Dubremetz, J.F., Raucher, B., Brocchini, L., Sibley, L.D., Cesbron-Delauw, M.F., 2002. Disruption of an endoplasmic network in *Toxoplasma parasitophorous vacuole* is induced by parasite invasion. *Mol. Biol. Cell* 13, 2007–2020.
- Mencier, C., Adjobi, K.D., Dubremetz, W., Delauw, M.F., 2005. Dense granules are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexan parasites? In: *J. Parasitol.* 35, 829–849.
- Michelin, A., Mencier, J.F., Sibley, L.D., 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* in a highly active penetration of the host cell. *J. Cell Sci.* 108 (Pt. 6), 2457–2464.
- Mitchell, B.A., Chappas, M.L., O'Connor, C.R., 1998. Secretion from a rhogony of *Toxoplasma gondii* during host–cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 10, 85–95.
- Reza, M., Heilig, N., Brecht, S., Fournace, M.M., Soret, M., Di Cristina, M., Dubremetz, J.F., Soldati, D., 2001. Identification and characterization of an enzyme for two secretory pathways in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* 152, 963–970.
- Sibley, L.D., Phillips, J.R., Boothroyd, J.C., 1991. Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today* 7, 327–328.
- Sibley, L.D., Meunier, J.R., Parmentier, S.L., Cesbron-Delauw, M.F., 1995. Regulated secretion of multivesicular vesicles (and incorporation of a vacuole–vacuole network) in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 108, 1669–1677.
- Soldati, D., Meunier, M., 2004. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 32–40.
- Thompson, J.D., Higgins, D.C., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4873–4882.
- Tavira, I., Bonifantou, R., Dubremetz, J.F., Musser, K., Monfaron, M., Garcia, S., Cesbron-Delauw, M.F., Mencier, C., 2005. Functional domains of the *Toxoplasma gondii* protein in the formation of the parasitophorous vacuole network of the parasitophorous vacuole. *Int. J. Parasitol.* 35, 757–773.

41.m01269	MPKFFIFHVQMRPHEHQSSIQARRHRSSPGSLPFPSSLHKT	SRVLVNIC	
64.m00340	-----METGLKERGGS		
64.m00341	-----		
80.m02161	-----MRAIVA		6
(GRA12)			
41.m01269	NYFKMRYSCRCRECGWLRVAGCVVGFVTSLLLPVAALVGOQRTGVDRGRFR		
64.m00340	RHAPRIWRGPTRHILSIRLAAFAGLTFLLAASRVSAEVGAFEGGIGDHVT		
64.m00341	MDVRYQTRGAVAAVYVLFRTVVGVAVGLHCLKIVSAEVLTHGIMSTEF		
80.m02161	STQQFLRPVGSRLAGISVVVVVALAIALGT--AADVGRHVGGFSGPFP		53
41.m01269	MNVPIINSWTTVERACLVGLPNNLVVDAMPTVDARGVQNMVVTGPSSRLCQ		
64.m00340	MHLICRSWEMHGCACFVGRPKNLVVDPVFGTYGRQPQVLETHKTGPRLCK		
64.m00341	VELRGHNWVIDSCACLLGQPRNLVVDPVLDSEFMTPOKLLTDRGTPELCS		
80.m02161	MTLRSGQWRLDHCACFVGKAKNLVVDPLPRVSPQGPQPLDVTITIGSALCW		103
	*	*****	
41.m01269	WLADRVQSHNDORGAWQKALLKEKSKYGWWRVWTRLALWQKEFSPRIIA		
64.m00340	WDELFEHQARRSEWERAEAAKSQVSMFNAVRRFKNVTVFPEFQVEI		
64.m00341	WLEKIHROHMEQKPAWLAAYQKFEKRFLLRLLGMVKGKPIFFPEFTVRI		
80.m02161	WLDSMYAAHMSLKAWEKRHOEAKNRTSWLNLWRRFANWASFPEFQIDV		153

41.m01269	TVTYFDFTDGDANPLATPWFSAIIFTYELPPADSFQVFDHLEGSFASFE-		
64.m00340	ESNYLSLFHDDWYGNQIPWMAATVKYVEP--KDGYGVFQHLNRVFAVPG-		
64.m00341	IVKHFSLWGDWRGNAQPWIAATFEYAFP-EGAGGELFLHIEKVFMEFS		
80.m02161	SVLYLDLWDDFYGHPLPWFSAEFSYTPPSGRYAYNLFDKLQSHFASAP-		202
41.m01269	GAAPKEVTLLNPSSTFNMVLPEDRP-----NEPPDVSDVFNFLGYSSE		
64.m00340	VPQAQLVFEFLLYPAPTFNQPVKLEKPGKGSIVSGFICGTGLGASVSHMR		
64.m00341	GRVAKLVHILLNPSATFNQYVELHRKSSGVPGDSGVSIGIRRTLYERDLN		
80.m02161	GTAVQEVFELLAPAPTFNQPVKEKRSIVARAATVAAGNELFKEALGHQRV		252
41.m01269	QKEQTRAYFHIKFNDIGSTPVTENLKLADFSYGGDCIILKGNFLVTWSEY		
64.m00340	GDIGDLVDLGRVIYAAVKNFTIQASLSDFWLNCGNCYMGSRFKVKGTTIQ		
64.m00341	ISHFPTADTSQISHSLAPDILTLRFAKQDFWMEGSCYILSRFVATSSIR		
80.m02161	DEVLSMVPADPFRLMLSTSAFSFQAKIGDFWERGLDCMLGSRRLNLRWDQV		302
	*		
41.m01269	RTPC SLVHEVTNSMVTAYLADKVEAVKFIARGIDFFSNIVPGIEAVVD		
64.m00340	GVTLC QFLAGEASKSVYGAYKAAKLSVHLTVTGVDLENRAQP-----		
64.m00341	GKTLCKIVSDYGHRESWMPFVGSRRKKTVALAVTAADFFNTRRP-----		
80.m02161	GTSVCRYMTAKASETGSG-LAASFINTVEVRVTGMDFFNHAP-----		344
	*		
41.m01269	KPHLIGPDGKPVLDWSNKWVKLGFLSDPLIKKLSRAKNFLSHIRAQMAV		
64.m00340	ELRCLVTEGLLLHDVHDFTVSLAVDINPOLIQHFQRTTRLASMFRRWKLI		
64.m00341	SLVAHIKEGVKLEALDKTPVVLLELVTDPVILRSYVEAARKA-----		
80.m02161	VFKTEFIEGIITKRATYIPVSMYLSLTDPTLTHEVEAAKTVKRAVQAGRVG		394
41.m01269	GLSEGIINPEKVF-----		
64.m00340	GRFLVKIGSTFMKPSQKK-----		
64.m00341	-----		
80.m02161	AALARGVNFARATNQKADESHEGQTKTPTSGVRGSAGSKHN		436

CHAPITRE II : Spécificité d'adressage des protéines GRA associées au RNM

A l'heure actuelle, il existe très peu de données sur les mécanismes qui régissent l'export et l'adressage post-sécrétoire des protéines membranaires chez les pathogènes eucaryotes intracellulaires. Plus particulièrement, les protéines GRA de *T. gondii* se caractérisent par un mécanisme d'adressage post-sécrétoire non conventionnel : suite à leur sécrétion sous forme soluble, ces protéines s'associent spécifiquement à différents compartiments membranaires vacuolaires, le RNM, les HOST ou la membrane de la VP. Au laboratoire, nous avons essayé de décortiquer le phénomène complexe d'adressage spécifique des protéines GRA vers les membranes vacuolaires en utilisant les protéines modèles GRA5, adressée à membrane de la VP ([Gendrin et al., 2008](#)) et GRA6, adressée aux membranes du RNM.

Les travaux que je présente dans ce deuxième chapitre de résultats ont pour but de mettre en lumière, le phénomène qui régit le ciblage spécifique des protéines GRA associées au RNM, en utilisant le modèle GRA6. Ma contribution à ce travail mené en collaboration avec Claire Gendrin, au sein du laboratoire ([C. Gendrin, thèse UJF, 2008](#)), concerne plus particulièrement l'étude du rôle du domaine N-terminal de GRA6 dans l'adressage de la protéine vers les membranes du RNM.

En utilisant la protéine transmembranaire GRA5 comme modèle pour étudier l'adressage post-sécrétoire des protéines GRA vers les membranes de la VP, C. Gendrin avait montré que le domaine N terminal (Nter) de la protéine joue un double rôle pour le trafic de GRA5 vers la membrane de la VP :

1) il adresse la protéine vers les GD ([Gendrin et al., 2008](#)), ce qui suggère que GRA5 ressemble aux nombreuses protéines des granules de mammifères, protéines qui sont ciblées vers la voie de sécrétion *via* une courte hélice alpha N-terminale chargée, située

dans la région Nter de la protéine ou *via* leur domaine transmembranaire (Dikeakos and Reudelhuber, 2007) ;

2) il adresse la protéine vers la membrane de la VP, ce qui laisse supposer que la voie d'adressage post-sécrétoire de GRA5 diffère de celle des protéines de cellules de mammifères contenant un domaine transmembranaire.

Afin de rechercher si les résultats obtenus pour GRA5 pouvaient être extrapolés aux autres protéines GRA, nous avons choisi d'étudier l'adressage de GRA6, protéine contenant un domaine transmembranaire et s'associant spécifiquement aux membranes du RNM de la VP.

II-1) Suffisance du domaine Nter de GRA6 pour l'adressage de la protéine aux membranes du RNM

A partir des travaux antérieurs du laboratoire (Gendrin *et al.*, 2008) ayant montré que le domaine Nter de GRA5 est responsable du ciblage de la protéine vers la membrane de la VP, nous avons émis l'hypothèse que le domaine Nter de GRA6 pourrait également cibler la protéine vers les membranes du RNM.

Pour tester cette hypothèse, différentes protéines chimériques ont été construites. Ces dernières contiennent des domaines spécifiques de GRA6 fusionnés à un ou plusieurs domaines de la protéine CD46 des cellules de mammifères. CD46 est une protéine ubiquitaire qui contient un domaine transmembranaire unique s'insérant dans la membrane plasmique des cellules, selon une topologie de type I. Des parasites délétés du gène *GRA6* et exprimant de façon stable, la construction GRA6-TM CD46-CD46-HF ont été obtenus. La protéine chimérique est sécrétée dans l'espace vacuolaire où elle co-localise avec GRA2. Par fractionnement subcellulaire de cellules infectées, la protéine se répartit à la fois dans la fraction soluble et membranaire, comme GRA6 endogène (Labruyère *et al.*, 1999). GRA6-TM CD46-CD46-HF est donc très probablement au moins partiellement associée aux membranes du RNM. Cette association est en partie solubilisée par l'Urée et par le NP-40, ce qui montre que la protéine chimérique est stabilisée dans les membranes du RNM, *via* des liaisons de type hydrogène et hydrophobe. Même si le mode d'association de GRA6-TM CD46-CD46-HF aux membranes du RNM diffère du mode d'association de GRA6 endogène aux membranes du RNM (GRA6 n'est déstabilisée de ces membranes, qu'en présence de NP-40 (Labruyère *et al.*, 1999, Mercier *et al.*, 2002), ces résultats permettent de conclure que le domaine Nter de GRA6 est suffisant pour assurer le ciblage de GRA6 vers les membranes du RNM.

II-2) Nécessité du domaine Nter de GRA6 pour l'adressage de la protéine au RNM

Afin de valider la nécessité du domaine Nter pour l'adressage spécifique de GRA6 vers les membranes du RNM, ce domaine a été remplacé par celui de SAG1, protéine de surface du toxoplasme (construction SAG1-TM GRA6-GRA6-HF, exprimée de façon stable dans des parasites délétés du gène *SAG1*). La protéine de fusion emprunte la voie des GD avant d'être sécrétée dans l'espace vacuolaire. A l'intérieur de la VP, la protéine chimérique est entièrement soluble. Le domaine Nter de GRA6 est donc nécessaire au ciblage de la protéine GRA6 vers les membranes du RNM.

Des résultats similaires, obtenus précédemment dans le laboratoire, avaient montré que le domaine Nter hydrophile de GRA5 est nécessaire et suffisant pour l'adressage spécifique de la protéine à la PVM ([Gendrin et al., 2008](#)).

Dans leur ensemble, ces résultats ont donc démontré que le domaine Nter des protéines GRA transmembranaires GRA5 et GRA6 constitue un élément essentiel dans le tri post-sécrétoire de ces protéines vers leur domaine membranaire vacuolaire respectif.

II-3) Existe-il des affinités du domaine Nter de GRA6 vis-à-vis de certains lipides membranaires?

L'ensemble des résultats obtenus sur GRA6 nous a amené à rechercher si la spécificité d'adressage de GRA6 aux membranes du RNM pouvait être régie par des interactions du domaine Nter de la protéine avec des lipides membranaires spécifiques.

Ma contribution à ces travaux a consisté à rechercher les éventuels partenaires lipidiques du domaine Nter de GRA6. Pour cela, j'ai réalisé des tests de superposition protéines / lipides (fat blots) au cours desquels le domaine Nter de GRA6 (avec le domaine Cter de GRA6 ou le domaine Nter de GRA5, en contrôles) a été incubé sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle différents lipides membranaires avaient été fixés. Contrairement au domaine Nter de GRA5 qui ne présente aucune réactivité vis-à-vis des lipides testés, le domaine Nter de GRA6 présente une affinité vis-à-vis du phosphatidylinositol (4) phosphate (PI(4)P) ; du phosphatidylinositol (3,4,5) tri-phosphate (PI(3,4,5)P₃) ; de l'acide phosphatidique (PA), du cardiolipide (CL) et du sulfogalactosylcéramide (SGC). Cette réactivité laisse supposer que le domaine Nter de GRA6 pourrait interagir avec les membranes *via* une interaction préalable avec ces lipides chargés négativement.

Le détail de ces travaux est présenté dans l'article N°2 intitulé : « **Post-translational membrane sorting of the *Toxoplasma gondii* GRA6 dense granule protein into**

the parasite-containing vacuole is driven by its N-terminal domain», publié en 2010, dans la revue *International Journal for Parasitology*. 40: 1325-1334.

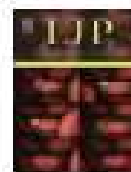
ARTICLE N°2

Claire Gendrin, Amina Bittame, Corinne Mercier and Marie-France Cesbron-Delauw (2010). « **Post-translational membrane sorting of the *Toxoplasma gondii* GRA6 dense granule protein into the parasite-containing vacuole is driven by its N-terminal domain** ». *International Journal for Parasitology*. 40: 1325-1334.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara

Post-translational membrane sorting of the *Toxoplasma gondii* GRA6 protein into the parasite-containing vacuole is driven by its N-terminal domain

Claire Gendrin¹, Anina Bittame, Corinne Mercier, Marie-France Cesbron-Delauw^{*}

¹Laboratoire Adaptation et Pathogénicité des Micro-organismes, CNRS UMR 5163, Université Joseph Fourier GADPA2E-1, Institut Jean Rogee, BP 170, 38042 Grenoble cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2010

Received in revised form 24 March 2010

Accepted 30 March 2010

Keywords:

Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii

GRA proteins

Sorting

secretion

Parasitophorous vacuole

Membranous tubular network

ABSTRACT

How eukaryotic pathogens export and sort membrane-bound proteins destined for host-cell compartments is still poorly understood. The dense granules of the intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* constitute an unusual secretory pathway that allows soluble export of the GRA proteins which become membrane-associated within the parasite replicative vacuole. This process relies on both the segregation of the proteins suited to the dense granules from those destined to the parasitophorous membrane and on the sorting of the secreted GRA proteins to their proper final membranous systems. Here, we provide evidence that the soluble trafficking of GRA6 to the dense granules relies on the N-terminal domain of the protein, which is sufficient to prevent GRA6 targeting to the parasite plasma membrane. We also show that the GRA6 N-terminal domain, possibly by interacting with negatively charged lipids, is fundamental for proper GRA6 association with the vacuolar membranous network of nanotubes. These results support our emerging model: sorting of membraneless GRA proteins to the host cell vacuole is mainly driven by the dual role of their N-terminal hydrophilic domain and is compartmentally regulated.

© 2010 Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology Inc.

1. Introduction

While the main rules that govern the traffic of membrane-bound proteins are conserved in eukaryotic cells, alternative mechanisms may ensure protein transport across biological membranes in a cell-specific fashion. This is particularly essential for eukaryotic intracellular pathogens, such as those belonging to the phylum Apicomplexa. These protozoa have to deliver membrane-bound proteins beyond the confine of their own plasma membrane, to several distinct compartments of the host cell. These unconventional systems have recently opened new research areas, which investigate eukaryotic cell-specific machineries involved in the export of proteins across cellular membranes.

The phylum Apicomplexa includes important human pathogens such as *Plasmodium* spp. the causative agent of malaria, and *Toxoplasma gondii*, responsible for neurological birth defects and opportunistic infections associated with AIDS. These are obligate intracellular parasites which reside within a non-fusogenic membrane-bound compartment named the parasitophorous vacuole (PV). Although the PV membrane of *Toxoplasma* is formed upon invasion by invagination of the host cell membrane (Suss-Dojby et al., 1995), it is devoid of most of the host cell transmembrane

(TM) proteins (Mordue et al., 1999). Instead, it includes a number of proteins secreted upon invasion from parasite-specific organelles, namely the thlopires and the electron-dense granules (DG) (Cesbron-Delauw et al., 2005).

The mature PV formed by *Toxoplasma* is organised in functionally distinct membranous sub-compartments (Cesbron-Delauw et al., 2005) to which the GRA proteins, released from *Toxoplasma* DG, are collectively targeted (reviewed in Mercier et al. (2005)). While GRA3, 5, 7, 8, 10 and GRA14 associate with the PV surrounding membrane that constitutes the host cell interface, GRA7, 1, 6, 9 and GRA12 associate with the membranous network of nanotubes (MN) that extends into the vacuolar lumen and links the parasites together and to the PV membrane. GRA1, together with two protease inhibitors, a nucleotide hydrolase and a cyclophilin, are the only known DG proteins which remain completely soluble within the vacuolar lumen (Mercier et al., 2007, in press).

In *T. gondii*, delivery of TM proteins to the parasite surface occurs via a vesicular-like default pathway, which probably follows co-translational insertion of these proteins in the endoplasmic reticulum (ER) membrane (Serber et al., 1998; Gendrin et al., 2005; Steiner and Sotgiu-Havre, 2005), by co-transmembrane association of the TM domain (TMD)-bearing GRA proteins to a post-secretory event that occurs within the PV (Levodina et al., 1999). Despite the presence of a membrane-association domain consisting of a predicted α -helical TMD in GRA6, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12 and GRA14, these GRA proteins seem to avoid ER membrane insertion and are instead solubilised in the ER lumen (Levodina

^{*} Corresponding author. Tel.: +33 476 63 74 63; fax: +334 7663 74 97.

E-mail address: marie-france.cesbron@ujf-grenoble.fr (M.-F. Cesbron-Delauw).

¹ Present address: Laboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale, 41 avenue Roméo 38027 Grenoble, France.

et al., 1999). They have been shown to form high molecular weight complexes (Braun et al., 2008) and to traffic to the PV in both a soluble and an aggregated state (Sibley et al., 1995; Labouyère et al., 1999; Lecordier et al., 1999) via the DG, which also constitutes the default pathway for secreted soluble proteins (Karsten et al., 1998; Striepen et al., 1998, 2001).

Using the PV membrane-targeted GRA5 protein as a model, we recently demonstrated that the N-terminal (Nt) domain is the main determinant of this unusual parasite-specific delivery system (Gendrin et al., 2008). As predicted, GRA5 was shown to be integrated into the plasma membrane of mammalian cells, providing evidence that the soluble trafficking of GRA5 and its post-secretory membrane insertion are parasite-specific. This process was demonstrated to rely on the dual role of the Nt domain of GRA5 which, independently from both the TMD and the C-terminal (Ct) domain, mediates aggregation into the DG and is essential to target the protein to the PV membrane (Gendrin et al., 2008). It thus appeared that the sorting mechanisms used to deliver the TMD-bearing GRA5 protein to the PV membrane does not follow the general rules which dictate the cellular localisation of TM proteins.

To investigate whether this conclusion could be extended to other TMD-bearing GRA proteins, we studied the role of the GRA6 Nt domain in the trafficking of the protein to the PV and in its selective targeting to the MNIN. GRA6 is a 32 kDa protein predicted to contain a typical Nt signal peptide (SP) and a TMD flanked by two hydrophilic domains (Lecordier et al., 1995). Similar to the other GRA proteins, GRA6 does not present any homology with proteins of known function, nor does its sequence include any identified targeting signal. The PV developed by GRA6 knockout parasites displays an altered mature MNIN (Mercier et al., 2002), indicating that GRA6 plays a role in this intravacuolar membranous structure. However, the protein GRA2 is thought to be the initial organizer of the MNIN (Mercier et al., 2002; Travier et al., 2008), and the observed role of GRA6 in MNIN stabilization likely depends on its interactions with GRA2 in the PV (Labouyère et al., 1999; Braun et al., 2008).

In the present study, we provide evidence that the unusual trafficking properties of GRA6 are dictated by its Nt domain. More precisely, we show that the selectivity of GRA6 targeting to the intravacuolar MNIN may rely on the peculiar properties of the GRA6 Nt domain, which displays a specific affinity for negatively charged lipids. It thus emerges from our studies on GRA5 and GRA6 that the Nt-mediated sorting of TM GRA proteins in the host cell vacuole might be a common rule among this subset of proteins.

2. Materials and methods

2.1. Parasites, cell culture and transfection

Tachyzoites of the *T. gondii* RH *hxprt*⁻ strain (Donald et al., 1996), the knockout mutants *Agru6-hxprt* (Mercier et al., 2002), *Agru5-hxprt* (Mercier et al., 2001) and *Asag1* (Rachinel et al., 2004) were maintained by serial passages in monolayers of human foreskin fibroblasts (HFF) grown in DMEM supplemented with 1 mM glutamine, 10% FBS, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (referred to as D10). Parasite transfection was performed by electroporation (Soldati and Boothroyd, 1993). Parasites derived from the *Agru6-hxprt* and *Agru5-hxprt* strains were selected using both xanthin and mycophenolic acid (Donald et al., 1996), whereas those derived from the *Asag1* strain were selected with phleomycin, as described previously (Messina et al., 1995).

2.2. Recombinant proteins and antibodies

Production of the GRA5 Nt- (amino acids (aa) 29–68) and the GRA6 Nt domains (aa 36–153) expressed in *Escherichia coli*, in fu-

sion with the GST protein from *Schistosoma japonicum*, has been described in Ferrandiz et al. (2004) and Lecordier et al. (2000), respectively. Both the Nt and the Ct domains of GRA6 (aa 41–152 and 174–230, respectively) in fusion with an Nt 5-tag and bordered by two hexahistidine (His 6×) tags, were produced by the Proteogenix company (Oberhausbergen, France) in *E. coli* using the pUET1 vector (DNA-Gdanskil sc. Gdansk, Poland). The GST-GRA5 Nt fusion protein was used in our laboratory to produce a mouse serum directed against the Nt domain of GRA5 (anti-GST-GRA5 Nt). The various fusion proteins were also detected using an anti-full-length GRA6 rabbit serum (Labouyère et al., 1999; gift from Dr. L.D. Sibley, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA), a monoclonal antibody (mAb) against His-Tags (Oncogene), and an anti-hemagglutinin (HA) rabbit serum (gift from Dr. M. A. Hakim, CNRS UMR 5163, Université Joseph Fourier, Grenoble, France). The mAbs TG 17–43, TG 17–179, TG2H11, TG 17–113 and TG 05–54 were used to detect GRA1, GRA2, GRA3, GRA5 and SAG1, respectively (Rodríguez et al., 1985; Charif et al., 1990; Achbarou et al., 1991); the anti-GRA3 mAb was a gift from Dr. J.F. Dubremetz (UMR CNRS 5539, Université Montpellier 2, France).

2.3. Plasmid constructs

Specific primers (Supplementary Table S1) were designed from the published sequences of GRA6 (Lecordier et al., 1995; GenBank Accession No. ABQ51264), CD46 (Lublin et al., 1988; Accession No. BAA12224) and SAG1 (Burg et al., 1988; Accession No. ABQ51252).

All of the constructs designed to be expressed in the parasite were cloned under the control of the regulatory regions of endogenous GRA5 (promoter, 5' and 3' untranslated regions) because the GRA5 promoter allows high-level expression of fusion proteins (Mercier et al., 1996). The GRA5 regulatory regions were first amplified and cloned into a pBluescript KS' vector modified by the insertion of an HA-FLAG (HF) tag (Saksouk et al., 2005). Specific fragments of the open reading frame (ORF) of GRA6, SAG1 or CD46 were then amplified with primers containing 15–20 bases complementary to the DNA fragment to be amplified and tailed with 15–20 bases complementary to the adjacent DNA fragments in the final construct. This technique allowed hybridization of adjacent fragments in further PCRs, with no need to introduce exogenous restriction sites. The pairs of primers allowing amplification of both the Nt and Ct parts of the final construct introduced a 5' SmaI and a 3' EcoRI site, respectively, so that all the constructs could be cloned into the modified KS' plasmid in frame with the 3' HF tag and the 5' untranslated region.

2.4. Immunofluorescence

Confluent HFF monolayers grown on 12-mm coverslips placed in 24-well plates were either overnight-infected, or pulse-infected for 20 min to study the early stages of invasion, fixed for 20 min in 5% formaldehyde in PBS, and selectively permeabilized for 10 min with 0.002% saponin (Sibley et al., 1995). All further steps were conducted in the presence of 0.002% saponin. Extracellular parasites were left to adhere to a cell monolayer for 15 min at 37 °C and permeabilized with 0.1% Triton X-100, following fixation. Infected cells were permeabilized with 0.002% digitonin as previously described (Lecordier et al., 1999).

After saturation, cells were incubated with primary antibodies followed by goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488 or 594 (Invitrogen, Molecular Probes). Coverslips were mounted using Prolong Antifade Reagent (Molecular Probes) and observed using a Zeiss AxioPlan II microscope equipped for phase-contrast and epifluorescence microscopy. Photographs were taken at the magnification 100×

using a Zeiss Axiovert 10M coupled to the Axiovision 4.5 software, and processed with Adobe Photoshop CS2.

2.5. Gel fractionation

The fusion proteins were analysed in overnight-infected HFF cells which were scraped and mechanically disrupted by syringing through a 27-gauge needle. Following removal of intact parasites and of cell debris by centrifugation, the soluble fraction was separated from the membrane-associated fraction by ultracentrifugation at 100,000g. When fusion proteins were found to be associated with vacuolar membranes, aliquots of the membrane pellets were treated with 6 M urea; 0.1% Nonidet P-40 (NP-40) or 50 mM Tris, pH 8, for 30 min at 4°C, followed by centrifugation at 100,000g, as described previously (Sibley et al., 1995). Supernatants were concentrated by trichloroacetic acid or acetone precipitation. Equal quantities of pellets and supernatants were loaded on gels. Each experiment was repeated three times.

2.6. Gel electrophoresis and immunoblot

Proteins boiled in SDS-PAGE sample buffer were separated by electrophoresis on 12% polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes. Immunological detection was achieved using appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. Peroxidase activity was visualised by enhanced chemiluminescence (ECL) using the SuperSignal ECL system (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA).

2.7. Protein-lipid overlay assays

Nitrocellulose membranes (Membrane Lipid Strips, Echelon Biosciences, USA) spotted with several types of lipids (100 pmol/spot) were blocked and incubated overnight, at 4°C, with 0.2 µg/ml of each tested protein. Following washes, the proteins bound to lipids were visualised by conventional immunoblot revealed by ECL.

3. Results

3.1. In *Toxoplasma* cells the Nt domain of GRA6 prevents targeting to the parasite surface and mediates stable trafficking via the DG secretory pathway

To investigate whether the GRA6 Nt domain mediates stable trafficking to the DG, we tested its ability to drive a fusion protein derived from a model TM protein to the DG. Human CD46 is a ubiquitous mammalian surface protein with a single TMD, like GRA6. CD46 is known to be highly glycosylated (Lublin et al., 1988), when expressed in *Neoplasma*, full-length CD46 did not reach the parasite surface (Gendrin et al., 2008), possibly due to the paucity of glycosylation processes in *T. gondii* (Fauguenoy et al., 2008). We thus used a C-terminally tagged version of a variant of the *Toxoplasma* surface protein SAG1, in which the GlycosylPhosphatidylinositol (GPI) anchor was replaced by the TMD and Ct domain of CD46 (construct SAG1/CD46TM/CD46-HF, Fig. 1A) (Seiber et al., 1998; Gendrin et al., 2008) as a model of a parasite TM surface protein. We compared the behaviour of this fusion with that of a derived construct, in which the SAG1 Nt domain was replaced by the GRA6 Nt domain (construct GRA6/CD46TM/CD46-HF, Fig. 1A). The intracellular fate of these fusion proteins was studied by immunofluorescence in extracellular parasites permeabilized with Triton X-100 (as previously reported) (Gendrin et al., 2008): the fusion protein SAG1/CD46TM/CD46-HF was detected in vesicle-like structures dispersed throughout the cytoplasm of transfected *Sag1*

parasites (data not shown); by contrast, the GRA6 Nt-derived fusion protein (GRA6/CD46TM/CD46-HF) co-localised with endogenous GRA2 in the DG of extracellular parasites (Fig. 1B).

Together, these data suggest that the Nt domain of GRA6 prevents the conventional insertion of the protein into the parasite endomembranous system, and that it is thus involved in trafficking of the protein to the DG.

3.2. The Nt domain of GRA6 targets the protein to the MNN of the vacuolar lumen

Following DG release into the PV GRA6, unlike CRA6, was not described as being targeted to the PV membrane, but as associating specifically with the MNN where it behaves as an integral membrane protein (Leocardier et al., 1995; Labruyère et al., 1999). Saponin treatment of overnight-infected cells led to selective permeabilization of both the host cell- and the PV membranes, which enabled the study of the vacuolar targeting of the fusion GRA6/CD46TM/CD46-HF. The protein was detected in the vacuolar space, with a pattern overlaying that of the MNN-associated GRA2 protein (Fig. 1C). When permeabilization was restricted to the host cell plasma membrane by the use of digitonin (Leocardier et al., 1999) the fusion GRA6/CD46TM/CD46-HF was not detected at the PV membrane, neither with the anti-GRA6 nor with the anti-HA antibody (Fig. 1D). After an additional step of Triton treatment, which further permeabilized both the PV membrane and the parasite plasma membrane, both antibodies were able to detect the fusion protein (Fig. 1D). By contrast, under digitonin permeabilization conditions, the PV membrane-inserted CRA6 protein was detected at the PV surrounding membrane with the anti-GRA6 mAb, which recognises the Nt domain of the protein (Fig. 1D). Unlike CRA6, which is inserted in the PV membrane with its Nt domain protruding into the host cell cytoplasm (Leocardier et al., 1999), GRA6/CD46TM/CD46-HF is thus exclusively located within the vacuolar space, similar to endogenous CRA6.

After elimination of intracellular parasites from overnight-infected cells, cellular debris and vacuolar material were fractionated into a soluble fraction (HSS) and a membranous fraction (HSP). Due to the low efficiency of detection of the proteins of interest, only long time exposures of immunoblots are presented (Fig. 1E). Analysis of the fractions showed that most of the GRA6/CD46TM/CD46-HF pool is present in the HSP fraction, indicating that the fusion protein is associated with vacuolar membranes (Fig. 1E). The vacuolar wild-type CRA6 protein migrates as a doublet in SDS-PAGE, reflecting different phosphorylation states, and it behaves as a typical TM protein, since its association with vacuolar membranes is both resistant to urea and sensitive to NP-40 (Labruyère et al., 1999 and Fig. 1E). By contrast, vacuolar GRA6/CD46TM/CD46-HF migrated as a single band on SDS-PAGE. Its membrane association did not appear to be very robust as simple pipetting in its buffer was sufficient to dissociate part of the membrane-associated protein pool (Fig. 1E). In addition, membrane association of GRA6/CD46TM/CD46-HF was partially sensitive to urea and to NP-40 (Fig. 1E), which would indicate that the fusion protein is associated with PV membranes via both hydrogen bonds (solubilised by urea) and hydrophobic interactions (solubilised by NP-40). Although not quantitative, these results indicate that the Nt domain of CRA6 is sufficient to direct the association of the protein with the MNN membranes.

To study the necessity of the GRA6 Nt domain in this peculiar post-secretory targeting, the fusion SAG1/GRA6TM/GRA6-HF was stably expressed in *Sag1* parasites (Fig. 2A). When extracellular parasites were permeabilized with Triton X-100, the signal obtained with the anti-HA serum revealed that of endogenous GRA1, indicating that the fusion protein was located in the DG (Fig. 2B). Although it is sufficient to drive the fusion GRA6/

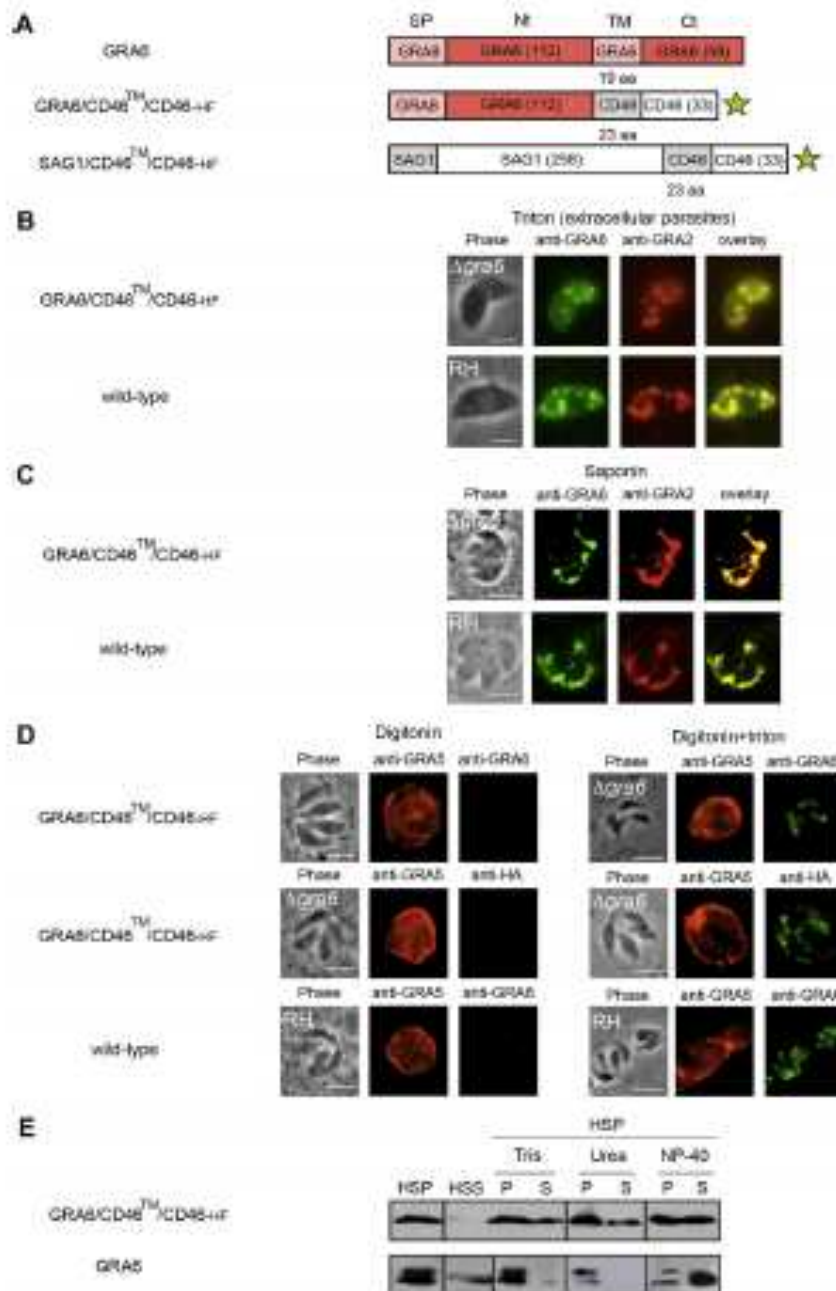


Fig. 1. The N-terminal (Nt) domain of *Toxoplasma gondii* GRA6 protein prevents surface targeting and is sufficient for membranous reticular network (MRN) association. (A) Schematic representation of endogenous GRA6, and of the fusion proteins GRA6/CD46TM/CD46-HF and SAG1/CD46TM/CD46-HF. The genes from which the signal peptide (SP), the transmembrane (TM), the Nt, and the C-terminal (Ct) domains were amplified are indicated with in the boxes. The number of amino acids (aa) of each segment is indicated between parentheses and the length of the TM domain is provided below. The star indicates the hemagglutinin (HA)-FLAG (HF) tag. (B) Immunolocalization of the fusion protein GRA6/CD46TM/CD46-HF stably expressed in *Agrob* parasites. Following permeabilization with Triton X-100, GRA6/CD46TM/CD46-HF was detected with the anti-full-length GRA6 serum in the dense granules (DG) of extracellular parasites, as indicated by co-detection of GRA6 with the anti-GRA2 monoclonal antibody (mAb). Co-detection of endogenous GRA6 and GRA2 in wild-type *T. gondii* RH parasites is presented below as a control. Bar = 2 μ m. (C) Following saponin permeabilization of overnight-infected cells, both the fusion protein GRA6/CD46TM/CD46-HF and endogenous GRA6 were detected using the anti-full-length GRA6 serum, whereas the anti-GRA2 mAb allowed co-detection of GRA2. Bar = 5 μ m. (D) The potential insertion of GRA6/CD46TM/CD46-HF within the parasitophorous vacuole (PV) membrane was studied in overnight-infected cells permeabilized with 0.002% digitonin. After an additional step of Triton permeabilization, the DG were detected. The anti-full-length-GRA6 and anti-HA antibodies were used as an anti-Nt and anti-Ct antibodies of the GRA6/CD46TM/CD46-HF protein, respectively. Endogenous GRA5 and GRA6 were detected using the anti-GRA5 mAb and the anti-full-length-GRA6 serum, respectively. Bar = 5 μ m. (E) Fractionation analysis of vacuolar GRA6/CD46TM/CD46-HF. Cells were infected overnight by *Agrob* parasites stably expressing the chimeric protein. After removal of intracellular parasites and of the host cell nuclei, the membranes (HSP) were separated from soluble proteins (HSS) by a high-speed spin. The HSP was treated with 6 M urea (Urea), 0.1% Nonidet P-40 (NP-40) or 50 mM Tris, pH 8 (Tris), and membrane pellets (P) were separated from soluble fractions (S) by a second high-speed spin. As a control, RH wild-type parasites were submitted to the same procedure. Fractions were analyzed using the anti-full-length-GRA6 rabbit serum.

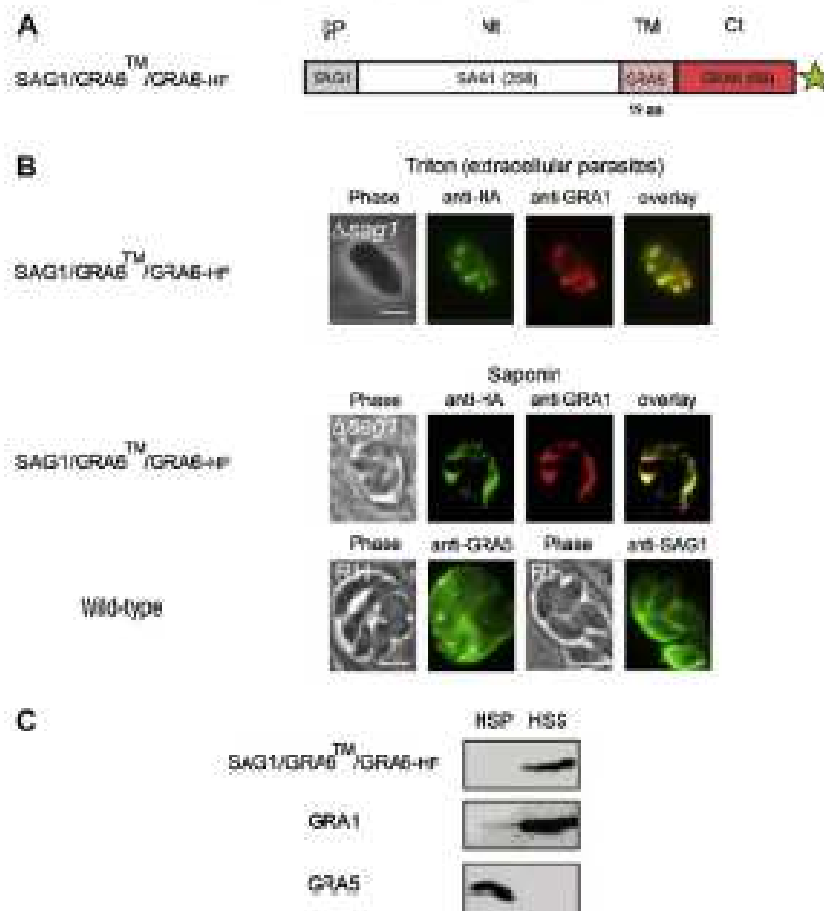


Fig. 2. The N-terminal (Nt) domain of *Toxoplasma gondii* GRA6 protein is necessary for association with the membranous microtubular network (MNN) representation of the fusion SAG1/GRA6TM/GRA6-HF. An notation and symbols are described in the legend of Fig. 1A. (B) Comparative immunofluorescence of GRA6-HF only expressed in Δagp parasites with that of endogenous GRA1. Extracellular parasites were permeabilized with Triton X-100 (time: 2 μ m), while infected cells were permeabilized with saponin (time: 5 μ m). For comparison, the localization of the parasitophorous vacuole (PV) membrane-targeted G1 parasite surface-suggested SAG1 is presented in wild-type parasites (time: 5 μ m). The fusion protein was detected using anti-*Seroglycin* (SA) serum, where GRA1, GRA5 and SAG1 were detected with anti-GRA1, anti-GRA5 or anti-SAG1 monoclonal antibodies (mAbs), respectively. (C) Fractionation analysis of Δagp GRA6TM/GRA6-HF expressed in Δagp parasites. Overnight-infected human foreskin fibroblast (HFF) cells were disrupted and the membranous fraction (HSP) from soluble proteins (HSS) as described in Fig. 3C. The anti-SA serum was used to detect the fusion protein. As a control, both endogenous GRA1 and GRA5 were Δagp parasites subjected to the same treatments using the anti-GRA1 and the anti-GRA5 mAbs, respectively.

CD46TM/CD46-HF to the DG (Fig. 1), the Nt domain of GRA6 thus appears not to be necessary for DG trafficking in the context of the GRA6 TM and Ct domains. Saponin permeabilization of overnight-infected cells led to detection of the protein SAG1/GRA6TM/GRA6-HF in the vacuolar space in a strict co-localisation with soluble GRA1 (Fig. 2B). By sub-cellular fractionation of overnight-infected cells, vacuolar SAG1/GRA6TM/GRA6-HF was shown to be completely soluble, despite its 19 aa-long TMD (Fig. 2C). Collectively, these results show that the GRA6 Nt domain is responsible for the selective membrane association of the protein in the vacuolar space.

3.3. The Nt domain of GRA6 is required for posterior accumulation of the protein in the vacuole

A peculiarity of GRA6, GRA2 and GRA12 consists in their post-secretory targeting to the invaginated parasite posterior pocket that is formed shortly after invasion. At the posterior pole, these proteins were shown to associate with a collection of multilamellar

vesicles that give rise to the MNN (Sibley et al., 1991; et al., 1999; Michelin et al., 2009). We further examine this posterior targeting process also depends on the C main. Localisation of the two vacuole-targeted fusi GRA6/CD46TM/CD46-HF and SAG1/GRA6TM/GRA6-HF passed 20 min post-invasion in pulse-infected cells, as previously (Sibley et al., 1995). At this time of invasion, membrane is closely apposed to the parasite membrane vacuolar space is limited, which explains the faint signal for the fusor proteins within the PV. However, in most prominent dot of fluorescence was observed with the a body at the posterior pole of GRA6/CD46TM/CD46-HF parasites. In contrast, the SAG1/GRA6TM/GRA6-HF fluorescent signal was dispersed throughout the PV (Fig. 3). In case, endogenous GRA2 was used as a control for a protein (Fig. 3A). To quantify the relative ability of each protein to traffic to the parasite posterior pocket, the parasites displaying a prominent posterior dot were (Fig. 3B). A portion of the GRA6/CD46TM/CD46-HF

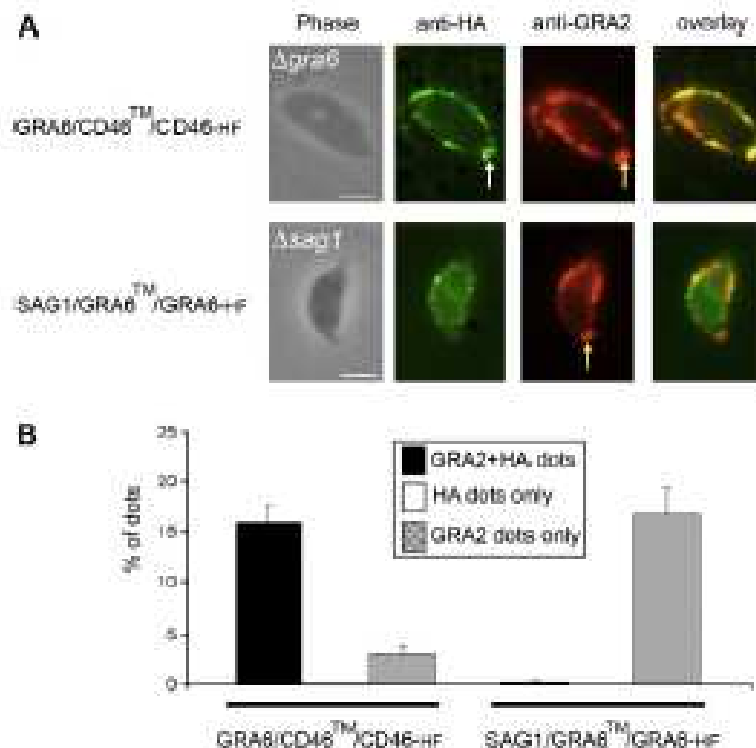


Fig. 3. The N-terminal (Nt) domain of *Toxoplasma gondii* GRA6 protein is responsible for the posterior targeting of the protein shortly after invasion. (A) Immunofluorescence localization of the fusion proteins GRA6/CD48TM/CD48-HF and SAG1/GRA6TM/GRA6-HF in the parasitophorous vacuole (PV) 30 min post-invasion. Following permeabilization of the host cells with saponin, both fusion proteins were detected using anti-hemagglutinin (HA) rabbit serum, whereas endogenous GRA2 was detected using anti-GRA2 monoclonal antibody (mAb). Fluorescence dots are indicated with a white- (HA dots) or a yellow arrow (GRA2 dots). Bars: 2 μ m. (B) Quantification of the posterior accumulation of fusion proteins in the PV. Values represent the mean (\pm SD) of fluorescence dots calculated from 1,000 parasite PVs analyzed from two coverslips of a representative experiment. Proteins were detected as described in (A).

parasites (15.9% (\pm 1.8)) formed dots detectable with both the anti-HA and the anti-GRA2 antibodies. By contrast, less than 0.2% (\pm 0.1) of SAG1/GRA6TM/GRA6-HF-expressing parasites displayed such a phenotype, while 16.8% (\pm 2.6) of these infected cells displayed GRA2 dots (Fig. 3B). Altogether, these results indicate that the GRA6 Nt domain drives early accumulation of the protein at the posterior end of parasites, where the nascent MNN is assembled.

3.4. The GRA6 Nt domain displays affinity for negatively charged lipids

To finally confirm that the Nt domains of both GRA5 and GRA6 mediate selective targeting of the proteins to the PV membrane versus the MNN, the Nt domains of both proteins were exchanged and the resulting fusion proteins GRA5/GRA6TM/GRA6-HF and GRA6/GRA5TM/GRA5-HF (Fig. 4A) were stably expressed in the *Agro5* and *Agro6* mutants, respectively. Immunofluorescence analyses of overnight-infected cells permeabilized with saponin allowed detection of GRA6/GRA5TM/GRA5-HF in the vacuolar space, with a pattern overlaying that of MNN-associated GRA2 (Fig. 4B). In contrast, the fusion GRA5/GRA6TM/GRA6-HF was detected at the PV membrane, similar to the TM protein GRA3. This PV membrane localization was confirmed using digitonin permeabilization (Fig. 4B). Interestingly, a rim of fluorescence was obtained at the PV periphery with the anti-HA, whereas no signal was obtained with the anti-Nt GRA5 antibody. These data indicate that the fusion GRA5/GRA6TM/GRA6-HF inserts into the PV membrane with an inverted topology when referred to the control protein GRA5-HF (Fig. 4B and Lecordier et al., 1999).

To investigate whether the differential targeting of GRA6 to the MNN and of GRA5 to the PV membrane could be due to an interaction of their Nt domain with specific membrane lipids, lipid strips were overlaid with either the GRA6 Nt- or the GRA5 Nt domain, both expressed in fusion with GST (GST-GRA6 Nt or GST-GRA5 Nt; Lecordier et al., 2000; Fernandez et al., 2004). Spots corresponding to phosphatidyl inositol (4) phosphate (PI(4)P), phosphatidylinositol (3,4,5) tri-phosphate (PI(3,4,5)P₃), phosphatidic acid (PA), cardiolipin (CL) and sulfolipidylceramide (SCL) were highlighted consecutively to the binding of GST-GRA6 Nt, as revealed by the anti-GRA6 serum (Fig. 4C). To confirm the lipid affinity of GST-GRA6 Nt, we tried using an anti-GST antibody to detect the GST moiety of GST-GRA6 Nt. Since the commercial anti-GST antibodies failed to recognise the fusion proteins once bound to lipids, we used the ability of the anti-GST-GRA6 Nt mouse serum to detect GST. Binding of GST-GRA6 Nt to most of the negatively charged lipids previously identified, i.e. PA, CL, PI(4)P and SCL, was confirmed when using the anti-GST-GRA6 Nt mouse serum (Fig. 4D). Interestingly, none of the lipids present on the nitrocellulose strip was bound by GST-GRA5 Nt (Fig. 4D), suggesting that targeting of GRA5 to the PV membrane does not rely on an interaction between the GRA5 Nt domain and specific lipids. The affinity of GRA6 Nt for PA, PI(4)P, CL and SCL was also observed when lipid strips were overlaid with an His-tag fusion of GRA6 Nt (pUET-GRA6 Nt) and further probed with anti-His (Fig. 4E). In contrast, the His-tag fusion of the Ct domain of GRA6 (pUET-GRA6 Ct) failed to bind any of the tested lipids when revealed with the same antibody (Fig. 4E).

Together, these results suggest that specific association of the GRA6 Nt domain with negatively charged membrane lipids could

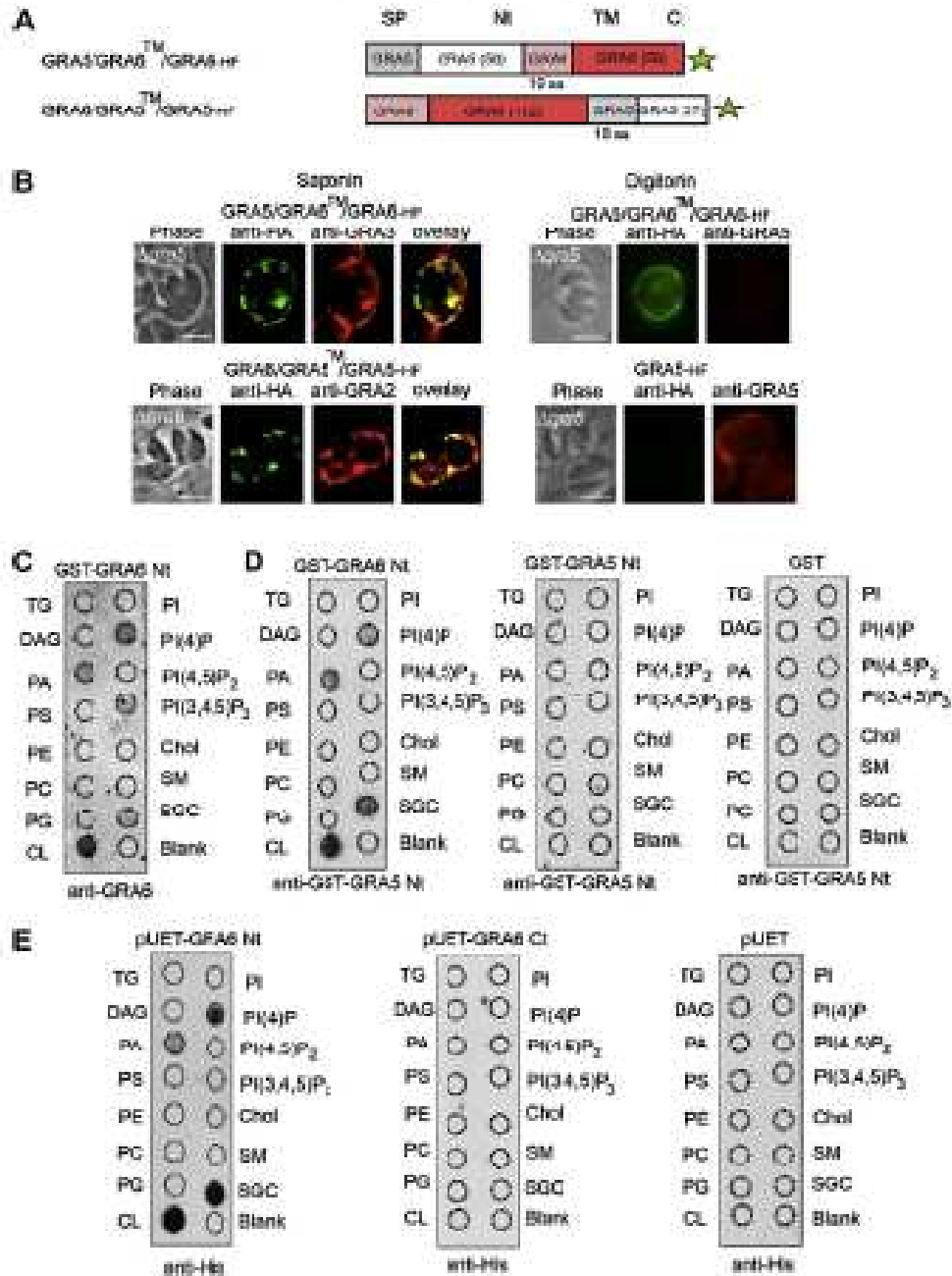


Fig. 4. Affinity of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein N-terminal (Nt) domain for negatively charged lipids could explain the selective targeting of GRA5 to the membrane nanotubular network (MNT) following secretion into the parasitophorous vacuole (PV). (A) Schematic representation of the fusion proteins GRA5/GRA6TM/GRA6-HF and GRA5/GRA6TM/GRA5-HF. Abbreviations and symbols are described in the legend of Fig. 1A. (B) Confocal immunofluorescence of GRA5/GRA6TM/GRA6-HF stably expressed in *Acanthamoeba castellanii* and of GRA5/GRA6TM/GRA5-HF stably expressed in *Acanthamoeba castellanii* cells. Following permeabilization of amoeba-infected cells with saponin, the fusion proteins were detected using the anti-Hemagglutinin (HA) rabbit serum (GRA5/GRA6TM/GRA6-HF) or with the anti-GRA5 rabbit serum (GRA5/GRA6TM/GRA5-HF). Endogenous GRA5 and GRA6 were detected using the anti-GRA5 and the anti-GRA6 monoclonal antibodies (mAb), respectively. Topology studies of the fusion GRA5/GRA6TM/GRA6-HF were performed under digitonin permeabilization conditions, using the anti-HA serum and the anti-GRA5 monoclonal antibody (mAb). As a control, the GRA5-HF fusion was stably expressed in *Acanthamoeba castellanii* and its topology was determined under the same conditions. Bars: 5 μ m. (C) The fusion proteins GST-GRA5 Nt, GST-GRA6 Nt and the GST control protein were incubated on lipid strips and further probed with the anti-GRA5 rabbit serum (C) and/or the anti-GST-GRA5 Nt mouse serum (D), as indicated. (E) Lipid strips were overlaid with the fusion proteins pUET-GRA5 Nt, pUET-GRA5 C-terminal (Ct) and the control pUET peptide, and further probed with the anti-Histidine antibody. TG: triglyceride; DAG, diacylglycerol; PA, phosphatidic acid; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; CL, cardiolipin; PI, phosphatidylinositol; PI(4)P, phosphatidylinositol (4-phosphate); PI(4,5)P₂, phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate; PI(3,4,5)P₃, phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate; Chol, cholesterol; SM, sphingomyelin; SGC, 3- α -hydroxysteroid.

contribute to the specific targeting of GRA6 to the intravacuolar MNN.

4. Discussion

Sorting of membrane-bound proteins to the PV in which they reside is a critical event for obligate intracellular pathogens such as *T. gondii*. This process, which implies the delivery of parasite-encoded TM proteins beyond the parasite plasma membrane, raises several conceptual questions which have recently gained interest. Our previous findings using GRA5 (Gendrin et al., 2008) and herein using GRA6, demonstrate that post-translational targeting of TM proteins en route to the PV relies on specific parasite machinery. We demonstrate here the predominant dual role of the Nt domain of GRA6, which is sufficient for the targeting of the protein to the DG and its sorting to the proper vacuolar membranous sub-compartment. It thus emerges that the Nt domain-mediated sorting could be a common feature of all TM GRA proteins. These findings contrast with the classical rule which states that targeting signals are present within the TMD and/or the Ct tail of TM proteins. Such singularity is likely necessary to ensure specific requirements of the obligate intracellular lifestyle of the *Toxoplasma* cell.

In higher eukaryotic cells, targeting of TM proteins to different compartments of the post-Golgi secretory pathways is mainly dependent on sorting signals which are often contained within the cytosolic domain of proteins and which interact with specific recognition molecules (Bonifacio and Traub, 2008; Dikoukou and Reuterhuber, 2007). In the absence of such sorting signals, TMD-bearing proteins are targeted by default to the cell surface, together with soluble proteins, which are released out of the cell.

In *Toxoplasma*, DG constitute the default pathway for soluble proteins (Karsten et al., 1998; Striepen et al., 1998, 2001). While TM surface proteins are targeted to the parasite plasma membrane via an alternative vesicular route (Gendrin et al., 2008), the TMD-bearing GRA proteins are trafficked to the DG as solubilised aggregates (Sibley et al., 1995; Labruyère et al., 1999; Lecordier et al., 1999; Ruffier and Cesbron-Delauw, unpublished data). These aggregates include high molecular weight complexes in which GRA proteins interact together (Braun et al., 2008).

It has been postulated that in *Toxoplasma*, the length of the TMD is of major importance for DG/surface targeting (Karsten et al., 2004). The fusion protein SAG1/CD46TM/CD46-HF, which contains the 23 aa TMD of CD46, was targeted to the parasite surface, whereas SAG1/GRA6TM/GRA6-HF, which contains the 19 aa-long TMD of GRA6, was sent to the DG. However, our results (Gendrin et al., 2008; and the present study) clearly demonstrate that the nature of the TMD is not the sole factor which determines tropism for the DG, since the fusion GRA6/CD46TM/CD46-HF was observed within the DG of extracellular parasites, despite the presence of the CD46 TMD. The Nt domain of GRA5 thus presents specific characteristics which outweigh the importance of the TMD in mediating trafficking to the DG. Similarly, the Nt domain of GRA5 was reported to prevent membrane association of the fusion proteins GRA5/CD46TM/GRA5 and GRA5/CD8TM/GRA5 within the parasite (Gendrin et al., 2008). As a whole, our results indicate that the Nt domain of TMD-bearing GRA proteins (GRA5 and GRA6 in our studies) is able to mediate DG trafficking by preventing membrane insertion within the parasite. As proposed earlier (Cesbron-Delauw et al., 2008; Gendrin et al., 2008), this domain could mediate homo and/or hetero-interactions between different DG proteins, resulting in the formation of solubilised complexes (Braun et al., 2008) which would then be trafficked to the DG by bulk flow.

We cannot exclude that other domains of GRA6 contribute to DG trafficking. In the case of GRA5, we verified that none of the SP, TMD or Ct regions of the protein is necessary for DG localisa-

tion. In addition, neither the SP nor the Ct domain of GRA5 was able to re-route a TM surface protein to the DG pathway (Gendrin et al., 2008). Based on the hypothesis that GRA proteins share a common mechanism of trafficking to the DG, we assume that the Nt domain of GRA6 is responsible for the protein solubilisation, leading to the DG route.

Following release from the DG into the PV at a site corresponding to the sub-apical pole of the parasite, the TM GRA proteins are sorted to their final destination. While GRA5, as well as several other GRA proteins, inserts into the PV membrane, GRA6 is first rapidly relocated to the posterior invagination, where the MNN first forms (Sibley et al., 1995; Labruyère et al., 1999) and remains associated with the MNN as a TM protein in the mature PV (Labruyère et al., 1999). Our results demonstrate the key role of the GRA6 Nt domain in these events, since the trafficking of GRA6/CD46TM/CD46-HF parallels that of wild-type GRA6. In contrast, SAG1/GRA6TM/GRA6-HF did not undergo posterior re-localisation and remained exclusively soluble within the vacuolar space of the mature vacuole, similar to the fusion SAG1/GRA6TM/GRA6-HF (Gendrin et al., 2008). However similar in many aspects of their trafficking, endogenous GRA6 and the fusion protein GRA6/CD46TM/CD46-HF seem to present different phosphorylation properties within the PV (Labruyère et al., 1999, and this study). Although several phosphorylation sites are predicted within the GRA6 Nt domain using the NetPhos program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), efficient phosphorylation of GRA6 may require the context of both its TMD and Ct domain. In contrast to endogenous GRA6, the fusion GRA6/CD46TM/CD46-HF associates with the MNN membranes via both hydrophobic interactions and hydrogen bonds. This may reflect the co-existence of two pools of fusion protein: the first could contain protein aggregates (possibly resulting from protein over-expression), while the second would correspond to the integral membrane protein pool. Despite this peculiar membrane interaction profile, our data point to both the sufficiency and the necessity of the GRA6 Nt domain for the post-secretory membrane targeting of the protein within the PV.

The differential targeting of the fusions GRA5/GRA6TM/GRA6-HF and GRA6/GRA6TM/GRA6-HF to the PV membrane versus the MNN corroborates the conclusion that the Nt domain of GRA5 and GRA6 dictates their post-secretory membrane sorting. Our results indicate that GRA5/GRA6TM/GRA6-HF inserts into the PV membrane with its C-terminus facing the host cell. The same topology has recently been described for GRA14 (Rome et al., 2008) and differs from that of GRA5 (Lecordier et al., 1999). Interestingly, topology prediction software indicates that GRA6 is expected to behave as a type II TM protein, whereas GRA5 is a type I protein when expressed in mammalian cells (Gendrin et al., 2008). These elements lead to the conclusion that the Nt domain of GRA6 directs the protein to the MNN while the TM and/or Ct domain would contain the topology information.

The precise mechanism by which GRA6 selectively associates with the MNN membranes following soluble secretion from the DG remains to be investigated. A conformational change induced by the environmental conditions within the PV could be involved. This conformational change could be linked to the physico-chemical properties of the GRA6 Nt domain, as the fusion SAG1/GRA6TM/GRA6-HF failed to display MNN membrane association. Alternatively, the GRA6 Nt domain could be involved in protein-protein interactions with specific vacuolar cofactors which would facilitate the membrane insertion of GRA6. The use of specific gene knock-out mutants has previously demonstrated that the unique nanotubule conformation of the MNN is induced by GRA2 and further stabilized by GRA6 (Mercier et al., 2002). GRA2 was shown to be necessary for the posterior recruitment of GRA6 to the nascent MNN (Mercier et al., 2002) and to interact with GRA6 in the mature

MNN (Labruyère et al., 1999; Braun et al., 2008). The posterior trafficking of the fusion protein GRA6(CD46⁺)CD46-HF strongly suggests that the GRA6 Nt domain is responsible for protein/protein interaction with GRA2, resulting in the posterior re-localisation of these proteins and their targeting to the nascent MNN.

Association of GRA6 with specific membrane lipids could also account for membrane affinity. We showed here that the GRA6 Nt domain displays affinity for negatively charged membrane lipids. Searches using the BLAST algorithm did not reveal any obvious homology of the GRA6 Nt domain to proteins of known function or of typical fold, but the KX_2RHR (145–152) and the RX_2RRR (122–131) motifs identified in this domain resemble the $KX_2(R)R(XR)$ sequence motif shown as being the phosphate group-interactor in the phospholipid-binding Pleckstrin Homology (PH) domain (DiNitto and Lambright, 2006; Lemmon, 2008). In a similar way, the two PH-like basic motifs detected in the GRA6 Nt sequence could thus interact with negatively charged membrane phospholipids of the MNN by electrostatic interactions. Such motifs were not identified in either the SAC1- or the GRA5 Nt domain. The lack of affinity of the GRA5 Nt domain for membrane lipids indicates that different types of interactions might be involved to ensure the specific targeting of TMD-bearing GRA proteins to their respective membranous compartment. Little is known about the lipid composition of the host cell-derived PV membrane, of the MNN or of the parasite plasma membrane, but future advances in this field will shed light on the biological significance of GRA6 lipid affinity.

Toxoplasma and *Plasmodium* PV display different structural and functional characteristics, adapted to their distinct intracellular life-styles (Cebbron-Delauw et al., 2008). *Plasmodium* parasites have evolved specialised mechanisms to allow extensive export of proteins into the host cell. Sorting of these proteins would involve a two-step model, based on protein secretion into the vacuolar space followed by translocation across the PV membrane. The translocation process would rely mainly on the *Plasmodium* export element/vacuolar translocation signal (PEXEL/NTS) motif (Hiller et al., 2004; Maiti et al., 2004). In contrast to the numerous studies on the export of proteins into the host cell, few *Plasmodium* PV-resident proteins have been described to date. Moreover, no GRA proteins homologues have been identified in *Plasmodium* spp. It is thus premature to discuss our new findings on *Toxoplasma* secretion strategies in comparison to *Plasmodium*, but further studies will hopefully help to draw a general model of Apicomplexa protein export.

It emerges from our studies that the Nt domain-mediated targeting of *Toxoplasma* GRA proteins to the (specific) final destination within the PV could be a common rule amongst this subset of parasite-secreted proteins. Our current model for the export of TMD-bearing GRA proteins relies on the dual role of the Nt domain, which both prevents membrane insertion in the parasite's early secretory pathway and mediates association with the PV membrane when the protein reaches the confines of the parasite-surrounding PV. Conformational and/or affinity changes related to the various parasite compartments would be implicated. Identification of the cell-specific machinery involved in the trafficking of proteins to and within the PV may lead to the development of intervention strategies able to interfere with the biogenesis of this vital compartment.

Acknowledgements

The authors thank Drs. J.F. Dubremetz, M.A. Hakim, K. Liszewski, D.S. Roos and L.D. Sibley for sharing reagents and acknowledge the help of K. Musset and A. Curt in culturing of HFF monolayers. This work was supported by the CNRS, the AC program "Dynamique et Réactivité des Assemblages Biologiques" (DRAB04/027 to

M.F.C.D.), Région Rhône-Alpes (Grant from Cluster 10 on Infectious Diseases to C.M.) and the Grenoble-Alpes Innovation and Incubation (GRAIN 2) (Grant No. 07 0304 to C.M.). C.C. and A.B. were the recipients of a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Research and from the Rhône-Alpes Region, respectively.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijpara.2010.03.014.

References

- Ahnbauer, A., Merovsz-Pujabin, G., Szék, A., Forster, B., Jenike, M.A., Cernan, D., Dubremetz, J.F., 1991. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 103, 321–329.
- Bonifacio, J.S., Traub, L.M., 2000. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395–447.
- Braun, L., Travier, L., Kieffer, S., Munnier, K., Curtin, J., Mercier, C., Cebbron-Delauw, M.F., 2008. Purification of *Toxoplasma* dense granule proteins reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157, 13–21.
- Burg, J.L., Penhagar, D., Kasper, L.H., Ware, P.L., Brothwood, J.C., 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141, 3584–3591.
- Cebbron-Delauw, M.F., Gardin, C., Travier, L., Balke, P., Mercier, C., 2008. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic* 9, 657–664.
- Charif, H., Dangy, F., Toppler, C., Cebbron-Delauw, M.F., Capron, A., 1993. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigen secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 71, 114–124.
- DiNitto, J.D., Beardsley, T.L., 2007. Smad6 protein to dense core secretory granules: will it fit or not out? *J. Cell Biol.* 177, 191–196.
- DiNitto, J.P., Lambright, D.C., 2006. Membrane and/or membrane targeting by PH and PTH domains. *Biochem. Biophys. Acta* 1761, 850–867.
- Donald, R.C., Carter, D., Utman, J., Ross, D.S., 1996. Immunol tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-thymine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J. Biol. Chem.* 271, 14010–14019.
- Fauquier, S., Morelle, W., Novais, A., Bednarczyk, A., Stomiancy, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., Tarnavo, S., 2008. Proteomics and glycomics analysis of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*–host cell interactions. *Mol. Cell Proteomics* 7, 991–910.
- Fernandez, J., Mercier, C., Wallon, M., Ponce, S., Cebbron-Delauw, M.F., Peyron, F., 2004. Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two transmembrane dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii* for distinguishing between acute and chronic infection in pregnant women. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 1016–1021.
- Gardin, C., Mercier, C., Braun, L., Munnier, K., Dubremetz, J.F., Cebbron-Delauw, M.F., 2008. *Toxoplasma gondii* uses unusual sorting mechanisms to deliver transmembrane proteins into the host-cell vacuole. *Traffic* 9, 1695–1699.
- Hiller, M.L., Sharmacharya, S., Liu, C., Lindo, K., Harrison, T., Lopez-Barneo, C., Halder, K., 2004. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306, 1934–1937.
- Karim, V., Qi, H., Beckers, C.J., Sully, A., Dubremetz, J.F., Webster, P., Joiner, K.A., 1993. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J. Cell Biol.* 124, 1229–1233.
- Karim, V., Nagai, R.S., Sui, A.P., Yang, M., Joiner, K.A., 2004. Transmembrane domain modulates sorting of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 279, 26952–26957.
- Labruyère, E., Lagrèze, M., Mercier, C., Sibley, L.D., 1999. Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA1 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102, 311–324.
- Leordeux, L., Molon-Boudonville, I., Dubremetz, J.F., Traverfille, B., Mercier, C., Sibley, D., Capron, A., Cebbron-Delauw, M.F., 1999. Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70, 85–94.
- Leordeux, L., Mercier, C., Sibley, L.D., Cebbron-Delauw, M.F., 1993. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA6 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell* 10, 1277–1287.
- Leordeux, L., Fournace, M.P., Mercier, C., Sibley, E., May, E., Cebbron-Delauw, M.F., 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 607–611.
- Lemmon, M.A., 2008. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 90–111.
- Lublin, D.M., Isaacowitz, M.K., Post, T.W., Aron, M.A., Le Beau, M.M., Reberthet, M.B., Lemmon, L.S., Seyer, T., Adelman, J.P., 1988. Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane oncogene protein (MCP). Does not lie within the mitogenic family of complement-regulatory proteins. *J. Exp. Med.* 169, 181–194.

- Mir, M., Good, R., Bag, M., Knappe, I., Cowman, A.J., 2004. Targeting malaria invasion and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306, 1084–1088.
- Morley, C., Adeline-Van Herde, S., Garhe, G.E., Leonard, L., Carson, A., Gibson-Delaw, M.F., 1995. Common cis-acting elements critical for the expression of several genes of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 21, 421–434.
- Morley, C., Sanchez, B., Leonard, L., Davis, D., Dubremetz, J.F., Gibson-Delaw, M.F., 2001. Lack of expression of the dense granule protein GRA5 does not affect the development of *Toxoplasma tachyzoites*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116, 247–251.
- Morley, C., Dubremetz, J.F., Sanchez, B., Frenkel, J., Shley, L.D., Gibson-Delaw, M.F., 2002. Biogenesis of microtubular network in *Toxoplasma paratuberculosis* vacuole induced by parasite invasion. *Mol. Biol. Cell* 13, 2397–2409.
- Morley, C., Adigbek, K.E., Dubremetz, J.F., Gibson-Delaw, M.F., 2003. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexan parasites? *Int. J. Parasitol.* 33, 929–949 (Erratum in: *Int. J. Parasitol.* 2003, 33, 1011–1012).
- Morley, C., Gibson-Delaw, M.F., Ferguson, D.P., 2007. Dense granules of the infectious stage of *Toxoplasma gondii*: their central role in the host/parasite interaction. *PLoS Pathog.* 3, e1000121. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000121>. *Microbes: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press, Norwich, pp. 475–482.
- Morley, C., Hume, A., Taylor, L., Gradián, C., Gibson-Delaw, M.F., in press. The dense granule proteins of *Toxoplasma gondii*. In: De Jager, O., Preter, S. (Eds.), *Parasitology Research Trends*. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Mouton, M., Mouton, L., Morley, C., Shley, L.D., 1995. Stable DNA transformation of *Toxoplasma gondii* using plasmid-catalyzed selection. *Gene* 165, 213–217.
- Michelin, A., Hume, A., Houdot, Y., Taylor, L., Morley, C., Dubremetz, J.F., Lehoucq, M., 2009. GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intracellular membranous microtubular network. *Int. J. Parasitol.* 39, 299–306.
- Mosler, D.C., Drees, M., Davis, M., Shley, L.D., 1993. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins of the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* 178, 1153–1164.
- Muchnik, M., Baroni-Cabel, D., Dutra, C., Bernasconi, F.J., Luangsay, S., Mirza, L.A., Crigg, M.E., Tonawo, I., Boothroyd, J.C., Kaplan, L.H., 2004. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 173, 2725–2735.
- Norte, M.A., Wick, J.A., Murray, J.M., Webster, P., Bradley, R.J., 2006. Intracellular transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 74, 4805–4815.
- Padgett, C., Adhota, D., Capron, A., Dumas, C., Sanoon, F., 1995. Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with reactive epitopes. *Eur. J. Immunol.* 25, 747–749.
- Salasik, N., Hume, A.M., Kistler, S., Smith, A.T., Murrell, K., Carr, J., Sullivan, W.J., Gibson-Delaw, M.F., Halden, M.A., 2005. Mitosis-modifying complex regulates gene expression patterns in the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell Biol.* 25, 10301–10314.
- Sanchez, B., Dubremetz, J.F., Boothroyd, J.C., 1999. Analysis of *Toxoplasma gondii* maily transcribed with a transmembrane variant of the major surface protein GRA1. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 1), 23–29.
- Shelton, L., Sidiqi-Faroo, D., 2001. Protein trafficking inside *Toxoplasma gondii*. *Trends* 3, 100–103.
- Shley, L.D., Norman, L.R., Nemley, S.F., Gibson-Delaw, M.F., 1995. Regulated secretion of mid-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host- and vacuole occupancy *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 108 (Pt. 4), 1669–1677.
- Soldati, D., Boothroyd, J.C., 1993. Parasite transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* 260, 549–552.
- Striepen, B., He, C.Y., Wang, M., Soldati, D., Boss, D.S., 1998. Segregation, selection and organelle targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 325–338.
- Striepen, B., Soldati, D., Garcia-Regueir, H., Dubremetz, J.F., Boss, D.S., 2001. Targeting of soluble proteins to the organelles and micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 45–53.
- Sun-kyu, H., Zimmerman, J., Ward, G.E., 1995. *Toxoplasma* invades the parasitophorous vacuole in human host liver cell plasma membrane and pinches off via a fusion pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8483–8487.
- Taylor, L., Montenegro, R., Dubremetz, J.F., Hume, C., Montenegro, M., Gonzalez, I., Landmann-Uribe, W., Mouton, L., 2006. Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous microtubular network of the parasitophorous vacuole. *Int. J. Parasitol.* 36, 777–778.

Supplementary Table SI. Sequence of the primers used in this study.

^a Name of the primer	^b Primer sequence	Length of the amplified fragment (bp)
Amplification of the 5' and 3' UTR of <i>GRA5</i> :		
Amplification of the 5' UTR:		884
GRA5-HF1	<u>CGGGATCCTGGTTCTCTTACACGTTGCAA</u> (<i>Bam</i> HI)	
GRA5-HF2	<u>TCCCCCGGGAGACGCCATTTTGTACTTCAC</u> (<i>Sma</i> I)	
Amplification of the 3'UTR:		394
GRA5-HF3	<u>CCCGCTCGAGGGGGCACTGTGTTGCTCG</u> (<i>Xho</i> I)	
GRA5-HF4	<u>GGGGTACCGCGCCTTGTGTGCGAATCA</u> (<i>Kpn</i> I)	
GRA6/CD46 TM /CD46-HF		631
Amplification of GRA6 Nt:		463
GRA6-HF1	<u>TCCCCCGGGGCACACGGTGGCATCCATC</u> (<i>Sma</i> I)	
GRA6-HF2	CACAGCAATGACCCAAACTCTGTGGCGTTTCTGTGTTT	
Amplification of CD46 TM + CD46 Ct:		168
CD46-HF19	GAACACAGAAACGCCACAGAGTTTGGGTCATTGCTGTG	
CD46-HF2	<u>CGGAATTCGCCTCTCTGCTCTGCTGG</u> (<i>Eco</i> RI)	
Amplification of the whole product: GRA6-HF1 + CD46-HF2		1094
SAG1/GRA6 TM /GRA6-HF		861
Amplification of SAG1 Nt:		
SAG1-HF1	<u>TCCCCCGGGTTTCCGAAGGCAGTGAAGGCAGTGAGACGC</u> (<i>Sma</i> I)	
SAG1-HF9	CACCACAGCACCAATGAGTGCAGCCCCGGCAAATC	
Amplification of GRA6 TM + GRA6 Ct:		233
GRA6-HF4	GAGTTTGCCGGGGCTGCACTCATTGGTGCTGTGGTG	
GRA6-HF5	<u>CGGAATTCATAATCAAACACATTCACACG</u> (<i>Eco</i> RI)	
Amplification of the whole product: SAG1-HF1 + GRA6-HF5		

GRA5/GRA6 TM /GRA6-HF	454
Amplification of GRA5 Nt:	221
GRA5-HF5 <u>TCCCCGGGGTAAAACGCGTCGTTGTGG</u> (<i>SmaI</i>)	
GRA5-HF19 CACCACAGCACCAATGAG AGTCCTCACTGGATGTCC	
Amplification of GRA6 TM + GRA6 Ct:	233
GRA6-HF6 GGACATCCAGTGAGGACT CTCATTGGTGCTGTGGTG	
GRA6-HF5	
Amplification of the whole product: GRA5-HF5 + GRA6-HF5	
GRA6/GRA5 TM /GRA5-HF	597
Amplification of GRA6 Nt:	463
GRA6-HF1	
GRA6-HF3 CTGCAGCAAGTCCCCTGCTCTGTGGCGTTTCTGTGTT C	
Amplification of GRA5 TM + GRA5 Ct:	134
GRA5-HF18 GAACACAGAAACGCCACAGAG GCAGTGGGACTTGCTGCAG	
GRA5-HF6 <u>CGGAATTCCTCTTCCTCGGCAACTTCTT</u> (<i>EcoRI</i>)	
Amplification of the whole product: GRA6-HF1 + GRA5-HF6	

^aThe name of each primer includes the gene to be amplified (bold). In each primer sequence, the region annealing to a specific gene is indicated in bold; the restriction site and its floating bases are underlined. The restriction sites used for cloning are indicated at the end of the primer sequences.

^bThe sequence of each primer is given 5' to 3'.

UTR, untranslated region; Nt, N-terminal; Ct, C-terminal.

CHAPITRE III : Contribution de GRA2 et GRA6 à la formation du RNM

Le RNM est une structure membranaire qui se forme 10 - 30 minutes après que le parasite soit entré dans la cellule hôte et ait formé sa VP. Les tubules membranaires qui le composent, semblent se former au pôle postérieur du parasite puisqu'on y détecte alors des vésicules, d'origine et de composition inconnue, et de courts tubules membranaires enroulés (Sibley *et al.*, 1995 ; Mercier *et al.*, 1998a). Certaines des protéines GRA, notamment GRA2, GRA6 et GRA12, ont été immuno-localisées au niveau de ce réseau en formation. Ces protéines semblent donc se localiser là où elles pourraient potentiellement assurer la mise en contact des vésicules, la déformation de leurs membranes, leur fusion, et stabiliser les tubules membranaires formés. De plus, par l'analyse du phénotype de parasites délétés de *GRA2* et/ou *GRA6*, il avait été montré de façon indirecte, que ces deux protéines sont indispensables à la formation d'un RNM mature dans l'espace vacuolaire : GRA2 initierait le processus de formation du RNM alors que GRA6 interviendrait après GRA2, pour stabiliser dans le temps et l'espace, les tubules membranaires initiés par GRA2 (**Figures 28-29**) (Mercier *et al.*, 2002).

Peu de protéines ont été détectées au RNM mature jusqu'à présent. Hormis la récente observation de protéines de la famille de ROP2 (protéines qui pourraient utiliser le RNM pour accéder à la membrane de la VP) (Reese *et al.*, 2009), seules des protéines GRA et notamment, GRA2, GRA6, GRA9 et GRA12, ont été décrites comme associées aux membranes du RNM mature (Mercier *et al.*, 2010). GRA2 était, *a priori*, un candidat intéressant pour initier le processus de déformation des membranes. En effet, sa

séquence en acides aminés permettrait de former deux ou trois hélices alpha-amphipatiques (AAH pour « amphipathic alpha-helix ») dans la région centrale de la protéine (Travier *et al.*, 2008). Or, l'insertion d'une AAH est suffisante pour générer des déformations membranaires (Peter *et al.*, 2004 ; Zimmerberg and Kozlov, 2006 ; Drin and Antony, 2010). GRA6, quant à elle, contiendrait une hélice alpha-hydrophobe (Lecordier *et al.*, 1995) qui assurerait l'association de la protéine aux membranes du RNM mature (Labruyère *et al.*, 1999). Cette protéine avait été décrite comme étant un partenaire privilégié de GRA2 durant la phase initiale de formation du RNM. En effet, la délétion du gène *GRA2* se traduit, entre autres, par un défaut d'accumulation de GRA6 au pôle postérieur du parasite, 10-30 min après l'invasion, c'est-à-dire quand le RNM se met en place (Mercier *et al.*, 2002). Ce résultat pouvait donc indiquer que les deux protéines GRA2 et GRA6 interagiraient dans la VP, très tôt après leur sécrétion, pour contribuer à la formation du RNM. De plus, les données récentes de la littérature concernant les mécanismes de déformation membranaire, indiquent que des protéines contenant des domaines transmembranaires peuvent également contribuer aux déformations membranaires, seules, ou en coopération avec d'autres protéines (Praefcke and McMahon, 2004). Enfin, il est à l'heure actuelle, impossible de purifier les membranes du RNM à partir de la VP (les données lipidomiques concernant ce compartiment sont donc inexistantes) et la purification des protéines GRA à partir de la fraction soluble de la PV serait longue et laborieuse.

Pour toutes ces raisons, afin de rechercher quelle est la participation des protéines GRA2 et GRA6 dans le mécanisme de formation du RNM, nous avons utilisé un système de larges vésicules unilamellaires (« Large Unilamellar Vesicles » ou LUV) formées de lipides complexes et des protéines GRA2 et GRA6 exprimées sous forme recombinante chez *Escherichia coli*. Après avoir validé les protéines recombinantes par différentes techniques de biochimie et de microscopie, nous avons tout d'abord étudié l'action de GRA2 et GRA6, incubées seules, avec les LUVs puis avons procédé à leur co-incubation avec les vésicules.

III-1) Etude des protéines recombinantes

Trois protéines recombinantes flanquées d'étiquettes His₆ (afin de faciliter leur purification par affinité sur une résine couplée au Ni²⁺) ont été produites à partir d'*E. coli*, sous forme soluble, selon un protocole qui n'utilise pas de détergent. Puisque les AAH de GRA2 avaient été démontrées comme étant responsables de l'association de la protéine aux membranes du RNM (Mercier *et al.*, 1998a ; 2002 ; Travier *et al.*, 2008), nous avons

également exprimé en plus de GRA2 et GRA6, la protéine GRA2 (NT-CT), c'est-à-dire GRA2 tronquée de ses AAH. Bien que les protéines recombinantes rGRA2, rGRA2 (NT-CT) et rGRA6 migrent en SDS-PAGE, à un poids moléculaire apparent compatible avec ce qui était attendu, des formes de plus haut poids moléculaire ont été détectées, notamment pour rGRA2. Après avoir vérifié en immunoblot que les protéines recombinantes sont reconnues par des anticorps spécifiques, il fallait valider la possibilité d'utiliser ces protéines dans notre système d'étude *in vitro* des interactions protéines-membranes. Pour cela, les protéines en solution ont été analysées par dichroïsme circulaire, par chromatographie d'exclusion de taille (cas de rGRA2 uniquement), par diffusion dynamique de la lumière et par microscopie électronique à transmission.

Si les spectres de dichroïsme circulaire de rGRA2 et rGRA2 (NT-CT) sont conformes aux prédictions de structure secondaire (protéine majoritairement repliée en hélice alpha pour rGRA2 et repliement aléatoire dans le cas de rGRA2 (NT-CT)), celui de rGRA6 indique que la protéine recombinante ne se replie que partiellement en hélice alpha. De plus, la diffusion dynamique de lumière, la chromatographie d'exclusion de taille ainsi que la microscopie électronique ont montré que rGRA2 (NT-CT) et rGRA6 constituent une population monodisperse de petites particules (8 nm de diamètre dans le cas de rGRA2 (NT-CT) et 7 nm de diamètre dans le cas de rGRA6). rGRA2, quant à elle, est constituée de deux populations de particules solubles, l'une formée de particules d'une dizaine de nm de diamètre, pour un poids moléculaire de 64-68 kDa (dimère probable) et la seconde, formée de particules à la forme caractéristique de « donuts » de 15 à 40 nm de diamètre pour un poids moléculaire > 500 kDa.

III-2) rGRA2 s'associe préférentiellement aux LUVs de 100 nm de diamètre qu'elle déforme en courts tubules membranaires

Du fait de l'absence de données sur la composition en lipides des membranes du RNM :

- nous avons choisi de travailler avec des LUV (soniquées ou extrudées) de composition lipidique complexe, c'est-à-dire formées à partir de lipides extraits de cellules eucaryotes HeLa ;
- nous n'avons pas pu travailler en quantités molaires de lipides mais uniquement en quantités massiques.

Après avoir déterminé empiriquement le rapport lipides/protéine le plus favorable à l'association de rGRA2 aux membranes, la protéine a été incubée avec des vésicules extrudées à 50, 100 ou 200 nm et le produit de l'incubation a été analysé d'une part, par immunoblot, après ultracentrifugation dans un gradient discontinu de densités de

sucrose, et d'autre part, par microscopie électronique à transmission. C'est lorsqu'elle est incubée avec des LUVs de 100 nm de diamètre qu'on observe la proportion la plus importante de rGRA2 dans les fractions supérieures du gradient, fractions qui contiennent aussi les liposomes. Ces résultats indiquent que la protéine s'associe bien aux membranes des vésicules de 100 nm de diamètre. Par dichroïsme circulaire, nous avons montré que le repliement majoritaire de rGRA2 en hélice α n'est pas modifié suite à son association aux membranes des LUV. Par traitement des membranes des LUVs par différents agents chimiques qui déstabilisent les interactions protéines-membranes, j'ai également montré que rGRA2 s'associe aux membranes des LUV via des interactions hydrophobes majoritaires. Enfin, c'est également à partir du produit de l'incubation de rGRA2 avec des LUV de 100 nm de diamètre, que de courts tubules membranaires (diamètre de 20-40 nm, longueur maximale d'une centaine de nm) ont été observés par microscopie électronique à transmission. De plus, nous avons vérifié que rGRA2 (NT-CT), incubée dans les mêmes conditions que rGRA2, ne s'associe pas aux LUVs.

Dans les cellules eucaryotes, un des partenaires lipidiques privilégiés des protéines déformant les membranes et contenant une AAH, est le PI(4,5)P₂. Afin de rechercher si rGRA2 présente une affinité pour PI(4,5)P₂, des expériences de « fat blots » ont été réalisées. Alors que rGRA2 reconnaît la plupart des phospholipides chargés négativement (PS, CL, PI(4)P), PI(4,5)P₂ et PI(3, 4, 5)P₃, de façon intéressante, rGRA2 (NT-CT), reconnaît les mêmes lipides, hormis PI(4,5)P₂. Ces résultats suggèrent donc que les AAHs de rGRA2 reconnaîtraient PI(4,5)P₂ dans les membranes.

Afin de valider cette interaction, rGRA2 a été incubée avec des LUVs soniquées et composées uniquement de 2- (PC/PE) ou de 3 phospholipides (PC/PE/PI) ou (PC/PE/PI(4,5)P₂), en utilisant les rapports molaires respectifs (6/4), (6/3/1) et (6/3/1) (**Figure 67A**). Le produit de l'incubation a été soit ultracentrifugé, soit déposé au fond d'un gradient de densité de sucrose. Les résultats de ces expériences ont montré qu'alors qu'une fraction de rGRA2 reste dans la fraction soluble dans le cas de vésicules contenant du PI ou uniquement PC/PE, la totalité de la protéine est retrouvée dans le culot dans le cas des vésicules contenant PC/PE/PI(4,5)P₂ (**Figure 67B-haut**). Le traitement du culot d'ultracentrifugation par des agents chimiques déstabilisant les protéines membranaires a montré que rGRA2 n'est solubilisée que par le NP-40 (**Figure 67B-bas**). Enfin, le gradient de densité a permis de confirmer l'association de rGRA2 aux membranes des LUV + PI(4,5)P₂ (**Figure 67C**).

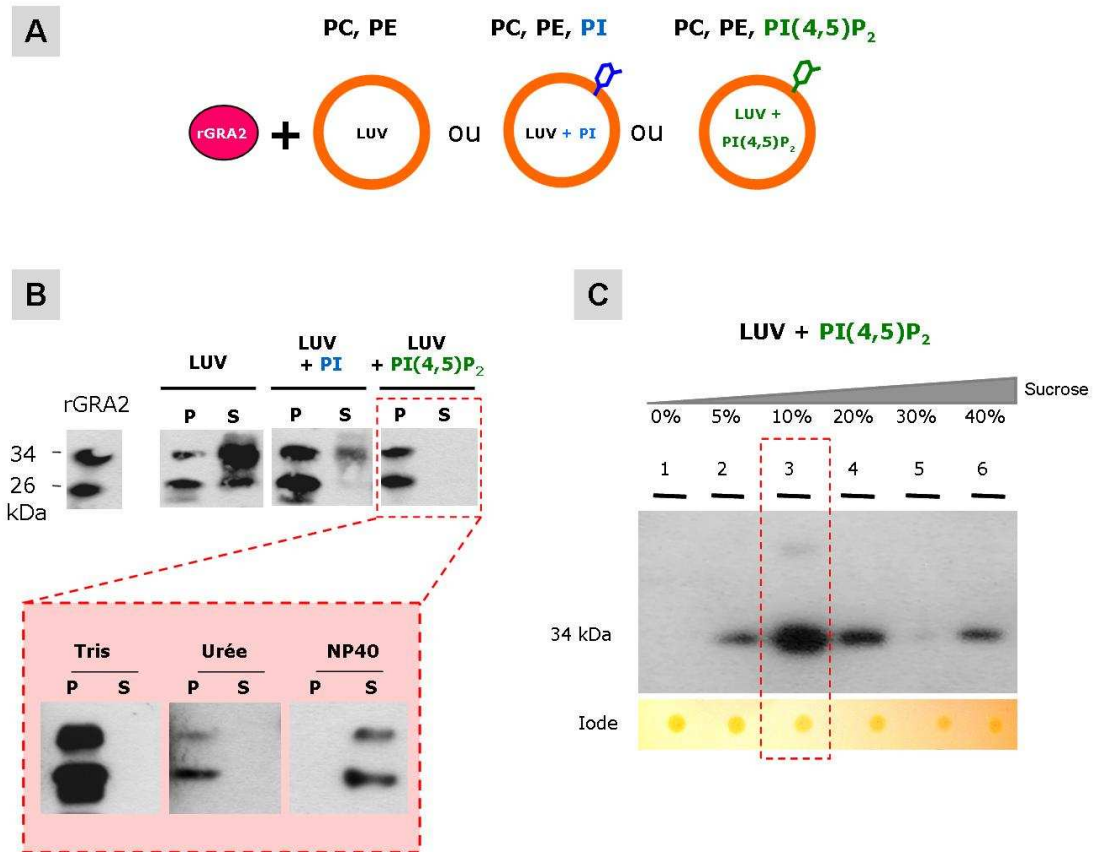


Figure 67. rGRA2 s'associe préférentiellement aux LUVs contenant du PI(4,5)P₂. (A) Représentation schématique des 3 types de LUVs incubées avec rGRA2. Les « LUV » étaient constituées de (PC/PE) (6/4) ; les « LUV+PI », de (PC/PE/PI) (6/3/1) et les « LUV+ PI(4,5)P₂ », de (PC/PE/ PI(4,5)P₂) (6/3/1) (rapports molaires). Le produit de l'incubation de rGRA2 avec trois types de LUVs a été : (B) ultracentrifugé, à 100 000 g pour obtenir un culot P, qui contient la protéine associée aux membranes et un surnageant, S, qui contient la protéine non associée. La fraction membranaire P a été traitée soit par de l'urée 6M, soit par du Nonidet P-40 (NP-40) 1%, soit par du Tris pH 8 (contrôle) (encadré rouge). Les traitements ont été appliqués pendant 30 min, sur glace. Une deuxième ultracentrifugation d'une heure, à 100 000 g, a été réalisée pour obtenir à nouveau un culot, P, qui contient la protéine non solubilisée par les traitements et un surnageant, S, qui contient la protéine solubilisée. (C) Le produit de l'incubation de rGRA2 avec les LUV+ PI(4,5)P₂ a également été déposé au fond d'un gradient discontinu de sucrose (0 - 40 %), puis centrifugé jusqu'à l'équilibre (100 000 g, 13h). Le contenu du gradient a été collecté par fractions de 100 µl. Les fractions ont été pesées puis analysées par immunoblot. L'ensemble des gels présentés a été révélé à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA2.

Dans leur ensemble, ces expériences :

1) ont permis de valider que rGRA2, seule, est capable de s'associer aux membranes de courbure membranaire importante et de composition lipidique complexe et de les déformer pour générer de courts tubules membranaires.

2) Ils montrent également que rGRA2 reconnaît PI(4,5)P₂ via ses AAH.

Néanmoins, la fréquence de formation des tubules membranaires est restée faible et la morphologie des tubules formés ne correspondait pas à celle du RNM observé dans la VP.

Nous avons donc ensuite recherché si rGRA6 permettrait d'améliorer le système d'étude *in vitro*.

III-3) rGRA6 facilite la formation des tubules membranaires initiés par rGRA2

Afin d'étudier le rôle de rGRA6 dans le processus de tubulation membranaire induit par rGRA2, il était nécessaire dans un premier temps, d'étudier le comportement de rGRA6, seule, vis-à-vis des membranes. rGRA6 a donc été incubée avec des LUVs HeLa de différents diamètres. Les résultats obtenus indiquent que rGRA6 ne présente pas de sensibilité à un degré particulier de courbure membranaire mais que par contre, elle semble favoriser le rapprochement et l'agglomération des vésicules lipidiques, sans provoquer leur déformation.

L'abondance relative des protéines GRA2 et GRA6 dans la VP n'étant pas connue, nous avons cherché à déterminer le rapport massique optimal rGRA2/rGRA6 qui favoriserait la formation de tubules membranaires, par l'action conjuguée de rGRA2 et rGRA6 sur des LUV HeLa de 100 nm de diamètre. De nombreux tubules membranaires irradiant des liposomes (longueur : jusque 200 nm ; diamètre moyen : 15-25 nm) ont été observés lorsque les deux protéines recombinantes ont été co-incubées dans un rapport massique protéine/protéine rGRA2/rGRA6 de 10/1. L'analyse en immunoblot des fractions des gradients de sucrose a confirmé que les deux protéines s'associent aux membranes des LUV. En présence de rGRA6, rGRA2 semble s'associer de façon plus importante aux membranes qu'en son absence.

Dans son ensemble, même s'il ne permet pas encore de définir le mécanisme par lequel les membranes du RNM se forment, ce travail a donc permis de valider le rôle coopératif de GRA2 et GRA6 dans la déformation initiale des membranes à l'origine du RNM.

L'ensemble de ces travaux est présenté en détails dans l'article N°3 intitulé «**The GRA2 protein of *Toxoplasma gondii* cooperates with GRA6 to induce membrane tubulation** », actuellement soumis pour publication.

ARTICLE N°3

Amina Bittame, Grégory Effantin, Anne Valat, Edgar Gentilhomme, Eric Maréchal, Graciane Pêtre, Pauline Ruffiot, Laetitia Travier, Marc Jamin, Guy Schoen, Winfried Weissenhorn, Marie-France Cesbron-Delauw, Jean Gagnon and Corinne Mercier. « **The Toxoplasma GRA2 and GRA6 proteins cooperate to generate membranous nanotubes** ». In preparation.

The Toxoplasma GRA2 and GRA6 proteins cooperate to generate membranous nanotubes

Amina Bittame¹, Grégory Effantin², Anne Valat^{1*}, Edgar Gentilhomme^{3*}, Eric Maréchal⁴, Graciane Pètre¹, Pauline Ruffiot¹, Laetitia Travier¹, Marc Jamin², Guy Schoen^{2,5}, Winfried Weissenhorn², Marie-France Cesbron-Delauw¹, Jean Gagnon¹ and Corinne Mercier^{1§}

* equal contribution

§ corresponding author: corinne.mercier@ujf-grenoble.fr

Tel: (+33) (0)4 76 63 74 72

Fax: (+33) (0)4 76 63 74 97

1 Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, CNRS UMR 5163, Université Joseph Fourier Grenoble 1, Institut Jean Roget, Campus Santé. BP 170, 38042 Grenoble cedex 9, France.

2 Unit for Virus Host-Cell Interactions (UVHCI), UMI 3265 Université Joseph Fourier Grenoble 1-EMBL-CNRS, Carl-Ivar Brändén Building. 6 rue Jules Horowitz. 38042 Grenoble Cedex 9. France

3 CRSSA. BP 87. 24 Av. des Maquis du Grésivaudan. 38702 La Tronche cedex, France

4. UMR 5168 CNRS-CEA-INRA-Université J. Fourier. Département Réponse et Dynamique Cellulaire - CEA-Grenoble. 17, rue des Martyrs. 38054 Grenoble Cedex 9, France

5 CEA, CNRS, Université J Fourier, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR5075 Grenoble France.

Summary (284 words)

Membrane deformation requires proteins. Those which contain an amphipatic alpha-helix (AAH) can penetrate and shape the lipid bilayer into tubules. A membranous nanotubular network (MNN) is the main structural feature of the parasitophorous vacuole (PV) in which *Toxoplasma gondii* develops within the host cell. The MNN is a key support of parasite development. However, how the MNN is formed and for which function remain poorly understood. We had previously demonstrated indirectly that the secreted dense granule GRA2 protein, which contains three AAH is a key element of the initiation of MNN biogenesis and that GRA6, which contains a long hydrophobic alpha helix, is required for MNN stabilization. Here we used an *in vitro* system to demonstrate that both GRA2 and GRA6 are sufficient to form membranous nanotubes. Recombinant GRA2 (rGRA2) and GRA6 (rGRA6) proteins were purified from bacteria. Circular dichroism and dynamic light scattering showed that rGRA2, which folds with an alpha-helical pattern, is purified as two soluble complexes, one being likely a dimer and the other, a multimeric complex of high molecular weight. rGRA6, which folds partially with an alpha-helical pattern, is purified as monomers. When incubated with Small Unilamellar Vesicles (SUVs) formed from complex lipids, rGRA2 associates preferentially with SUVs of 100 nm in diameter *via* hydrophobic interactions and generates short membranous tubules observed by transmission electron microscopy (TEM). rGRA6 also associated with SUVs of 100 nm in diameter and was shown to tether vesicles. Upon co-incubation of rGRA2 and rGRA6 with SUVs, the frequency of tubule formation did increase. Fat blots showed that rGRA2 recognizes Phosphatidyl Inositol (4, 5) bi-phosphate via its AAH. These results thus validate the cooperation of both GRA2 and GRA6 to deform membranes and to generate membranous tubules.

Key words: amphipatic alpha-helices; Apicomplexa; dense granule proteins (GRA proteins); membranous tubules; phosphatidyl inositol (4,5) biphosphate; *Toxoplasma gondii*.

Introduction

In eukaryotic cells, formation of membranous tubules or more specifically, changes in local membrane curvature are linked to various biological processes, such as the genesis of filopodia, cellular division, communication between cells and formation of elongated organelles (the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, mitochondria...) (Ramirez-Weber and Kornberg, 1999; Rustom et al., 2004; for a review, Shibata et al., 2009). Formation of membranous tubules can also be linked to various infectious processes, with pathogen-induced membranous tubules occurring within or outside the pathogen-containing vacuole (Lauer et al., 1997; Cesbron-Delauw et al., 2008; Mercier et al., 2010), the infected cell (Maier and Wiethoff, 2010; Drecktrah et al., 2008; Lata et al., 2008) or between infected- and potentially infected cells (Sowinski et al., 2008).

How membrane curvature is generated, is still poorly understood. Various parameters including specific membrane lipids, lipid asymmetry and energy, are required to induce the initial membrane curvature (Zimmerberg and Kozlov, 2006). Although certain lipids are sufficient to generate membrane domains of moderate curvature (Bacia et al., 2005; Baumgart et al., 2003) or even membrane tubules from liposomes (Stowell et al., 1999), it is generally accepted that the energy required for high membrane curvature in intracellular membranes, is provided by proteins (Zimmerberg and Kozlov, 2006; Devaux et al., 2008; Madsen et al., 2010), which act directly on membranes to deform them, using three types of mechanisms. The first mechanism involves molecular motors that pull-out thin membranous tubules from a lipid bilayer by progressing along microtubules or actin filaments (McMahon and Gallop, 2005). The second mechanism is scaffolding by which proteins with affinity for lipid polar heads (as an example, the Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) proteins; McMahon and Gallop, 2005; Campelo et al., 2010) assemble into concave structures which are sufficiently rigid to impose membrane bending. The third mechanism relies on the insertion of a hydrophobic domain into the membrane bilayer. This wedging effect can be sustained by proteins

which contain hydrophobic segments that form a hairpin in the membrane (proteins of the reticulons/DP1/Yop1 family as examples) (for a review, Shibata et al., 2009) or by proteins that contain an amphipatic alpha-helix (AAH) (for a review, Drin and Antonny, 2010). In these helices, the hydrophobic amino acids, located on one face of the helix, are segregated from both the polar and charged residues which are located on the opposite face. Most of the AAHs are unfolded in ionic buffers but upon contact with the surface of a curved membrane, they undergo a transition into AAH, which interacts via its positive charges with the membranous negatively charged lipids and deform them to induce membrane tubulation (for a review, Drin and Antonny, 2010).

Toxoplasma gondii is the intracellular parasite responsible for toxoplasmosis, a widespread anthroponozoonose that affects up to one third of the human population worldwide and is responsible for severe fetal disabilities or fatal encephalitis in immunocompromised patients, if not treated. Like the other parasites of the Apicomplexa phylum, such as *Plasmodium* spp (the etiologic agent of malaria), *T. gondii* multiplies within the infected cell, inside a parasitophorous vacuole (PV) that provides a safe metabolically active compartment to the parasite. The PV is formed upon active invasion of the host cell, from the cellular plasma membrane and from the coordinated secretion from parasite's secretory organelles, namely the micronemes, the rhoptries and the dense granules (for reviews, Cesbron-Delauw et al., 2008, Sibley, 2004; Carruthers and Boothroyd, 2007; Dubremetz, 2007).

The most important structural feature of the *Toxoplasma* PV is a membranous nanotubular network (MNN) which connects the parasites together and to the vacuolar membrane. The function of the MNN remains currently unclear: it was initially proposed as being involved in the acquisition of nutrients from the host cell and/or the export of degradation products from the PV to the host cell (Sibley et al., 1995; Mercier et al., 1998a). Current hypotheses favor a role in maintaining the dividing parasites in an ordered arrangement within the PV to optimize their synchronous division (Travier et al., 2008). The MNN could also be involved in the transport of secreted protein complexes en route to the PV

membrane (Reese and Boothroyd, 2009). Despite its unknown function at the parasite/host cell interface, the MNN was correlated to the parasite's virulence (Mercier et al., 1998b).

Both the dense granule secreted proteins GRA2 and GRA6 are currently the best effector candidates of MNN membrane tubulation. GRA2 is a 28 kDa protein (185 amino acids (aa)) which contains three central AAHs flanked by two hydrophilic regions (Travier et al., 2008). Transmission electron microscopy analysis of the PV of a parasite strain from which the single *gra2* gene had been deleted (Δ GRA2 strain) showed complete disruption of the MNN (Mercier et al., 2002), demonstrating indirectly that GRA2 is a crucial effector of MNN formation (Mercier et al., 1998b; Mercier et al., 2002; Travier et al., 2008). By complementation of the Δ GRA2 strain with truncated GRA2 proteins, both the N-terminal hydrophilic domain and the AAHs were shown to be necessary to induce the formation of the MNN (Travier et al., 2008). GRA2 is secreted sub-apically from the dense granules into the vacuolar space shortly after formation of the PV. It rapidly re-localizes to the posterior end of the parasite which is then invaginated. This is likely during this particular time period, i.e. 10-30 min post-invasion, that GRA2 does associate with the membrane whorls and the vesicles present within the PV space and which will progressively fuse and elongate to form the MNN (Sibley et al., 1995).

Interestingly, deletion of the *gra6* gene also resulted into the parasite's PV being devoid of its MNN, which was replaced by small vesicles within the vacuolar space. Furthermore, the posterior invagination of the Δ gra6 strain did contain small membranous whorls which yet failed to later elongate and unfold because of the lack of GRA2 (Mercier et al., 2002). These results indicated indirectly that GRA6 would also contribute significantly to the MNN formation, likely by stabilizing the membranous tubules once initiated by GRA2.

In this study, we examined the contribution of both GRA2 and GRA6 in the MNN formation. We first developed the production of recombinant GRA2 (rGRA2) and GRA6 (rGRA6) proteins (rGRA2 and rGRA6) from *Escherichia coli* and without detergent. Using biochemical and microscopy techniques, we then investigated the effect of these recombinant proteins on small unilamellar

vesicles (SUVs) generated from complex lipids extracted from eukaryotic cells. The results showed that rGRA2 associates preferentially with vesicles of 100 nm in diameter and deforms them into short membranous tubules. Upon co-incubation of rGRA2 and rGRA6 with SUVs, the efficacy in membranous tubules formation was increased. Together, these results validate the crucial role of both GRA2 and GRA6 in the formation of the Toxoplasma MNN.

Results

Bio-physical characterization of recombinant GRA2 and GRA6 expressed in bacteria.

In order to obtain direct proofs of the role of both GRA2 and GRA6 in membrane tubulation, we first set up conditions of purification from *E. coli* and without detergent, of the recombinant soluble proteins rGRA2 (theoretical molecular weight (MW): 27.29 kDa) (Golkar et al., 2007), rGRA6 (theoretical MW: 28.38 kDa) and of rGRA2 (NT-CT) (theoretical MW: 18.41 kDa), using the pUET1 plasmid vector (Dabrowski and Kur, 1999). rGRA2 (NT-CT) is a truncated form of rGRA2, from which the amphipatic α -helices have been deleted (Fig.1A). pUET1 allows the fusion of the recombinant proteins with a N-terminal S tag derived from a pancreatic ribonuclease (solubilizing peptide) and with two flanking Hisx6 tags (Fig. 1A). Purification of the recombinant proteins was achieved by lysing the transformed bacteria in 20 mM MOPS pH 7.5, followed by single step affinity purification on Ni-agarose and subsequent size exclusion chromatography to eliminate the imidazole used to elute the recombinant proteins. SDS-PAGE analysis (Fig. 1B, first panel) showed major bands at the MW of 34 kDa (rGRA2), 27 kDa (rGRA2 (NT-CT)) and 43 kDa (rGRA6), respectively. Upper forms, which could correspond to SDS-resistant multimeric forms of rGRA2 and lower bands, which could be rGRA6 degradation products were also observed. On immunoblots, each recombinant protein was efficiently recognized by the anti-Hisx6 monoclonal antibody (mAb) (Fig. 1B, 2nd panel) as well as by antibodies specific of the GRA proteins, i.e. the mAb TG17.179 which recognizes the 8 C-terminal amino acids of GRA2 (Cesbron-Delauw et al., 1992) (Fig. 1B, 3rd panel) and the rabbit serum raised against another recombinant form of GRA6 (Labuyère et al., 1999) (Fig. 1B, 4th

panel). Three different kinds of circular dichroism (CD) spectra were observed for the recombinant proteins. The spectrum of rGRA2 displayed two minima, at 208 and 222 nm respectively, both characteristic of a protein mainly folded in α -helical structure; the spectrum of rGRA2 (NT-CT) was that of a protein arranged mainly in random coil and the spectrum of rGRA6 was a mix between that of a protein folded in α -helical structure (see the minimum at 225 nm) and that of a protein in random coil (**Fig. 2C**). Dynamic light scattering (DLS) analysis using a zetasizer was used to investigate whether the purified proteins were homogenous or not. While both rGRA2 (NT-CT) and rGRA6 appeared as homogenous populations of small particles (8 nm and 7 nm in diameter, respectively), 2 populations of particles were observed in the soluble rGRA2: 56% of rGRA2 was included in particles of 17.7 nm in diameter while 44% of the protein was comprised in particles of 66 nm in diameter; (**Fig. 1D, left panel**). Although the diameter of these rGRA2 particles could not be confirmed when using the DLS Wyatt technology apparatus because of the low amplitude of the refraction index peaks, calibration of the Sephacryl-500 column coupled to the detector with soluble proteins of defined molecular weight, allowed to estimate that the rGRA2 peak characterized by an elution volume of 32 ml, would correspond to particles > 500 kDa (**Fig. 1D, right panel, b peak**). In order to gain more information into the oligomeric forms of the different GRA proteins, we analyzed them by negative stain Transmission Electron Microscopy (TEM). For rGRA2, we observed a continuum of structures ranging from 8 to more than 100 nm in diameter (maximum dimensions). In conjunction with the DLS results presented above, we interpreted the smaller particles (i.e. around ~10 nm in diameter) as soluble small oligomers of rGRA2 (**Fig. 1E, left panel, black circles**). While we cannot exclude the possibility that the very large objects (up to 100 nm in diameter) might be vesicles/membrane pieces co-purifying with the protein, the intermediate sized structures, ranging from ~15 to 40 nm in diameter (maximum dimensions), likely represent the > 500 kDa multimeric forms of rGRA2 either soluble or membrane-bound (**Fig. 1E, left panel, white arrows**). When both rGRA2 (NT-CT) and rGRA6 were observed by negative stain TEM, they revealed a more homogenous population of

particles compared to rGRA2. The external diameter of both rGRA2 (NT-CT) and rGRA6 was ~6 – 8 nm (**Fig. 1E, central and right panel**). Together, these results suggest that soluble rGRA2 forms a variety of oligomeric structures, the smaller one matching a 65 kDa dimer, and that both rGRA2 (NT-CT) and rGRA6 were purified as homogenous populations of monomeric proteins.

rGRA2 is capable of deforming liposomes of complex lipid composition into short membranous nanotubes. In order to analyze the effect of rGRA2 on membranes, small unilamellar vesicles (SUVs) were generated either by sonication or by extrusion, using 100 nm pore-sized membranes and lipids extracted from HeLa cells. DLS analyses of these HeLa SUVs showed single peaks, indicating homogenous populations of vesicles of 100 nm- (**extruded SUVs, suppl. Fig. 1A**) or of 67.5 nm in diameter (**sonicated SUVs, suppl. Fig. 1B**). The homogeneity of SUVs extruded at 100 nm was also confirmed by TEM (**Supl. Fig. 1C, central panel**).

To set up the conditions to investigate the effect of rGRA2 on membranes, we first defined the optimal lipid:protein ratio. Aliquots of SUVs obtained by sonication from 116 μ g of HeLa lipids were first incubated for 30 min with various, empirical, quantities of rGRA2, followed by an ultracentrifugation at 100,000 g for 1 h (standard binding assay). The minimum ratio in lipids:rGRA2 (MW:MW) which allowed complete recovery of the protein in the pellet, in an easily detectable amount, was determined as 116 μ g of lipids for 5 μ g of rGRA2 (0.18 nmoles) (ratio 23.2:1 (MW:MW) (**Suppl. Fig. 2A**). However, because the recombinant proteins had to be purified and frozen before their incubation with SUVs, we performed a mock incubation of rGRA2, rGRA2 (NT-CT) and of rGRA6 for 30 min, at room temperature, in the binding buffer, before ultracentrifugation at 100,000 g for 1 h. While most of rGRA2 (NT-CT) was detected in the supernatant, approximately 30% of rGRA2 and 50% of rGRA6 were observed in the pellet (**suppl. Fig. 2B**). Together, these results indicated that despite spontaneous aggregation of part of the rGRA2 and rGRA6 pools upon freezing, the lipid:protein ratio 25:1 or lower ratios such as 50:1 (not tested here) or 100:1 should allow maximal membrane association of rGRA2. Therefore,

unless otherwise stated, these results led us to use thereafter, the ratio 25:1 (MW:MW) when biochemical analyses of the incubation product were required and the ratio 50:1 (MW:MW) when TEM was performed consecutively to the incubation of rGRA2 with HeLa SUVs. However, to avoid any misinterpretation of the results of the subsequent incubations of rGRA2 or rGRA6 with SUVs, the recombinant proteins were thus thereafter, systematically centrifuged for 20 min at 10,000 x g, 4°C, upon thawing and the binding assays were performed on the supernatants, immediately after protein quantification.

To investigate whether rGRA2 binds preferentially to membranes of low or of higher curvature, the recombinant protein as well as rGRA2 (NT-CT) as a control of protein which does not supposedly associate with membranes, were incubated with HeLa SUVs extruded at 50, 100 or 200 nm. The incubation products were loaded into step gradients of sucrose and ultracentrifuged for 13 h at 100,000 x g. Independently from the SUVs' diameter, most of rGRA2 remained in both the 30% and 40% sucrose fractions of the gradients, suggesting aggregation of the protein. However, approximately 20 % of the rGRA2 pool floated up to the 10% sucrose fraction when SUVs of 100 nm in diameter were used. Traces of rGRA2 did even float up to both the 0 and 5% sucrose fractions (**Fig. 2A, upper panel**). Importantly, rGRA2 (NT-CT) remained in both the 30% and 40% sucrose fractions, whatever the SUVs' diameter, confirming its lack of membrane association (**Fig. 2A, lower panel**). Since the majority of the phospholipid pool was identified by iodine within the 0-10% sucrose fractions (**Fig. 2A, central panel**), together, these results suggested that 20% of soluble rGRA2 did associate with the membranes of 100 nm Ø HeLa SUVs.

To test whether binding of rGRA2 to HeLa SUVs had an impact on the protein folding, CD experiments were performed on rGRA2 incubated with 100 nm extruded HeLa SUVs (lipids:protein 2:1 (MW:MW)), and the results were compared to the spectrum obtained for rGRA2 in solution. Following membrane association, the alpha-helical pattern of rGRA2 was preserved (**Fig. 2B**). Similar results were obtained for the lipids:rGRA2 ratio of 3:1 (MW:MW) (**data not shown**). To analyze the type of interactions that rGRA2 establishes with the membranes of HeLa SUVs,

the membranous fraction recovered from binding assays (sonicated SUVs, lipids:protein 90:1 (MW:MW)) was treated with several chemical agents known as denaturing protein-membrane interactions. None of these chemicals, except 1% Nonidet P-40 (NP-40), had an effect on the membrane-bound fraction of rGRA2 (**Fig. 2C**), suggesting that rGRA2 interacts with HeLa SUVs mainly by hydrophobic interactions and hydrogen bonds. Both the incubation products of rGRA2 and of rGRA2 (NT-CT) with HeLa SUVs extruded at 50, 100 or 200 nm (lipids:protein of 25:1 (MW:MW)), were thereafter analyzed by TEM. The sole reaction conditions for which membrane deformation was observed was that corresponding to rGRA2 being incubated with SUVs of 50 or 100 nm in diameter. Short tubules of up to 300 nm in length and 20-30 nm in diameter were indeed observed (**Fig. 2D, upper panels**). In contrast, no membrane deformation was observed when rGRA2 (NT-CT) was incubated with HeLa SUVs of 50, 100 or 200 nm (**Fig. 2D, central panels**). Moreover, while the 10% sucrose fraction resulting from the incubation of rGRA2 with 50 nm or 100 nm Ø HeLa SUVs also displayed vesicle deformations (up to 100 nm in length and up to 40 nm in diameter), only roundly shaped liposomes were observed in the 10% sucrose fractions resulting from the incubation of rGRA2 with 200 nm HeLa SUVs (**Fig. 2D, lower panel**). Direct TEM analysis of the product resulting from the incubation of various quantities of rGRA2 with HeLa SUVs extruded at 100 nm confirmed the formation of membranous tubules (up to 1000 nm in length and up to 40 nm in diameter) when lipids:protein ratios of 50:1 or 100:1 (MW:MW) were used (**Suppl. Fig. 2C**). We next investigated whether rGRA2 would recognize specific membrane lipids. Both rGRA2 and rGRA2 (NT-CT) were thus incubated on nitrocellulose membranes onto which defined synthetic lipids had been spotted (membranes known as "Lipid strips"), and further revealed by the anti-GRA2 mAb. While both proteins displayed similar intense reactivity to phosphatidyl-inositol (4) phosphate (PI(4)P), phosphatidyl-inositol (3,4,5) triphosphate (PI(3,4,5)P₃) and cardiolipin (CL), as well as similar weaker affinity for phosphatidylserine (PS), rGRA2 showed specific reactivity to phosphatidyl-inositol (4,5) biphosphate (PI(4,5)P₂) (**Fig. 2E**).

Together, these results led to conclude that 1) the amphipatic α -helices of rGRA2 recognize membranous PI(4,5)P₂, 2) rGRA2 is capable of association via hydrophobic interactions, with the membranes of 50 or 100 nm \varnothing SUVs formed from complex lipids, without modification of its α -helical fold and 3) it deforms these vesicles into short membranous tubes.

Membrane association of rGRA2 and membrane deformation are facilitated by rGRA6.

Within the parasitophorous vacuole, lack of GRA6 forbids both the elongation and the persistence of the membranous nanotubes initiated by GRA2 (Mercier et al., 2002). To explore the role of rGRA6 in the tubulation process, the recombinant protein was first incubated for 30 min, in a lipids:protein ratio of 50:1 (MW:MW), with HeLa SUVs extruded at various diameters, and further examined by TEM. Whatever the SUVs' diameter, while control liposomes were homogenously dispersed on the grids (suppl. Fig. 1C), the SUVs which had been incubated with rGRA6 appeared aggregated (Fig. 3A). These results suggested that firstly, rGRA6 might act on membranes by tethering them and secondly, that unlike rGRA2, rGRA6 does not favor any particular liposome diameter. Incubation of rGRA6 on lipid strips identified negatively charged lipids as potential lipid partners of rGRA6. P.A. and CL were indeed revealed with the rabbit anti-GRA6, and CL, PI(4)P, PI(4,5)P₂ and PI (3,4,5)P₃ with the rabbit serum directed against the GRA6 Cterminal region (Fig. 3B).

Since the GRA2:GRA6 ratio in the vacuole remains unknown, various ratios of rGRA2:rGRA6 (MW:MW) were then co-incubated with 100 nm \varnothing HeLa SUVs, but respecting the lipids:total proteins of 50:1 (MW:MW). While both the rGRA2:rGRA6 ratios 1:1 and 25:1 (MW:MW) resulted in aggregated or coalescent SUVs, only the ratio 10:1 (MW:MW) led to abundant tubular deformations (membranous tubules up to 200 nm in length and 15 - 25 nm in diameter) irradiating from the SUVs (Fig. 3C). When the incubation product of both rGRA2 and rGRA6 with 100 nm \varnothing HeLa SUVs (lipids:rGRA2:rGRA6: 25:0.9:0.1 (MW:MW:MW)) was loaded into a step sucrose gradient, the amount of rGRA2 which floated up to the 5-20% sucrose fractions (approx 40% of the rGRA2 total signal) increased, as compared to rGRA2 incubated alone with HeLa SUVs approx

20% of the rGRA2 total signal) (Fig. 3D). Similar results were obtained with the ratio 25:0.96:0.04 (MW:MW:MW) (data not shown). In contrast, the co-incubation of both recombinant proteins with HeLa SUVs did not affect the proportion of rGRA6 which associated with membranes vesicles (approx 10% of the rGRA6 total signal), as compared with rGRA6 incubated alone with the vesicles (approx 10% of the rGRA6 total signal) (Fig. 3D). Together, these results showed that rGRA6 increases the efficacy of rGRA2 to associate with membranes formed from complex lipids and to deform them into elongated membranous nanotubes.

Discussion

One of the major structural features of the Toxoplasma parasitophorous vacuole is the presence of a membranous nanotubular network (MNN) that connects the parasites together and to the vacuolar membrane (Sibley et al., 1995; Magno et al., 2005). The function of this membranous prominent structure within the PV remains currently unknown. To our knowledge, purification of fully developed MNN, independently from the vacuolar membrane or from cellular membranes, has never been achieved. Proteomic and lipidomic data on this intriguing structure are thus currently missing. Dense granule proteins of the GRA family (for a review: Mercier et al., 2010) and rhoptry proteins en route to the vacuolar membrane (Reese and Boothroyd, 2010) are, so far, the only proteins that were described as being associated with the MNN. We had previously demonstrated indirectly, *i.e.* by the deletion of the corresponding unique genes from the Toxoplasma genome, that both the dense granule proteins GRA2 and GRA6 are necessary to assemble the MNN (Mercier et al., 2002; Travier et al., 2008). In the present study, we demonstrated that elongated membranous nanotubes (15-20 nm in diameter and up to 200 nm in length) can be generated *in vitro* when both recombinant GRA2 and GRA6, expressed in bacteria, are co-incubated with SUVs made from complex lipids and of 50 or 100 nm in diameter. These results thus demonstrate that GRA2 and GRA6 are sufficient to induce membrane deformation and to generate membranous nanotubes which resemble those of the vacuolar MNN.

Purification of recombinant membrane proteins is always tricky and that of both rGRA2 and rGRA6 was no less difficult. After having tested several plasmid vectors, we achieved the purification of both these proteins from *E. coli*, using the pUET1 vector (Dabrowski and Kur, 1999), which allows solubilization of the recombinant proteins by N-terminal fusion with a peptide derived from a pancreatic ribonuclease. The folding of each recombinant protein, as observed by CD (fig. 1C), was in agreement with that predicted from the Garnier secondary structure prediction program (Garnier et al., 1996). Since the ribonuclease peptide, the Hisx6 tags and the linkers are rather short as compared to the length of the expressed GRA sequences, the secondary structure predicted for each recombinant protein was also close to that predicted for the corresponding native proteins (table 1).

Despite the use of protease inhibitors along all the purification steps, several degradation products were observed for rGRA6 (apparent MW on SDS-PAGE: 43 kDa), with two major ones migrating at 36 and 26 kDa, respectively. The fact that rGRA6 was only partially folded with a α -helical pattern, the rest of the protein remaining in random coil (fig 1C), could explain this particular sensitivity to proteases. Given that on immunoblots, the rGRA6 degradation products were only revealed by antibodies specific to GRA6 and not by those specific to the Hisx6 tags (fig. 1B), one can legitimately assume that the degradation takes place from each extremity of the recombinant protein. The major degradation products of 36 and 26 kDa would thus correspond to the trimming of 154 and 63 aa, respectively.

A major limitation encountered during our study was the spontaneous aggregation of the expressed recombinant proteins upon freezing. We have previously shown that the spontaneous formation of GRA protein aggregates is a natural feature of the GRA proteins within the parasite and likely contributes to the formation of the dense granule storage organelles (Braun et al., 2008; Gendrin et al., 2008; Cesbron-Delauw et al., 2008). Yet, a fraction of soluble GRA proteins, including soluble GRA2 and soluble GRA6, is always recovered from the parasite dense granules (Sibley et al., 1995; Mercier et al., 1998a; Lecordier et al., 1999, Labruyère et al., 1999, Adjogble et al., 2004). The recombinant protein aggregates might thus only reflect the

natural behavior of the GRA proteins. Nevertheless, to overcome the aggregation problem, the recombinant proteins were systematically spun at 10,000 x g upon thawing and the experiments performed on the supernatants, once their content in soluble proteins had been quantified.

Most of the proteins which sense membrane curvature through AAH typically contain only one AAH, usually located in the N-terminal region. GRA2 is particular in the sense that it was described as containing potentially either 3 AAHs (aa 70 to 92, 95 to 110 and 119 to 139, respectively) or alternatively, one long in-plane AAH1+2 (aa 70 to 112) followed by the AAH corresponding to aa 119 to 139 in its central region (Travier et al., 2008). These AAHs, which fit the Eisenberg criteria of hydrophobicity (Eisenberg et al., 1982), were re-analyzed using the recently released Heliquest program (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>). Using these new criteria defined by Drin and Antony (Drin and Antony, 2010), the GRA2 AAHs (Fig. 4 and table 2) were also predicted to be able to remodel membranes. The positioning of lysine residues at the AAH polar/apolar interfaces (Fig.4) would conveniently induce a snorkel effect. The long hydrocarbonated chains of lysine amino acids would indeed insert into the lipid acyl chains, thus favoring binding of the AAHs to membranes (Monné et al., 1998).

Most of the AAHs described in the literature are basic and unfolded in ionic buffer (Gallop et al., 2006). This does not seem to be entirely the case for the AAHs of GRA2 since CD revealed an alpha-helical pattern for rGRA2 in solution in 20 mM MOPS, pH 7 - 500 mM NaCl (Fig. 1C). However, the GRA2 AAHs display positive net charges (+3, +3 and +4, respectively) (table 2) that are adapted to membranes enriched in negatively charged lipids. One such potential lipid partner could be the PI(4,5) P₂, as suggested by fat blot analyses (Fig. 2E). Our results also suggested that rGRA2, like many proteins that sense curved membranes or deform them, recognizes steep positive membrane curvatures, i.e. vesicles of 50-100 nm in diameter (Fig. 2D).

The membranous tubules induced by rGRA2 alone were found to be rare and short (most of them were in the range of ~100 nm in length for a diameter of ~20-40 nm) (Fig. 2D). However, the addition of rGRA6 1) did increase the occurrence

of membranous tubules and 2) resulted in longer and thinner tubules (mean length: 200 nm; mean diameter: 15-25 nm) (**Fig. 3A**). These results are in favor of a cooperation between GRA2 and GRA6, possibly by a direct interaction between both proteins, to deform membranes and led us to propose the model presented on **Fig. 5**. While GRA2 would interact with the membranes of steep positive curvature by the mean of its AAHs recognizing PI(4,5)P₂, both the N-terminal hydrophilic- and the hydrophobic domains of GRA6 (GRA2:GRA6 ratio of 10:1 (MW:MW)) would interact with the negatively charged lipids of these membranes (our results and [Gendrin et al., 2010](#)), GRA2 contributing to the initial curvature and GRA6 aggregating the membranes. Our studies showed that rGRA2 forms high molecular weight multimers (**Fig. 1E, left panel, white arrows**). However, although these particles were sometimes observed in association with vesicles (**data not shown**), we currently do not know which one of the forms of rGRA2, i.e. the dimers or the larger oligomers, are active to deform membranes. Hence, our results do not allow choosing between both the possibilities (a) and (b) presented on **Fig. 5**. rGRA2 could indeed organize itself as multimers inserted in the outer leaflet of membranes (a). Alternatively, upon contact with membranes, the rGRA2 multimers could organize themselves into proteinous tubules which would recruit vesicles (b). Whatever the scenario, the formation of membranous tubules is improved by the presence of rGRA6. This cooperation comforts the assumption previously made from the phenotypic analysis of the *gra2-gra6* double KO which showed complete disappearance of the MNN, even at its initial stage of formation ([Mercier et al., 2002](#)). However, the fact that GRA6 failed to be abundantly co-purified with GRA2-HA-FLAG from the membranes of fully developed MNN ([Braun et al., 2008](#)), suggests that the GRA2-GRA6 cooperation would not require direct protein-protein interaction within the membranes of the mature MNN.

Although the diameter of the membranous tubules observed within the *Toxoplasma* PV has been estimated to 40-50 nm, it remains difficult to estimate their length due to their convolutions. They could reach up to 500 nm in length ([Magno et al., 2005](#)). The tubules we observed with rGRA2, rGRA6 and liposomes prepared from lipids extracted from HeLa cells, reached a

maximum length of several hundreds of nm and a mean diameter of ~ 15-25 nm. The difference between the tubules obtained in vitro and the structural characteristics of the vacuolar MNN might be due in part to the lipids used to form the SUVs. Because it belongs to the Apicomplexa phylum characterized by the presence of a non photosynthetic (apico)plast ([Fichera and Roos, 1997](#)), *Toxoplasma* does indeed synthesize plant-like lipids ([Bisanz et al., 2006](#); [Botté et al., 2008](#)). Whether these lipids are recruited to the PV is currently unknown but if so, they might influence the MNN shape. One can also not exclude that other proteins would be recruited to the membranous tubules initiated by the cooperation of GRA2 and GRA6 in order to shape them further. Amongst these potential partners, one could count on GRA12, which, like GRA2 and GRA6, traffic to the posterior end of the parasite shortly after its secretion into the PV ([Michelin et al., 2009](#)). The recent construction of a *Toxoplasma* mutant strain deficient in nonhomologous end joining (i.e. knocked-out in the KU80 protein) ([Fox et al., 2009](#); [Huynh et al., 2009](#)) should allow to isolate a broad collection of defective parasite strains in order to study the function of proteins whose function remains currently unknown. The phenotypic analysis of such mutants might thus allow the identification of additional important proteins required for shaping of the MNN.

Material and Methods

Cell culture. The HeLa cells (ATCC CCL-2) used to extract the glycerophospholipids used in this study, were maintained in Dubelcco's modified minimal essential medium (DMEM) supplemented with 1 mM glutamine, 10% fetal bovine serum, 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin.

Antibodies. The recombinant proteins were detected using either the mouse monoclonal antibody (mAb) TG 17-179 to GRA2 ([Charif et al., 1990](#); [Cesbron-Delauw et al., 1992](#)), a rabbit serum directed against the full length recombinant GRA2 protein, a rabbit serum directed against the full length recombinant GRA6 protein (both sera were gifts from L.D. Sibley, Washington University School of Medicine, Saint-Louis, MO; [Labruyère et al., 1999](#)), a rabbit serum directed against the GRA6 C terminal hydrophilic region (aa 220 to

230) expressed in fusion with the Gutathione-S-Transferase from *Schistosoma japonicum* (serum produced by the Eurogentec company) or the Ab-1 mAb anti-Hisx6 (Oncogene; gift from M.A. Hakimi, CNRS UMR5163 – Université Joseph Fourier, Grenoble).

Lipids. Lipids were extracted from batches of 10 x 150 cm² confluent flasks of HeLa cells, according to [Bligh and Dyer \(1959\)](#). Quantification of glycerolipids was performed after methanolysis, as previously described in [Botté et al. \(2008\)](#). The amount of fatty acids was used to calculate the initial glycerophospholipid content and therefore, the lipids:protein(s) ratios (MW:MW) used in the binding assays. Quantified lipids were dried under argon and frozen at -20°C until being used.

Formation of Small Unilamellar Vesicles. Small Unilamellar Vesicles (SUVs) were formed using complex lipids extracted from HeLa cells and solubilized in chloroform. Lipid films were rehydrated overnight, at room temperature, in 10 mM HEPES, pH 7.4 - 150 mM NaCl. Unilamellar vesicles were produced either by sonication for 10 min, at 4°C, using a Vibra-Cell 75041 (Bioblocks Scientific), with its probe set up at 20% of power (9 sec on, 9 sec off), or by extrusion using a lipid extruder (Avanti) equipped with 250 µL Hamilton syringes and polycarbonate membranes (pores of 50, 100 or 200 nm in diameter; Avanti), according to the manufacturer's instructions.

Construction of expression vectors. All the vectors constructed for this study allow the expression of sequences derived from the *Toxoplasma* type I RH strain (ATCC-50174).

The construction of the pUET-GRA2 (21-185) (RH) plasmid, which allows the expression of the aa 21 to 185 of GRA2 (recombinant GRA2 (rGRA2)), in N-terminal fusion with a S-tag (this peptide, derived from a pancreatic ribonuclease, increases the solubility of the recombinant protein of interest) and flanked by two Hisx6 tags in N-terminus and in C-terminus, respectively, was described previously in [Golkar et al. \(2007\)](#).

As a control of soluble GRA2 protein, the sequence corresponding to the N-terminal hydrophilic region of GRA2 (aa 22 to 69) in fusion with the hydrophilic C-terminal region (aa 134 to 185), was amplified from the pSK/cGRA2 (NT-CT)-HA9/HXGPRT ([Travier et al., 2008](#)) and

further cloned into the pUET1 vector (DNA-Gdańsk II s.c., Gdańsk, Poland) opened by both NcoI and EcoRI (cloning performed by the Proteogenix company, Oberhausbergen, France). The resulting construct, confirmed by sequencing, was named pUET-GRA2 (NT-CT) (RH) and led to the production of the rGRA2 (NT-CT) protein.

The sequence coding for the aa 40 to 230 from GRA6 was amplified from the plasmid pUC18.G1.Pst1, which contains the genomic sequence of *gra6* ([Lecordier et al., 1995](#)), cloned into the pUET1 vector opened by both BglII-NotI and confirmed by sequencing, leading to the plasmid pUET-GRA6 (43-230) (RH) (cloning performed by the Proteogenix company) and to the recombinant GRA6 protein (rGRA6).

Purification of recombinant proteins. The pUET constructs were transformed into the Overexpress C41(DE3) *Escherichia coli* strain (Lucigen Corporation, Middleton, WI) and expression was induced for 4 hours, at 33°C, in Terrific Broth ([Sambrook et al., 2001](#)) supplemented with 50 µg/ml Ampicillin and 1 mM Iso-Propyl-Thio-Galactoside.

Following centrifugation of the bacteria, the pellets were dispersed in 20 mM MOPS supplemented with a cocktail of protease inhibitors without EDTA (Roche) and bacteria were lysed mechanically using a French Pressure Cell Press (Bioritech). Following a 20 min centrifugation at 100,000 x g, 4 °C, each supernatant was incubated for 2 h, at 4 °C, under gentle agitation, with Ni-NTA Agarose (Qiagen) pre-équilibrated in MOPS 20 mM pH 7.5 – protease inhibitors. After a first wash of the resin with 20 ml of 20 mM MOPS pH 7.5 - 5 mM imidazole and a second wash with 20 ml of 20 mM MOPS pH 7.5 - 60 mM Imidazole, the bound proteins were eluted with 500 mM imidazole, pH 7. Imidazole was eliminated by size exclusion chromatography on a Sephadex G-25M columns (GE Healthcare) equilibrated with 20 ml of 20 mM MOPS pH 7.5. The eluted fractions were concentrated using a 10 kDa Centriprep (Millipore); protein concentrations were determined using a Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad) and aliquoted proteins were frozen at -80°C until being used. Upon thawing, the recombinant proteins were centrifuged for 15 min, at 4°C and at 10,000 x g to eliminate potential aggregates. The content in soluble proteins

present in the supernatants was determined prior any further experiment.

Determination of the molecular weight of rGRA2 by size exclusion chromatography. An aliquot of 100 μ L of rGRA2 at 8 mM in 20 mM MOPS pH 7 was loaded on a Sephacryl 500 (GE Healthcare) size exclusion chromatography column equilibrated in [10 mM Hepes pH 7,4 - 150 mM NaCl] and calibrated with monomeric soluble proteins (BSA (67 kDa), glucose oxydase (160 kDa) and beta-galactosidase (500 kDa). The column was run with a flow rate of 1 ml/min and absorbance of the eluted fractions was read at 280 nm.

Prediction of proteins secondary structure. The secondary structure of the recombinant proteins was predicted using the GOR secondary structure prediction method (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html; Garnier et al., 1996) available at the Expert Protein Analysis System proteomics server (ExPASy server) (<http://kr.expasy.org/>).

Circular dichroism. Spectra of circular dichroism (CD) were recorded at 20°C, from soluble recombinant proteins diluted at 15 μ M in [20 mM MOPS, pH 7 - 500 mM NaCl - protease inhibitors] (rGRA2 and rGRA2 (NT-CT)) or in [0.02 M NaPO₄ pH 7.4 – protease inhibitors] (rGRA6) or from rGRA2 bound to membranes, using a spectropolarimeter J – 810 (Jasco) coupled to a temperature-regulating device and 0.1 cm-optical path spectroscopy cuvettes. The CD spectra were recorded between 250 and 200 nm. The presented spectra are the mean of 4 independent accumulations from which the buffer spectrum was subtracted.

Dynamic Light Scattering (DLS). The homogeneity and the diameter of the sonicated HeLa SUVs was analyzed by DLS, at 35°C, using a DawnEos Enhanced Optical system (Wyatt Technology) coupled to the Sephacryl 500 size exclusion chromatography column equilibrated in [10 mM Hepes pH 7,4 - 150 mM NaCl] and with a flow rate of 1 ml/min. A RI 2000 detector (Schambeck SFD) coupled to the optical system allowed to measure the refraction index. DLS data

were analyzed using the « Light Scattering for the Masses » software (Astra).

Fifteen μ g of the recombinant proteins diluted in 50 μ l of [10 mM Hepes pH7,4 - 150 mM NaCl] were analyzed at 25°C, on a « Zetasizer dedicated to proteins » (Malvern Instruments).

Protein-Lipid overlay assays. Nitrocellulose membranes onto which several types of lipids (100 pmol/spot) had been immobilized (Lipid Membrane Strips, Echelon Biosciences), were blocked for 1 hour with 3% fatty acid-free bovine serum albumin (FAF-BSA, fraction V, Sigma) in TBS-T (50 mM pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated overnight, at 4°C, with 0.1 μ g/ml of rGRA2, of rGRA2 (NT-CT) or of rGRA6 diluted in TBS-T-3% FAF-BSA. Following 6 washes in TBS-T, the proteins bound to lipids were revealed by 1 h incubation with the anti- GRA2 mAb (1/10,000), the rabbit serum anti- GRA6 (1/10,000) or the rabbit serum anti-GST- GRA6 Cterm (1/250). Following 6 washes in TBS-T, secondary antibodies coupled to peroxidase (1/20,000), (Jackson Immuno Research) and diluted in TBS-T was added for 1 h. After 12 washes in TBS-T, the bound proteins were revealed by chemiluminescence (SuperSignalTM Chemiluminiscent Substrate, Pierce) followed by exposure to an autoradiography film (Hyperfilm ECL, Amersham).

Liposome binding assays. SUVs formed by sonication in 10 mM HEPES, pH 7.4 -150 mM NaCl from 116 μ g of lipids were incubated with rGRA2 (different ratios were used, see legend of figures for details) for 30 min, at room temperature, under gentle agitation, in a final volume of 70 μ l.

To analyze the behavior of the recombinant proteins incubated with membranes by flotation in a discontinuous sucrose gradient, 6 μ g of each recombinant protein were incubated for 30 min, at room temperature, with SUVs formed from 160 μ g of lipids, in a final volume of 160 μ l of 10 mM HEPES, pH 7.4- 150 mM NaCl. Sixty-five μ l of the binding assay were mixed with 65 μ l of 80% sucrose and loaded at the bottom of a 0,65 mL open tube (Beckmann). The mix was overlaid step by step, with 5 concentrations of sucrose (30% to 0%) to form a step sucrose gradient 40%-0% (bottom to top). Following a centrifugation for 13 h at 4°C, 100,000 x g, using a TLA45 rotor

(Backmann) and a TL100 ultracentrifuge (Beckmann), fractions were collected from the top of the gradient and analyzed by immunoblot with specific antibodies against GRA2 or GRA6 and by dot blot with iodine.

To analyze the type of interaction established between rGRA2 and the membranes, following a standard binding assay, the membrane fraction (high speed pellet, HSP) was separated from the ultrasoluble fraction (high speed supernatant, HSS) by centrifugation for 1 h at 100,000 $\times g$ on a Ultracentrifuge Beckmann Optima Max (Beckmann) and the HSP was treated for 30 min, at 4°C, with various denaturing agents (500 mM KCl, 100 mM sodium carbonate pH 11.6 M urea, 1% Nonidet P-40 (NP-40)) or with 50 mM Tris pH 8 as a control. Following a second ultracentrifugation of 1 h at 100,000 $\times g$, 4°C, proteins were precipitated by 15% trichloroacetic acid and analyzed by immunoblot with anti-GRA2 mAb.

Dot blots and immunoblots. Following flotation in sucrose gradients, 2 μ L of each gradient fraction were spotted onto a nitrocellulose membrane and the phospholipids' unsaturated fatty acids were revealed by fumigation with iodine (Sigma).

Proteins were separated on 13% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. Membranes were blocked for 1 h with saturation solution (PBS containing 5% powder milk, 5% goat serum, 0.05% Tween-20 and 0.05% Triton-X114), incubated for 1 h with the appropriate primary antibody diluted in saturation solution. After incubation with peroxidase-conjugated goat secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Laboratories), proteins were visualized by chemiluminescence using the Supersignal ECL system (Pierce Chemical).

Transmission Electron Microscopy (TEM). 2-3 μ L of each sample were adsorbed on the clean side of a carbon film which had been pre-evaporated on a mica sheet. The carbon film was detached from the mica by floating it in a well containing the negative stain solution. The carbon film was then picked up on a 400 mesh copper grid and air dried before observation with a JEOL 1200 EX II operating at 120 kV. All samples were imaged with 2% (w/v) uranyl acetate stain (pH 4.5), with the exception of purified rGRA6 for which 2% sodium silicotungstate (pH 7.0) was

used. Images were recorded on a 2.7k by 2.7k Gatan ORIUS CCD camera at nominal magnification of $\times 10,000$ or $\times 40,000$.

Acknowledgements

The authors thank L. David Sibley, Ludovic Pelosi and M.A. Hakimi for sharing reagents and both Aurélie Curt and Karine Musset for the amplification of HeLa cells. They acknowledge the Master students Mélanie Ferlazzo, Vincent Grassot, François Hermetet and Khady Sall for their contribution to this work. This work was supported by Région Rhône-Alpes (Grant from Cluster 10 on Infectious Diseases to CM). AB was the recipient of a PhD fellowship from the Rhône-Alpes Region and GE was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0271-CSD8 to WW and GS).

References

- [Adjogble KD, Mercier C, Dubremetz JF, Hucke C, Mackenzie CR, Cesbron-Delauw MF, Däubener W.](#) (2004). GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int J Parasitol.* 34:1255-1264.
- Bacia K, Schwille P, Kurzchalia T. (2005) Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:3272-3277.
- Baumgart T, Hess ST, Webb WW. (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature.* 425:821-4S
- Bisanz C, Bastien O, Grando D, Jouhet J, Maréchal E, Cesbron-Delauw MF. (2006) *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J.* 394:197-205.
- Bligh, E.G., and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Botté C, Saïdani N, Mondragon R, Mondragón M, Isaac G, Mui E, McLeod R, Dubremetz JF, Vial H, Welti R, Cesbron-Delauw MF, Mercier C, Maréchal E. 2008. Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like epitope in *Toxoplasma gondii*. *J Lipid Res.* 49:746-762.
- [Braun L, Travier L, Kieffer S, Musset K, Garin J, Mercier C, Cesbron-Delauw MF.](#) (2008). Purification of *Toxoplasma* dense granule proteins reveals that they are in complexes

- throughout the secretory pathway. *Mol Biochem Parasitol.* 157:13-21.
- Campelo F, Fabrikant G, McMahon HT, Kozlov MM. (2010) Modeling membrane shaping by proteins: focus on EHD2 and N-BAR domains. *FEBS Lett.* 584:1830-1839
- [Carruthers V](#), [Boothroyd JC](#). (2007) Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol.* 10:83-89.
- [Cesbron-Delauw MF](#), [Boutillon C](#), [Mercier C](#), [Fourmaux MP](#), [Murray A](#), [Miquey F](#), [Tartar A](#), [Capron A](#). (1992). Amino acid sequence requirements for the epitope recognized by a monoclonal antibody reacting with the secreted antigen GP28.5 of *Toxoplasma gondii*. *Mol Immunol.* 29:1375-1382
- Cesbron-Delauw MF, Gendrin C, Travier L, Ruffiot P, Mercier C. (2008) Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic.* 9:657-664.
- Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M. F. and Capron, A. (1990). *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 71, 114-124.
- [Dabrowski, S., and J. Kur](#). (1999). Cloning, over-expression, and purification of the recombinant His-tagged SSB protein of *Escherichia coli* and use in polymerase chain reaction amplification. *Protein. Expr. Purif.* 16:96-102.
- [Devaux PF](#), [Herrmann A](#), [Ohlwein N](#), [Kozlov MM](#). (2008) How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta.* 1778:1591-1600.
- Drecktrah D, Levine-Wilkinson S, Dam T, Winfree S, Knodler LA, Schroer TA, Steele-Mortimer O. (2008) Dynamic behavior of *Salmonella*-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic.* 9:2117-2129.
- [Drin G](#), [Antonny B](#). (2010). Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett.* 584:1840-1847.
- Dubremetz JF. (2007) Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol.* 9:841-848.
- Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC. (1982) The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature.* 299:371-374.
- Fichera ME, Roos DS. (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature.* 390:407-409.
- Fox BA, Ristuccia JG, Gigley JP, Bzik DJ. (2009) Efficient gene replacements in *Toxoplasma gondii* strains deficient for nonhomologous end joining. *Eukaryot Cell.* 8:520-529.
- Gallop JL, Jao CC, Kent HM, Butler PJ, Evans PR, Langen R, McMahon HT. (2006) Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J.* 25:2898-2910.
- Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.* 266:540-553.
- Gendrin C, Mercier C, Braun L, Musset K, Dubremetz JF, Cesbron-Delauw MF. (2008) *Toxoplasma gondii* uses unusual sorting mechanisms to deliver transmembrane proteins into the host-cell vacuole. *Traffic.* 9:1665-1680.
- Gendrin C, Bittame A, Mercier C, Cesbron-Delauw MF. (2010) Post-translational membrane sorting of the *Toxoplasma gondii* GRA6 protein into the parasite-containing vacuole is driven by its N-terminal domain. *Int J Parasitol.* 40:1325-1334
- Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Musset K, Assmar M, Sadaie R, Cesbron-Delauw MF, Mercier C. (2007) Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine.* 25:4301-4311.
- Huynh MH, Carruthers VB. (2009) Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell.* 8:530-539.
- Labruyère, E., Lingnau, M., Mercier, C., and Sibley, L.D. (1999). Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102: 311-324.
- Lata S, Schoehn G, Jain A, Pires R, Piehler J, Gottlinger HG, Weissenhorn W. (2008) Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science.* 321:1354-1357.
- Lauer SA, Rathod PK, Ghori N, Haldar K. (1997) A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science.* 276:1122-1125.
- [Lecordier L](#), [Mercier C](#), [Sibley LD](#), [Cesbron-Delauw MF](#). (1999). Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol Biol Cell.* 10:1277-1287.
- Lecordier, L., Moleon-Borodowsky, I., Dubremetz, J. F., Tourvieille, B., Mercier, C., Deslee, D., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M. F. (1995). Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol Biochem Parasitol* 70, 85-94.
- Madsen KL, Bhatia VK, Gether U, Stamou D. (2010) BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins use the same

- mechanism to sense membrane curvature. *FEBS Lett.* 584:1848-1855.
- McMahon HT, Gallop JL. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling. *Nature.* 38:590-596.
- [Magno RC, Lemgruber L, Vommaro RC, De Souza W, Attias M.](#) (2005b). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Tech.* 67:45-52.
- Maier O, Wiethoff CM. (2010) N-terminal α -helix-independent membrane interactions facilitate adenovirus protein VI induction of membrane tubule formation. *Virology.* 408:31-38.
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.F., and Sibley, L.D. (1998a). The amphipathic α -helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J. Cell Sci.* 111: 2171-2180.
- Mercier, C., Dubremetz, J. F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D. and Cesbron-Delauw, M. F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell* 13, 2397-2409
- Mercier C, Howe DK, Mordue D, Lingnau M, Sibley LD. (1998b) Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect Immun.* 66:4176-82.
- Mercier, C , Travier, L., Bittame, A., Gendrin, C. and Cesbron-Delauw, M.F. (2010) The dense granule proteins of *Toxoplasma gondii*. (O. De Bruyn and S. Peeters, editors). In "Parasitology Research Trends". Nova Publishers, pp 1-31.
- Michelin, A., Bittame, A., Bordat, Y., Travier, L., Mercier, C., Dubremetz, J.F., Lebrun, M., 2009. GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. *Int. J. Parasitol.* 39, 299-306.
- [Monné M, Nilsson I, Johansson M, Elmhed N, von Heijne G.](#) (1998) Positively and negatively charged residues have different effects on the position in the membrane of a model transmembrane helix. *J Mol Biol.* 284:1177-1183.
- Ramírez-Weber FA, Kornberg TB. (1999) Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell.* 97:599-607.
- [Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH.](#) (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* 303:1007-1010.
- Reese ML, Boothroyd JC. (2009) A helical membrane-binding domain targets the *Toxoplasma* ROP2 family to the parasitophorous vacuole. *Traffic.* 10:1458-1470.
- Sambrook, J., Russel, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd edition. (Irwin, N., Curtis, S., Zierler, M., McInerney, N., Brown, D. and Schaefer, S. eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- [Sibley LD.](#) (2004) Intracellular parasite invasion strategies. *Science.* 304:248-253.
- [Sibley LD, Niesman IR, Parmley SF, Cesbron-Delauw MF.](#) (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 108:1669-1677.
- Shibata Y, Hu J, Kozlov MM, Rapoport TA. (2009) Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:329-3254.
- [Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Köhler K, Oddos S, Eissmann P, Brodsky FM, Hopkins C, Onfelt B, Sattentau Q, Davis DM.](#) (2008) Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol.* 10:211-219.
- Stowell MH, Marks B, Wigge P, McMahon HT. (1999) Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol.* 1:27-32
- Travier, L., Mondragon, R., Dubremetz, J. F., Musset, K., Mondragon, M., Gonzalez, S., Cesbron-Delauw, M. F. and Mercier, C. (2008). Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. *Int J Parasitol* 38, 757-773
- [Zimmerberg J, Kozlov MM \(2006\)](#) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:9-19.

Legends to figures

Figure 1: Characterization of the recombinant GRA proteins. (A) Schematic representation of the recombinant GRA proteins produced in *Escherichia coli* from pUET constructs, in comparison to that of both native GRA2 and GRA6. The vertically striped boxes indicate the signal peptide (SP) predicted for GRA2 and GRA6; the black boxes, the amphipatic α -helices of GRA2 (α_1 , α_2 , α_3) and the putative hydrophobic α -helical transmembrane domain (TMD) of GRA6; the left-handed diagonally striped boxes, the N-terminal hydrophilic domain of GRA2 and of GRA6 (NT); the right-handed diagonally striped boxes, the C-terminal hydrophilic domain of GRA2 and of GRA6 (CT); the dotted boxes, the pancreatic ribonuclease-derived segment (RP) and the stars, the HisX6 tags. The white boxes L indicate the linkers. Numbers refer to the number of amino acids (aa) in the proteins. (B) SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins rGRA2, rGRA2 (NT-CT), and rGRA6, as detected by Coomassie (first panel) or immuno-revealed using anti-HisX6 mAb (second panel); anti-GRA2 mAb (third panel), or rabbit serum anti-GRA6 (4th panel). Two μ g of each recombinant protein were loaded per lane. Anti-GRA2 mAb: 1/20,000; anti-HisX6 mAb: 1/1,000; rabbit serum anti-GRA6: 1/10,000; secondary antibodies: 1/20,000. (C) Circular dichroism spectra of rGRA2, rGRA2 (NT-CT) and of rGRA6 registered between 200 and 250 nm. The arrows indicate both the 208 and 223 nm minima of the rGRA2 spectrum; the arrowhead, the 224 nm minimum of the rGRA6 spectrum. (D) Dynamic light scattering analysis of soluble rGRA2, rGRA2 (NT-CT) and of rGRA6 using a Zetasizer (left panel). Dynamic light scattering analysis of soluble rGRA2 using the Wyatt apparatus coupled to a Sephacryl 500 size exclusion chromatography calibrated with bovine serum albumin (67 kDa), glucose oxydase (160 kDa) and tetrameric α -galactosidase (500 kDa) (right panel). (E) Transmission electron microscopy analysis of rGRA2, rGRA2 (NT-CT) and of rGRA6, at the concentrations of 2 mg/mL, 0.1 mg/mL and 0.05 mg/mL respectively in 10 mM HEPES, pH 7.4-150 mM NaCl. White arrowheads and arrows indicate the rGRA2 small and larger oligomers, respectively.

Figure 2: rGRA2 stably associates with the membranes of 100 nm \varnothing HeLa SUVs and deforms them into short membranous tubules.

(A) Analysis of the incubation product of rGRA2 and of rGRA2 (NT-CT) with HeLa SUVs extruded at 100 nm by flotation in a 0-40% sucrose step gradient. Six μ g of each protein were incubated for 30 min with 150 μ g of HeLa SUVs (lipids:protein (25:1) (MW:MW)). Twenty-five μ L of each fraction were analyzed by immunoblot probed with the rabbit serum specific of GRA2 (upper and lower panels). Five μ L of each fraction were spotted onto nitrocellulose and saturated phospholipids were revealed by fumigation with iodine (central panel). (B) Circular dichroism spectrum of 33 μ g of rGRA2 incubated for 30 min with 64 μ g (lipids:protein: 2:1 (MW:MW)) of HeLa SUVs extruded at 100 nm, as compared to the spectrum obtained from 33 μ g of rGRA2 mock-incubated. (C) One hundred sixty-six ng of rGRA2 were incubated for 30 min with SUVs sonicated from 15 μ g of HeLa lipids (lipids:protein 90:1 (MW:MW)) and centrifuged for 1 h at 100,000 g, 4°C. The high speed pellet was treated with several agents destabilizing membrane proteins (0.5 M KCl, 0.1 M Carbonate pH11, 6 M urea or 1% NP-40) or with 50 mM Tris pH 8 as control, and centrifuged again. Fractions of each pellet (P) and of each supernatant (S) were compared to 100 μ L of the first high speed supernatant (HSS). Fractions were analyzed by immunoblot using the anti-GRA2 mAb. (D) Transmission electron microscopy analysis of the incubations of rGRA2 (upper panels), or of rGRA2 (NT-CT) (central panels) incubated with HeLa SUVs extruded at 100 nm (lipids:protein 50:1 (MW:MW)), compared to the rGRA2 10% sucrose fraction from (A) (lower panels). (E) Lipid affinity analysis of rGRA2 by lipid-protein overlay. Both rGRA2 and rGRA2 (NT-CT) were incubated on lipid strips and further probed with the anti-GRA2 mAb. TG, triglyceride; DAG, diacylglycerol; PA, phosphatidic acid; PS, phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; CL, cardiolipin; PI, phosphatidyl-inositol; PI(4)P, phosphatidylinositol 4 phosphate; PI(4,5)P₂, phosphatidylinositol (4,5) di-phosphate; PI(3,4,5)P₃, phosphatidylinositol (3,4,5) tri-phosphate; chol, cholesterol; SM, sphingomyelin; SGC, 3 sulfogalactosylceramide.

Figure 3: rGRA6 improves association of rGRA2 to HeLa SUVs and membrane tubulation. (A) Transmission electron microscopy analysis of the incubation of rGRA6 with HeLa SUVs extruded at various diameters, as indicated above the images (lipids:protein 50:1 (MW:MW)). **(B)** Lipid affinity analysis of rGRA6 by lipid-protein overlay. rGRA6 was incubated on lipid strips and further probed with the rabbit serum anti-GRA6 (left panel) or the rabbit serum anti-GST GRA6 Cterm (right panel). Abbreviations of the lipids spotted on the membranes are provided in the legend of **Fig. 2E**. **(C)** Transmission electron microscopy analysis of the co-incubation of rGRA2 - rGRA6 (various ratios, as indicated above each photo) with HeLa SUVs extruded at 100 nm (lipids:protein 50:1 (MW:MW)). **(D)** Analysis of the co-incubation product of both rGRA2 and rGRA6 (rGRA2:rGRA6 10:1 (MW:MW)) with HeLa SUVs extruded at 100 nm by flotation in a 0-40% sucrose step gradient. Six μg of each protein were incubated with 150 μg of HeLa SUVs (lipids:protein (25:1) (MW:MW)). Twenty-five μL of each fraction were analyzed by immunoblot probed with rabbit serum specific of GRA2 or rabbit serum specific of GRA6 (upper panels). For comparison, rGRA2 and rGRA6 incubated alone with HeLa SUVs extruded at 100 nm (lipids:protein (25:1) (MW:MW)) were analyzed by the same kind of flotation in sucrose step gradients (central panels). Five μL of each fraction were spotted onto nitrocellulose and saturated phospholipids were revealed by fumigation with iodine (lower panel).

Figure 4. Schematic representation of the GRA2 AAHs, as predicted by the Heliquist program (<http://heliquist.ipmc.cnrs.fr/>). Color codes: yellow, hydrophobic; purple, serine and threonine; blue, basic; red, acidic; pink, asparagine and glutamine; grey, alanine and glycine; light blue, histidine. The arrow in each helical wheel corresponds to the hydrophobic moment.

Figure 5. Possible models of interaction of both rGRA2 and rGRA6 with HeLa SUVs.

Supplementary figure 1: HeLa SUVs analysis.

(A) Dynamic light scattering analysis of HeLa SUVs extruded at 100 nm, using a Zetasizer. **(B)** Dynamic light scattering analysis of sonicated HeLa SUVs. SUVs were formed by sonication of 22 μg of lipids extracted from HeLa cells. The SUVs were loaded onto the Sephacryl 500 size exclusion chromatography column equilibrated at 1 mL/min in [10 mM Hepes - 150 mM NaCl, pH 7.4] and calibrated with Ribonuclease (Rb, 13.7 kDa); Ovalbumin (Ova, 43 kDa); Bovine Serum Albumin (BSA, 67 kDa). The void volume (18 mL) is indicated by V_0 (upper panel). The Sephacryl 500 column was coupled to the Wyatt apparatus for detection of the dynamic light scattering (lower panel). **(C)** Transmission Electron Microscopy analysis of the HeLa SUVs extruded at 50, 100 or 200 nm.

Supplementary figure 2: Determination of the lipid:protein ratio required for satisfactory membrane association of rGRA2. (A)

A fixed quantity of SUVs sonicated from HeLa lipids (116 μg) were incubated for 30 min with varying quantities of rGRA2. After a 1 h ultracentrifugation at 100,000 g, each pellet (P) and each supernatant (S) were analyzed by immunoblot with the anti-GRA2 mAb. **(B)** Six μg of each of the recombinant proteins rGRA2, rGRA2 (NT-CT) and of rGRA6 were mock-incubated for 30 min in a total volume of 65 μL and further spun for 1 h at 100,000 g. Equal quantities from the pellets (P) and the supernatants (S) were analyzed by immunoblot using the anti-GRA2 mAb or the rabbit serum anti-GRA6. **(C)** Transmission electron microscopy analysis of the incubations of various quantities of rGRA2 with a fixed quantity of HeLa SUVs extruded at 100 nm (ratios 10:1, 25:1, 50:1 and 100:1 (MW:MW)). White arrow heads indicate the rGRA2 larger oligomers (cf. Fig. 1E, left panel, white arrows).

Table 1: Comparison of the secondary structures predicted for rGRA2, rGRA2 (NT-CT) and rGRA6 to those predicted for endogenous GRA2 and GRA6

Protein	number of aa	% of α helix ^a	% of extended strand ^a	% of random coil ^a
GRA2	185	29.73	9.73	60.54
GRA6	230	18,26	18.26	63.48
rGRA2	239	33.89	7.53	58.58
rGRA2 (NT-CT) 172		22.67	8.14	69.19
rGRA6	298	26.51	15.77	57.72

a: using the GOR secondary structure prediction method version IV ([Garnier et al., 1996](#)).

Table 2: Comparison of the hydrophobicity criteria of the GRA2 AAHs, as defined by [Eisenberg et al. \(1982\)](#) (A) and by [Drin and Antony \(2010\)](#) (B).

AAH	Number of aa	Net charge		Peak hydrophobic moment		Mean hydrophobicity	
		z		$\langle \mu H \rangle_{\max}$		$\langle H \rangle$ (kcal/mol)	
		A	B	A	B	A	B
AAH1	23	+3	+3	0.67	0.458	-0.22	0.237
AAH2	16	+3	+3	0.41	0.271	-0.29	-0.053
AAH3	21	+4	+4	0.45	0.201	-0.02	0.125
AAH1+2	43	+6	+6	0.57	0.380	-0.20	0.177

Figure 1

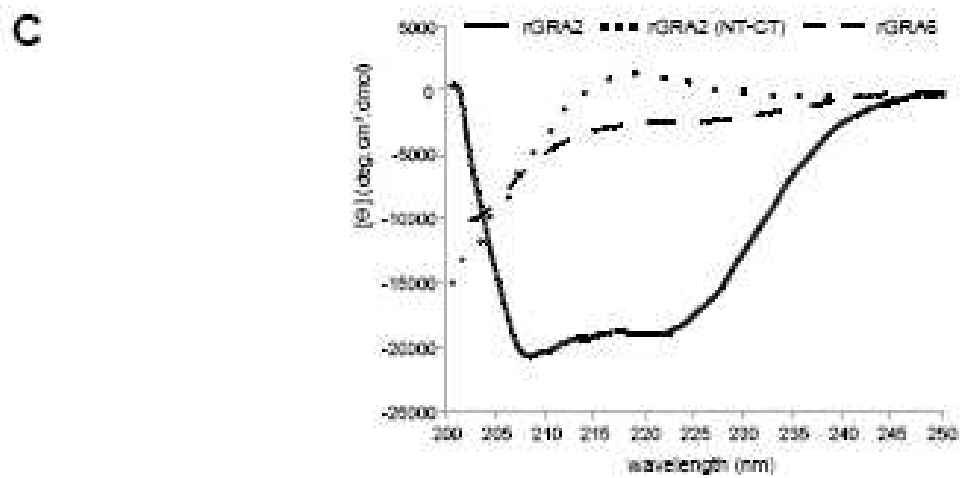
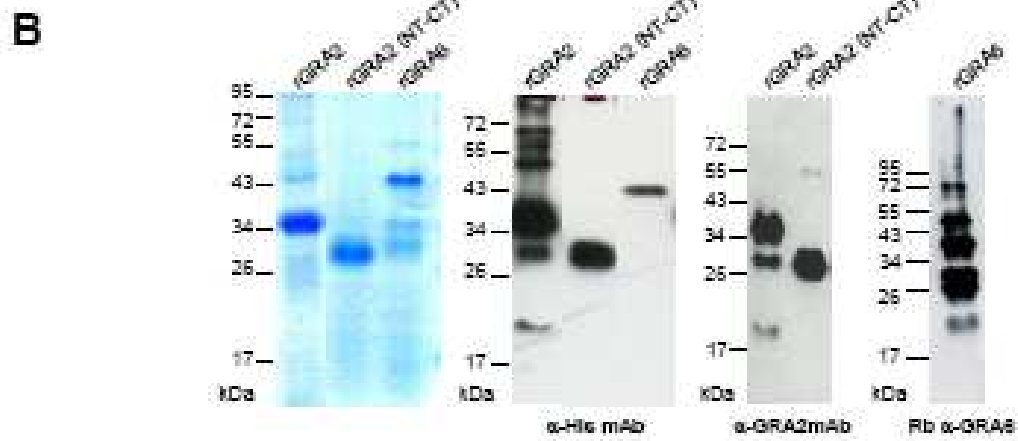
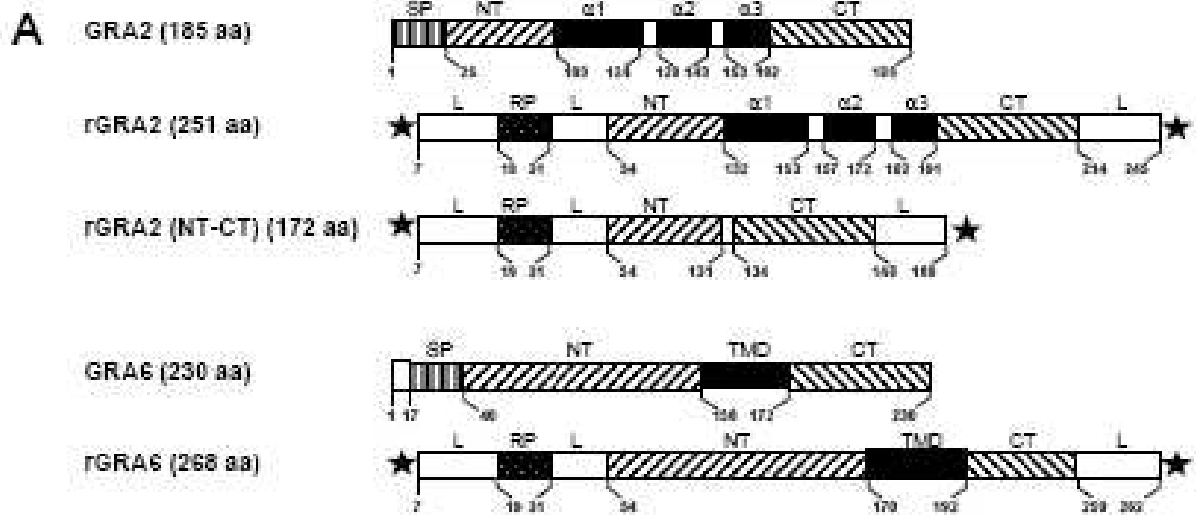


Figure 1

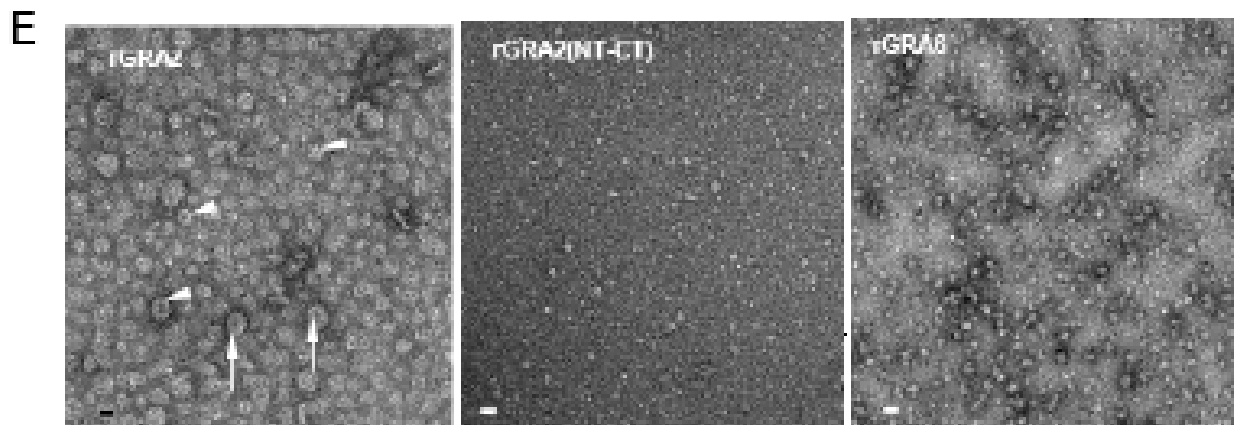
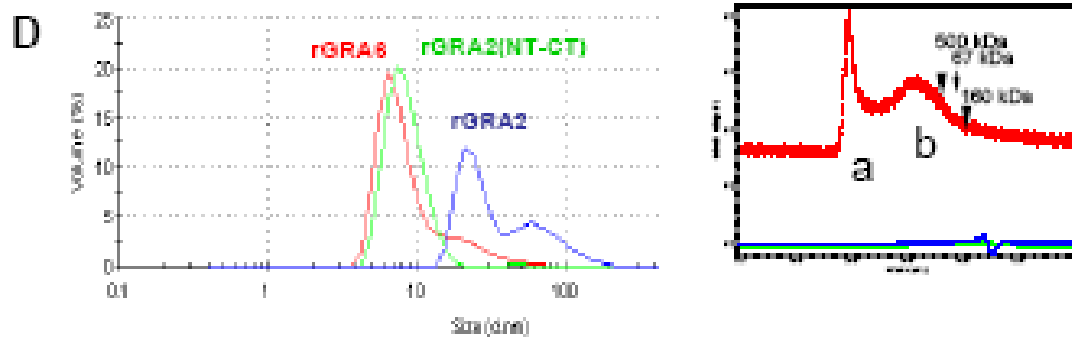
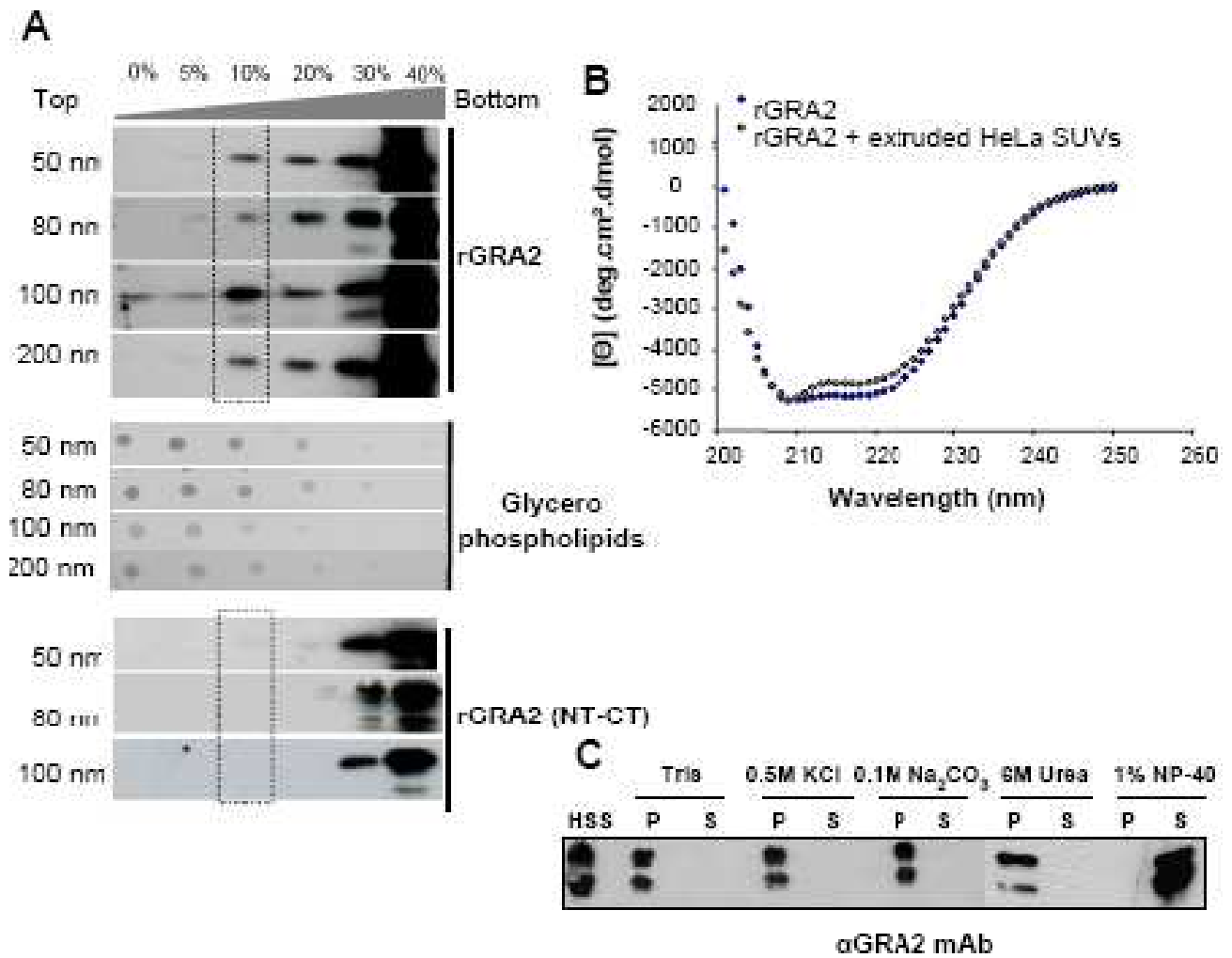


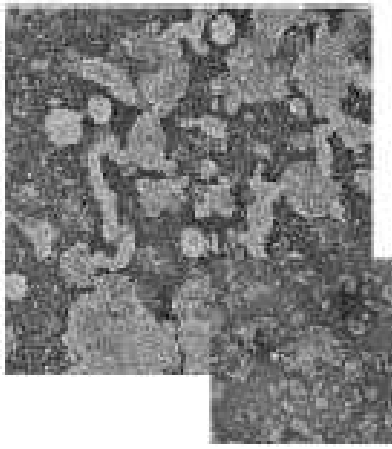
Figure 2



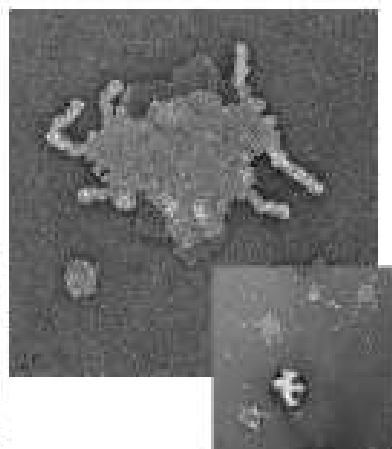
D

rGRA2 +

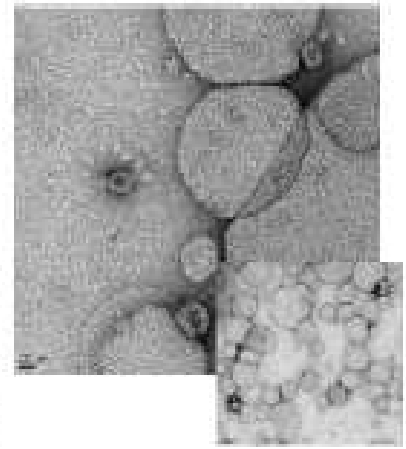
50 nm HeLa SUVs



100 nm HeLa SUVs

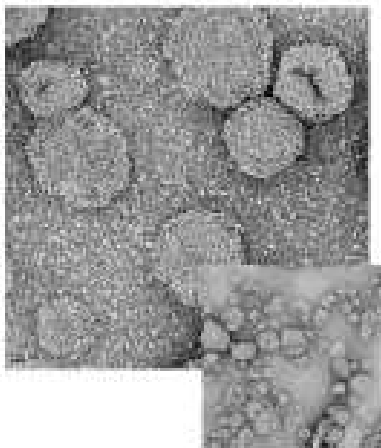


200 nm HeLa SUVs

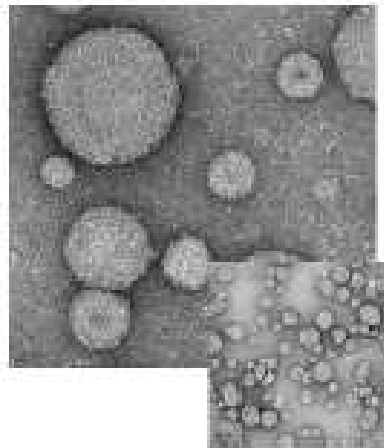


rGRA2 (NT-CT) +

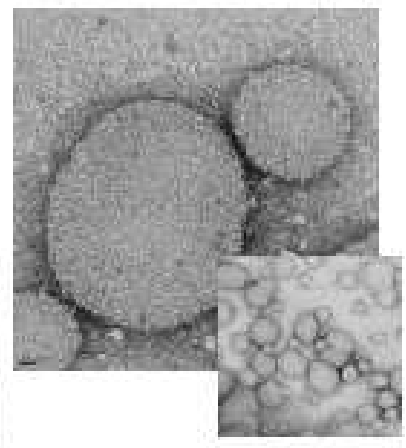
50 nm HeLa SUVs



100 nm HeLa SUVs

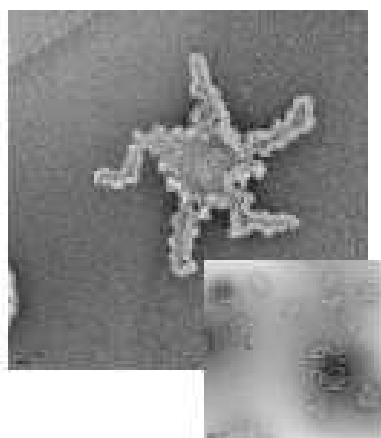


200 nm HeLa SUVs



10% sucrose fraction from the rGRA2 incubation +

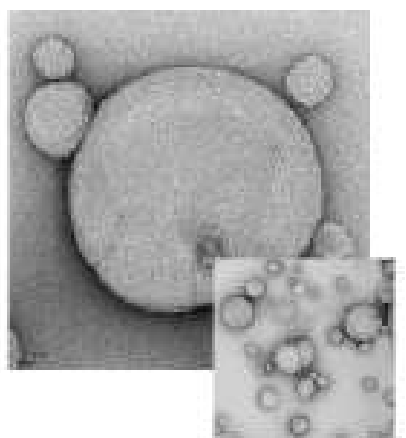
50 nm HeLa SUVs



100 nm HeLa SUVs



200 nm HeLa SUVs



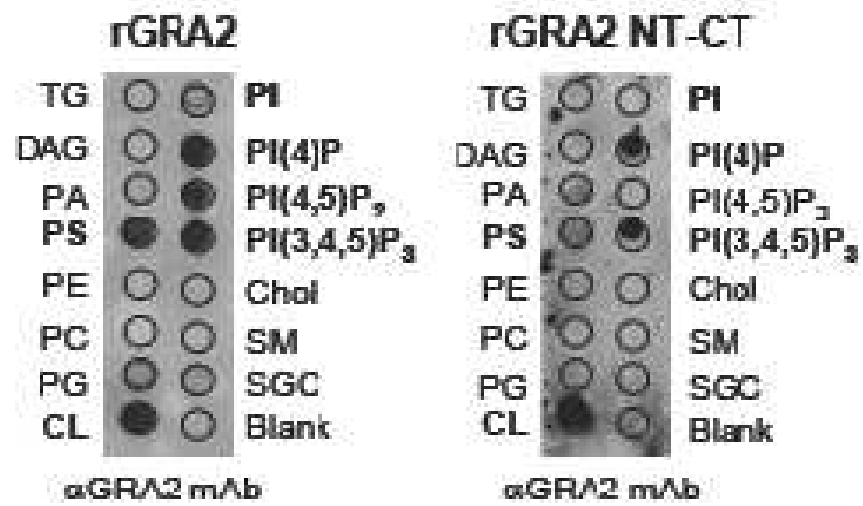
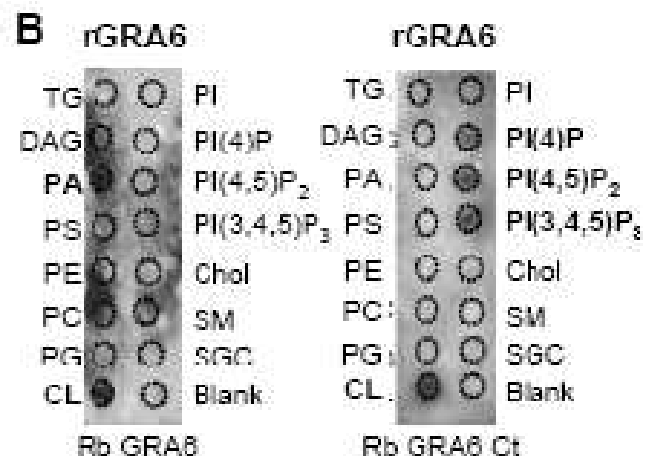
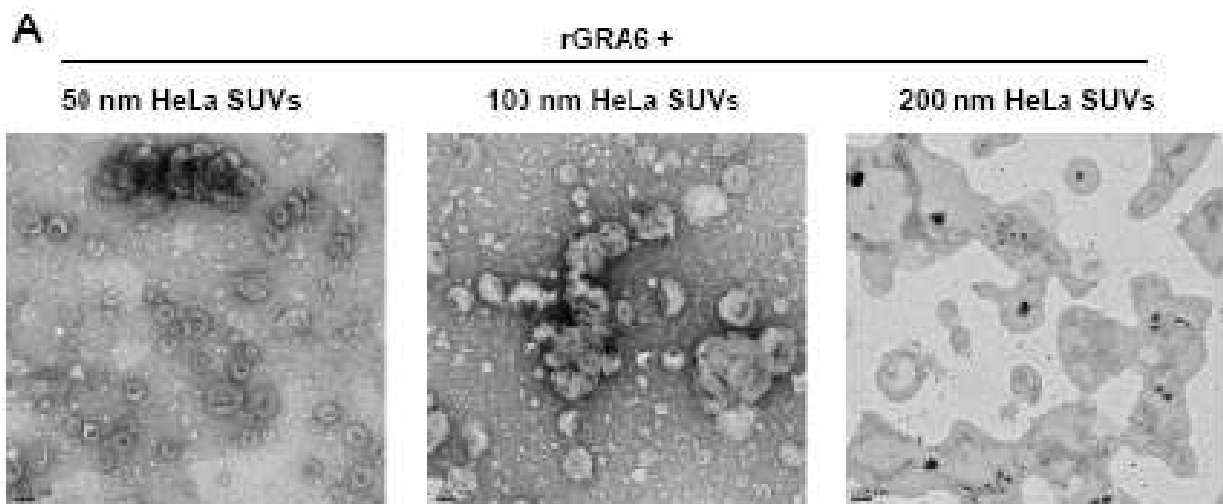
E

Figure 3



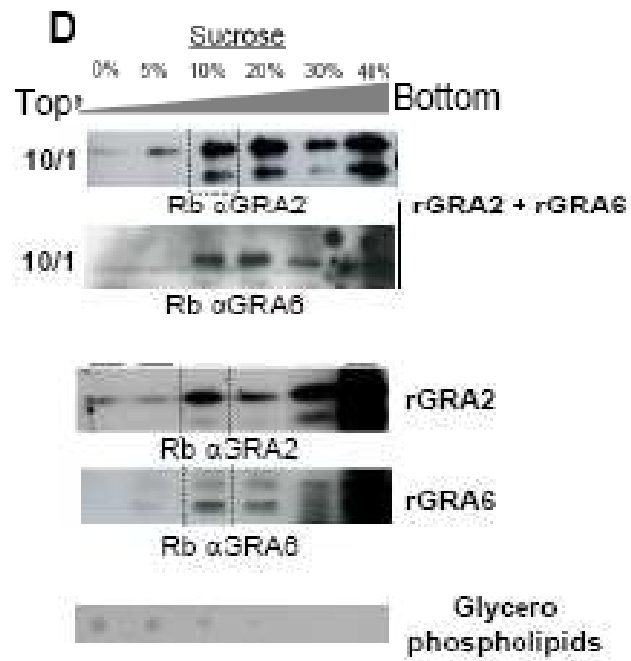
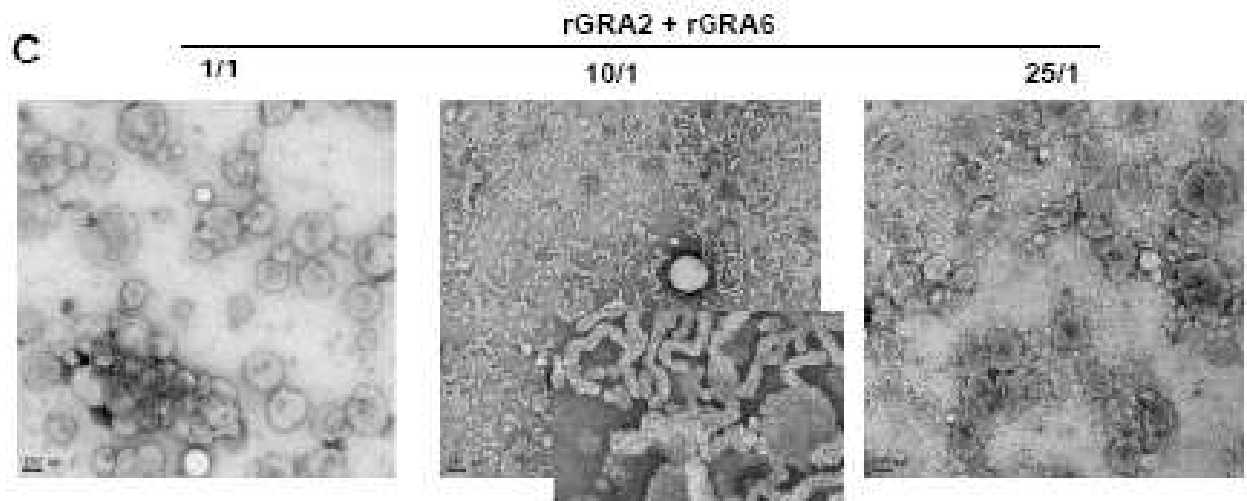
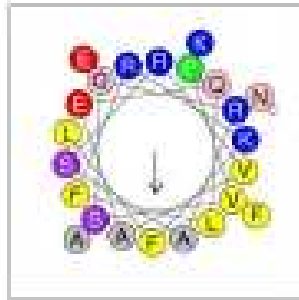


Figure 4



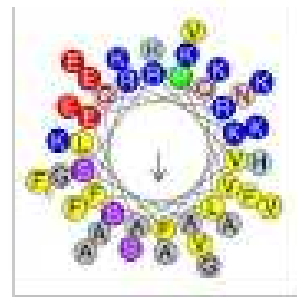
AAH1 (70-92)



AAH2 (96-110)

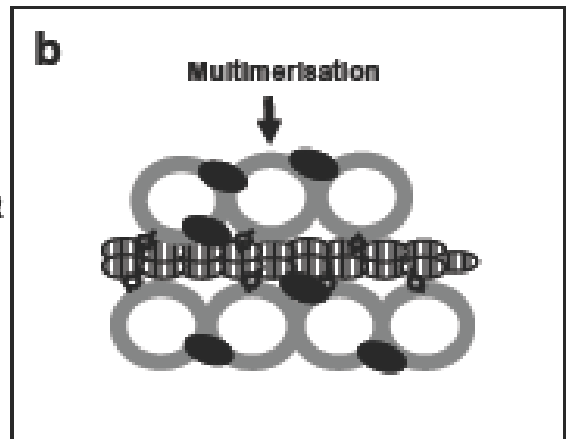
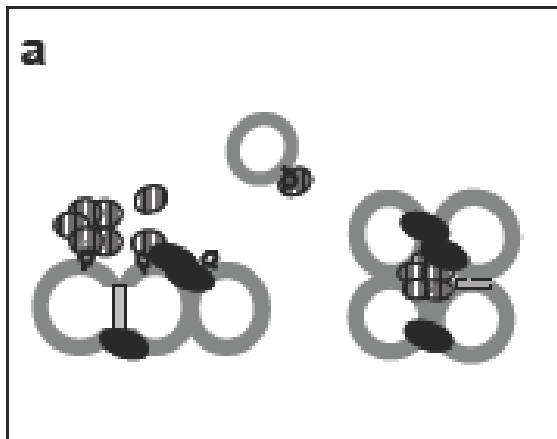
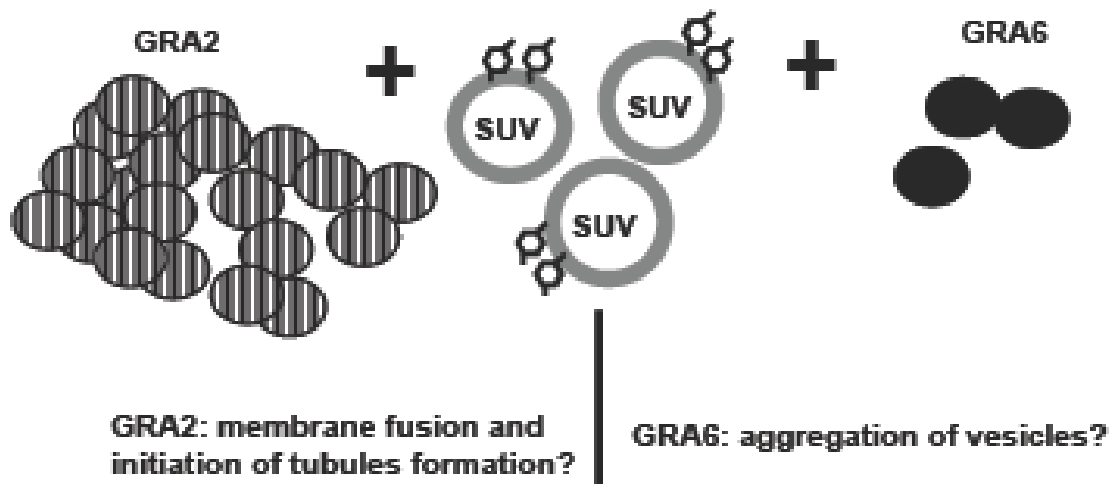


AAH3 (119-139)



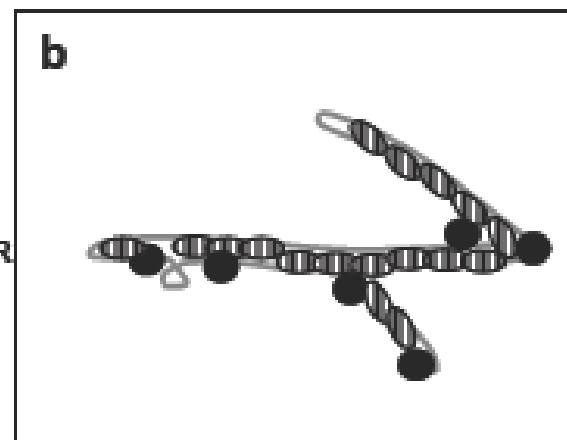
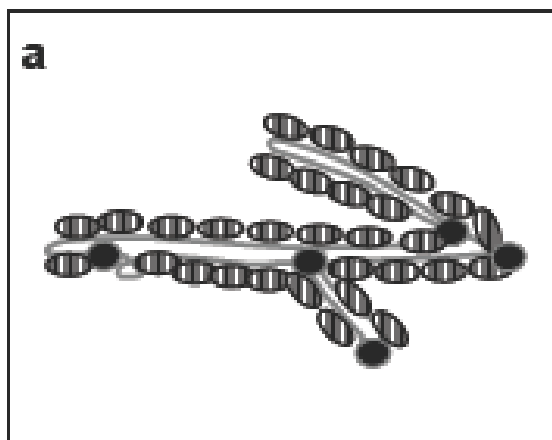
AAH1+2 (70-112)

Figure 5



OR

Membranous tubules



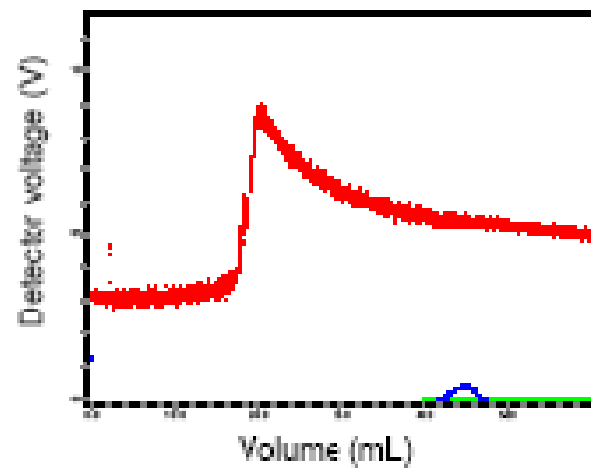
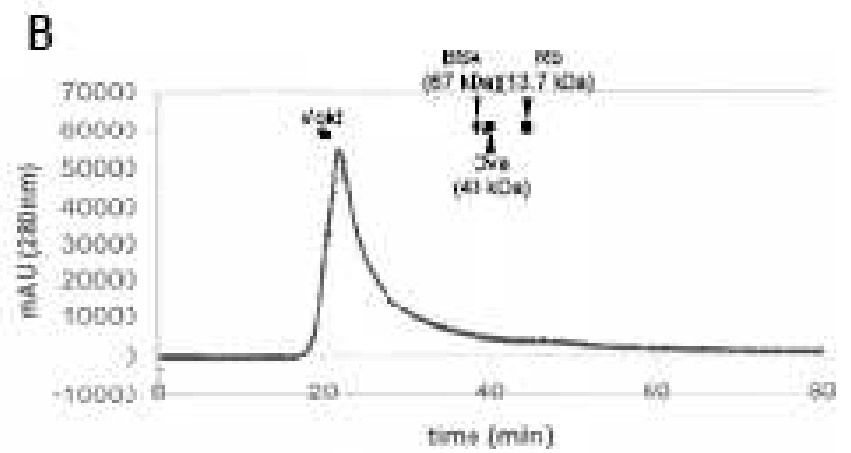

OR

Supplementary figure 1

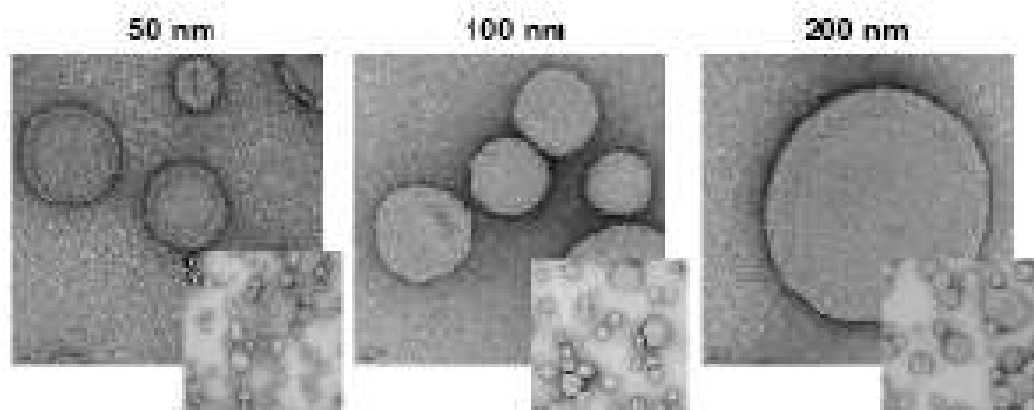
A

Extruded HeLa SUVs
(σ : 100 nm)

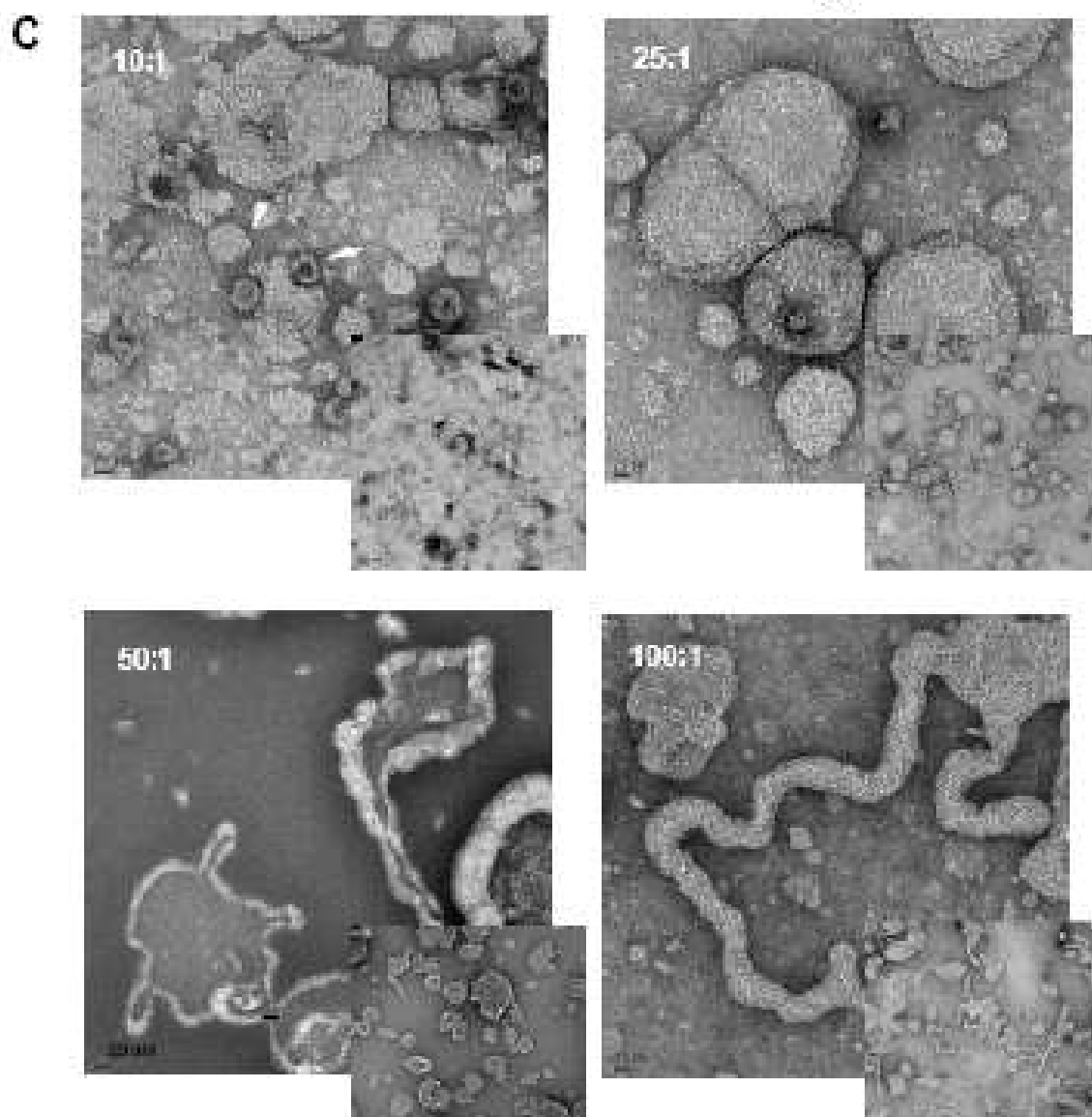
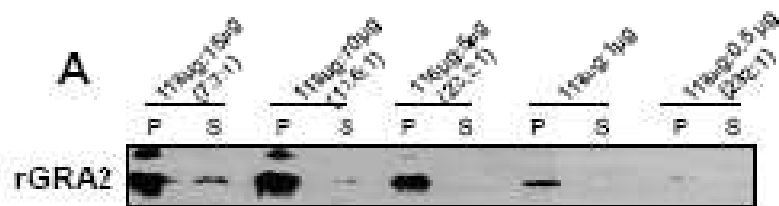
Extruded HeLa SUVs
100 nm (zetasizer)



C



Supplementary figure 2



DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce chapitre final a pour objectifs, de dresser le bilan des résultats obtenus au travers des trois volets expérimentaux et d'essayer d'apporter des éléments de réponse aux questions posées lorsque j'ai commencé ce travail. Dans le cadre global du projet de recherche qui vise à comprendre le mécanisme de la mise en place de la VP et du RNM en particulier, les questions qui étaient posées étaient :

- comment les protéines GRA sont-elles capables d'exister dans la PV, à la fois sous un état soluble et membranaire, alors qu'elles contiennent dans leur séquence en aa, des domaines d'interaction avec les membranes ?
- quelle est, dans la VP, la spécificité de l'adressage des protéines GRA aux membranes du RNM ?
- quelle est la contribution de GRA2 et GRA6 dans la biogenèse des membranes du RNM ?

Les problématiques soulevées vont être reprises et commentées à la lumière des résultats obtenus. Ce chapitre présentera également les perspectives de développement de ce travail.

1) Caractérisation des protéines GRA associées au RNM et solubilisation de ces protéines dans la PV avant association membranaire

Dans le cadre de la caractérisation des protéines GRA associées au RNM, j'ai participé au cours de ma thèse, à la caractérisation d'une nouvelle protéine, GRA12, sécrétée à partir des GD et associée aux membranes du RNM (**article N°1**). Des expériences d'immunofluorescence indirecte et de microscopie électronique après immunomarquage ont montré que dans le parasite, GRA12 est localisée dans les GD. Après sécrétion dans la VP, son trafic est identique à celui de GRA2 : elle est retrouvée au pôle postérieur du parasite, là où le RNM commence à se mettre en place. Puis, dans les vacuoles matures, GRA12 est localisée dans l'espace

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

vacuolaire et associée aux membranes du RNM. Pour ma part, j'ai réalisé des expériences de fractionnement de cellules infectées, suivies de traitements solubilisant la protéine à partir des membranes afin de déterminer la nature des interactions de GRA12 avec les membranes du RNM. J'ai montré que GRA12 est solubilisée par les détergents et qu'elle se comporte donc comme une protéine intégrale de membrane, ce qui est en accord avec sa structure secondaire prédite. Afin de rechercher d'éventuelles interactions entre GRA12 et GRA2, j'ai recherché la présence de GRA12 dans les fractions de purification de la protéine GRA2-HA-FLAG (purifiée à partir d'une lignée parasitaire disponible au laboratoire), à partir d'extraits parasitaires solubles ou d'extraits vacuolaires. GRA12 est co-purifiée avec GRA2-HA-FLAG à partir des extraits parasitaires solubles et à partir de la fraction soluble des extraits vacuolaires mais elle ne l'est pas à partir des extraits de membranes vacuolaires. GRA12 interagit donc avec GRA2 dans le parasite et dans l'espace vacuolaire mais elle n'interagit pas avec GRA2 dans les membranes du RNM (**Figure 68**). Il est intéressant de noter à ce niveau, que GRA12 se comporte donc comme GRA1, GRA3 et dans une moindre mesure, GRA6 et GRA9 qui voient leurs interactions avec GRA2, abolies ou fortement diminuées suite à l'association de la protéine avec les membranes du RNM (Braun *et al.*, 2008).

Dans le cadre de l'étude des protéines GRA associées au RNM, la première question à laquelle je me suis intéressée était d'essayer de comprendre comment les protéines GRA, qui présentent des domaines d'association membranaire dans leurs séquences en aa, sont capables d'exister dans le compartiment vacuolaire sous forme soluble, avant de s'associer à leur membrane vacuolaire cible. Afin de répondre à cette question, nous avons procédé à l'étude de l'état de compaction des protéines GRA, avant et après sécrétion. Les résultats de la comparaison des profils de centrifugation isopycnique sur gradient de densité de glycérol, avant et après sécrétion (fraction soluble des GD *versus* fraction soluble de la VP), ont montré que les protéines GRA ont un profil de solubilisation variable au cours de leur trafic (**Figure 63**). A part la protéine GRA1 qui est totalement soluble avant et après sécrétion et dont le profil de centrifugation ne varie pas, les autres protéines GRA analysées se caractérisent par une diminution de leur densité isopycnique après sécrétion. Cette diminution de densité est plus marquée pour GRA3 et GRA7 (protéines destinées à la MVP). Ces résultats nous ont amené à supposer l'existence de deux types de complexes de protéines GRA : un premier complexe regrouperait toutes les protéines analysées dans ces expériences ; un deuxième complexe regrouperait GRA3 et GRA7 dans des assemblages plus compacts. Ces résultats nous indiquent également que les protéines GRA, après sécrétion et avant insertion dans leur membrane cible de la VP, passent par des états de compaction intermédiaires. Le cas de la protéine GRA2 est considéré à part car les formes solubles de cette protéine présentent une densité isopycnique moins variable et relativement faible, avant et après sécrétion dans la VP. Ce résultat pourrait indiquer que GRA2 serait disponible à tout moment de son trafic, sous une forme peu compacte (probablement en petits assemblages) (**Figure 68**).

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Bien que cette méthode ne nous donne accès qu'à la densité (relative) et non à la taille des structures séparées, les données obtenues peuvent tout de même être traduites en termes de multimérisation car l'augmentation de densité est généralement considérée comme liée à la multimérisation des protéines. Il est donc probable que les protéines GRA forment de gros complexes néanmoins solubles, avant leur sécrétion dans la VP et que ces complexes se dissocient partiellement après sécrétion dans la VP. Les résultats du laboratoire ont par ailleurs montré que les protéines GRA forment des complexes de haut poids moléculaires dans le parasite et qu'elles continuent d'interagir entre elles après sécrétion, dans la fraction soluble de la VP (P. Ruffiot, thèse UJF, 2007 ; L. Travier, thèse UJF, 2007 ; Braun *et al.*, 2008). Mes résultats confortent ces données. En effet, ils montrent que certaines protéines GRA, telles que GRA2 et GRA6 d'une part ou GRA3 et GRA7 d'autre part, sont susceptibles d'être en interaction puisqu'elles se répartissent dans une même zone d'un gradient de densité. Toutefois, ces résultats ne permettaient pas de déterminer comment se forment les complexes.

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation des complexes solubles de protéines GRA, nous avons cherché à déterminer quelle est la nature biochimique des interactions permettant de solubiliser ces protéines pour la plupart, membranaires. La diminution de densité isopycnique des complexes de protéines GRA depuis les GD jusqu'à la fraction soluble de la PV, nous a amené à supposer l'existence d'un changement de conformation progressif de ces protéines en même temps qu'une décompaction, depuis leur sécrétion à partir des GD, jusqu'à leur membrane vacuolaire cible. Cette décompaction progressive et ce changement de conformation pourraient faire intervenir des éléments d'une autre nature biochimique que les protéines, notamment des lipides, micelles ou vésicules lipidiques. Ces éléments pourraient se trouver dans l'espace vacuolaire au moment de la sécrétion des protéines GRA et pourraient permettre de les solubiliser et de faciliter leur insertion dans les membranes vacuolaires. Cette hypothèse a été testée par l'application de traitements dénaturants aux protéines GRA sécrétées *in vitro*. Nous avons observé qu'à l'exception de la protéine GRA4, les protéines du RNM (GRA2 et GRA6) ainsi que celles de la MVP (GRA3 et GRA7) sont solubilisées uniquement par un détergent (**Figure 65**). Les protéines semblent donc interagir *via* des interactions majoritairement hydrophobes avec peut être des éléments lipidiques, au sein des complexes solubles et de compaction intermédiaire formés dans l'espace vacuolaire. Les éléments constituant ces structures de solubilisation des protéines GRA dans l'espace de la VP ainsi que le mode d'association des protéines à ces structures, sont pour le moment totalement inconnus. Néanmoins, afin d'explorer la piste « lipides », nous avons comparé les profils de sécrétion *in vitro* des protéines GRA, en présence de milieu complet induisant la sécrétion (c'est-à-dire contenant des lipides) *versus* sans lipides. Les résultats (**Figure 66**) ont montré que contrairement aux protéines GRA1, 2, et 4, les protéines GRA3, 5, 6 et 7 contenant un TMD, ne sont plus détectées dans la fraction ultrasoluble des produits de sécrétion parasitaire en absence de lipides. Elles sont néanmoins toujours détectées dans le culot d'ultracentrifugation, ce qui indique qu'elles sont toujours sécrétées. Il est donc possible que

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

des lipides contribuent à solubiliser les complexes de protéines GRA contenant un TMD après leur sécrétion dans la VP. L'hypothèse d'une association des protéines GRA à des structures lipidiques, trop petites pour être détectées en microscopie électronique, ne peut pas être exclue. Ces structures pourraient correspondre à des microvésicules lipidiques ou à des petites micelles, en partie solubles à 100 000 x *g*. Chez les mammifères, l'existence de ce type de vésicules a déjà été rapportée : les corps multivésiculaires présents dans les lymphocytes B et les cellules dendritiques contiennent en effet des exosomes, petites vésicules lipidiques riches en molécules du CMH II et qui peuvent être exocytées pour permettre la reconnaissance de motifs antigéniques par les lymphocytes T. Si la présence de ces exosomes dans la VP est confirmée, il faudra rechercher s'ils correspondent aux « beads on a string » observés dans le cytoplasme de la cellule hôte au moment de la sécrétion des rhoptries. Ces structures pourraient en effet être en partie, internalisées dans la VP (Ravindran and Boothroyd, 2008). De plus, dans la littérature, très peu de données existent concernant le trafic, sous forme soluble, de protéines possédant des segments hydrophobes. C'est une problématique qui concerne une minorité de protéines, pour la plupart impliquées dans le transport de lipides (apolipoprotéines, protéines de transport de phospholipides,...) (Segrest *et al.*, 2000 ; Voelker, 2005). Un rôle des protéines GRA dans le transport de lipides au sein de la VP n'est pas à exclure...

Afin d'approfondir l'étude des formes de solubilisation des protéines GRA dans la fraction soluble de la VP, une piste possible est de reconstituer leurs interactions en solution, *in vitro*, à partir de protéines recombinantes. Le vecteur pUET1 (Dabrowski and Kur, 1999) s'est révélé permettre l'expression puis la purification des protéines GRA même les plus hydrophobes, telles que GRA6 (**article N°3**). Si les protéines GRA peuvent être marquées par un fluorophore, leurs caractéristiques individuelles de diffusion pourraient être étudiées par spectroscopie à fluorescence (FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy) (Yu *et al.*, 2005 ; Gilbert *et al.*, 2006). L'ajout progressif d'autres protéines GRA sous forme recombinante permettrait de déterminer leurs capacités d'interactions par le suivi des variations de leur mobilité. Ces mesures pourraient être couplées à une étude par dichroïsme circulaire afin de détecter d'éventuels changements de conformation des protéines mises en présence. Enfin, l'étude des paramètres d'affinité de ces protéines entre elles par résonance plasmonique de surface (SPR : Surface Plasmon Resonance) peut également être envisagée. En parallèle, l'analyse des interactions entre les protéines GRA en solution par la technique de calorimétrie isothermale (ITC : Isothermal Titration Calorimetry) (Liang, 2008), permettant de mesurer la chaleur libérée lors d'une réaction entre deux ou plusieurs protéines, pourrait aider à définir les paramètres des interactions établies entre les protéines. Cette technique présente l'avantage d'utiliser des protéines en solution, sans avoir recours à des modifications chimiques (Ababou *et al.*, 2007 ; Garidel *et al.*, 2009).

L'inconvénient des expériences proposées ci-dessus est qu'elles seraient réalisées sur des protéines recombinantes produites en bactéries. Pour valider les résultats dans le parasite, il

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

conviendrait de réaliser un suivi en FCS des protéines GRA libérées dans la VP, juste après invasion. Pour cela, il faudrait disposer de parasites exprimant les protéines d'intérêt en fusion avec une protéine fluorescente (GFP, RFP, YFP, ...). L'analyse des variations de la mobilité des protéines pourrait permettre de déterminer le processus de dissociation des protéines GRA sortant des granules denses. Cette approche n'a jusqu'ici, pas pu être mise en œuvre car le trafic des protéines GRA-XFP exprimées de façon stable chez *T. gondii*, est altéré (L. Travier, Thèse UJF, 2007). Le fait que la GFP par exemple ait un poids moléculaire équivalent à celui des protéines GRA n'est peut être pas étranger à ce problème. Le développement de nouveaux marqueurs fluorescents moins volumineux tels que la FIAsh-tetracycline (Hoffmann *et al.*, 2005 ; Frischknecht *et al.*, 2006), pourrait peut être permettre de résoudre ce problème.

2) Adressage des protéines GRA au RNM : rôle de(s) domaine(s) protéique(s) particulier(s)

La deuxième question abordée lors de ma thèse, était de rechercher si les protéines GRA adressées au RNM, contiennent un ou plusieurs domaines requis pour cet adressage spécifique. Cette problématique avait été abordée par C. Gendrin au laboratoire, avant que je ne commence mes travaux de thèse. Au cours de ses travaux de thèse, C. Gendrin avait essayé de disséquer les déterminants moléculaires qui permettent le trafic des protéines GRA contenant un TMD vers les GD, puis après sécrétion, vers les membranes de la VP. Grâce à l'utilisation de protéines chimériques dérivées de la protéine GRA5, modèle de la MVP, elle avait démontré l'importance des domaines N terminal et transmembranaire de la protéine pour son adressage aux GD puis à la MVP (Gendrin *et al.*, 2008). Dans le travail réalisé en collaboration avec C. Gendrin (**article N°2**), nous nous sommes concentrées sur les paramètres d'adressage de GRA6 au RNM. Le but était de rechercher si GRA6 se comporte de la même façon que GRA5 et si son domaine N terminal est essentiel au ciblage de la protéine dans les GD et vers les membranes du RNM. Nous avons montré qu'effectivement, le domaine N terminal de GRA6 est indispensable à la fois pour l'adressage de la protéine vers les GD et vers les membranes du RNM, après sécrétion. A partir de ces données, nous avons supposé que le domaine N terminal de GRA6 pourrait permettre l'initiation de l'association de la protéine avec les membranes, en interagissant avec les lipides membranaires.

Il est admis que les mécanismes de ciblage d'une protéine dépendent de plusieurs paramètres, dont la nature de la bicouche lipidique et les protéines en interaction avec la protéine d'intérêt. La reconnaissance de lipides spécifiques par une protéine est un événement clé pour son association aux membranes. Pour les protéines GRA, il a été montré par exemple que GRA7, ciblée à la MVP, lie spécifiquement une famille particulière de lipides, les phosphoinositides. Cependant, *in vitro*, elle peut s'associer aux membranes ne contenant que de la PC (Coppens *et al.*, 2006). Il est donc possible que l'interaction spécifique de GRA7 avec les

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

phosphoinositides n'intervienne que tardivement afin de réguler les fonctions de cette protéine. L'interaction avec les phosphoinositides pourrait par exemple, permettre d'induire un changement de conformation, comme cela a été décrit pour une protéine adaptateur de clathrine (Collins *et al.*, 2002 ; Balla, 2005). Bien que la composition lipidique des membranes de la MVP et du RNM ne soit pas connue, leur épaisseur différente (Magno *et al.*, 2005a) peut permettre de supposer une composition différente en lipides. Ma contribution au projet de thèse de C. Gendrin a consisté à rechercher par des tests de superposition protéines/lipides, si le domaine N terminal de GRA6 pouvait réagir avec des lipides membranaires. J'ai montré qu'en effet, il présente une affinité vis-à-vis de phospholipides chargés négativement, notamment du PI(4)P, du PI(3, 4, 5)P₃, du PA, du CL et du SGC. Ce résultat a conforté notre hypothèse de départ et laisse supposer que le domaine N terminal de GRA6 pourrait interagir avec les membranes, *via* une interaction préalable avec des lipides chargés négativement. Néanmoins, il est évident que ces tests de superposition protéines/lipides ne sont pas suffisants. Il faudrait maintenant valider cette interaction en solution, en utilisant des liposomes de composition lipidique définie et des fragments recombinants de la protéine. Une fois le(s) /les lipide(s) identifié(s), les paramètres d'affinité du domaine N terminal de GRA6 vis-à-vis de tel ou tel lipide pourraient être déterminés par SPR.

Il a été décrit pour de nombreuses protéines, que le recrutement à la membrane peut se faire au niveau de rafts lipidiques généralement riches en cholestérol, en sphingomyéline et contenant des phosphoinositides. Ces domaines sont assimilés à la fraction des membranes résistant aux détergents à froid (DRM) (Simons and Gerl, 2010). Une des questions à laquelle j'ai essayé de répondre au cours de ma thèse, a été de savoir si dans leurs membranes vacuolaires cibles, les protéines GRA sont associées aux rafts. Comme la purification de membranes vacuolaires est actuellement impossible, j'ai procédé à des fractionnements cellulaires à partir de cellules HFF infectées pendant 24 h, par le toxoplasme. Les DRM ont été obtenus après traitement au Triton X-100, à 4°C, de la fraction membranaire (contenant les membranes vacuolaires) des cellules infectées, suivis d'une séparation sur gradient discontinu de sucrose. J'ai recherché par immunoblot, une éventuelle co-localisation des protéines GRA avec la flotilline-1, marqueur des DRM. Les résultats de ces expériences ont montré qu'effectivement, les protéines de la MVP (GRA3, 5 et 7) ainsi que les protéines GRA4 et GRA12 du RNM se retrouvent dans les mêmes fractions que la flotilline-1 alors que GRA9 reste dans le fond du gradient. Malheureusement, les protéines GRA2 et GRA6 n'ont pas pu être détectées, faute de matériel suffisant (résultats non présentés). A l'heure actuelle, par manque d'une vision globale sur l'ensemble des protéines GRA, il est donc impossible d'établir un quelconque lien entre une localisation de protéines GRA aux DRM vacuolaires et un recrutement spécifique de ces protéines vers tel ou tel type de membrane vacuolaire. Sachant que le type de détergent utilisé pour l'extraction des DRM est déterminant pour l'efficacité de l'extraction des protéines associées aux rafts, il conviendrait par exemple de répéter l'expérience en utilisant le CHAPSO, plus efficace que le Triton X-100 (Williamson *et al.*, 2010).

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces expériences devraient également être complétées par des études en immunofluorescence et en microscopie électronique après immunomarquage afin de confirmer ou non la co-localisation des protéines GRA avec la flotilline-1 dans les membranes de la VP.

Le tropisme des protéines GRA pour les différents systèmes membranaires présents dans la VP pourrait également dépendre en partie, de signaux portés par ces protéines. Diverses modifications post-traductionnelles pourraient constituer ces signaux. Parmi les protéines GRA, seules GRA1 et les protéines associées au RNM GRA2, 4, 6, 9 et GRA12 sont prédites pour contenir des sites de sumoylation (<http://sumosp.biocuckoo.org/online.php>). Cette modification qui peut réguler le trafic de certaines protéines, pourrait être la signature des protéines destinées à s'associer au RNM. L'étude du rôle de cette modification post-traductionnelle pourrait être abordée par la construction de parasites mutants ponctuels sur les lysines cibles de la modification puis l'analyse de leur phénotype.

3) Implication des protéines GRA2 et GRA6 dans la formation du RNM

Des travaux antérieurs avaient mis en évidence, par une approche indirecte, l'implication des protéines GRA2 et GRA6 dans la formation du RNM, GRA2 en initiant la formation et GRA6, en stabilisant dans le temps, les structures tubulaires initiées par GRA2 *via* ses AAH ([Mercier et al., 2002](#) ; [Travier et al., 2008](#)). Une partie de mon travail de thèse visait à disséquer l'implication directe de ces deux protéines dans la formation du RNM. Après avoir purifié et caractérisé par DC, DLS et microscopie électronique, les protéines recombinantes rGRA2 et rGRA6, celles-ci ont été utilisées dans des tests de liaison à des membranes modèles (LUV) formées de lipides complexes. J'ai montré que rGRA2 semble s'associer préférentiellement aux membranes dont le rayon de courbure est important (diamètre de 50-100 nm) et qu'elle les déforme en courts tubules membranaires. Par contre, l'utilisation de rGRA6 dans les mêmes tests n'a pas révélé une sensibilité de la protéine à un rayon de courbure membranaire particulier. Les observations en microscope électronique à transmission ont montré que rGRA6 ne déforme pas les liposomes mais qu'elle semble favoriser leur assemblage. Enfin, en réalisant des co-incubations de rGRA2 et de rGRA6 avec des LUVs de 100 nm de diamètre, j'ai montré que l'efficacité d'association de rGRA2 aux membranes ainsi que la formation de tubules membranaires sont accentuées en présence de rGRA6.

Les protéines recombinantes utilisées dans mes expériences ayant été produites en bactéries, leurs modifications post-traductionnelles sont limitées. Or GRA2 et GRA6 ont par exemple été décrites comme étant O-glycosylées dans le parasite ([Zinecker et al., 1998](#) ; [Travier et al., résultats non publiés du laboratoire](#)). Ce manque de modifications post-traductionnelles des protéines recombinantes pourrait influencer indirectement sur le processus de déformation des

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

liposomes *in vitro*, en altérant la structure tri-dimensionnelle des protéines. L'expression des protéines dans un système de cellules eucaryotes pourrait peut être résoudre le problème.

La connaissance de la structure tridimensionnelle des protéines GRA2 et GRA6 pourrait apporter des informations intéressantes sur leurs interactions avec les membranes. En collaboration avec W. Weissenhorn (UVHCI, CNRS UMI 3265-Université Joseph Fourier Grenoble 1-EMBL), nous avons essayé d'augmenter le rendement de production de rGRA2 en vue de sa cristallisation. Nous n'avons malheureusement pas atteint un rendement suffisant pour envisager des essais de cristallisation. Cette étude devrait néanmoins être poursuivie car connaître la structure des protéines est un défi majeur pour les protéines membranaires et en particulier, pour celles qui contiennent des AAH (Drin and Antony, 2010). Même si elle reste difficile à obtenir, la structure tri-dimensionnelle de rGRA6 devrait pouvoir être obtenue dans un avenir proche (collaboration du laboratoire avec le consortium américain Center for Structural Genomics of Infectious Diseases (<http://www.csqid.org/csqid/>)).

Une des caractéristiques majeures de la protéine rGRA2 produite à partir du vecteur pJET1 en bactéries, est qu'elle se présente sous forme de deux types d'agrégats solubles (**article N°3**). Nous n'avons pas étudié si la formation de ces agrégats résulte d'un artéfact lié au système de production ou est lié à une propriété intrinsèque de la protéine. Des expériences de calorimétrie différentielle pourraient peut être permettre de répondre à cette question (Adrover *et al.*, 2010).

Le comparaiso de l'affinité de rGRA2 et de rGRA2 (NT-CT) (rGRA2 dépourvue de ses AAH) aux lipides dans des expériences de fat blots, a permis de suggérer que les AAH de GRA2 reconnaîtraient le PI(4,5)P₂. Afin de déterminer les paramètres d'affinité de rGRA2 vis-à-vis du PI(4,5)P₂, des expériences de SPR ont été tentées, en utilisant deux types de supports (Chip) pour l'immobilisation des LUV : une Chip HPA permettant la fixation de monocouches de lipides et une Chip L1, permettant de garder les liposomes sous leur forme vésiculaire. Les LUV étaient formées soit de PC/PE/PI(4,5)P₂ (6/3/1) ou de PC/PE (6/4) (ratios molaires). Plusieurs conditions ont été testées, en faisant varier la concentration en lipides ou en protéine. Malheureusement, la fixation non spécifique de rGRA2, même en absence de liposomes, ne nous a pas permis de conclure quant à la spécificité de l'affinité de rGRA2 vis-à-vis de PI(4,5)P₂. C'est donc en incubant rGRA2 avec des liposomes de composition lipidique définie, et contenant ou non PI(4,5)P₂, que nous avons validé l'interaction biochimique de GRA2 avec ce lipide (**Figure 67**). Il faudrait néanmoins valider par microscopie électronique à transmission, le fait que rGRA2 déforme des liposomes formés uniquement de PC/PE/ PI(4,5)P₂ en tubules membranaires puis dans un second temps, valider la co-localisation de la protéine et du lipide par un immunomarquage. Afin de valider l'interaction de GRA2 vis-à-vis du PI(4,5)P₂, nous avons également cherché à mettre en évidence l'interaction possible entre la protéine et le lipide dans la PV. Nous avons utilisé des fibroblastes infectés d'une nuit par *T. gondii*, puis les avons immunomarcués à l'aide d'un anticorps commercial, supposé être

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

monoclonal et dirigé contre PI(4,5)P₂. L'observation de ces cellules en microscopie confocale a permis de détecter un signal PI(4,5)P₂ à la MVP alors que le signal de GRA2 (révélée à l'aide d'un anticorps spécifique produit chez le lapin) est détecté dans l'espace intravacuolaire, là où se trouve le RNM qui demeure non visible en microscopie photonique. Il est possible que la différence de stockiométrie entre PI(4,5)P₂ et GRA2, largement en faveur de GRA2, nuise fortement à la détection de PI(4,5)P₂ au niveau du RNM. Des expériences de dot blots faisant varier la quantité de rGRA2 incubée sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle avait été déposée une quantité fixe de PI(4,5)P₂, vont en effet dans ce sens. Néanmoins, lorsque nous avons vérifié la spécificité de l'anticorps monoclonal anti- PI(4,5)P₂ par des expériences de fat blots, nous avons été surpris de constater que l'anticorps reconnaissait majoritairement le PI(3,4)P₂ et seulement minoritairement le PI(4,5)P₂. Ne pouvant pas conclure directement quant à une interaction de GRA2 avec PI(4,5)P₂ dans la VP, du fait de l'impossibilité de co-localiser les deux molécules par immunofluorescence, l'alternative serait de faire exprimer de façon stable par le parasite, un vecteur d'expression d'une sonde fluorescente spécifique du PI(4,5)P₂, comme par exemple le domaine PH (pleckstrin homology) en fusion avec une protéine fluorescente (Halet *et al.*, 2005). Le domaine PH est en effet connu pour lier fortement le PI(4,5)P₂ (Lemmon, 2008). Cette perspective semble réalisable dans notre modèle puisque une approche similaire a été récemment utilisée pour localiser PI(3)P dans les parasites Plasmodium et Toxoplasma (Tawk *et al.*, 2010). Cette approche permettrait par exemple, de suivre en temps réel et par vidéomicroscopie, la dynamique du PI(4,5)P₂ dans les membranes vacuolaires et son éventuelle association à GRA2.

Afin de compléter l'étude que j'ai réalisée, il conviendrait d'étudier la topologie de rGRA2 et de rGRA6 dans les membranes. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées. L'une d'entre elles, que j'ai rapidement testée lors de ma thèse, consiste à utiliser une sonde fluorescente, le 1-aniline-8-naphthalene sulfonate (ANS). Cette molécule a la particularité d'interagir avec les régions hydrophobes exposées des protéines. Elle permet donc d'appréhender les changements conformationnels liés à l'association d'une protéine aux membranes. Les quelques essais que nous avons réalisés montrent que suite à l'incubation de rGRA2 avec les SUV formés de lipides complexes, l'intensité de fluorescence de l'ANS augmente par rapport à celle obtenue avec rGRA2 soluble. Ces résultats suggèrent donc qu'au moment où la protéine s'apprête à s'associer aux membranes, ses régions hydrophobes se retrouvent exposées et qu'elles sont rendues accessibles à l'ANS. Par ce type d'approche, il est possible, en faisant varier la concentration en ANS, de quantifier l'état majoritaire, c'est-à-dire la forme soluble ou associée aux membranes, de la protéine. L'étude de la topologie de GRA2 dans les membranes pourrait être également complétée par une étude de l'accessibilité des aa de GRA2 associée aux membranes du RNM, après action d'une protéase (trypsine), suite à la perméabilisation sélective des membranes de la cellule hôte et de la MVP (Papakrivos *et al.*, 2005).

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Pour des raisons de simplicité de mise en œuvre, nous avons choisi d'utiliser un système de LUV pour étudier l'interaction de GRA2 et GRA6 avec les membranes. Les résultats obtenus jusqu'à présent, sont encourageants puisque les tubules observés (longueur maximale de 200 nm et diamètre de 15-20 nm) ressemblent à ceux observés dans la VP par leur aspect et leurs formes courbées. Néanmoins, les conditions optimales de tubulation ne sont pas encore obtenues puisque le diamètre moyen des tubules membranaires du RNM est de 40-50 nm (Magno *et al.*, 2005a). La longueur de ces tubules dans la VP est difficile à estimer du fait de leur forme courbée. Différents paramètres devront encore être testés pour optimiser le système *in vitro*, parmi lesquels la température. Bien que la température à laquelle ont été réalisées les expériences (25°C environ) permette la fluidité des membranes et limite la dégradation des protéines recombinantes, elle ne correspond pas à la température à laquelle les protéines agissent dans l'hôte infecté. Le toxoplasme infectant tous les animaux à sang chaud, il est probable que la température de la VP soit en effet, comprise entre 35 et 40°C. Afin de vérifier si ce paramètre influe sur la qualité des tubules membranaires formés, des incubations protéines/lipides devront être réalisées dans des incubateurs réglés à des températures supérieures. De plus, les tests d'association des protéines rGRA aux LUV que j'ai réalisés ont tous été menés à pH 7. Bien que le pH de la VP soit certainement proche de celui-ci, nous ne le connaissons pas avec certitude. Il faudra donc tester cette condition, en effectuant des tests d'association de rGRA2 + rGRA6 incubées avec des LUVs de 100 nm de diamètre, dans un tampon équilibré à différents pH (6,8 ; 7 ; 7,2 et 7,4).

Une des approches techniques cruciales dans notre travail a été de visualiser en microscopie électronique à transmission, l'effet de rGRA2 et de rGRA6 sur les LUV. Or, lorsque l'on utilise la microscopie électronique à transmission après une coloration négative qui sert à contraster les liposomes, l'échantillon peut être dégradé en partie, notamment lors de l'étape de séchage. Les liposomes étant très fragiles, ils peuvent alors éclater et former des « trainées » ressemblant à des tubules membranaires. Afin d'éviter toute erreur d'interprétation, il faudra confirmer les observations à l'aide d'une autre technique de microscopie électronique telle que la cryo-microscopie. Cette technique évite en effet, la déshydratation et permet d'observer l'échantillon tel qu'il se présente en milieu liquide.

Parce que la courbure des membranes n'est jusqu'ici, pas quantifiable *in vivo*, les interactions entre les protéines et les membranes courbées s'étudient *in vitro*. Or, la plupart des études sont menées, comme nous l'avons fait, en utilisant des populations de liposomes de diamètres différents. Cette approche permet certes, de définir les caractéristiques moyennes de liaison d'une protéine aux membranes, à partir d'un ensemble polydisperse de courbures mais malgré l'extrudation, les diamètres des liposomes obtenus ne sont pas parfaitement homogènes. L'utilisation de populations de LUV, par nature, ne permet donc pas de prendre en compte que des motifs senseurs de courbure peuvent se lier de façon asynchrone ou de façon inhomogène. Pour pallier ce problème, il faudrait pouvoir utiliser un système de mesure de courbure membranaire sur liposome individuel immobilisé (Single Liposome Curvature assay) (Bhatia *et al.*, 2010).

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Une approche technologique complémentaire à celle que j'ai employée serait l'utilisation de GUV et de protéines marquées par un fluorochrome (ex : FITC,...). Ce système d'étude des interactions protéines-membranes avait commencé à être développé au laboratoire par P. Ruffiot (P. Ruffiot, Thèse UJF, 2007), alors même que nous ne disposions pas encore des protéines recombinantes. Les résultats de cette étude avaient montré que suite à l'incubation des GUV formées de lipides complexes (lipides de cellules HeLa) avec la fraction soluble de protéines GRA sécrétées *in vitro*, puis observation par immunofluorescence indirecte grâce aux anticorps spécifiques des protéines GRA (**Figure 67**),

- (1) les protéines GRA2, 6 et 7 se concentrent dans des micro-environnements de la membrane des GUV isolées. Ces micro-environnements pourraient être de composition lipidique particulière et constituer des zones favorisant des déformations ;
- (2) les protéines GRA2, 3 et 7 se concentrent dans les zones d'attachement entre les GUV ;
- (3) les protéines GRA2 et GRA7 s'associent à de longues extensions membranaires partant des GUV.

Cette étude devrait être poursuivie, à la lumière des résultats apportés par mes expériences et en utilisant des protéines marquées par un fluorophore (ou en fusion avec une protéine fluorescente). Cette approche permettrait par exemple, d'étudier la dynamique des déformations membranaires induites par GRA2 et GRA6.

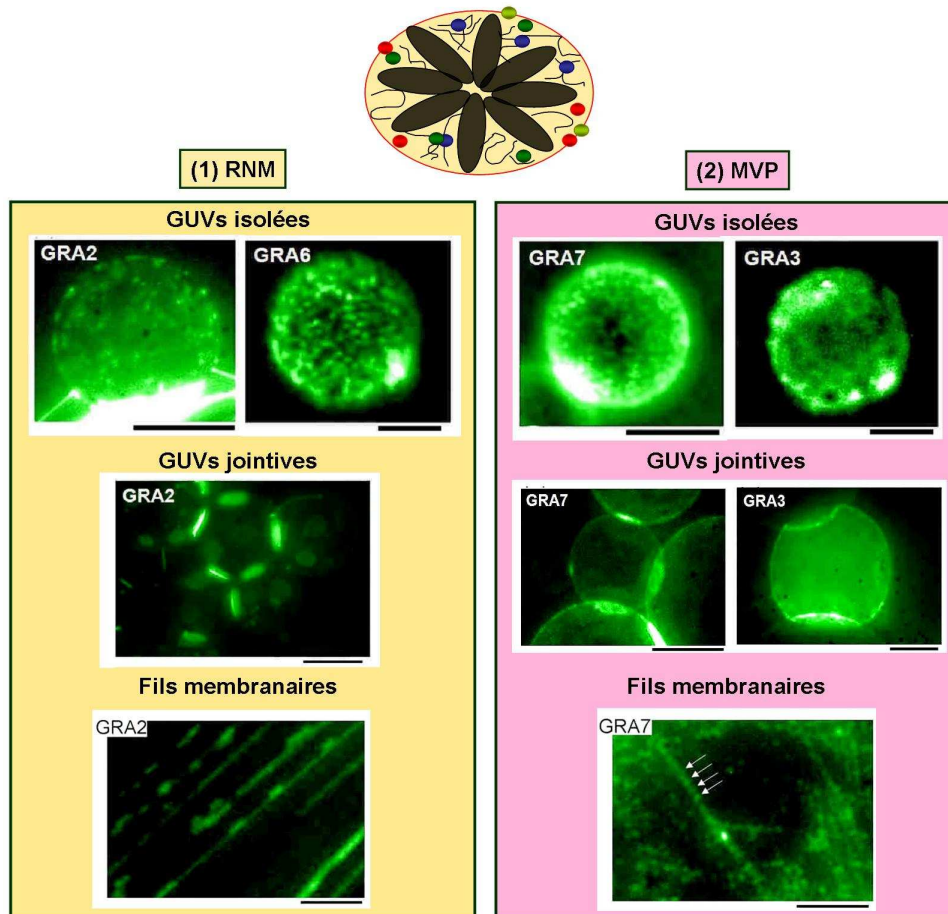


Figure 67. Observation par immunofluorescence indirecte de l'association des protéines GRA2 et GRA6 du RNM (1) et des protéines GRA3 et GRA7 de la membrane de MVP (2) à des vésicules lipidiques géantes (GUV), isolées, jointives ou aux fils membranaires issus de ces GUV. Alors que GRA3 est caractérisée par une répartition diffuse à la surface des GUVs isolées, GRA2, GRA6 et GRA7 forment un marquage piqueté. Contrairement à GRA3 qui est associée à toute la surface des GUVs, GRA2 et GRA7 sont majoritairement détectées au niveau des zones de contact entre GUVs. Enfin, GRA2 et GRA7 (mais ni GRA3, ni GRA6) s'associent également à un réseau dense de fils membranaires présents sur le fond de la chambre d'incubation : la répartition de GRA2 y est diffuse, comparée à celle en points réguliers (flèches blanches) de GRA7. Echelle : 25 μm . D'après (P. Ruffiot, thèse UJF, 2007).

Les résultats obtenus lors de ma thèse pourraient indiquer intuitivement que GRA2 et GRA6 interviendraient à des moments différents au cours du processus de tubulation membranaire : dans un premier temps, GRA6 aiderait au rapprochement spatial des vésicules lipidiques, peut être en formant des complexes intermoléculaires en trans (Ban *et al.*, 2010), et à la formation d'agrégats de liposomes, puis GRA2 interviendrait dans un second temps, pour la fusion de ces liposomes en tubules membranaires (**article N°3**). Ces résultats n'étaient pas forcément attendus puisque l'analyse des mutants de délétion de GRA2 et GRA6 laissent plutôt supposer une antériorité de l'action de GRA2 sur celle de GRA6 (Mercier *et al.*, 2002). Il semble donc important de rechercher dans quel ordre les deux protéines interviennent, en remplaçant la co-incubation des deux protéines avec les liposomes par des incubations successives des LUVs avec rGRA6 puis avec rGRA2 (et inversement). Afin de déterminer l'ordre de recrutement des deux protéines, il est également envisageable de réaliser des co-

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

immunoprécipitations de GRA2/GRA6 seules, en solution, ou en présence de liposomes. Différentes conditions devront ainsi être testées : (1) (GRA2 + liposomes) + GRA6 ; (2) (GRA6 + liposomes) + GRA2 ou encore (3) (GRA6+ GRA2) + liposomes. Enfin, il faudra tester si GRA2 est capable d'induire la fusion de liposomes en utilisant une sonde fluorescente, par exemple, l'octadecyl rhodamine B chloride (Keller *et al.*, 1977 ; Weinstein *et al.*, 1977) incorporée aux liposomes.

Si mes travaux confortent le fait que GRA6 contribue à la formation du RNM, il n'est pas exclu que d'autres protéines de la VP soient également importantes pour façonner le réseau. Dix souches parasitaires délétées chacune d'un gène *GRA* sont maintenant construites (mutants KO *GRA2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14*) dans le fond génétique RH (type I). L'observation en microscopie électronique à transmission de la VP de ces souches mutées est en cours et mettra peut être en évidence d'autres protéines importantes pour la formation du RNM (travail effectué en collaboration entre D. Bzik, Dartmouth Medical School, Lebanon, NH ; J.F. Dubremetz, UMR CNRS 5539 – Université Montpellier 2 et C. Mercier).

Bilan des travaux présentés dans ce manuscrit

Au terme de ce travail, dans le cadre global de l'étude du RNM de la VP de *T. gondii* et des protéines GRA associées, les données apportées peuvent être résumées en trois points majeurs :

- 1/** une fois secrétées à partir des GD, les protéines GRA trafiqueraient dans la VP sous forme de complexes solubles, en interagissant vraisemblablement avec des lipides, afin de maintenir leur solubilité jusqu'à leur arrivée aux membranes vacuolaires cibles (RNM ou MVP) ;
- 2/** le domaine N terminal de GRA6 constitue un élément clé pour la spécificité d'adressage de la protéine vers les membranes du RNM : il semble initier l'interaction de la protéine avec les membranes, en interagissant avec des lipides membranaires chargés négativement ;
- 3/** j'ai montré pour la première fois, l'effet direct de GRA2, en coopération avec GRA6, dans la génération de tubules membranaires à partir de membranes modèles. Bien que les résultats ne permettent pas de déterminer le mécanisme de formation de ces tubules membranaires par GRA2 et GRA6, un modèle peut être envisagé selon lequel rGRA6 interviendrait dans l'agrégation des SUV, puis rGRA2 interagirait avec le PI(4,5)P₂, *via* ses AAH, et permettrait la fusion membranaire et la déformation des LUV en tubules membranaires (**Figure 68**).

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

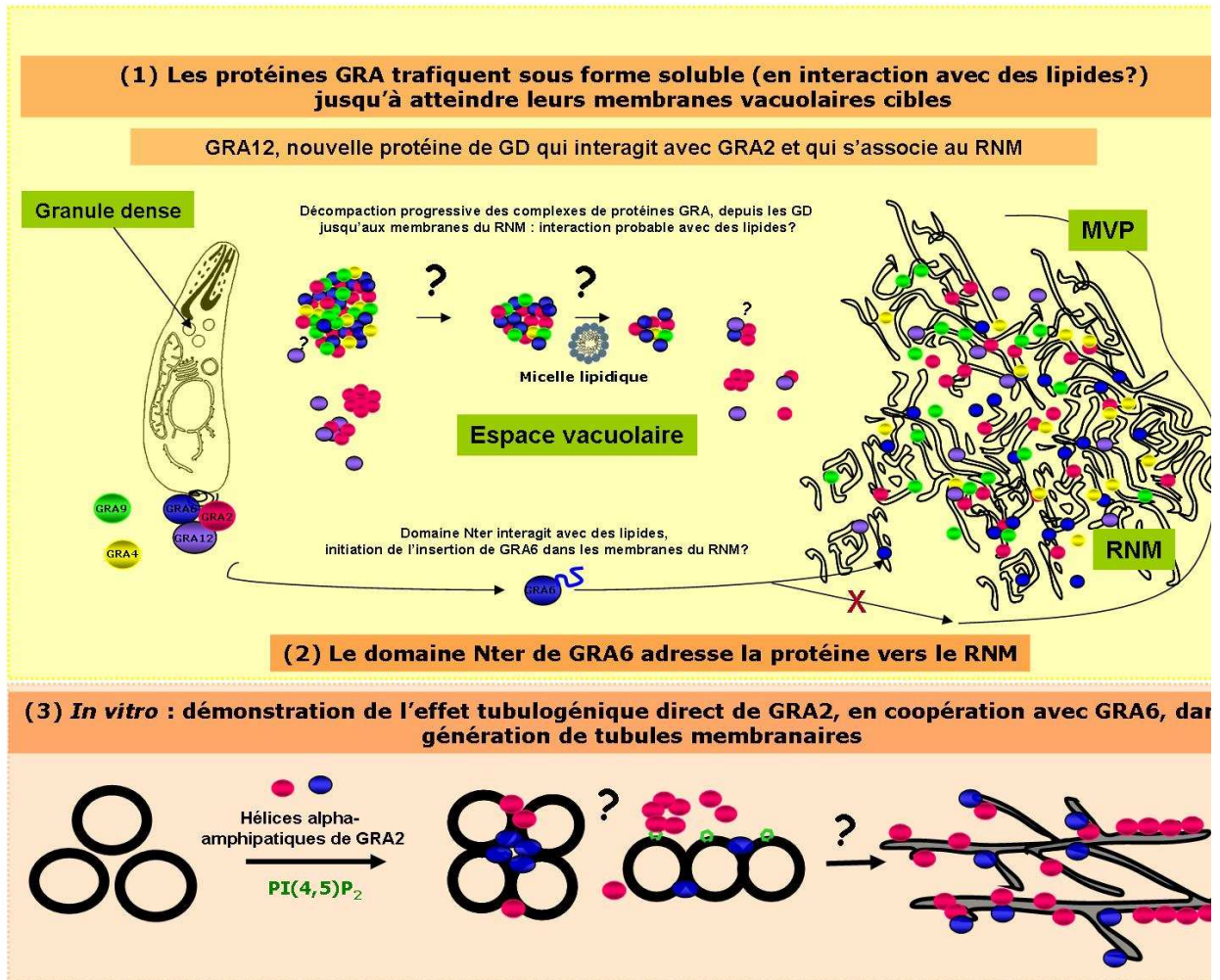


Figure 68. Bilan des résultats des travaux de thèse

MATERIEL & METHODES

- **CHAPITRE I : *Obtention des protéines***
- **CHAPITRE II : *Obtention et analyse des lipides***
- **CHAPITRE III : *Méthodes d'étude des interactions protéines / lipides***

CHAPITRE I – Obtention des protéines

Dans cette section, je ne développerai que les outils que j'ai utilisés dans mes travaux. Les protéines, les souches parasitaires ainsi que les techniques utilisées dans le cadre des travaux collaboratifs présentés dans ce manuscrit, sont détaillés dans le matériel et méthodes des publications correspondantes.

I-1) Obtention des souches parasitaires exprimant les protéines GRA

1) Récapitulatif des souches parasitaires utilisées

Au cours de ces travaux, j'ai utilisé la souche sauvage RH (type I) ainsi que des souches mutantes, délétées de certains gènes codant pour des protéines GRA, ou exprimant des protéines GRA mutées. Ces souches sont répertoriées dans le **Tableau 1**.

Souche de parasite <i>Toxoplasma gondii</i>	Protéine GRA exprimée	Protéine GRA annulée	Sources et/ou Références
RH (ATCC-50174)	Toutes	Aucune	Sabin <i>et al.</i> , 1941
$\Delta gra2$ - $\Delta HXGPRT$ (RH)	-	GRA2	Travier <i>et al.</i> , 2008
$\Delta gra2$ / GRA2-HA-FLAG (RH)	GRA2-HA-FLAG	-	Braun <i>et al.</i> , 2008
$\Delta gra5$ - $\Delta HXGPRT$ (RH)	-	GRA5	Mercier <i>et al.</i> , 2001
$\Delta gra6$ - $\Delta HXGPRT$ (RH)	-	GRA6	Mercier <i>et al.</i> , 2002

Tableau 1 : Liste des souches de Toxoplasmes utilisées

2) Maintien des souches parasitaires en culture

Les parasites ont été amplifiés par infection de cellules humaines adhérentes confluentes HFF (Human Foreskin Fibroblasts, ATCC-CRL 1634) ou HeLa (cellules d'adénocarcinome du col de l'utérus, ATCC-CCL2), maintenues en culture jusqu'à lyse complète du tapis cellulaire (soit 48 h après infection). Les cellules infectées ou non par les parasites ont été cultivées à 37°C, sous 5 % de CO₂, en milieu D10 [Dulbecco Minimum Essential Medium, (DMEM, Gibco) additionné de 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Bio West), 2 mM de Glutamine (Euromedex), 50 U/ml de Pénicilline et de 50 µg/µl de Streptomycine (Dutscher)].

I-2) Obtention des protéines GRA à partir du parasite

1) Obtention des protéines GRA à partir de parasites extracellulaires

L'équivalent d'une boîte de culture de 180 cm² de parasites ayant fraîchement lysé le tapis de cellules HFF (soit environ 18 ml de milieu de culture) a été centrifugé pendant 10 min, à 4°C, à 2 000 g. Le culot résultant a été dispersé dans un volume de 1 ml de PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Invitrogen). Les parasites ont ensuite été lysés par 3 chocs thermiques successifs dans un bain d'azote liquide suivi d'un passage dans un bain-marie à 37°C. Les débris (organites parasitaires) ont été éliminés par une première centrifugation de 10 min à 17 000 g, à 4°C, puis par une deuxième centrifugation du surnageant pendant 1 h, à 100 000 g, à 4°C. Le surnageant obtenu, appelé HSS_{Tx} pour « *Toxoplasma* High Speed Supernatant», correspond à la fraction ultrasoluble des parasites et comprend donc les protéines solubles des granules denses.

2) Obtention des protéines GRA par fractionnement des produits vacuolaires

Le comportement soluble ou membranaire des protéines GRA, après leur sécrétion dans la VP, a été analysé par fractionnement sub-cellulaire de cellules infectées. Les cellules HFF de 50 boîtes de culture de 180 cm², infectées par les parasites pendant 18 – 20 h, ont été lavées en PBS afin d'éliminer les parasites extracellulaires. Les cellules ont été décollées mécaniquement à l'aide d'un grattoir. Après 10 min de centrifugation, à 750 g

et à 4°C, les cellules infectées ont été dispersées dans un volume de 2 - 3 ml de PBS puis elles ont été cassées par passages successifs au travers d'aiguilles 23 , 25 puis 27 G. Après élimination des déchets parasites et cellulaires par 10 min de centrifugation à 750 g puis 10 min à 17 000 g, à 4°C, la fraction protéique soluble a été ultracentrifugée pendant 1 h, à 100 000 g. Le culot, HSP_{vac} pour « High Speed Pellet de la vacuole » correspond aux membranes des vacuoles et des cellules hôtes alors que le surnageant HSS_{vac} (« High Speed Supernatant de la vacuole»), contient la phase protéique ultrasoluble de la vacuole et des cellules hôtes. La stabilité des protéines GRA associées aux membranes vacuolaires a été testée par traitement de la fraction HSP_{vac} par 0.5 M de KCl, 0.1 M de Carbonate de Sodium (Na₂CO₃) pH 11, 1 % de Nonidet P-40 (NP-40) ou 6 M d'Urée pendant 30 min, sur glace. Après ultracentrifugation d'une heure à 100 000 g, les fractions traitées par le Na₂CO₃ ou par l'Urée ont été précipitées par 15 % d'Acide Trichloracétique (TCA) ; les fractions traitées par le KCl ou le NP-40 ont été précipitées par deux volumes d'Acétone. Les fractions ont ensuite été analysées par SDS-PAGE et les protéines d'intérêt ont été détectées par immunoblot. Les protéines GRA1 et SAG1 ont servi de contrôles à cette expérience de fractionnement des produits vacuolaires.

3) Sécrétion *in vitro* des protéines granulaires

Selon le protocole développé par Darcy *et al.* (Darcy *et al.*, 1988), la sécrétion des protéines granulaires peut être induite en milieu extracellulaire, par incubation de parasites ayant fraîchement lysé le tapis cellulaire (concentration : 1,2 x 10⁸ toxoplasmes/ml) pendant 3 h, à 37°C, sous agitation rotative douce, en milieu D10.

Les parasites LSP ou « Low Speed Pellet » ont été séparés des produits de sécrétion LSS ou « Low Speed Supernatant » par centrifugation de 12 min à 1 000 g puis 10 min à 17 000 g. Ensuite, La fraction LSS a été ultracentrifugée 1 h à 100 000 g, permettant l'obtention d'un HSP_{ES} pour « High Speed Pellet des produits de sécrétion » et d'un HSS_{ES} pour « High Speed Supernatant des produits de sécrétion». Les fractions ont été analysées par SDS-PAGE puis immunoblot après précipitation des fractions HSS_{ES} par deux volumes d'acétone. Les protéines GRA1 et SAG1 ont servi de contrôle à cette expérience de sécrétion parasitaire *in vitro*.

4) Purification de la protéine GRA2-HA-FLAG par affinité sur résine FLAG à partir du parasite ou de la fraction vacuolaire

Ces expériences ont été réalisées par Laetitia Travier au cours de ses travaux de thèse (L. Travier, thèse UJF, 2007), selon le protocole suivant : 5×10^8 parasites extracellulaires exprimant GRA2 fusionnée à la double étiquette HA-FLAG ont été lysés dans un tampon de lyse [20 % Glycérol ; 20 mM Tris-HCl, pH 8 ; 500 mM KCl ; 1.5 mM $MgCl_2$; 0.2 mM EDTA, pH 8 ; 0.5 mM DTT ; 0.5 % NP-40 et 0.2 mM Phénylméthylsulfonyl Fluoride (PMSF)]. L'extrait parasitaire a été centrifugé 2 h à 17 000 g et à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. L'extrait protéique soluble résultant ou les produits vacuolaires solubles ont été incubés pendant 2 h, à 4°C, sous agitation douce, avec 120 μ l de résine HA-FLAG (*Sigma*). La résine a été ensuite lavée avec 50 volumes de BC500 [10 % Glycérol ; 20 mM Tris HCl pH 8 ; 500 mM KCl et 0.2 mM EDTA, pH 8]. Les protéines fixées à la résine ont été éluées deux fois par compétition, avec un volume de peptide FLAG (*Sigma*) (contact de 15 min entre résine et peptide FLAG), puis trois fois avec un volume de BC500 et enfin, deux fois avec un volume de 100 mM Glycine, pH 2.5. Enfin, les fractions éluées ont été analysées par SDS-PAGE et immunoblot.

I-3) Séparation isopycnique des protéines GRA purifiées à partir du parasite, sur gradient linéaire de glycérol

La méthode utilisée pour étudier le comportement des protéines GRA dans les différents compartiments parasitaires était la séparation isopycnique sur gradient linéaire d'une molécule non réactive, ici le glycérol. Par ce moyen, les protéines se répartissent en fonction de leur densité, sur l'ensemble du gradient.

Les gradients linéaires de glycérol ont été coulés à l'aide d'un mélangeur, à partir des deux solutions tamponnées (50 mM Tris, pH7.4) de glycérol qui fournissent les densités extrêmes du gradient : la première solution était de densité $d=1.01$ et la deuxième solution, de densité $d=1.11$. Le mélangeur a été relié à une pompe péristaltique. Cette dernière a été utilisée pour couler le gradient en partant des plus hautes densités, au fond du tube, jusqu'aux plus faibles densités, au sommet du tube. Le gradient a ensuite été laissé au repos, à 4°C, pendant au moins 30 min, avant utilisation.

Le produit à analyser (extrait soluble de parasites extracellulaires ou extrait soluble de cellules infectées pendant 24 h) a été déposé à la surface du gradient et l'ensemble a été centrifugé à 100 000 g, jusqu'à l'équilibre, soit 15 h minimum. Le gradient a ensuite été

élué à partir du fond du tube, en une vingtaine de fractions de 500 µl, numérotées à partir du fond (**Figure 69**). Les fractions éluées ont été pesées systématiquement afin de vérifier la linéarité du gradient puis elles ont été analysées par SDS-PAGE et immunoblot.

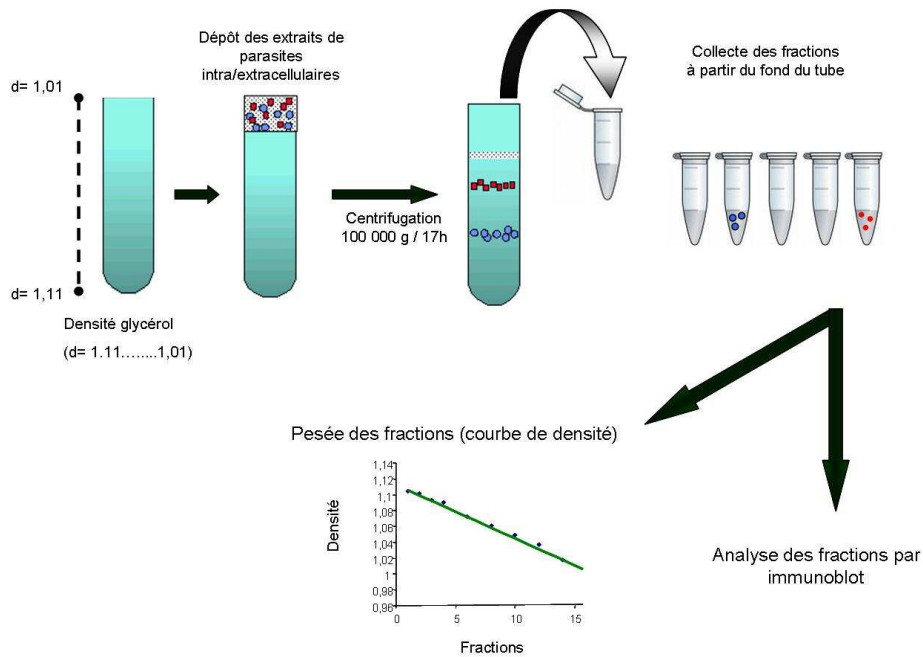


Figure 69. Schématisation de l'analyse des protéines GRA par séparation isopycnique sur gradient linéaire de glycérol. Le gradient de glycérol est coulé puis stabilisé pendant 30 min à 4°C. Après dépôt de l'échantillon à séparer, le gradient est centrifugé à 100 000 g, pendant 17h, puis son contenu est collecté par fractions de 500 µl. Ces fractions sont numérotées depuis le fond vers le haut du gradient et pesées pour déterminer leur densité et vérifier la linéarité du gradient. La présence des protéines GRA dans chacune des fractions est analysée par immunoblot à l'aide des anticorps spécifiques.

I-4) Obtention des protéines GRA exprimées en bactéries

1) Tableau récapitulatif des protéines recombinantes utilisées

L'ensemble des protéines recombinantes utilisées dans les expériences présentées dans ce manuscrit est répertorié dans le **Tableau 2**.

Protéines GRA exprimées en bactéries	Bactéries utilisées pour l'expression	Plasmide utilisé	Poids moléculaire théorique de la protéine (kDa)	Poids moléculaire de la protéine en SDS-PAGE (kDa)	Sources et/ou Références
Peptide pUET-1	<i>E. Coli</i> C41 (DE3)	pUET1 (DNA-GdanskiIsc.Gdansk, 19 Poland)	9,11	13	Protéogénix
GRA2 (21-185) (RH)	<i>E. Coli</i> C41 (DE3)	pUET-GRA2 (21-185) (RH)	27,29	34	Protéogénix
GRA2 Nt-Ct (RH)	<i>E. Coli</i> C41 (DE3)	pUET-GRA2 Nt-Ct (RH)	18,41	28	Protéogénix
GRA6 (43-230) (RH)	<i>E. Coli</i> C41 (DE3)	pUET-GRA6 (43-230) (RH)	28,38	43	Protéogénix
GRA6 Nt (41-152) (RH)	<i>E. Coli</i> C41 (DE3)	pUET-GRA6 Nt (41-152) (RH)	18,5	36	Protéogénix
GRA6 Ct (174-230) (RH)	<i>E. Coli</i> C41 (DE3)	pUET-GRA6 Ct (174-230) (RH)	11,82	18	Protéogénix
GST	<i>E. Coli</i> BL21	pGEX 3X	28	28	Laboratoire
GST-GRA5 Nt (29-68) (RH)	<i>E. Coli</i> BL21	pGEX 3X-GST-GRA5 Nt (29-68)	30,4	30	Ferrandiz <i>et al.</i> , 2004
GST-GRA6 Nt (36-153) (RH)	<i>E. Coli</i> BL21	pGEX 3X-GST-GRA6 Nt (36-153)	38,9	49	Lecordier <i>et al.</i> , 2000

Tableau 2 : Liste des protéines recombinantes utilisées

2) Purification des protéines pUET-GRA par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel puis chromatographie d'exclusion de taille

Environ 250 ml de milieu LB (milieu de Luria-Bertani : 10 g/L de Tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 10 g/L de NaCl), additionné de 50 µg/ml d'Ampicilline et de 30 µg/ml de Chloramphénicol ont été inoculés avec une préculture de nuit obtenue à partir d'une colonie mise en culture dans 5 ml du même milieu. Après une culture à 33°C, 200 rpm, pendant 6 - 7 h jusqu'à atteindre une Densité Optique (DO₆₀₀) de 0,4, la production des protéines recombinantes a été induite pendant 4 h, à 33°C, par 1 mM d'Iso-Propyl-Thio-Galactoside (IPTG). L'équivalent de 10 g du culot bactérien a été dispersé dans 25 ml de tampon de lyse [20 mM MOPS, pH 7,5 ; 100 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (à partir d'une suspension d'une pastille dans 1 ml de tampon 20 mM MOPS, pH 7,5)] puis les bactéries ont été lysées mécaniquement par deux passages à la presse de French (French® Pressure Cell Press, *Bioritech*) (1 000 PSI). Le lysat a été centrifugé

pendant 20 min, à 10 000 g, 4°C. Le culot obtenu a été dispersé dans 25 ml de tampon de purification [20 mM MOPS, pH 7,5 ; 500 mM NaCl ; 100 µl de la solution du cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (à partir d'une suspension d'une pastille dans 1 ml de tampon 20 mM MOPS, pH 7,5)] et centrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant S (environ 25 ml) a été mis en contact avec environ 2 - 4 ml de Ni-NTA Agarose (*Qiagen*) pendant 2 h, à 4°C, sous agitation douce. La résine a été lavée par 5 mM puis 60 mM d'Imidazole, pH 7. Les protéines retenues sur la résine ont été éluées par 500 mM d'Imidazole, pH 7. Pour éliminer l'Imidazole, une chromatographie d'exclusion de taille a été réalisée. Les fractions contenant les protéines éluées (2 - 3 ml) ont été déposées à la surface d'une colonne Sephadex™ G-25M, de type PD10 (*GE-Healthcare*), préalablement équilibrée avec au moins 30 ml de tampon de purification. Au cours de cette chromatographie d'exclusion de taille, les protéines sortent les premières lorsque la colonne est rincée à l'aide du tampon [20 mM MOPS, pH 7,5 ; 100 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA, 150 mM de NaCl]. L'Imidazole n'est élué qu'après avoir passé 5 ml de tampon. Les fractions contenant la protéine d'intérêt (10 fractions de 500 µl chacune) ont été concentrées sur centricon dont le seuil de rétention est de 10 kDa (CENTRIPREP®, AMICON Bioseparations, *MILLIPORE*). La concentration finale en protéine est en moyenne de 2 mg/ml.

3) Dosage des protéines par la méthode Bradford

Les protéines purifiées ont été dosées par la méthode de Bradford. Le réactif de Bradford contient du bleu de Coomassie qui se lie de façon covalente aux groupements amines des protéines. Il permet, à l'aide d'une gamme étalon de concentration connue en Sérum Albumine Bovine (SAB), de doser les protéines selon la méthode colorimétrique ([Bradford, 1976](#)). Le dosage a été effectué par lecture de l'absorbance à 595 nm, à l'aide du kit Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate (*Bio-Rad*).

I-5) Méthodes d'analyse des protéines GRA recombinantes

1) Etude de la structure secondaire des protéines recombinantes par dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire s'appuie sur la capacité des molécules qui ont une activité optique, d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. Le spectre dichroïque correspond à la différence d'absorbance entre ces deux types de lumière, pour chaque longueur d'onde. Dans le cas des protéines, la mesure du dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (180-260 nm, zone d'absorption de la liaison peptidique) fournit des informations sur leur structure secondaire (hélices α , feuillets β , tours et structures désordonnées).

Ces expériences de CD ont été réalisées en collaboration avec M. Jamin (Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble). Les spectres ont été enregistrés à 20°C, en utilisant un spectropolarimètre Jasco J-810, couplé à une unité permettant de régler la température. La concentration de protéines nécessaire à ces mesures est de 15 μ M. La longueur de la cuvette de spectroscopie est de 0.1 cm et le signal de CD a été enregistré entre 250 et 200 nm. Les courbes finales sont représentatives de quatre accumulations indépendantes, desquelles le spectre du tampon a été soustrait.

2) Etude de la dispersion des protéines recombinantes en solution par diffusion dynamique de la lumière

Cf Chapitres II- 3 et II-4

3) Etude des protéines recombinantes par microscopie électronique à transmission

Cf Chapitre III-5

4) SDS-PAGE et détection des protéines par coloration au bleu de Coomassie ou par immunoblot

a) Séparation des protéines par SDS-PAGE

Les extraits protéiques ou les protéines recombinantes ont été repris dans du tampon d'échantillon (20 % Glycérol, 4 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 13 % tampon gel supérieur (0.5 M Tris-HCl, pH 6,8 ; 0.4 % SDS ; 0.0004 % bleu de Bromophénol). Les échantillons ont été dénaturés pendant 5 min, à 95°C, avant d'être séparés sur gel de polyacrylamide (13 % - 5 %), en présence de SDS (SDS-PAGE), dans du tampon de migration (25 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 200 mM Glycine ; 0.1 % SDS). Chaque migration a été réalisée en présence de marqueurs de poids moléculaire précolorés (*Fermentas*). Les protéines ont ensuite été colorées soit par une solution de bleu de Coomassie (Instant Blue™, *Expedeon Protein Solutions*), soit révélées par immunoblot à l'aide des anticorps spécifiques (voir **Tableau 3**) après transfert sur membrane de nitrocellulose.

b) Détection des protéines par immunoblot

Après séparation des protéines par SDS-PAGE, les protéines contenues dans le gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond™ ECL™, *Amersham*) par application d'un courant électrique de 100 Volt, pendant 1h30, à 4°C, et dans le tampon de transfert (20 mM Tris-base, 150 mM Glycine, 20 % éthanol). La membrane a été saturée 1 h, dans une solution de saturation (PBS, 5 % lait écrémé, 0.05 % Tween-20, 0.05 % Triton X-114), sous agitation. La membrane a ensuite été incubée 2 h en présence de l'anticorps primaire dilué en solution d'incubation (solution de saturation diluée 5 fois en PBS) avant d'être lavée 3 fois 10 min, sous agitation, avec une solution de lavage (PBS, 2 % solution de saturation, 0.0225 % Tween-20, 0.0225 % Triton X-114). La membrane a ensuite été incubée 1 h en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dilué en PBS - 20 % de solution de saturation, avant d'être lavée 3 fois avec la solution de lavage, puis 10 min en PBS. Les protéines ont été révélées par chimioluminescence (SuperSignal™ Chemiluminescent Substrate, *Pearce*). Le signal a été mis en évidence par exposition d'un film d'autoradiographie (Hyperfilm™ ECL™, *Amersham*) sur la membrane. Les membranes peuvent être réutilisées pour un second immunoblot. Pour cela, les anticorps ont été décrochés en incubant la membrane pendant 2 - 5 min, sous agitation, dans une solution de déshybridation à pH 2,2 (100 mM Glycine, 1 % SDS et 0,1 % NP-40). La membrane a ensuite été lavée 3 x 10 min en PBS avant d'être à nouveau saturée puis incubée avec le nouvel anticorps primaire.

c) Anticorps utilisés pour la détection des protéines

Les anticorps primaires et secondaires utilisés au cours des expériences présentées dans ce manuscrit, sont répertoriés successivement dans les **Tableaux 3 et 4**.

Protéine ou motif	Anticorps primaires	Poids moléculaire apparent (en kDa) de la protéine reconnue dans un extrait de toxoplasme	Dilution Immunoblot	Référence et provenance
GRA1	Monoclonal de souris TG17-43	27	1/10000	Charif <i>et al.</i> , 1990 (labo)
	-Monoclonal de souris TG17-179 - Sérum de lapin anti-GRA2-His		1/20000 1/20000	Charif <i>et al.</i> , 1990 (labo) L.D Sibley
GRA2	- Sérum de lapin anti- GST- GRA2-Nt (SE4874) (aa 42-68) - Sérum de souris anti- GST- GRA2-Ct (SE 4876) (aa 134-185)	28	1/250 1/500	Eurogentec (labo) Eurogentec (labo)
	Monoclonal de souris TG2H11	30	1/10000	J.F. Dupremetz Achbarou <i>et al.</i> , 1991
GRA4	Sérum de lapin anti-GRA4-His	40	1/10000	L.D Sibley Labruyère <i>et al.</i> , 1999
GRA5	Monoclonal de souris TG17-113	21	1/5000	Charif <i>et al.</i> , 1990 (labo)
GRA6	- Sérum de lapin anti-His-GRA6 - Sérum de lapin anti- GST-GRA6-Ct (SE4873) (aa 175-230)	32	1/10000 1/5000	L.D Sibley Labruyère <i>et al.</i> , 1999 Labo Eurogentec
	Monoclonal de souris BATO 214	29	1/10000	Innogenetics Saavedra <i>et al.</i> , 1990
GRA12	Sérum de rat anti-GRA12-Ty	45	1/5000	M. Lebrun (Michelin <i>et al.</i> , 2008)
SAG1	- Monoclonal de souris TG054 - Sérum de rat anti Octopus SAG1	30	1/10000 1/5000	Rodriguez <i>et al.</i> , 1985 (labo) Darcy <i>et al.</i> , 1992 (labo)
	Sérum de souris anti-GST-2 Sérum de rat anti-GST-HRP	26	1/1000 1/2000	Sigma Ge-Healthcare
Poly-Histidine	Monoclonal de souris (IgG)	6 aa	1/1000	Oncogene™ Santacruz

Tableau 3. Liste des anticorps primaires utilisés dans les expériences d'immunoblot.

Labo : anticorps produits par le laboratoire, ND : non déterminé

Anticorps secondaires	Dilution Immunoblot	Provenance
Sérum de chèvre anti-IgG de souris (H+L) couplé à la peroxydase	1/20000	<i>Jackson immuno Research</i>
Sérum de chèvre anti-IgG de lapin (H+L) couplé à la peroxydase	1/20000	<i>Jackson immuno Research</i>
Sérum de chèvre anti-IgG de rat couplé à la peroxydase	1/5000	<i>Jackson immuno Research</i>

Tableau 4. Liste des anticorps secondaires utilisés en immunoblot,

CHAPITRE II : *Obtention des lipides, formation et contrôle des Small Unilamellar Vesicles (SUVs)*

II-1) Obtention des lipides utilisés pour la formation des liposomes

Des lipides naturels et commerciaux ont été utilisés pour la formation des liposomes.

1) Lipides commerciaux

PC : L- α -PhosphatidylCholine de cerveau de porc (*Avanti®polar lipids*) ; PE : PhosphatidylEthanolamine de cerveau de porc (*Avanti®polar lipids*) ; PI : PhosphatidylInositol de foie de bœuf (*Avanti®polar lipids*) ; PI(4,5)P₂ : PhosphatidylInositol (4,5) diPhosphate de cerveau de porc (*Avanti®polar lipids*). Ces lipides commerciaux ont été solubilisés en Chloroforme ou en Butanol (concentration 1 mg/ml) puis conservés à -20°C , sous azote.

2) Lipides naturels, obtenus à partir de cellules HeLa, après extraction selon la méthode de [Bligh and Dyer \(1959\)](#)

L'équivalent de 50 boîtes de culture de 180 cm² de cellules HeLa non infectées, maintenues en culture en milieu D10 jusqu'à confluence, ont été lavées en PBS afin d'éliminer le milieu de culture, puis récupérées à l'aide d'un grattoir. Après centrifugation des cellules pendant 10 min, à 350 g, à 4°C, et élimination du PBS, les extraits cellulaires ont été repris dans un mélange de 3 ml de chloroforme/méthanol (1 : 2) puis vortexés toutes les 5 min, pendant 30 min. Enfin, 500 μ l de chloroforme et 900 μ l d'eau ont été ajoutés. Après une centrifugation de 10 min à 350 g, la phase organique inférieure

contenant les lipides solubilisés en chloroforme a été récupérée. Afin d'augmenter la pureté des lipides obtenus, une extraction en retour a été effectuée sur la phase inférieure, selon le même protocole. Le chloroforme a été évaporé sous un flux de N₂. Ce processus permet aussi de chasser l'O₂ du tube afin d'éviter l'oxydation des phospholipides. Les films lipidiques obtenus ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

3) Quantification des glycérophospholipides (extraits à partir de cellules HeLa) par méthanolyse puis chromatographie en phase gazeuse

Le dosage des glycérophospholipides provenant des cellules HeLa a été réalisé en collaboration avec E. Maréchal (CNRS 5168-CEA-INRA-UJF, Grenoble), selon le protocole suivant : les glycérophospholipides ont été extraits à partir d'un culot sec de lipides équivalent à une boîte de culture de 180 cm², à l'aide de solvants organiques. Le principe du dosage des glycérophospholipides repose sur une méthanolyse qui génère des acides gras méthylés, ensuite dosés par spectrométrie en phase gazeuse. Pour cela, les lipides ont été solubilisés dans 3 ml de 2,5 % d'Acide Sulfurique (H₂SO₄), dans du méthanol, incubés pendant 1 h, puis la réaction a été arrêtée par addition de 3 ml d'eau. Les acides gras méthylés ont été extraits deux fois par addition de 3 ml d'hexane et évaporés à sec. Enfin, après solubilisation dans 10 µl d'hexane, 5 µl ont été injectés dans une colonne BPX70 (SGE). Les acides gras ont été entraînés par le gaz vecteur (l'azote) à des vitesses dépendantes de leur taille et de leur solubilité. Ils ont ensuite été quantifiés par comparaison avec un témoin interne (acide gras à 21 carbones) ajouté avant la méthanolyse. La quantité de glycérophospholipides extraits par boîte de 180 cm² de cellules HeLa dépend de l'efficacité de la purification. Elle peut atteindre jusqu'à 400 µg de glycérophospholipides totaux.

II-2) Formation et contrôle des Small Unilamellar Vesicles (SUVs)

1) Mélanges de lipides utilisés pour former les SUVs

Quatre types de mélanges de lipides ont été utilisés pour former les SUVs, les lipides de cellules HeLa d'une part et trois mélanges de lipides commerciaux (*Avanti® polar lipids*) d'autre part (voir **tableau 5**).

Le premier mélange de lipides commerciaux, constitué de PhosphatidylCholine (PC) / PhosphatidylEthanolamine (PE) (Rapport molaire : 6 / 4), a permis de former les liposomes notés « SUVs » ; le second, constitué de PC / PE / PhosphatidylInositol (PI) (rapport molaire : 6 / 3 / 1), a permis de former les liposomes notés « SUVs + PI », et le troisième mélange, qui comprend PC / PE / PI(4,5)P₂ (rapport molaire : 6 / 3 / 1) a permis de former les liposomes notés « SUVs + PIP₂ ». Les films lipidiques ont été formés en mélangeant les volumes requis de lipides stock à 1 mM chacun, puis en évaporant le CHCl₃ sous un jet de N₂.

Nom simplifié des SUVs	Noms et pourcentages des lipides utilisés	Rapport molaire	Proportions en µg	Proportions en nmol
SUVs HeLa	Lipides totaux extraits de cellules HeLa	-	20 à 100 µg de lipides totaux par test	-
SUVs	Phosphatidyl-choline (PC) 60 % / Phosphatidyl-Ethanolamine (PE) 40 %	PC / PE (6 / 4)	PC (51,6 µg) / PE (34,4 µg)	PC (74,9 nmol) / PE (47,9 nmol)
SUVs + PI	Phosphatidyl-choline (PC) 60 % / Phosphatidyl-Ethanolamine (PE) 30 % / Phosphatidyl-Inositol (PI) 10 %	PC / PE / PI (6 / 3 / 1)	PC (51,6 µg) / PE (31,3 µg) / PI (7,8 µg)	PC (68,1 nmol) / PE (43,6 nmol) / PI (8,8 nmol)
SUVs + PIP ₂	Phosphatidyl-choline (PC) 60 % / Phosphatidyl-Ethanolamine (PE) 30 % / Phosphatidyl-Inositol (4,5) di-Phosphate (PI(4,5)P ₂) 10 %	PC / PE / PI(4,5)P ₂ (6 / 3 / 1)	PC (51,6 µg) / PE (25,8 µg) / PI(4,5)P ₂ (8,6 µg)	PC (74,9 nmol) / PE (36 nmol) / PI(4,5)P ₂ (8,2 nmol)

Tableau 5 : Tableau récapitulatif de la composition en lipides des différents types de SUVs utilisés dans les expériences d'association de protéines aux liposomes

2) Techniques de formation des SUVs par sonication ou par extrusion

Pour l'ensemble des tests du comportement des protéines testées dans les membranes, j'ai utilisé un système de membranes artificielles. Ce sont de petites vésicules lipidiques unilamellaires, appelées Small Unilamellar Vesicles (SUVs). La formation de ces vésicules lipidiques se déroule selon deux étapes :

1- formation spontanée de vésicules multilamellaires suite à la réhydratation des films lipidiques ;

2- séparation des feuillets membranaires grâce à un apport d'énergie, *via* la sonication ou l'extrudation.

Les films lipidiques ont été réhydratés pendant une nuit, dans un tampon appelé HN [10 mM Hepes, pH 7,4 - 150 mM NaCl]. Les SUVs ont été soniquées pendant 10 min, avec application de la sonde d'ultrasons (Vibra-cell 75041, *Bioblockscientific*) dans l'échantillon, avec une alternance on/off de 9 secondes et une puissance de l'appareil de 21 %.

Pour obtenir des SUVs de diamètre identique et calibré, j'ai utilisé la technique de l'extrudation. La suspension de vésicules multilamellaires a été homogénéisée par application de trois cycles de congélation dans de l'azote liquide puis décongélation dans un bain-marie à 37°C. Les trois bains de congélation / décongélation ont été entrecoupés par des étapes de vortex. Enfin, la solution obtenue a été extrudée 20 fois au travers de membranes de polycarbonate dont le diamètre des pores était calibré soit à 50, 100 ou 200 nm, (Nucleopore Track-Etch Membrane Filtration Products, *Avanti® polar lipids*). L'extrudeur (*Avanti®*) utilisé est représenté sur la **Figure 70**.



Emplacement de la membrane de polycarbonate

Figure 70. Photo de l'extrudeur. Il est composé d'un portoir en téflon contenant deux seringues Hamilton de 250 µl chacune qui se font face et qui sont reliées par un système permettant d'insérer une membrane en polycarbonate dont le diamètre du pore est calibré (50, 80, 100 ou 200 nm).

3) Contrôle de l'homogénéité des SUVs par diffusion dynamique de lumière (DLS) après une étape de chromatographie d'exclusion de taille

Le contrôle de l'homogénéité des SUVs formées a été réalisé par des expériences de diffusion dynamique de lumière (DLS), en collaboration avec M. Jamin (Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble). Cette technique consiste à

mesurer la diffusion de lumière par les particules contenues à l'intérieur d'un volume donné. La diffusion de lumière est due au mouvement des électrons suivant l'oscillation du champ électrique de l'onde lumineuse qui traverse l'échantillon. L'intensité de lumière diffusée est proportionnelle à la masse moléculaire multipliée par la concentration. La mesure de cette intensité de lumière diffusée au cours du temps révèle d'importantes fluctuations, causées par les changements ponctuels de concentration à l'intérieur du volume étudié. Grâce à la transformation de Fourier, on obtient à partir de la courbe irrégulière Intensité = f(temps), la courbe régulière % Intensité = f(rayon (nm)). Cette seconde courbe présente un pic pour chaque espèce moléculaire présente, ce qui permet de vérifier la pureté de la solution analysée et de déterminer le rayon des espèces moléculaires présentes dans l'échantillon. Ces mesures peuvent être appliquées à différents types d'objets dont les vésicules lipidiques ou les protéines en solution.

a) Chromatographie d'exclusion de taille

Afin de s'assurer que les échantillons injectés dans l'appareil de mesure de DLS étaient homogènes en diamètre, les SUVs HeLa obtenues à partir de 86 µg de lipides en tampon HN ont été déposées sur une colonne de filtration sur gel de 60 cm de hauteur, 1 cm de diamètre, remplie de Sephacryl-500 (*Ge-Healthcare*) et équilibrée en tampon HN. Le débit de la colonne a été réglé à 1 ml / min. Le volume de SUVs déposé sur cette colonne était de 100 µl. La colonne a été calibrée à l'aide de différentes protéines monomériques, la sérum albumine bovine (67 kDa) ; la glucose oxydase (160 kDa) et la bêta-galactosidase (500 kDa).

b) DLS utilisant le « DawnEos Enhanced Optical system »

L'appareil utilisé, couplé à la sortie de la colonne de chromatographie d'exclusion de taille, était le « DawnEos Enhanced Optical system », (Wyatt Technology). Cet appareil, réglé à 35°C, est couplé à un détecteur d'indice de réfraction (RI 2000 detector, Schambeck SFD) qui permet de calculer la concentration et le diamètre des particules. Environ 100 µl de SUVs HeLa (soit 22 µg de lipides) ont été déposés sur la colonne et donc injectés dans l'appareil de mesure. Les données de DLS mesurées par l'appareil ont été analysées grâce au logiciel « Light Scattering for the Masses » (Astra).

4) Contrôle de l'homogénéité des SUVs par DLS utilisant le Zetasizer

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec W. Weissenhorn (Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble). L'appareil utilisé était un granulomètre zétamètre « Zetasizer dedicated to proteins », (Malvern Instruments), réglé à 25°C. Il permet de mesurer la taille et la stabilité de protéines et de molécules en solution en milieu dilué ou concentré, sans chromatographie d'exclusion de taille préalable. La concentration optimale requise pour ces mesures est de 1 mg/ml. La mesure a été réalisée sur des SUVs HeLa (environ 10,5 µg de lipides), soniquées ou extrudées.

CHAPITRE III : Méthodes d'études des interactions protéines / lipides

III-1) Tests de superposition protéines / lipides (« Fat Blots »)

Afin d'étudier l'interaction des protéines avec les lipides membranaires, des tests de superposition protéines / lipides, aussi appelés « fat blots », ont été réalisés. Au cours de ces expériences, j'ai utilisé des membranes commerciales de type « Membrane Lipid-Strips » (Echelon Biosciences), sur lesquelles les classes majoritaires de lipides retrouvés dans les membranes biologiques ont été fixées.

Les membranes ont été saturées pendant 1 h avec 3 % de SAB sans acide gras (*Sigma*), dans du TBST [50 mM Tris HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 0.1 % Tween 20]. La membrane a ensuite été incubée pendant une nuit, à 4°C, avec 1 µg/ml de protéine recombinante (GRA2 (21-185) (RH) ; GRA2 Nt-Ct (RH) ; GRA6 (43-230) (RH) ; GRA6 Nt (41-152) (RH) ; GRA6 Ct (174-230), peptide pUET ; GST ; GST-GRA5 Nt (29-68) (RH) ; ou GST-GRA6 Nt (RH)) dans du TBST additionné de 3 % SAB sans acide gras. La membrane a ensuite été lavée 6 fois 5 min en TBST avant d'être mise en présence des anticorps primaires spécifiques de chaque protéine (Cf. **Tableau 3**) dilués en TBST, pendant 1 h. La membrane a été lavée 6 fois 5 min en TBST avant d'être incubée avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (Cf. **Tableau 4**), dilués en TBST puis lavée 12 fois 5 min en TBST avant d'être révélée par chimioluminescence (SuperSignal™ Chemiluminescent Substrate, *Pearce*). Le signal a été mis en évidence par exposition de la membrane contre un film ECL (Hyperfilm™ ECL™, *Amersham*).

III-2) Tests et analyses de l'association des protéines aux SUVs

1) Incubation des protéines avec les SUVs

Cette étape consiste à incuber la (les) protéine (s) avec les liposomes, selon différents rapports protéines / lipides, dans un volume final ne dépassant pas 100 µl. L'incubation a été réalisée à température ambiante, pendant 30 min, sous agitation douce. Le résultat de cette incubation a été analysé soit par simple ultracentrifugation, soit par un test de flottaison de la (des) protéine (s) associée (s) aux liposomes dans un gradient de sucrose.

2) Analyse de l'association des protéines aux liposomes par ultracentrifugation puis immunoblot

Afin de déterminer le rapport protéines / lipides adéquat pour l'association des protéines aux liposomes, différents rapports protéines / lipides (en µg) ont été testés (1 / 1 ; 1 / 2 ; 1 / 10 ; 1 / 25 et 1 / 50). Les protéines associées aux membranes (fraction membranaire, P) ont été séparées de celles non associées (fraction soluble, S) par une ultracentrifugation d'1 heure, à 4°C, à 100 000 g (ultracentrifugeuse TL100 Ultracentrifuge, rotor TLA45, Beckman). Les fractions P ont été lavées dans 1 ml de tampon HN. Les protéines non associées (fractions S) ont été précipitées par 15 % de TCA, une nuit, à -20°C. L'ensemble des échantillons a été conservé à -20°C avant d'être analysé par SDS-PAGE et immunoblot.

3) Traitements dénaturants des protéines associées aux membranes

Les culots obtenus à la suite du test d'association des protéines aux liposomes puis ultracentrifugation ont été solubilisés dans 50 mM Tris, pH 8, puis séparés en trois fractions équivalentes, chacune étant traitée pendant 30 min, sur glace, avec un agent chimique différent : de l'urée 6 M Urée, afin de perturber les liaisons hydrogène) ; du nonidet P-40 1 %, pour perturber les interactions hydrophobes et hydrogènes ou du Tris 50 mM, pH 8 (contrôle). Les protéines solubilisées par ces traitements (S) ont été séparées des protéines restant associées aux membranes (P), par une ultracentrifugation d'1 h, à 4°C, 100 000 g. Les fractions solubles S obtenues après les traitements à l'Urée ou au Tris ont été précipitées par 15 % de TCA, tandis que les surnageants résultant du

traitement NP-40 ont été précipités par 2 volumes d'Acétone. Les fractions P ont été lavées avec du Tris 50 mM pH 8. L'ensemble des échantillons a été conservé à -20°C avant d'être analysé par SDS-PAGE et immunoblot.

4) Analyse de l'association des protéines aux SUVs par flottaison dans un gradient de sucrose

Une partie de ces expériences a été réalisé en collaboration avec W. Weissenhorn (Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble).

Suite à l'incubation des protéines recombinantes selon le rapport protéines / lipides de 1 / 25 (en µg, rapport déterminé préalablement par les tests d'ultracentrifugation), la solution de protéines mise en contact avec les liposomes a été mélangée à une solution à 80 % de sucrose (P/V) (préparée dans le tampon HN) et déposée au fond d'un tube ouvert de 650 µl (*Beckman*). Des coussins de 30 %, 20 %, 10 %, 5 % et 0 % de sucrose (en tampon HN) ont ensuite été ajoutés successivement. Les gradients obtenus ont été centrifugés jusqu'à l'équilibre, pendant 17 - 19 h, 4°C, à 100 000 g (46 000 rpm) (TL100 Ultracentrifuge, rotor TLA45, *Beckman*). Des fractions de 100 µl ont été collectées à partir du sommet du gradient. Ces fractions ont été analysées par SDS-PAGE et immunoblot, pour la détection des protéines, et par fumigation aux vapeurs d'iode, pour la détection des glycérophospholipides, en utilisant le protocole qui suit. Environ 5 µl de chaque fraction de gradient ont été déposés sur une plaque d'aluminium recouverte de silice (support de chromatographie couche mince, ALUGRAM® SIL G/UV254 Für DIE DC, *Macherey-Nagel*) puis après séchage des échantillons, la plaque de silice a été introduite dans une cuve saturée en vapeurs d'iode (cristaux d'iode, *Sigma*) afin de colorer les phospholipides en marron-brun, suite à la fixation de l'iode sur les doubles liaisons des acides gras. Une fraction aliquote de chaque fraction du gradient contenant les protéines associées aux liposomes a également été analysée par microscopie électronique à transmission (Cf. Paragraphe suivant)

5) Analyse par Microscopie Electronique à Transmission (TEM) après coloration négative

Les expériences de TEM ont été réalisées en collaboration avec E. Gentilhomme (CRSSA, Grenoble) et G. Effantin (Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble).

- Les observations réalisées au CRSSA, en collaboration avec E. Gentilhomme, ont été faites à l'aide d'un microscope de type JEOL 1010, à 80 kV. Dix microlitres de chaque échantillon (SUVs seules, protéines seules ou produits d'incubation des protéines avec les liposomes) ont été déposés sur la face brillante de grilles de microscopie électronique en cuivre et recouvertes de formvar (grilles de 300 mesh, *SPI Supplies*[®]). Ce dépôt a été suivi d'une fixation standard de 2 min avec 2 % d'Acétate d'Uranyle (*Electron Microscopy Sciences*), préparé dans de l'eau ultra pure (*Electron Microscopy Sciences*). Ce fixateur sert également d'agent contrastant.

- Les observations réalisées à l'UVHCI de Grenoble, en collaboration avec G. Effantin, ont été faites à l'aide d'un microscope de type JEOL 1200, à 80 kV, selon le protocole suivant : environ 1 - 2 μ l d'échantillon (SUVs seules, protéines seules ou produits d'incubation des protéines avec les liposomes) ont été injectés délicatement entre un film de carbone et une feuille de mica (*Agar Scientific*) (prédécoupée en petits carrés). L'échantillon adhère au film de carbone en quelques secondes seulement. Le film de carbone a été détaché de la feuille de mica en retournant la préparation sur une goutte d'Acétate d'Uranyle 2%. Une grille en cuivre (400 mesh, *Agar Scientific*) préalablement trempée dans du chloroforme pour faciliter l'adhésion de la grille au film du carbone, puis séchée sur du papier Whatman, a été déposée sur le film de carbone, lui-même déposé sur la goutte d'Acétate d'Uranyle. Enfin, la grille a été récupérée par adhésion à un petit carré de papier Whatman amené au dessus de la grille. Après quelques secondes, le papier a été soulevé avec la grille et l'ensemble (grille + carbone + échantillon) a été déposé sur du papier Whatman afin d'éliminer l'excès de colorant.

BIBLIOGRAPHIE

- Ababou, A.; van der Vaart, A.; Gogonea, V.; Merz, K. M., Jr., Interaction energy decomposition in protein-protein association: a quantum mechanical study of barnase-barstar complex. *Biophys Chem* **2007**, *125*, (1), 221-36.
- Achbarou, A.; Mercereau-Puijalon, O.; Sadak, A.; Fortier, B.; Leriche, M. A.; Camus, D.; Dubremetz, J. F., Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **1991**, *103* Pt 3, 321-9.
- Adjogble, K. D.; Mercier, C.; Dubremetz, J. F.; Hucke, C.; Mackenzie, C. R.; Cesbron-Delauw, M. F.; Daubener, W., GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int J Parasitol* **2004**, *34*, (11), 1255-64.
- Adrover, M.; Pauwels, K.; Prigent, S.; de Chiara, C.; Xu, Z.; Chapuis, C.; Pastore, A.; Rezaei, H., Prion fibrillization is mediated by a native structural element that comprises helices H2 and H3. *J Biol Chem* **2010**, *285*, (27), 21004-12.
- Agop-Nersesian, C.; Egarter, S.; Langsley, G.; Foth, B. J.; Ferguson, D. J.; Meissner, M., Biogenesis of the inner membrane complex is dependent on vesicular transport by the alveolate specific GTPase Rab11B. *PLoS Pathog* **2010**, *6*, (7), e1001029.
- Ahmed, S.; Bu, W.; Lee, R. T.; Maurer-Stroh, S.; Goh, W. I., F-BAR domain proteins: Families and function. *Commun Integr Biol* **2010a**, *3*, (2), 116-21.
- Ahmed, S.; Goh, W. I.; Bu, W., I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin Cell Dev Biol* **2010b**, *21*, (4), 350-6.
- Ahn, H. J.; Kim, S.; Nam, H. W., Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *331*, (2), 614-20.
- Ajzenberg, D.; Cogne, N.; Paris, L.; Bessieres, M. H.; Thulliez, P.; Filisetti, D.; Pelloux, H.; Marty, P.; Darde, M. L., Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* **2002**, *186*, (5), 684-9.
- Alexander, D. L.; Mital, J.; Ward, G. E.; Bradley, P.; Boothroyd, J. C., Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog* **2005**, *1*, (2), e17.
- Aliberti, J., Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol* **2005**, *5*, (2), 162-70.
- Aliberti, J.; Reis e Sousa, C.; Schito, M.; Hieny, S.; Wells, T.; Huffnagle, G. B.; Sher, A., CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol* **2000**, *1*, (1), 83-7.
- Aliberti, J.; Valenzuela, J. G.; Carruthers, V. B.; Hieny, S.; Andersen, J.; Charest, H.; Reis e Sousa, C.; Fairlamb, A.; Ribeiro, J. M.; Sher, A., Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* **2003**, *4*, (5), 485-90.
- Anderson-White, B. R.; Ivey, F. D.; Cheng, K.; Szatanek, T.; Lorestani, A.; Beckers, C. J.; Ferguson, D. J.; Sahoo, N.; Gubbels, M. J., A family of intermediate filament-like proteins is sequentially assembled into the cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* **2010**.
- Andrade, E. F.; Stumbo, A. C.; Monteiro-Leal, L. H.; Carvalho, L.; Barbosa, H. S., Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? *J Submicrosc Cytol Pathol* **2001**, *33*, (3), 337-41.
- Antonny, B.; Beraud-Dufour, S.; Chardin, P.; Chabre, M., N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **1997**, *36*, (15), 4675-84.
- Antonny, B.; Bigay, J.; Casella, J. F.; Drin, G.; Mesmin, B.; Gounon, P., Membrane curvature and the control of GTP hydrolysis in Arf1 during COPI vesicle formation. *Biochem Soc Trans* **2005**, *33*, (Pt 4), 619-22.
- Asai, T.; Miura, S.; Sibley, L. D.; Okabayashi, H.; Takeuchi, T., Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **1995**, *270*, (19), 11391-7.

- Azzouz, N.; Shams-Eldin, H.; Niehus, S.; Debierre-Grockiego, F.; Bieker, U.; Schmidt, J.; Mercier, C.; Delauw, M. F.; Dubremetz, J. F.; Smith, T. K.; Schwarz, R. T., Toxoplasma gondii grown in human cells uses GalNAc-containing glycosylphosphatidylinositol precursors to anchor surface antigens while the immunogenic Glc-GalNAc-containing precursors remain free at the parasite cell surface. *Int J Biochem Cell Biol* **2006**, 38, (11), 1914-25.
- Bacia, K.; Schwille, P.; Kurzchalia, T., Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, (9), 3272-7.
- Bakowski, M. A.; Braun, V.; Brumell, J. H., Salmonella-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic* **2008**, 9, (12), 2022-31.
- Balla, T., Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci* **2005**, 118, (Pt 10), 2093-104.
- Ban, T.; Heymann, J. A.; Song, Z.; Hinshaw, J. E.; Chan, D. C., OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum Mol Genet* **2010**, 19, (11), 2113-22.
- Baumgart, T.; Hess, S. T.; Webb, W. W., Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* **2003**, 425, (6960), 821-4.
- Beck, R.; Rawet, M.; Wieland, F. T.; Cassel, D., The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett* **2009**, 583, (17), 2701-9.
- Behnke, M. S.; Wootton, J. C.; Lehmann, M. M.; Radke, J. B.; Lucas, O.; Nawas, J.; Sibley, L. D.; White, M. W., Coordinated progression through two subtranscriptomes underlies the tachyzoite cycle of Toxoplasma gondii. *PLoS One* **2010**, 5, (8), e12354.
- Bennett, R. M.; Christiansen, K.; Clifton-Hadley, R. S., Direct costs of endemic diseases of farm animals in Great Britain. *Vet Rec* **1999**, 145, (13), 376-7.
- Berdoy, M.; Webster, J. P.; Macdonald, D. W., Fatal attraction in rats infected with Toxoplasma gondii. *Proc Biol Sci* **2000**, 267, (1452), 1591-4.
- Bergman, L. W.; Kaiser, K.; Fujioka, H.; Coppens, I.; Daly, T. M.; Fox, S.; Matuschewski, K.; Nussenzweig, V.; Kappe, S. H., Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of Plasmodium sporozoites. *J Cell Sci* **2003**, 116, (Pt 1), 39-49.
- Bermudes, D.; Peck, K. R.; Afifi, M. A.; Beckers, C. J.; Joiner, K. A., Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii. *J Biol Chem* **1994**, 269, (46), 29252-60.
- Bessieres, M. H.; Berrebi, A.; Cassaing, S.; Fillaux, J.; Cambus, J. P.; Berry, A.; Assouline, C.; Ayoubi, J. M.; Magnaval, J. F., Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, 104, (2), 389-92.
- Besteiro, S.; Bertrand-Michel, J.; Lebrun, M.; Vial, H.; Dubremetz, J. F., Lipidomic analysis of Toxoplasma gondii tachyzoites rhoptries: further insights into the role of cholesterol. *Biochem J* **2008**, 415, (1), 87-96.
- Bhatia, V. K.; Hatzakis, N. S.; Stamou, D., A unifying mechanism accounts for sensing of membrane curvature by BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins. *Semin Cell Dev Biol* **2010**, 21, (4), 381-90.
- Bhatia, V. K.; Madsen, K. L.; Bolinger, P. Y.; Kunding, A.; Hedegard, P.; Gether, U.; Stamou, D., Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing. *Embo J* **2009**, 28, (21), 3303-14.
- Bierly, A. L.; Shufesky, W. J.; Sukhumavasi, W.; Morelli, A. E.; Denkers, E. Y., Dendritic cells expressing plasmacytoid marker PDCA-1 are Trojan horses during Toxoplasma gondii infection. *J Immuno* **2008**, 181, (12), 8485-91.
- Binder, E. M.; Lagal, V.; Kim, K., The prodomain of Toxoplasma gondii GPI-anchored subtilase TgSUB1 mediates its targeting to micronemes. *Traffic* **2008**, 9, (9), 1485-96.
- Bisanz, C.; Bastien, O.; Grando, D.; Jouhet, J.; Marechal, E.; Cesbron-Delauw, M. F., Toxoplasma gondii acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J* **2006**, 394, (Pt 1), 197-205.
- Bisanz, C.; Botte, C.; Saidani, N.; Bastien, O.; Cesbron-Delauw, M. F.; Marechal, E., Structure, function and biogenesis of the secondary plastid of apicomplexan parasites. In *Plant Cell Compartments - Selected Topics*, Schoefs, B., Ed. Research Signpost: Kerala, India, **2008**; pp 393-423.

- Black, M. W.; Boothroyd, J. C., Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* **2000**, *64*, (3), 607-23.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **1959**, *37*, (8), 911-7.
- Blumenschein, T. M.; Friedrich, N.; Childs, R. A.; Saouros, S.; Carpenter, E. P.; Campanero-Rhodes, M. A.; Simpson, P.; Chai, W.; Koutroukides, T.; Blackman, M. J.; Feizi, T.; Soldati-Favre, D.; Matthews, S., Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. *Embo J* **2007**, *26*, (11), 2808-20.
- Boothroyd, J. C., Expansion of host range as a
- Boothroyd, J. C., *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol* **2009**, *39*, (8), 935-46.
- Boothroyd, J. C.; Dubremetz, J. F., Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol* **2008**, *6*, (1), 79-88.
- Botté, C.; Saidani, N.; Mondragon, R.; Mondragon, M.; Isaac, G.; Mui, E.; McLeod, R.; Dubremetz, J. F.; Vial, H.; Welti, R.; Cesbron-Delauw, M. F.; Mercier, C.; Marechal, E., Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like epitope in *Toxoplasma gondii*. *J Lipid Res* **2008**, *49*, (4), 746-62.
- Boucrot, E.; Henry, T.; Borg, J. P.; Gorvel, J. P.; Meresse, S., The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science* **2005**, *308*, (5725), 1174-8.
- Bougdour, A.; Maubon, D.; Baldacci, P.; Ortet, P.; Bastien, O.; Bouillon, A.; Barale, J. C.; Pelloux, H.; Menard, R.; Hakimi, M. A., Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *J Exp Med* **2009**, *206*, (4), 953-66.
- Bout, D. T.; Mevelec, M. N.; Velge-Roussel, F.; Dimier-Poisson, I.; Lebrun, M., Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **2002**, *2*, (3), 227-34.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **1976**, *7*;72:248-54.
- Bradley PJ, Boothroyd JC. The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal. *Int J Parasitol.* **2001**, *31*(11):1177-86.
- Bradley, P. J.; Sibley, L. D., Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr Opin Microbiol* **2007**, *10*, (6), 582-7.
- Bradley, P. J.; Ward, C.; Cheng, S. J.; Alexander, D. L.; Coller, S.; Coombs, G. H.; Dunn, J. D.; Ferguson, D. J.; Sanderson, S. J.; Wastling, J. M.; Boothroyd, J. C., Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **2005**, *280*, (40), 34245-58.
- Brambillasca, S.; Yabal, M.; Soffientini, P.; Stefanovic, S.; Makarow, M.; Hegde, R. S.; Borgese, N., Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *Embo J* **2005**, *24*, (14), 2533-42.
- Braun, L.; Travier, L.; Kieffer, S.; Musset, K.; Garin, J.; Mercier, C.; Cesbron-Delauw, M. F., Purification of *Toxoplasma* dense granule proteins reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway. *Mol Biochem Parasitol* **2008**, *157*, (1), 13-21.
- Brossier, F.; David Sibley, L., *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**, *37*, (11), 2266-72.
- Brossier, F.; Jewett, T. J.; Sibley, L. D.; Urban, S., A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, (11), 4146-51.
- Bullen, H. E.; Tonkin, C. J.; O'Donnell, R. A.; Tham, W. H.; Papenfuss, A. T.; Gould, S.; Cowman, A. F.; Crabb, B. S.; Gilson, P. R., A novel family of Apicomplexan glideosome-associated proteins with an inner membrane-anchoring role. *J Biol Chem* **2009**, *284*, (37), 25353-63.
- Bussieras, J.; Chermette, R., *Protozoologie*. Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort: 1992; p 51-54; 87-96.
- Butcher, B. A.; Denkers, E. Y., Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. *Infect Immun* **2002**, *70*, (9), 5216-24.
- Buxton, D.; Innes, E. A., A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* **1995**, *110* Suppl, S11-6.
- Buzoni-Gatel, D.; Dubremetz, J. F.; Werts, C., [Molecular cross talk between *Toxoplasma gondii* and the host immune system]. *Med Sci (Paris)* **2008**, *24*, (2), 191-6.
- Cai, G.; Radzanowski, T.; Villegas, E. N.; Kastelein, R.; Hunter, C. A., Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **2000**, *165*, (5), 2619-27.

- Cai, X.; Fuller, A. L.; McDougald, L. R.; Zhu, G., Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. *Gene* **2003**, 321, 39-46.
- Caiaffa, W. T.; Chiari, C. A.; Figueiredo, A. R.; Orefice, F.; Antunes, C. M., Toxoplasmosis and mental retardation--report of a case-control study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1993**, 88, (2), 253-61.
- Caldas, L. A.; de Souza, W.; Attias, M., Microscopic analysis of calcium ionophore activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell. *Vet Parasitol* **2010**, 167, (1), 8-18.
- Campelo, F.; Fabrikant, G.; McMahon, H. T.; Kozlov, M. M., Modeling membrane shaping by proteins: focus on EHD2 and N-BAR domains. *FEBS Lett* **2010**, 584, (9), 1830-9.
- Campelo, F.; McMahon, H. T.; Kozlov, M. M., The hydrophobic insertion mechanism of membrane curvature generation by proteins. *Biophys J* **2008**, 95, (5), 2325-39.
- Carne, B.; Bissuel, F.; Ajzenberg, D.; Bouyne, R.; Aznar, C.; Demar, M.; Bichat, S.; Louvel, D.; Bourbigot, A. M.; Peneau, C.; Neron, P.; Darde, M. L., Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol* **2002**, 40, (11), 4037-44.
- Carmen, J. C.; Sinai, A. P., Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol Microbiol* **2007**, 64, (4), 904-16.
- Carruthers, V.; Boothroyd, J. C., Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol* **2007**, 10, (1), 83-9.
- Carruthers, V. B.; Blackman, M. J., A new release on life: emerging concepts in proteolysis and parasite invasion. *Mol Microbiol* **2005**, 55, (6), 1617-30.
- Carruthers, V. B.; Sherman, G. D.; Sibley, L. D., The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J Biol Chem* **2000**, 275, (19), 14346-53.
- Carruthers, V. B.; Sibley, L. D., Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* **1999**, 31, (2), 421-8.
- Carruthers, V. B.; Sibley, L. D., Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* **1997**, 73, (2), 114-23.
- Carruthers, V. B.; Suzuki, Y., Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr Bull* **2007**, 33, (3), 745-51.
- Carruthers, V. B.; Tomley, F. M., Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell Biochem* **2008**, 47, 33-45.
- C  r  de, O.; Dubremetz, J. F.; Soete, M.; Deslee, D.; Vial, H.; Bout, D.; Lebrun, M., Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J Exp Med* **2005**, 201, (3), 453-63.
- Cesbron-Delauw, M. F.; Gendrin, C.; Travier, L.; Ruffiot, P.; Mercier, C., Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic* **2008**, 9, (5), 657-64.
- Cesbron-Delauw, M. F.; Guy, B.; Torpier, G.; Pierce, R. J.; Lenzen, G.; Cesbron, J. Y.; Charif, H.; Lepage, P.; Darcy, F.; Lecocq, J. P.; et al., Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, 86, (19), 7537-41.
- Chard  s, T.; Bourguin, I.; Mevelec, M. N.; Dubremetz, J. F.; Bout, D., Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect Immun* **1990**, 58, (5), 1240-6.
- Charif, H.; Darcy, F.; Torpier, G.; Cesbron-Delauw, M. F.; Capron, A., *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp Parasitol* **1990**, 71, (1), 114-24.
- Charron, A. J.; Sibley, L. D., Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* **2002**, 115, (Pt 15), 3049-59.
- Charron, A. J.; Sibley, L. D., Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic* **2004**, 5, (11), 855-67.
- Chaturvedi, S.; Qi, H.; Coleman, D.; Rodriguez, A.; Hanson, P. I.; Striepen, B.; Roos, D. S.; Joiner, K. A., Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J Biol Chem* **1999**, 274, (4), 2424-31.
- Cleary, M. D.; Singh, U.; Blader, I. J.; Brewer, J. L.; Boothroyd, J. C., *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell* **2002**, 1, (3), 329-40.
- Collins, B. M.; McCoy, A. J.; Kent, H. M.; Evans, P. R.; Owen, D. J., Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* **2002**, 109, (4), 523-35.

- Conseil, V.; Soete, M.; Dubremetz, J. F., Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, *43*, (6), 1358-61.
- Cooke, B. M.; Lingelbach, K.; Bannister, L. H.; Tilley, L., Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol* **2004**, *20*, (12), 581-9.
- Coppens, I., Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cell Microbiol* **2006**, *8*, (1), 1-9.
- Coppens, I.; Andries, M.; Liu, J. L.; Cesbron-Delauw, M. F., Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis. *Eur J Cell Biol* **1999**, *78*, (7), 463-72.
- Coppens, I.; Dunn, J. D.; Romano, J. D.; Pypaert, M.; Zhang, H.; Boothroyd, J. C.; Joiner, K. A., *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* **2006**, *125*, (2), 261-74.
- Coppens, I.; Joiner, K. A., Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Mol Biol Cell* **2003**, *14*, (9), 3804-20.
- Coppens, I.; Sinai, A. P.; Joiner, K. A., *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol* **2000**, *149*, (1), 167-80.
- Coppens, I.; Vielemeyer, O., Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. *Int J Parasitol* **2005**, *35*, (6), 597-615.
- Coppin, A.; Dzierszynski, F.; Legrand, S.; Mortuaire, M.; Ferguson, D.; Tomavo, S., Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie* **2003**, *85*, (3-4), 353-61.
- Cortez, E.; Stumbo, A. C.; Saldanha-Gama, R.; Villela, C. G.; Barja-Fidalgo, C.; Rodrigues, C. A.; das Gracias Henriques, M.; Benchimol, M.; Barbosa, H. S.; Porto, L. C.; Carvalho, L., Immunolocalization of an osteopontin-like protein in dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and its association with the parasitophorous vacuole. *Micron* **2008**, *39*, (1), 25-31.
- Courret, N.; Darche, S.; Sonigo, P.; Milon, G.; Buzoni-Gatel, D.; Tardieux, I., CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* **2006**, *107*, (1), 309-16.
- Craver, M. P.; Knoll, L. J., Increased efficiency of homologous recombination in *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 demonstrates that GRA3 is not necessary in cell culture but does contribute to virulence. *Mol Biochem Parasitol* **2007**, *153*, (2), 149-57.
- Crawford J, Lamb E, Wasmuth J, Grujic O, Grigg ME, Boulanger MJ. Structural and functional characterization of SporoSAG: a SAG2-related surface antigen from *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*. **2010**, *285*(16):12063-70.
- Crawford J, Tonkin ML, Grujic O, Boulanger MJ. Structural characterization of apical membrane antigen 1 (AMA1) from *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*. **2010**, *285*(20):15644-52
- Dabrowski, S.; Kur, J., Cloning, overexpression, and purification of the recombinant His-tagged SSB protein of *Escherichia coli* and use in polymerase chain reaction amplification. *Protein Expr Purif* **1999**, *16*, (1), 96-102.
- Darcy, F.; Deslee, D.; Santoro, F.; Charif, H.; Auriault, C.; Decoster, A.; Duquesne, V.; Capron, A., Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* **1988**, *10*, (5), 553-67.
- Darcy F, Maes P, Gras-Masse H, Auriault C, Bossus M, Deslee D, Godard I, Cesbron MF, Tartar A, Capron A. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J Immunol*. **1992**, *149*(11):3636-41.
- Darde, M. L.; Villena, I.; Pinon, J. M.; Beguinot, I., Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana. *J Clin Microbiol* **1998**, *36*, (1), 324.
- da Silva CV, da Silva EA, Cruz MC, Chavier P, Mortara RA. ARF6, PI3-kinase and host cell actin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii* cell invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. **2009**, *378*(3):656-61.
- Dawson, J. C.; Legg, J. A.; Machesky, L. M., Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol* **2006**, *16*, (10), 493-8.
- de Souza, W., Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol* **2005**, *123*, 1-18.

- Debierre-Grockiego, F.; Campos, M. A.; Azzouz, N.; Schmidt, J.; Bieker, U.; Resende, M. G.; Mansur, D. S.; Weingart, R.; Schmidt, R. R.; Golenbock, D. T.; Gazzinelli, R. T.; Schwarz, R. T., Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **2007**, *179*, (2), 1129-37.
- Del Carmen, M. G.; Mondragon, M.; Gonzalez, S.; Mondragon, R., Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* **2009**, *11*, (6), 967-82.
- [de Melo EJ](#), [de Souza W](#). A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. **1997**;83(3):252-6.
- Devaux, P. F.; Herrmann, A.; Ohlwein, N.; Kozlov, M. M., How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, (7-8), 1591-600.
- Dikeakos, J. D.; Reudelhuber, T. L., Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. *J Cell Biol* **2007**, *177*, (2), 191-6.
- Dion, S.; Barbe, P. G.; Leman, S.; Camus, V.; Dimier-Poisson, I., [Schizophrenia and toxoplasmosis]. *Med Sci (Paris)* **2009**, *25*, (8-9), 687-91.
- Dobrowolski, J. M.; Niesman, I. R.; Sibley, L. D., Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil Cytoskeleton* **1997**, *37*, (3), 253-62.
- Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*. **1996**, *84*(6):933-9.
- Doskaya, M.; Caner, A.; Degirmenci, A.; Jurnak, F.; Guruz, Y., Investigation of folding of purified recombinant GRA1 protein using web based protein disorder servers and trypsin digestion. *Protein Pept Lett* **2009**, *16*, (7), 834-41.
- Dowse, T.; Soldati, D., Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr Opin Microbiol* **2004**, *7*, (4), 388-96.
- Dowse, T. J.; Pascall, J. C.; Brown, K. D.; Soldati, D., Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. *Int J Parasitol* **2005**, *35*, (7), 747-56.
- Drecktrah, D.; Levine-Wilkinson, S.; Dam, T.; Winfree, S.; Knodler, L. A.; Schroer, T. A.; Steele-Mortimer, O., Dynamic behavior of Salmonella-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic* **2008**, *9*, (12), 2117-29.
- Drin, G.; Antonny, B., Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett* **2010**, *584*, (9), 1840-7.
- Drin, G.; Casella, J. F.; Gautier, R.; Boehmer, T.; Schwartz, T. U.; Antonny, B., A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol* **2007**, *14*, (2), 138-46.
- Dubey, J. P., Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **1998**, *28*, (7), 1019-24.
- Dubey, J. P., Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* **1997**, *44*, (6), 592-602.
- Dubey, J. P.; Kotula, A. W.; Sharar, A.; Andrews, C. D.; Lindsay, D. S., Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol* **1990**, *76*, (2), 201-4.
- Dubey, J. P.; Lindsay, D. S., Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **2006**, *22*, (3), 645-71.
- Dubey, J. P.; Lindsay, D. S.; Speer, C. A., Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* **1998**, *11*, (2), 267-99.
- Dubey, J. P.; Miller, N. L.; Frenkel, J. K., *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc* **1970**, *157*, (11), 1767-70.
- Dubremetz, J. F., Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol* **2007**, *9*, (4), 841-8.
- Dubremetz, J. F.; Achbarou, A.; Bermudes, D.; Joiner, K. A., Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol Res* **1993**, *79*, (5), 402-8.
- Dunn, J. D.; Ravindran, S.; Kim, S. K.; Boothroyd, J. C., The *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7 is phosphorylated upon invasion and forms an unexpected association with the rhoptry proteins ROP2 and ROP4. *Infect Immun* **2008**, *76*, (12), 5853-61.
- Ehrenman, K.; Sehgal, A.; Lige, B.; Stedman, T. T.; Joiner, K. A.; Coppens, I., Novel roles for ATP-binding cassette G transporters in lipid redistribution in *Toxoplasma*. *Mol Microbiol* **2010**, *76*, (5), 1232-49.

- El Hajj, H.; Lebrun, M.; Arold, S. T.; Vial, H.; Labesse, G.; Dubremetz, J. F., ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **2007a**, 3, (2), e14.
- El Hajj, H.; Lebrun, M.; Fourmaux, M. N.; Vial, H.; Dubremetz, J. F., Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cell Microbiol* **2007b**, 9, (1), 54-64.
- Ernst, A. M.; Contreras, F. X.; Brugger, B.; Wieland, F., Determinants of specificity at the protein-lipid interface in membranes. *FEBS Lett* **2010**, 584, (9), 1713-20.
- Fang, J.; Marchesini, N.; Moreno, S. N., A *Toxoplasma gondii* phosphoinositide phospholipase C (TgPI-PLC) with high affinity for phosphatidylinositol. *Biochem J* **2006**, 394, (Pt 2), 417-25.
- Farsad, K.; De Camilli, P., Mechanisms of membrane deformation. *Curr Opin Cell Biol* **2003**, 15, (4), 372-81.
- Farsad, K.; Ringstad, N.; Takei, K.; Floyd, S. R.; Rose, K.; De Camilli, P., Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* **2001**, 155, (2), 193-200.
- Fath, S.; Mancias, J. D.; Bi, X.; Goldberg, J., Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell* **2007**, 129, (7), 1325-36.
- Ferguson, D. J., Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol* **2004**, 34, (3), 347-360.
- Ferguson DJ, Hutchison WM. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol Res.* **1987**. 73:483-491.
- Ferguson, D. J.; Jacobs, D.; Saman, E.; Dubremetz, J. F.; Wright, S. E., In vivo expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the exoenteric (tachyzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **1999**, 119 (Pt 3), 259-65.
- Ferrandiz J, Mercier C, Wallon M, Picot S, Cesbron-Delauw MF, Peyron F. Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. *Clin Diagn Lab Immunol.* **2004** 11(6):1016-21
- Ferreira Ade, M.; Vitor, R. W.; Gazzinelli, R. T.; Melo, M. N., Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* **2006**, 6, (1), 22-31.
- Ferreira, Ade. M.; Martins, M. S.; Vitor, R. W., Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil. *Parasite* **2001**, 8, (2), 99-105.
- Ferreira, I. M.; Vidal, J. E.; Costa-Silva, T. A.; Meira, C. S.; Hiramoto, R. M.; Penalva de Oliveira, A. C.; Pereira-Chioccola, V. L., *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol* **2008**, 118, (2), 221-7.
- Fichera, M. E.; Roos, D. S., A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* **1997**, 390, (6658), 407-9.
- Fischer, T.; Lu, L.; Haigler, H. T.; Langen, R., Annexin B12 is a sensor of membrane curvature and undergoes major curvature-dependent structural changes. *J Biol Chem* **2007**, 282, (13), 9996-10004.
- Flegr, J., Effects of toxoplasma on human behavior. *Schizophr Bull* **2007**, 33, (3), 757-60.
- Ford, M. G.; Mills, I. G.; Peter, B. J.; Vallis, Y.; Praefcke, G. J.; Evans, P. R.; McMahon, H. T., Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **2002**, 419, (6905), 361-6.
- Fortier, B.; Dubremetz, J. F., Structure et biologie de *Toxoplasma gondii*. *Med Mal Infect* **1993**, **23 Special**, 148-153.
- Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006** 103(10):3681-6.
- Foth, B. J.; McFadden, G. I., The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* **2003**, 224, 57-110.
- Foussard, F.; Leriche, M. A.; Dubremetz, J. F., Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology* **1991**, 102 Pt 3, 367-70.
- Fox, B. A.; Ristuccia, J. G.; Gigley, J. P.; Bzik, D. J., Efficient gene replacements in *Toxoplasma gondii* strains deficient for nonhomologous end joining. *Eukaryot Cell* **2009**, 8, (4), 520-9.

- Frenkel, J. K.; Dubey, J. P., Effects of freezing on the viability of toxoplasma oocysts. *J Parasitol* **1973**, 59, (3), 587-8.
- Frenkel, J. K.; Pfefferkorn, E. R.; Smith, D. D.; Fishback, J. L., Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. *Am J Vet Res* **1991**, 52, (5), 759-63.
- Freyre, A.; Bonino, J.; Falcon, J.; Castells, D.; Correa, O.; Casaretto, A., The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet Parasitol* **1999**, 81, (1), 85-8.
- Friedrich, N.; Santos, J. M.; Liu, Y.; Palma, A. S.; Leon, E.; Saouros, S.; Kiso, M.; Blackman, M. J.; Matthews, S.; Feizi, T.; Soldati-Favre, D., Members of a novel protein family containing microneme adhesive repeat domains act as sialic acid-binding lectins during host cell invasion by apicomplexan parasites. *J Biol Chem* **2010**, 285, (3), 2064-76.
- Frischknecht, F.; Lanzer, M., The Plasmodium falciparum Maurer's clefts in 3D. *Mol Microbiol* **2008**, 67, (4), 687-91.
- Frischknecht, F.; Renaud, O.; Shorte, S. L., Imaging today's infectious animalcules. *Curr Opin Microbiol* **2006**, 9, (3), 297-306.
- Frixione, E.; Mondragon, R.; Meza, I., Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. *Cell Motil Cytoskeleton* **1996**, 34, (2), 152-63.
- Frost, A.; Perera, R.; Roux, A.; Spasov, K.; Destaing, O.; Egelman, E. H.; De Camilli, P.; Unger, V. M., Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell* **2008**, 132, (5), 807-17.
- Fuertes, G.; Gimenez, D.; Esteban-Martin, S.; Garcia-Saez, A.; Sanchez, O.; Salgado, J., Role of membrane lipids for the activity of pore forming peptides and proteins. *Adv Exp Med Biol* **2010**, 677, 31-55.
- Garcia, J. L.; Navarro, I. T.; Biazzone, L.; Freire, R. L.; da Silva Guimaraes Junior, J.; Cryssafidis, A. L.; Bugni, F. M.; da Cunha, I. A.; Hamada, F. N.; Dias, R. C., Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. *Vet Parasitol* **2007**, 145, (3-4), 197-206.
- Garidel, P.; Hoffmann, C.; Blume, A., A thermodynamic analysis of the binding interaction between polysorbate 20 and 80 with human serum albumins and immunoglobulins: a contribution to understand colloidal protein stabilisation. *Biophys Chem* **2009**, 143, (1-2), 70-8.
- Gazzinelli, R. T.; Eltoun, I.; Wynn, T. A.; Sher, A., Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J Immunol* **1993**, 151, (7), 3672-81.
- Gazzinelli, R. T.; Hakim, F. T.; Hieny, S.; Shearer, G. M.; Sher, A., Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* **1991**, 146, (1), 286-92.
- Gendrin C. [Etude de l'adressage des protéines GRAs transmembranaires de Toxoplasma gondii aux granules denses et de leur insertion membranaire post-sécrétoire.](#) Université Joseph-Fourier - Grenoble I, **2007**
- Gendrin, C.; Mercier, C.; Braun, L.; Musset, K.; Dubremetz, J. F.; Cesbron-Delauw, M. F., *Toxoplasma gondii* uses unusual sorting mechanisms to deliver transmembrane proteins into the host-cell vacuole. *Traffic* **2008**, 9, (10), 1665-80.
- Gilbert, L.; Toivola, J.; Valilehto, O.; Saloniemä, T.; Cunningham, C.; White, D.; Makela, A. R.; Korhonen, E.; Vuento, M.; Oker-Blom, C., Truncated forms of viral VP2 proteins fused to GFP assemble into fluorescent parvovirus-like particles. *J Nanobiotechnology* **2006**, 4, 13.
- Gilbert, L. A.; Ravindran, S.; Turetzky, J. M.; Boothroyd, J. C.; Bradley, P. J., *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryot Cell* **2007**, 6, (1), 73-83.
- Gilk, S. D.; Gaskins, E.; Ward, G. E.; Beckers, C. J., GAP45 phosphorylation controls assembly of the *Toxoplasma* myosin XIV complex. *Eukaryot Cell* **2009**, 8, (2), 190-6.
- Gilk, S. D.; Raviv, Y.; Hu, K.; Murray, J. M.; Beckers, C. J.; Ward, G. E., Identification of PhIL1, a novel cytoskeletal protein of the *Toxoplasma gondii* pellicle, through photosensitized labeling with 5-[125I]iodonaphthalene-1-azide. *Eukaryot Cell* **2006**, 5, (10), 1622-34.
- Goldszmid, R. S.; Coppens, I.; Lev, A.; Caspar, P.; Mellman, I.; Sher, A., Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J Exp Med* **2009**, 206 (2), 399-410.
- Golkar, M.; Shokrgozar, M. A.; Rafati, S.; Musset, K.; Assmar, M.; Sadaie, R.; Cesbron-Delauw, M. F.; Mercier, C., Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens

- GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine* **2007**, *25*, (21), 4301-11.
- Gonzalez, V.; Combe, A.; David, V.; Malmquist, N. A.; Delorme, V.; Leroy, C.; Blazquez, S.; Menard, R.; Tardieux, I., Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, (3), 259-72.
- Goodman, C. D.; McFadden, G. I., Fatty acid biosynthesis as a drug target in apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets* **2007**, *8*, (1), 15-30.
- Grigg, M. E.; Bonnefoy, S.; Hehl, A. B.; Suzuki, Y.; Boothroyd, J. C., Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* **2001**, *294*, (5540), 161-5.
- Grimwood, J.; Mineo, J. R.; Kasper, L. H., Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infect Immun* **1996**, *64*, (10), 4099-104.
- Gubbels, M. J.; Lehmann, M.; Muthalagi, M.; Jerome, M. E.; Brooks, C. F.; Szatanek, T.; Flynn, J.; Parrot, B.; Radke, J.; Striepen, B.; White, M. W., Forward genetic analysis of the apicomplexan cell division cycle in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **2008**, *4*, (2), e36.
- Guionaud, C.; Hemphill, A.; Mevissen, M.; Alaeddine, F., Molecular characterization of *Neospora caninum* MAG1, a dense granule protein secreted into the parasitophorous vacuole, and associated with the cyst wall and the cyst matrix. *Parasitology* **2010**, *137*, (11), 1605-19.
- Gupta, N.; Zahn, M. M.; Coppens, I.; Joiner, K. A.; Voelker, D. R., Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem* **2005**, *280*, (16), 16345-53.
- Hager, K. M.; Striepen, B.; Tilney, L. G.; Roos, D. S., The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* **1999**, *112* (Pt 16), 2631-8.
- Håkansson, S.; Charron, A. J.; Sibley, L. D., *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *Embo J* **2001**, *20*, (12), 3132-44.
- Håkansson S, Morisaki H, Heuser J, Sibley LD. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol Biol Cell*. **1999** *10*(11):3539-47
- Haldar, K.; Hiller, N. L.; van Ooij, C.; Bhattacharjee, S., Plasmodium parasite proteins and the infected erythrocyte. *Trends Parasitol* **2005**, *21*, (9), 402-3.
- Haldar, K.; Mohandas, N.; Samuel, B. U.; Harrison, T.; Hiller, N. L.; Akompong, T.; Cheresch, P., Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cell Microbiol* **2002**, *4*, (7), 383-95.
- Halet, G., Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains. *Biol Cell* **2005**, *97*, (7), 501-18.
- Halonen, S. K.; Weidner, E., Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J Eukaryot Microbiol* **1994**, *41*, (1), 65-71.
- Harper, J. M.; Huynh, M. H.; Coppens, I.; Parussini, F.; Moreno, S.; Carruthers, V. B., A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Mol Biol Cell* **2006**, *17*, (10), 4551-63.
- Hatzakis, N. S.; Bhatia, V. K.; Larsen, J.; Madsen, K. L.; Bolinger, P. Y.; Kunding, A. H.; Castillo, J.; Gether, U.; Hedegard, P.; Stamou, D., How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs. *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, (11), 835-41.
- He, C. Y.; Shaw, M. K.; Pletcher, C. H.; Striepen, B.; Tilney, L. G.; Roos, D. S., A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Embo J* **2001**, *20*, (3), 330-9.
- He, X. L.; Grigg, M. E.; Boothroyd, J. C.; Garcia, K. C., Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, (8), 606-11.
- Heaslip, A. T.; Ems-McClung, S. C.; Hu, K., TgICMAP1 is a novel microtubule binding protein in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* **2009**, *4*, (10), e7406.
- Heintzelman, M. B.; Schwartzman, J. D., A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J Mol Biol* **1997**, *271*, (1), 139-46.
- Henriquez, F. L.; Nickdel, M. B.; McLeod, R.; Lyons, R. E.; Lyons, K.; Dubremetz, J. F.; Grigg, M. E.; Samuel, B. U.; Roberts, C. W., *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 (GRA3) is a type I transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (KKXX)

- endoplasmic reticulum (ER) retrieval motif. *Parasitology* **2005**, 131, (Pt 2), 169-79.
- Henriquez, S. A.; Brett, R.; Alexander, J.; Pratt, J.; Roberts, C. W., Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation* **2009**, 16, (2), 122-33.
- Herm-Gotz, A.; Weiss, S.; Stratmann, R.; Fujita-Becker, S.; Ruff, C.; Meyhofer, E.; Soldati, T.; Manstein, D. J.; Geeves, M. A.; Soldati, D., *Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *Embo J* **2002**, 21, (9), 2149-58.
- Hessa, T.; Kim, H.; Bihlmaier, K.; Lundin, C.; Boekel, J.; Andersson, H.; Nilsson, I.; White, S. H.; von Heijne, G., Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* **2005**, 433, (7024), 377-81.
- Hettmann, C.; Herm, A.; Geiter, A.; Frank, B.; Schwarz, E.; Soldati, T.; Soldati, D., A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. *Mol Biol Cell* **2000**, 11, (4), 1385-400.
- Hill, D.; Dubey, J. P., *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* **2002**, 8, (10), 634-40.
- Hinshaw, J. E.; Schmid, S. L., Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **1995**, 374, (6518), 190-2.
- Hiszczynska-Sawicka, E.; Li, H.; Xu, J. B.; Oledzka, G.; Kur, J.; Bickerstaffe, R.; Stankiewicz, M., Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations. *Exp Parasitol* **2010**, 124, (4), 365-72.
- Hoffmann, C.; Gaietta, G.; Bunemann, M.; Adams, S. R.; Oberdorff-Maass, S.; Behr, B.; Vilardaga, J. P.; Tsien, R. Y.; Ellisman, M. H.; Lohse, M. J., A FLAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* **2005**, 2, (3), 171-6.
- Holliman, R. E., *Toxoplasmosis*, behaviour and personality. *J Infect* **1997**, 35, (2), 105-10.
- Horvath, C. A.; Vanden Broeck, D.; Boulet, G. A.; Bogers, J.; De Wolf, M. J., Epsin: inducing membrane curvature. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, 39, (10), 1765-70.
- Howe, D. K.; Honore, S.; Derouin, F.; Sibley, L. D., Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* **1997**, 35, (6), 1411-4.
- Howe, D. K.; Sibley, L. D., *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* **1995**, 172, (6), 1561-6.
- Howe, D. K.; Summers, B. C.; Sibley, L. D., Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **1996**, 64, (12), 5193-8.
- Hu, J.; Shibata, Y.; Voss, C.; Shemesh, T.; Li, Z.; Coughlin, M.; Kozlov, M. M.; Rapoport, T. A.; Prinz, W. A., Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. *Science* **2008**, 319, (5867), 1247-50.
- Hu, K.; Johnson, J.; Florens, L.; Fraunholz, M.; Suravajjala, S.; DiLullo, C.; Yates, J.; Roos, D. S.; Murray, J. M., Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **2006**, 2, (2), e13.
- Hurtig, J.; Chiu, D. T.; Onfelt, B., Intercellular nanotubes: insights from imaging studies and beyond. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2010**, 2, (3), 260-76.
- Hutchison, W. M., Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* **1965**, 206, (987), 961-2.
- Huynh, M. H.; Carruthers, V. B., Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell* **2009**, 8, (4), 530-9.
- Innes, E. A.; Bartley, P. M.; Maley, S. W.; Wright, S. E.; Buxton, D., Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine* **2007**, 25, (30), 5495-503.
- Ismael, A. B.; Dimier-Poisson, I.; Lebrun, M.; Dubremetz, J. F.; Bout, D.; Mevelec, M. N., Mic1-3 knockout of *Toxoplasma gondii* is a successful vaccine against chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *J Infect Dis* **2006**, 194, (8), 1176-83.
- Itoh, T.; De Camilli, P., BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1761, (8), 897-912.
- Jao, C. C.; Hegde, B. G.; Chen, J.; Haworth, I. S.; Langen, R., Structure of membrane-bound alpha-synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, 105, (50), 19666-71.
- Jewett, T. J.; Sibley, L. D., The *Toxoplasma* proteins MIC2 and M2AP form a hexameric

- complex necessary for intracellular survival. *J Biol Chem* **2004**, 279, (10), 9362-9.
- Johnson, T. M.; Rajfur, Z.; Jacobson, K.; Beckers, C. J., Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell* **2007**, 18, (8), 3039-46.
- Joiner, K. A.; Fuhrman, S. A.; Miettinen, H. M.; Kasper, L. H.; Mellman, I., *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* **1990**, 249, (4969), 641-6.
- Joiner, K. A.; Roos, D. S., Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol* **2002**, 157, (4), 557-63.
- Jongert, E.; Roberts, C. W.; Gargano, N.; Forster-Wald, E.; Petersen, E., Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, 104, (2), 252-66.
- Joseph, J. T.; Aldritt, S. M.; Unnasch, T.; Puijalón, O.; Wirth, D. F., Characterization of a conserved extrachromosomal element isolated from the avian malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Cell Biol* **1989**, 9, (9), 3621-9.
- Kafsack, B. F.; Carruthers, V. B., Apicomplexan perforin-like proteins. *Commun Integr Biol* **2010**, 3, (1), 18-23.
- Kafsack, B. F.; Pena, J. D.; Coppens, I.; Ravindran, S.; Boothroyd, J. C.; Carruthers, V. B., Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* **2009**, 323, (5913), 530-3.
- Kalanon, M.; Tonkin, C. J.; McFadden, G. I., Characterization of two putative protein translocation components in the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* **2009**, 8, (8), 1146-54.
- Karsten, V.; Hegde, R. S.; Sinai, A. P.; Yang, M.; Joiner, K. A., Transmembrane domain modulates sorting of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **2004**, 279, (25), 26052-7.
- Karsten V, Qi H, Beckers CJ, Reddy A, Dubremetz JF, Webster P, Joiner KA. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J Cell Biol.* **1998** 141(6):1323-33
- Kasper, L. H.; Buzoni-Gatel, D., Some Opportunistic Parasitic Infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. *Parasitol Today* **1998**, 14, (4), 150-6.
- Kawase, O.; Nishikawa, Y.; Bannai, H.; Igarashi, M.; Matsuo, T.; Xuan, X., Characterization of a novel thrombospondin-related protein in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int* **2010**, 59, (2), 211-6.
- Keller, P. M.; Person, S.; Snipes, W., A fluorescence enhancement assay of cell fusion. *J Cell Sci* **1977**, 28, 167-77.
- Khaminets A, Hunn JP, Könen-Waisman S, Zhao YO, Preukschat D, Coers J, Boyle JP, Ong YC, Boothroyd JC, Reichmann G, Howard JC. Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol.* **2010** 12(7):939-61.
- Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2007** 104(37):14872-7.
- Khan, A.; Jordan, C.; Muccioli, C.; Vallochi, A. L.; Rizzo, L. V.; Belfort, R., Jr.; Vitor, R. W.; Silveira, C.; Sibley, L. D., Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* **2006**, 12, (6), 942-9.
- Kiefer, D.; Kuhn, A., Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control. *Embo J* **1999**, 18, (22), 6299-306.
- Kijlstra, A.; Jongert, E., Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol* **2008**, 38, (12), 1359-70.
- Kim, S. K.; Fouts, A. E.; Boothroyd, J. C., *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J Immunol* **2007**, 178, (8), 5154-65.
- Kirchhausen, T., Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, 1, (3), 187-98.
- Klun, I.; Djurkovic-Djakovic, O.; Katic-Radivojevic, S.; Nikolic, A., Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet Parasitol* **2006**, 135, (2), 121-31.
- Köhler, S., Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: II. the ovoid mitochondrial cytoplasmic (OMC) complex of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Parasitol Res* **2006**, 98, (4), 355-69.
- Köhler, S.; Delwiche, C. F.; Denny, P. W.; Tilney, L. G.; Webster, P.; Wilson, R. J.; Palmer, J. D.; Roos, D. S., A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* **1997**, 275, (5305), 1485-9.

- Ladruyère, E.; Lingnau, M.; Mercier, C.; Sibley, L. D., Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **1999**, 102, (2), 311-24.
- Ladokhin, A. S.; Isas, J. M.; Haigler, H. T.; White, S. H., Determining the membrane topology of proteins: insertion pathway of a transmembrane helix of annexin 12. *Biochemistry* **2002**, 41, (46), 13617-26.
- Lafferty, K. D., Can the common brain parasite, *Toxoplasma gondii*, influence human culture? *Proc Biol Sci* **2006**, 273, (1602), 2749-55.
- Lagal, V.; Binder, E. M.; Huynh, M. H.; Kafsack, B. F.; Harris, P. K.; Diez, R.; Chen, D.; Cole, R. N.; Carruthers, V. B.; Kim, K., *Toxoplasma gondii* protease TgSUB1 is required for cell surface processing of micronemal adhesive complexes and efficient adhesion of tachyzoites. *Cell Microbiol* **2010**, 12, (12), 1792-808.
- Laliberté, J.; Carruthers, V. B., Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci* **2008**, 65, (12), 1900-15.
- Lanzer, M.; Wickert, H.; Krohne, G.; Vincensini, L.; Braun Breton, C., Maurer's clefts: a novel multifunctional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int J Parasitol* **2006**, 36, (1), 23-36.
- Lauer, S.; VanWye, J.; Harrison, T.; McManus, H.; Samuel, B. U.; Hiller, N. L.; Mohandas, N.; Haldar, K., Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J* **2000**, 19, (14), 3556-64.
- Lauer, S. A.; Rathod, P. K.; Ghori, N.; Haldar, K., A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* **1997**, 276, (5315), 1122-5.
- Lebrun M., Carruthers V., Cesbron-Delauw, MF. *Toxoplasma* Secretory Proteins and their Roles in Cell Invasion and Intracellular Survival in *Toxoplasma gondii*. In Weiss, LM, Kim, K, editors. *The Model Apicomplexan-Perspectives and Methods*. Academic Press, London, **2007**, p 265-316
- Lebrun, M.; Michelin, A.; El Hajj, H.; Poncet, J.; Bradley, P. J.; Vial, H.; Dubremetz, J. F., The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol* **2005**, 7, (12), 1823-33.
- Lecordier, L.; Moleon-Borodowsky, I.; Dubremetz, J. F.; Tourvieille, B.; Mercier, C.; Deslee, D.; Capron, A.; Cesbron-Delauw, M. F., Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol Biochem Parasitol* **1995**, 70, (1-2), 85-94.
- Lee, A. G., How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **2004**, 1666, (1-2), 62-87.
- Lee, M. C.; Orci, L.; Hamamoto, S.; Futai, E.; Ravazzola, M.; Schekman, R., Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* **2005**, 122, (4), 605-17.
- Lei, Y.; Birch, D.; Davey, M.; Ellis, J. T., Subcellular fractionation and molecular characterization of the pellicle and plasmalemma of *Neospora caninum*. *Parasitology* **2005**, 131, (Pt 4), 467-75.
- Lemgruber, L.; Kloetzel, J. A.; Souza, W.; Vommaro, R. C., *Toxoplasma gondii*: further studies on the subpellicular network. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, 104, (5), 706-9.
- Lemmon, M. A., Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, 9, (2), 99-111.
- Lenarcic, R.; Halbedel, S.; Visser, L.; Shaw, M.; Wu, L. J.; Errington, J.; Marenduzzo, D.; Hamoen, L. W., Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *Embo J* **2009**, 28, (15), 2272-82.
- Liang, Y., Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2008**, 40, (7), 565-76.
- Liendo, A.; Stedman, T. T.; Ngo, H. M.; Chaturvedi, S.; Hoppe, H. C.; Joiner, K. A., *Toxoplasma gondii* ADP-ribosylation factor 1 mediates enhanced release of constitutively secreted dense granule proteins. *J Biol Chem* **2001**, 276, (21), 18272-81.
- Lim, L.; McFadden, G. I., The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2010**, 365, (1541), 749-63.
- Lin, S. S.; Gross, U.; Bohne, W., Type II NADH dehydrogenase inhibitor 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone leads to collapse of mitochondrial inner-membrane potential and ATP depletion in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* **2009**, 8, (6), 877-87.
- Lomize, A. L.; Pogozheva, I. D.; Lomize, M. A.; Mosberg, H. I., Positioning of proteins in membranes: a computational approach. *Protein Sci* **2006**, 15, (6), 1318-33.

- Lopez-Montero, I.; Rodriguez, N.; Cribier, S.; Pohl, A.; Velez, M.; Devaux, P. F., Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes. *J Biol Chem* **2005**, *280*, (27), 25811-9.
- Lorestani, A.; Sheiner, L.; Yang, K.; Robertson, S. D.; Sahoo, N.; Brooks, C. F.; Ferguson, D. J.; Striepen, B.; Gubbels, M. J., A Toxoplasma MORN1 null mutant undergoes repeated divisions but is defective in basal assembly, apicoplast division and cytokinesis. *PLoS One* **2010**, *5*, (8), e12302.
- Lyons, R. E.; McLeod, R.; Roberts, C. W., Toxoplasma gondii tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol* **2002**, *18*, (5), 198-201.
- Madsen, K. L.; Bhatia, V. K.; Gether, U.; Stamou, D., BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins use the same mechanism to sense membrane curvature. *FEBS Lett* **2010**, *584*, (9), 1848-55.
- Magno, R. C.; Lemgruber, L.; Vommaro, R. C.; De Souza, W.; Attias, M., Intravacuolar network may act as a mechanical support for Toxoplasma gondii inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Tech* **2005a**, *67*, (1), 45-52.
- Magno, R. C.; Straker, L. C.; de Souza, W.; Attias, M., Interrelations between the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii and host cell organelles. *Microsc Microanal* **2005b**, *11*, (2), 166-74.
- Mann, T.; Beckers, C., Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite Toxoplasma gondii. *Mol Biochem Parasitol* **2001**, *115*, (2), 257-68.
- Mant, A.; Woolhead, C. A.; Moore, M.; Henry, R.; Robinson, C., Insertion of PsaK into the thylakoid membrane in a "Horseshoe" conformation occurs in the absence of signal recognition particle, nucleoside triphosphates, or functional albino3. *J Biol Chem* **2001**, *276*, (39), 36200-6.
- Maréchal, E.; Cesbron-Delauw, M. F., The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci* **2001**, *6*, (5), 200-5.
- Marsh, M.; McMahon, H. T., The structural era of endocytosis. *Science* **1999**, *285*, (5425), 215-20.
- Martin, A. M.; Liu, T.; Lynn, B. C.; Sinai, A. P., The Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J Eukaryot Microbiol* **2007**, *54*, (1), 25-8.
- Martins-Duarte, E. S.; Lemgruber, L.; de Souza, W.; Vommaro, R. C., Toxoplasma gondii: fluconazole and itraconazole activity against toxoplasmosis in a murine model. *Exp Parasitol* **2010**, *124*, (4), 466-9.
- Masuda, M.; Takeda, S.; Sone, M.; Ohki, T.; Mori, H.; Kamioka, Y.; Mochizuki, N., Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *Embo J* **2006**, *25*, (12), 2889-97.
- Matsuo, H.; Chevallier, J.; Mayran, N.; Le Blanc, I.; Ferguson, C.; Faure, J.; Blanc, N. S.; Matile, S.; Dubochet, J.; Sadoul, R.; Parton, R. G.; Vilbois, F.; Gruenberg, J., Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* **2004**, *303*, (5657), 531-4.
- Mattila, P. K.; Pykalainen, A.; Saarikangas, J.; Paavilainen, V. O.; Vihinen, H.; Jokitalo, E.; Lappalainen, P., Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol* **2007**, *176*, (7), 953-64.
- Maubon, D.; Bougdour, A.; Wong, Y. S.; Brenier-Pinchart, M. P.; Curt, A.; Hakimi, M. A.; Pelloux, H., Activity of the histone deacetylase inhibitor FR235222 on Toxoplasma gondii: inhibition of stage conversion of the parasite cyst form and study of new derivative compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, *54*, (11), 4843-50.
- Mazumdar, J.; E, H. W.; Masek, K.; C, A. H.; Striepen, B., Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in Toxoplasma gondii. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, (35), 13192-7.
- McFadden, G. I.; Reith, M. E.; Munholland, J.; Lang-Unnasch, N., Plastid in human parasites. *Nature* **1996**, *381*, (6582), 482.
- McFadden, G. I.; Waller, R. F., Plastids in parasites of humans. *Bioessays* **1997**, *19*, (11), 1033-40.
- McLeod, R.; Mack, D.; Brown, C., Toxoplasma gondii--new advances in cellular and molecular biology. *Exp Parasitol* **1991**, *72*, (1), 109-21.
- McMahon, H. T.; Gallop, J. L., Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **2005**, *438*, (7068), 590-6.
- Meissner, M.; Schluter, D.; Soldati, D., Role of Toxoplasma gondii myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* **2002**, *298*, (5594), 837-40.
- Meissner, M.; Soldati, D., The transcription machinery and the molecular toolbox to control gene expression in Toxoplasma gondii and

- other protozoan parasites. *Microbes Infect* **2005**, 7, (13), 1376-84.
- Melo, E. J.; Attias, M.; De Souza, W., The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol* **2000**, 130, (1), 27-33.
- Melo EJ, de Souza W. Relationship between the host cell endoplasmic reticulum and the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii*. *Cell Struct Funct*. **1997**. 22(3):317-23.
- Melo, M. B.; Kasperkovitz, P.; Cerny, A.; Konen-Waisman, S.; Kurt-Jones, E. A.; Lien, E.; Beutler, B.; Howard, J. C.; Golenbock, D. T.; Gazzinelli, R. T., UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **2010**, 6, (8).
- Mennechet, F. J.; Kasper, L. H.; Rachinel, N.; Li, W.; Vandewalle, A.; Buzoni-Gatel, D., Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol* **2002**, 168, (6), 2988-96.
- Mennechet, F. J.; Kasper, L. H.; Rachinel, N.; Minns, L. A.; Luangsay, S.; Vandewalle, A.; Buzoni-Gatel, D., Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. *Eur J Immunol* **2004**, 34, (4), 1059-67.
- Mercier, C.; Adjogble, K. D.; Daubener, W.; Delauw, M. F., Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol* **2005**, 35, (8), 829-49.
- Mercier, C.; Cesbron-Delauw, M. F.; Ferguson, D. J. P., Dense Granules of the Infectious Stages of *Toxoplasma gondii*: Their Central Role in the Host-Parasite Relationship. In *Toxoplasma. Molecular and Cellular Biology*, Ajioka, J. W.; Soldati, D., Eds. Horizon Bioscience: Norfolk, England, **2007**; pp 475-492.
- Mercier, C.; Cesbron-Delauw, M. F.; Sibley, L. D., The amphipathic alpha helices of the toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J Cell Sci* **1998a**, 111 (Pt 15), 2171-80.
- Mercier, C.; Dubremetz, J. F.; Rauscher, B.; Lecordier, L.; Sibley, L. D.; Cesbron-Delauw, M. F., Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell* **2002**, 13, (7), 2397-409.
- Mercier, C.; Howe, D. K.; Mordue, D.; Lingnau, M.; Sibley, L. D., Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect Immun* **1998b**, 66, (9), 4176-82.
- [Mercier C](#), [Rauscher B](#), [Lecordier L](#), [Deslée D](#), [Dubremetz JF](#), [Cesbron-Delauw MF](#). Lack of expression of the dense granule protein GRA5 does not affect the development of *Toxoplasma* tachyzoites. *Mol Biochem Parasitol*. **2001** 116(2):247-51.
- Mercier, C.; Travier, L.; Bittame, A.; Gendrin, C.; Cesbron-Delauw, M. F., The dense granule proteins of *Toxoplasma gondii*. In *Parasitology Research Trends*, De Bruyn, O.; Peeters, S., Eds. Nova Science Publishers, Inc.: **2010**, pp 1-31.
- Mévélec MN, Bout D, Desolme B, Marchand H, Magné R, Bruneel O, Buzoni-Gatel D. Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine*. **2005** 23(36):4489-99
- Mévelec, M. N.; Ducournau, C.; Bassuny Ismael, A.; Olivier, M.; Seche, E.; Lebrun, M.; Bout, D.; Dimier-Poisson, I., Mic1-3 Knockout *Toxoplasma gondii* is a good candidate for a vaccine against *T. gondii*-induced abortion in sheep. *Vet Res* **2010**, 41, (4), 49.
- Michelin, A.; Bittame, A.; Bordat, Y.; Travier, L.; Mercier, C.; Dubremetz, J. F.; Lebrun, M., GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. *Int J Parasitol* **2009**, 39, (3), 299-306.
- Millard, T. H.; Dawson, J.; Machesky, L. M., Characterisation of IRTKS, a novel IRSp53/MIM family actin regulator with distinct filament bundling properties. *J Cell Sci* **2007**, 120, (Pt 9), 1663-72.
- Miller, C. M.; Boulter, N. R.; Ikin, R. J.; Smith, N. C., The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **2009**, 39, (1), 23-39.
- Mineo, J. R.; Kasper, L. H., Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp Parasitol* **1994**, 79, (1), 11-20.
- Minns, L. A.; Menard, L. C.; Foureau, D. M.; Darce, S.; Ronet, C.; Mielcarz, D. W.; Buzoni-Gatel, D.; Kasper, L. H., TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **2006**, 176, (12), 7589-97.
- Miranda, K.; Pace, D. A.; Cintron, R.; Rodrigues, J. C.; Fang, J.; Smith, A.; Rohloff, P.; Coelho, E.;

- de Haas, F.; de Souza, W.; Coppens, I.; Sibley, L. D.; Moreno, S. N., Characterization of a novel organelle in *Toxoplasma gondii* with similar composition and function to the plant vacuole. *Mol Microbiol* **2010**, *76*, (6), 1358-75.
- Mital, J.; Meissner, M.; Soldati, D.; Ward, G. E., Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol Biol Cell* **2005**, *16*, (9), 4341-9.
- Moiré, N.; Dion, S.; Lebrun, M.; Dubremetz, J. F.; Dimier-Poisson, I., Mic1-3KO tachyzoite a live attenuated vaccine candidate against toxoplasmosis derived from a type I strain shows features of type II strain. *Exp Parasitol* **2009**, *123*, (2), 111-7.
- Mondragon, R.; Frixione, E., Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Eukaryot Microbiol* **1996**, *43*, (2), 120-7.
- Monteiro, V. G.; de Melo, E. J.; Attias, M.; de Souza, W., Morphological changes during conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites treated with calcium ionophore. *J Struct Biol* **2001**, *136*, (3), 181-9.
- Mordue, D. G.; Desai, N.; Dustin, M.; Sibley, L. D., Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* **1999**, *190*, (12), 1783-92.
- Morris, M. T.; Carruthers, V. B., Identification and partial characterization of a second Kazal inhibitor in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **2003**, *128*, (1), 119-22.
- Morris, M. T.; Coppin, A.; Tomavo, S.; Carruthers, V. B., Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. *J Biol Chem* **2002**, *277*, (47), 45259-66.
- Morrisette, N. S.; Murray, J. M.; Roos, D. S., Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* **1997**, *110* (Pt 1), 35-42.
- Morrisette, N. S.; Sibley, L. D., Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* **2002**, *66*, (1), 21-38; table of contents.
- Mortensen, P. B.; Norgaard-Pedersen, B.; Waltoft, B. L.; Sorensen, T. L.; Hougaard, D.; Yolken, R. H., Early infections of *Toxoplasma gondii* and the later development of schizophrenia. *Schizophr Bull* **2007**, *33*, (3), 741-4.
- Moudy, R.; Manning, T. J.; Beckers, C. J., The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **2001**, *276*, (44), 41492-501.
- Nakaar, V.; Samuel, B. U.; Ngo, E. O.; Joiner, K. A., Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. *J Biol Chem* **1999**, *274*, (8), 5083-7.
- Nelson, M. M.; Jones, A. R.; Carmen, J. C.; Sinai, A. P.; Burchmore, R.; Wastling, J. M., Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **2008**, *76*, (2), 828-44.
- Ngo, H. M.; Yang, M.; Joiner, K. A., Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? *Mol Microbiol* **2004**, *52*, (6), 1531-41.
- Ngo, H. M.; Yang, M.; Paprotka, K.; Pypaert, M.; Hoppe, H.; Joiner, K. A., AP-1 in *Toxoplasma gondii* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment. *J Biol Chem* **2003**, *278*, (7), 5343-52.
- Nicolle, C.; Manceaux, L., C. Nicolle and L. Manceaux, Sur un protozoaire nouveau du gondi, *CR Acad. Sci.* 148 (1909), p. 369. *CR Acad Sci* **1909**, *148*, 369.
- Nishi, M.; Hu, K.; Murray, J. M.; Roos, D. S., Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* **2008**, *121*, (Pt 9), 1559-68.
- Nishikawa, Y.; Quittnat, F.; Stedman, T. T.; Voelker, D. R.; Choi, J. Y.; Zahn, M.; Yang, M.; Pypaert, M.; Joiner, K. A.; Coppens, I., Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell Microbiol* **2005**, *7*, (6), 849-67.
- Normaznah, Y.; Saniah, K.; Fuzina Noor, H.; Naseem, M.; Khatijah, M., Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* among farmers and cattle in Gombak District, Selangor, Malaysia - a preliminary report. *Trop Biomed* **2004**, *21*, (2), 157-9.
- Ohlson, M. B.; Huang, Z.; Alto, N. M.; Blanc, M. P.; Dixon, J. E.; Chai, J.; Miller, S. I., Structure and function of *Salmonella* SifA indicate that its interactions with SKIP, SseJ, and RhoA family GTPases induce endosomal tubulation. *Cell Host Microbe* **2008**, *4*, (5), 434-46.
- Omata, Y.; Aihara, Y.; Kanda, M.; Saito, A.; Igarashi, I.; Suzuki, N., *Toxoplasma gondii*: experimental infection in cats vaccinated with

- 60Co-irradiated tachyzoites. *Vet Parasitol* **1996**, 65, (3-4), 173-83.
- Önfelt, B.; Davis, D. M., Can membrane nanotubes facilitate communication between immune cells? *Biochem Soc Trans* **2004**, 32, (Pt 5), 676-8.
- Önfelt, B.; Nedvetzki, S.; Yanagi, K.; Davis, D. M., Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* **2004**, 173, (3), 1511-3.
- Opitz, C.; Soldati, D., 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* **2002**, 45, (3), 597-604.
- Papakrivos, J.; Newbold, C. I.; Lingelbach, K., A potential novel mechanism for the insertion of a membrane protein revealed by a biochemical analysis of the *Plasmodium falciparum* cytoadherence molecule PfEMP-1. *Mol Microbiol* **2005**, 55, (4), 1272-84.
- Pappas, G.; Roussos, N.; Falagas, M. E., Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* **2009**, 39, (12), 1385-94.
- Patron, S. A.; Mondragon, M.; Gonzalez, S.; Ambrosio, J. R.; Guerrero, B. A.; Mondragon, R., Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Int J Parasitol* **2005**, 35, (8), 883-94.
- Peixoto, L.; Chen, F.; Harb, O. S.; Davis, P. H.; Beiting, D. P.; Brownback, C. S.; Ouloguem, D.; Roos, D. S., Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. *Cell Host Microbe* **2010**, 8, (2), 208-18.
- Pelletier, L.; Stern, C. A.; Pypaert, M.; Sheff, D.; Ngo, H. M.; Roper, N.; He, C. Y.; Hu, K.; Toomre, D.; Coppens, I.; Roos, D. S.; Joiner, K. A.; Warren, G., Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature* **2002**, 418, (6897), 548-52.
- Pena, H. F.; Gennari, S. M.; Dubey, J. P.; Su, C., Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol* **2008**, 38, (5), 561-9.
- Pernas, L.; Boothroyd, J. C., Association of host mitochondria with the parasitophorous vacuole during *Toxoplasma* infection is not dependent on rhoptry proteins ROP2/8. *Int J Parasitol* **2010**, 40, (12), 1367-71.
- Peter, B. J.; Kent, H. M.; Mills, I. G.; Vallis, Y.; Butler, P. J.; Evans, P. R.; McMahon, H. T., BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **2004**, 303, (5657), 495-9.
- Plattner, F.; Soldati-Favre, D., Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. *Annu Rev Microbiol* **2008**, 62, 471-87.
- Polonais, V.; Soldati-Favre, D., Versatility in the acquisition of energy and carbon sources by the Apicomplexa. *Biol Cell* **2010**, 102, (8), 435-45.
- Pomel, S.; Luk, F. C.; Beckers, C. J., Host cell egress and invasion induce marked relocations of glycolytic enzymes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *PLoS Pathog* **2008**, 4, (10), e1000188.
- Popot, J. L.; Engelman, D. M., Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* **1990**, 29, (17), 4031-7.
- Porto, A. M.; Amorim, M. M.; Coelho, I. C.; Santos, L. C., [Serologic profile of toxoplasmosis in pregnant women attended at a teaching-hospital in Recife]. *Rev Assoc Med Bras* **2008**, 54, (3), 242-8.
- Praefcke, G. J.; McMahon, H. T., The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, 5, (2), 133-47.
- Przyborski, J. M.; Wickert, H.; Krohne, G.; Lanzer, M., Maurer's clefts--a novel secretory organelle? *Mol Biochem Parasitol* **2003**, 132, (1), 17-26.
- Pszenny, V.; Ledesma, B. E.; Matrajt, M.; Duschak, V. G.; Bontempi, E. J.; Dubremetz, J. F.; Angel, S. O., Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **2002**, 121, (2), 283-6.
- Qiu, W.; Wernimont, A.; Tang, K.; Taylor, S.; Lunin, V.; Schapira, M.; Fentress, S.; Hui, R.; Sibley, L. D., Novel structural and regulatory features of rhoptry secretory kinases in *Toxoplasma gondii*. *Embo J* **2009**, 28, (7), 969-79.
- Que, X.; Engel, J. C.; Ferguson, D.; Wunderlich, A.; Tomavo, S.; Reed, S. L., Cathepsin Cs are key for the intracellular survival of the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **2007**, 282, (7), 4994-5003.
- Quittnat, F.; Nishikawa, Y.; Stedman, T. T.; Voelker, D. R.; Choi, J. Y.; Zahn, M. M.; Murphy, R. C.; Barkley, R. M.; Pypaert, M.; Joiner, K. A.; Coppens, I., On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* DGAT1-related enzyme. *Mol Biochem Parasitol* **2004**, 138, (1), 107-22.

- Ramamurthi, K. S.; Lecuyer, S.; Stone, H. A.; Losick, R., Geometric cue for protein localization in a bacterium. *Science* **2009**, 323, (5919), 1354-7.
- Ramamurthi, K. S.; Losick, R., Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, (32), 13541-5.
- Ramya, T. N.; Mishra, S.; Karmodiya, K.; Surolia, N.; Surolia, A., Inhibitors of nonhousekeeping functions of the apicoplast defy delayed death in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, (1), 307-16.
- Ravindran, S.; Boothroyd, J. C., Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. *Traffic* **2008**, 9, (5), 647-56.
- Reese, M. L.; Boothroyd, J. C., A helical membrane-binding domain targets the *Toxoplasma* ROP2 family to the parasitophorous vacuole. *Traffic* **2009**, 10, (10), 1458-70.
- Reis e Sousa, C.; Yap, G.; Schulz, O.; Rogers, N.; Schito, M.; Aliberti, J.; Hieny, S.; Sher, A., Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity* **1999**, 11, (5), 637-47.
- Reiss, M.; Viebig, N.; Brecht, S.; Fourmaux, M. N.; Soete, M.; Di Cristina, M.; Dubremetz, J. F.; Soldati, D., Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol* **2001**, 152, (3), 563-78.
- Ren, G.; Vajjhala, P.; Lee, J. S.; Winsor, B.; Munn, A. L., The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol Mol Biol Rev* **2006**, 70, (1), 37-120.
- Robibaro, B.; Stedman, T. T.; Coppens, I.; Ngo, H. M.; Pypaert, M.; Bivona, T.; Nam, H. W.; Joiner, K. A., *Toxoplasma gondii* Rab5 enhances cholesterol acquisition from host cells. *Cell Microbiol* **2002**, 4, (3), 139-52.
- Rodriguez C, Afchain D, Capron A, Dissous C, Santoro F. Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur J Immunol*. **1985**, 15(7):747-9.
- Romano, J. D.; Bano, N.; Coppens, I., New host nuclear functions are not required for the modifications of the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma*. *Cell Microbiol* **2008**, 10, (2), 465-76.
- Rome, M. E.; Beck, J. R.; Turetzky, J. M.; Webster, P.; Bradley, P. J., Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **2008**, 76, (11), 4865-75.
- Roos, D. S.; Crawford, M. J.; Donald, R. G.; Kissinger, J. C.; Klimczak, L. J.; Striepen, B., Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol* **1999**, 2, (4), 426-32.
- Roux, A.; Cappello, G.; Cartaud, J.; Prost, J.; Goud, B.; Bassereau, P., A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, (8), 5394-9.
- Roux, A.; Cuvelier, D.; Nassoy, P.; Prost, J.; Bassereau, P.; Goud, B., Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *Embo J* **2005**, 24, (8), 1537-45.
- Ruffiot P. Développement de systèmes membranaires modèles pour la vacuole parasitophore de *Toxoplasma gondii* : Interactions des protéines de granules denses (protéines GRA) avec des vésicules unilamellaires Université Joseph-Fourier - Grenoble I , **2007**.
- Rustum A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. **2004** 303(5660):1007-10.
- Saarikangas, J.; Zhao, H.; Pykalainen, A.; Laurinmaki, P.; Mattila, P. K.; Kinnunen, P. K.; Butcher, S. J.; Lappalainen, P., Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Curr Biol* **2009**, 19, (2), 95-107.
- [Saavedra R](#), [De Meuter F](#), [Hérion P](#). Monoclonal antibodies identify new *Toxoplasma gondii* soluble antigens. *Hybridoma*. **1990**, 9(5):453-63.
- Sabin, A., Toxoplasmic encephalitis in children. *J Am Med Assoc* **1941**, 116, 801-807.
- Saeij, J. P.; Coller, S.; Boyle, J. P.; Jerome, M. E.; White, M. W.; Boothroyd, J. C., *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* **2007**, 445, (7125), 324-7.
- Samuelson, J. C.; Chen, M.; Jiang, F.; Moller, I.; Wiedmann, M.; Kuhn, A.; Phillips, G. J.; Dalbey, R. E., YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **2000**, 406, (6796), 637-41.
- Sauros, S.; Edwards-Jones, B.; Reiss, M.; Sawmynaden, K.; Cota, E.; Simpson, P.; Dowse, T. J.; Jakle, U.; Ramboarina, S.; Shivarattan, T.; Matthews, S.; Soldati-Favre, D., A novel galectin-like domain from

- Toxoplasma gondii micronemal protein 1 assists the folding, assembly, and transport of a cell adhesion complex. *J Biol Chem* **2005**, 280, (46), 38583-91.
- [Sasono PM](#), [Smith JE](#). Toxoplasma gondii: an ultrastructural study of host-cell invasion by the bradyzoite stage. *Parasitol Res.* **1998**, 84(8):640-645.
- Scharton-Kersten, T. M.; Yap, G.; Magram, J.; Sher, A., Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen Toxoplasma gondii. *J Exp Med* **1997**, 185, (7), 1261-73.
- Schatten, H.; Ris, H., Three-dimensional imaging of Toxoplasma gondii-host cell interactions within the parasitophorous vacuole. *Microsc Microanal* **2004**, 10, (5), 580-5.
- Schatten, H.; Sibley, L. D.; Ris, H., Structural evidence for actin-like filaments in Toxoplasma gondii using high-resolution low-voltage field emission scanning electron microscopy. *Microsc Microanal* **2003**, 9, (4), 330-5.
- Schlüter, D.; Deckert-Schluter, M.; Lorenz, E.; Meyer, T.; Rollinghoff, M.; Bogdan, C., Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in Toxoplasma gondii-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in T. gondii-resistant BALB/c mice. *J Immunol* **1999**, 162, (6), 3512-8.
- Schneiter, R.; Toulmay, A., The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, 73, (6), 1224-32.
- Schroeder, N.; Henry, T.; de Chastellier, C.; Zhao, W.; Guilhon, A. A.; Gorvel, J. P.; Meresse, S., The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of Salmonella-containing vacuoles. *PLoS Pathog* **2010**, 6, (7), e1001002.
- Schwab, J. C.; Beckers, C. J.; Joiner, K. A., The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular Toxoplasma gondii functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91, (2), 509-13.
- Segrest, J. P.; Harvey, S. C.; Zannis, V., Detailed molecular model of apolipoprotein A-I on the surface of high-density lipoproteins and its functional implications. *Trends Cardiovasc Med* **2000**, 10, (6), 246-52.
- Sehgal, A.; Bettiol, S.; Pypaert, M.; Wenk, M. R.; Kaasch, A.; Blader, I. J.; Joiner, K. A.; Coppens, I., Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing Toxoplasma. *Traffic* **2005**, 6, (12), 1125-41.
- Seron, K.; Dzierszinski, F.; Tomavo, S., Molecular cloning, functional complementation in Saccharomyces cerevisiae and enzymatic properties of phosphatidylinositol synthase from the protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Eur J Biochem* **2000**, 267, (22), 6571-9.
- Sharif, M.; Gholami, S.; Ziaei, H.; Daryani, A.; Laktarashi, B.; Ziapour, S. P.; Rafiei, A.; Vahedi, M., Seroprevalence of Toxoplasma gondii in cattle, sheep and goats slaughtered for food in Mazandaran province, Iran, during 2005. *Vet J* **2007**, 174, (2), 422-4.
- Sharma, S.; Sandhu, K. S.; Bal, M. S.; Kumar, H.; Verma, S.; Dubey, J. P., Serological survey of antibodies to Toxoplasma gondii in sheep, cattle, and buffaloes in Punjab, India. *J Parasitol* **2008**, 94, (5), 1174-5.
- Shaw, M. K.; Tilney, L. G., Induction of an acrosomal process in Toxoplasma gondii: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, (16), 9095-9.
- Sheiner, L.; Santos, J. M.; Klages, N.; Parussini, F.; Jemmely, N.; Friedrich, N.; Ward, G. E.; Soldati-Favre, D., Toxoplasma gondii transmembrane microneme proteins and their modular design. *Mol Microbiol* **2010**.
- Shibata, Y.; Hu, J.; Kozlov, M. M.; Rapoport, T. A., Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2009**, 25, 329-54.
- Shibata, Y.; Voss, C.; Rist, J. M.; Hu, J.; Rapoport, T. A.; Prinz, W. A.; Voeltz, G. K., The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **2008**, 283, (27), 18892-904.
- Sibley, L. D., Active modification of host cell phagosomes by Toxoplasma gondii In *Intracellular parasitism*, Moulder, J., Ed. CRC Press: **1989**; pp 245-257.
- Sibley, L. D., Interactions between Toxoplasma gondii and its mammalian host cells. *Semin Cell Biol* **1993**, 4, (5), 335-44.
- Sibley, L. D., Toxoplasma gondii: perfecting an intracellular life style. *Traffic* **2003**, 4, (9), 581-6.
- Sibley, L. D.; Ajioka, J. W., Population structure of Toxoplasma gondii: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu Rev Microbiol* **2008**, 62, 329-51.
- Sibley, L. D.; Krahenbuhl, J. L.; Adams, G. M.; Weidner, E., Toxoplasma modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network

- rich in surface proteins. *J Cell Biol* **1986**, 103, (3), 867-74.
- Sibley, L. D.; Niesman, I. R.; Parmley, S. F.; Cesbron-Delauw, M. F., Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* **1995**, 108 (Pt 4), 1669-77.
- Sibley, L. D.; Pfefferkorn, E. R.; Boothroyd, J. C., Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* **1991**, 7, (12), 327-8.
- Simons, K.; Gerl, M. J., Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, 11, (10), 688-99.
- Sinai, A. P., Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem* **2008**, 47, 155-64.
- Sinai, A. P.; Joiner, K. A., The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* **2001**, 154, (1), 95-108.
- Sinai, A. P.; Payne, T. M.; Carmen, J. C.; Hardi, L.; Watson, S. J.; Molestina, R. E., Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **2004**, 34, (3), 381-91.
- Sinai, A. P.; Webster, P.; Joiner, K. A., Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* **1997**, 110 (Pt 17), 2117-28.
- Soldati, D.; Dubremetz, J. F.; Lebrun, M., Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **2001**, 31, (12), 1293-302.
- Soldati, D.; Lassen, A.; Dubremetz, J. F.; Boothroyd, J. C., Processing of *Toxoplasma* ROP1 protein in nascent rhoptries. *Mol Biochem Parasitol* **1998**, 96, (1-2), 37-48.
- Soldati, D.; Meissner, M., *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr Opin Cell Biol* **2004**, 16, (1), 32-40.
- [Sonda S, Hehl AB](#). Lipid biology of Apicomplexa: perspectives for new drug targets, particularly for *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol*. **2006** 22(1):41-7.
- Sonnino, S.; Mauri, L.; Chigorno, V.; Prinetti, A., Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* **2007**, 17, (1), 1R-13R.
- Sowinski, S.; Jolly, C.; Berninghausen, O.; Purbhoo, M. A.; Chauveau, A.; Kohler, K.; Oddos, S.; Eissmann, P.; Brodsky, F. M.; Hopkins, C.; Onfelt, B.; Sattentau, Q.; Davis, D. M., Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* **2008**, 10, (2), 211-9.
- Splendore, A., Un nuovo protozoo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo, Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo* **1908**, 3, 109-112.
- Stedman, T. T.; Sussmann, A. R.; Joiner, K. A., *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. *J Biol Chem* **2003**, 278, (7), 5433-43.
- Steele-Mortimer, O., The Salmonella-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol* **2008**, 11, (1), 38-45.
- Stein, M. A.; Leung, K. Y.; Zwick, M.; Garcia-del Portillo, F.; Finlay, B. B., Identification of a Salmonella virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol* **1996**, 20, (1), 151-64.
- Stokkermans, T. J.; Schwartzman, J. D.; Keenan, K.; Morrissette, N. S.; Tilney, L. G.; Roos, D. S., Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. *Exp Parasitol* **1996**, 84, (3), 355-70.
- Stowell, M. H.; Marks, B.; Wigge, P.; McMahon, H. T., Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol* **1999**, 1, (1), 27-32.
- Straub, K. W.; Cheng, S. J.; Sohn, C. S.; Bradley, P. J., Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cell Microbiol* **2009**, 11, (4), 590-603.
- Su, C.; Evans, D.; Cole, R. H.; Kissinger, J. C.; Ajioka, J. W.; Sibley, L. D., Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* **2003**, 299, (5605), 414-6.
- Subauste, C. S.; Chung, J. Y.; Do, D.; Koniaris, A. H.; Hunter, C. A.; Montoya, J. G.; Porcelli, S.; Remington, J. S., Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma delta T cells in response to *Toxoplasma gondii* in vitro and their cytokine production and cytotoxic activity against T. *gondii*-infected cells. *J Clin Invest* **1995**, 96, (1), 610-9.

- Suetsugu, S.; Murayama, K.; Sakamoto, A.; Hanawa-Suetsugu, K.; Seto, A.; Oikawa, T.; Mishima, C.; Shirouzu, M.; Takenawa, T.; Yokoyama, S., The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J Biol Chem* **2006**, *281*, (46), 35347-58.
- Suetsugu, S.; Toyooka, K.; Senju, Y., Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin Cell Dev Biol* **2010**, *21*, (4), 340-9.
- Suzuki, Y.; Orellana, M. A.; Schreiber, R. D.; Remington, J. S., Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* **1988**, *240*, (4851), 516-8.
- Suzuki, Y.; Sher, A.; Yap, G.; Park, D.; Neyer, L. E.; Liesenfeld, O.; Fort, M.; Kang, H.; Gufwoli, E., IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **2000**, *164*, (10), 5375-82.
- Sweeney, K. R.; Morrissette, N. S.; LaChapelle, S.; Blader, I. J., Host cell invasion by *Toxoplasma gondii* is temporally regulated by the host microtubule cytoskeleton. *Eukaryot Cell* **2010**, *9*, (11), 1680-9.
- Sweitzer, S. M.; Hinshaw, J. E., Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **1998**, *93*, (6), 1021-9.
- Takei, K.; McPherson, P. S.; Schmid, S. L.; De Camilli, P., Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* **1995**, *374*, (6518), 186-90.
- Takei, K.; Slepnev, V. I.; Haucke, V.; De Camilli, P., Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **1999**, *1*, (1), 33-9.
- Tamez, P. A.; Bhattacharjee, S.; van Ooij, C.; Hiller, N. L.; Llinas, M.; Balu, B.; Adams, J. H.; Haldar, K., An erythrocyte vesicle protein exported by the malaria parasite promotes tubovesicular lipid import from the host cell surface. *PLoS Pathog* **2008**, *4*, (8), e1000118.
- Tarleton, R. L., New approaches in vaccine development for parasitic infections. *Cell Microbiol* **2005**, *7*, (10), 1379-86.
- Tawk, L.; Chicanne, G.; Dubremetz, J. F.; Richard, V.; Payrastre, B.; Vial, H. J.; Roy, C.; Wengelnik, K., Phosphatidylinositol 3-phosphate, an essential lipid in Plasmodium, localizes to the food vacuole membrane and the apicoplast. *Eukaryot Cell* **2010**, *9*, (10), 1519-30.
- Taylor, S.; Barragan, A.; Su, C.; Fux, B.; Fentress, S. J.; Tang, K.; Beatty, W. L.; Hajj, H. E.; Jerome, M.; Behnke, M. S.; White, M.; Wootton, J. C.; Sibley, L. D., A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* **2006**, *314*, (5806), 1776-80.
- Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R.; Weiss, L. M., *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* **2000**, *30*, (12-13), 1217-58.
- Teo, C. F.; Zhou, X. W.; Bogyo, M.; Carruthers, V. B., Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51*, (2), 679-88.
- Tilley, L.; Sougrat, R.; Lithgow, T.; Hanssen, E., The twists and turns of Maurer's cleft trafficking in *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Traffic* **2008**, *9*, (2), 187-97.
- Tomavo, S., The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy. *Int J Parasitol* **2001**, *31*, (10), 1023-31.
- Tomley, F. M.; Soldati, D. S., Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol* **2001**, *17*, (2), 81-8.
- Tomova, C.; Humbel, B. M.; Geerts, W. J.; Entzeroth, R.; Holthuis, J. C.; Verkleij, A. J., Membrane contact sites between apicoplast and ER in *Toxoplasma gondii* revealed by electron tomography. *Traffic* **2009**, *10*, (10), 1471-80.
- Tonkin, C. J.; Roos, D. S.; McFadden, G. I., N-terminal positively charged amino acids, but not their exact position, are important for apicoplast transit peptide fidelity in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **2006**, *150*, (2), 192-200.
- Tonkin, M. L.; Grujic, O.; Pearce, M.; Crawford, J.; Boulanger, M. J., Structure of the micronemal protein 2 A/I domain from *Toxoplasma gondii*. *Protein Sci* **2010**, *19*, (10), 1985-90.
- Torpier, G.; Charif, H.; Darcy, F.; Liu, J.; Darde, M. L.; Capron, A., *Toxoplasma gondii*: differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. *Exp Parasitol* **1993**, *77*, (1), 13-22.
- Torrey, E. F.; Bartko, J. J.; Lun, Z. R.; Yolken, R. H., Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients

- with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Bull* **2007**, 33, (3), 729-36.
- Travier, L. Caractérisation des protéines de granules denses de *Toxoplasma gondii* :Etude des interactions protéiques et lipidiques et du rôle des hélices alpha-amphipatiques de GRA2. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007.
- Travier, L.; Mondragon, R.; Dubremetz, J. F.; Musset, K.; Mondragon, M.; Gonzalez, S.; Cesbron-Delauw, M. F.; Mercier, C., Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. *Int J Parasitol* **2008**, 38, (7), 757-73.
- Turetzky, J. M.; Chu, D. K.; Hajagos, B. E.; Bradley, P. J., Processing and secretion of ROP13: A unique *Toxoplasma* effector protein. *Int J Parasitol* **2010**, 40, (9), 1037-44.
- van Dooren, G. G.; Ralph, S. A., Novel vacuoles in *Toxoplasma*. *Mol Microbiol* **2010**, 76, (6), 1335-9.
- van Ooij, C.; Haldar, K., Protein export from *Plasmodium* parasites. *Cell Microbiol* **2007**, 9, (3), 573-82.
- Varkey, J.; Isas, J. M.; Mizuno, N.; Jensen, M. B.; Bhatia, V. K.; Jao, C. C.; Petrova, J.; Voss, J. C.; Stamou, D. G.; Steven, A. C.; Langen, R., Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J Biol Chem* **2010**, 285, (42), 32486-93.
- Villarino, A. V.; Stumhofer, J. S.; Saris, C. J.; Kastelein, R. A.; de Sauvage, F. J.; Hunter, C. A., IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol* **2006**, 176, (1), 237-47.
- Vinh, D. B.; Ko, D. C.; Rachubinski, R. A.; Aitchison, J. D.; Miller, S. I., Expression of the *Salmonella* spp. virulence factor SifA in yeast alters Rho1 activity on peroxisomes. *Mol Biol Cell* **2010**, 21, (20), 3567-77.
- Vivier, E.; Petitprez, A., [The outer membrane complex and its development at the time of the formation of daughter cells in *Toxoplasma gondii*]. *J Cell Biol* **1969**, 43, (2), 329-42.
- Voelker, D. R., Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends Biochem Sci* **2005**, 30, (7), 396-404.
- Voeltz, G. K.; Prinz, W. A.; Shibata, Y.; Rist, J. M.; Rapoport, T. A., A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* **2006**, 124, (3), 573-86.
- Walker, M. E.; Hjort, E. E.; Smith, S. S.; Tripathi, A.; Hornick, J. E.; Hinchcliffe, E. H.; Archer, W.; Hager, K. M., *Toxoplasma gondii* actively remodels the microtubule network in host cells. *Microbes Infect* **2008**, 10, (14-15), 1440-9.
- Waller, R. F.; McFadden, G. I., The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr Issues Mol Biol* **2005**, 7, (1), 57-79.
- Webster, J. P.; Lamberton, P. H.; Donnelly, C. A.; Torrey, E. F., Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proc Biol Sci* **2006**, 273, (1589), 1023-30.
- Weinstein, J. N.; Yoshikami, S.; Henkart, P.; Blumenthal, R.; Hagins, W. A., Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science* **1977**, 195, (4277), 489-92.
- Wetzel, D. M.; Hakansson, S.; Hu, K.; Roos, D.; Sibley, L. D., Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol Biol Cell* **2003**, 14, (2), 396-406.
- Wichroski, M. J.; Ward, G. E., Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol is essential to the survival of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* **2003**, 2, (5), 1132-6.
- Wickert H, Rohrbach P, Scherer SJ, Krohne G, Lanzer M. A putative Sec23 homologue of *Plasmodium falciparum* is located in Maurer's clefts. *Mol Biochem Parasitol.* **2003** 129(2):209-13.
- Wille, U.; Villegas, E. N.; Striepen, B.; Roos, D. S.; Hunter, C. A., Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* **2001**, 23, (6), 291-6.
- Williamson, R.; Thompson, A. J.; Abu, M.; Hye, A.; Usardi, A.; Lynham, S.; Anderton, B. H.; Hanger, D. P., Isolation of detergent resistant microdomains from cultured neurons: detergent dependent alterations in protein composition. *BMC Neurosci* **2010**, 11, 120.
- Wimley, W. C.; White, S. H., Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol* **1996**, 3, (10), 842-8.
- Xia, D.; Sanderson, S. J.; Jones, A. R.; Prieto, J. H.; Yates, J. R.; Bromley, E.; Tomley, F. M.; Lal, K.; Sinden, R. E.; Brunk, B. P.; Roos, D. S.; Wastling, J. M., The proteome of *Toxoplasma gondii*: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. *Genome Biol* **2008**, 9, (7), R116.

- Yamamoto, M.; Standley, D. M.; Takashima, S.; Saiga, H.; Okuyama, M.; Kayama, H.; Kubo, E.; Ito, H.; Takaura, M.; Matsuda, T.; Soldati-Favre, D.; Takeda, K., A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J Exp Med* **2009**, 206, (12), 2747-60.
- Yang, M.; Coppens, I.; Wormsley, S.; Baevova, P.; Hoppe, H. C.; Joiner, K. A., The *Plasmodium falciparum* Vps4 homolog mediates multivesicular body formation. *J Cell Sci* **2004**, 117, (Pt 17), 3831-8.
- Yap, G. S.; Sher, A., Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* **1999**, 201, (2), 240-7.
- Yarovinsky, F.; Zhang, D.; Andersen, J. F.; Bannenberg, G. L.; Serhan, C. N.; Hayden, M. S.; Hieny, S.; Sutterwala, F. S.; Flavell, R. A.; Ghosh, S.; Sher, A., TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **2005**, 308, (5728), 1626-9.
- Yereli, K.; Balcioglu, I. C.; Ozbilgin, A., Is *Toxoplasma gondii* a potential risk for traffic accidents in Turkey? *Forensic Sci Int* **2006**, 163, (1-2), 34-7.
- Yu, J.; Xia, Z.; Liu, Q.; Liu, J.; Ding, J.; Zhang, W., Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. *Vet Parasitol* **2007**, 143, (1), 79-85.
- Yu, L.; Ding, J. L.; Ho, B.; Wohland, T., Investigation of a novel artificial antimicrobial peptide by fluorescence correlation spectroscopy: an amphipathic cationic pattern is sufficient for selective binding to bacterial type membranes and antimicrobial activity. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1716, (1), 29-39.
- Zakharov, S. D.; Lindeberg, M.; Griko, Y.; Salamon, Z.; Tollin, G.; Prendergast, F. G.; Cramer, W. A., Membrane-bound state of the colicin E1 channel domain as an extended two-dimensional helical array. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95, (8), 4282-7.
- Zhang, X.; Mosser, D. M., Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol* **2008**, 214, (2), 161-78.
- Zhou, H.; Gu, Q.; Zhao, Q.; Zhang, J.; Cong, H.; Li, Y.; He, S., *Toxoplasma gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and GRA2 in *Pichia pastoris*. *Parasitol Res* **2007**, 100, (4), 829-35.
- Zhu, G.; Keithly, J. S.; Philippe, H., What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *Int J Syst Evol Microbiol* **2000**, 50 Pt 4, 1673-81.
- Zhu, G.; Marchewka, M. J.; Keithly, J. S., *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology* **2000**, 146 (Pt 2), 315-21.
- Zimmerberg, J.; Kozlov, M. M., How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, 7, (1), 9-19.
- Zimmermann, S.; Murray, P. J.; Heeg, K.; Dalpke, A. H., Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J Immunol* **2006**, 176, (3), 1840-7.
- Zinecker, C. F.; Striepen, B.; Tomavo, S.; Dubremetz, J. F.; Schwarz, R. T., The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. *Mol Biochem Parasitol* **1998**, 97, (1-2), 241-6.

Résumé

Le parasite intracellulaire obligatoire *Toxoplasma gondii* se développe au sein de la cellule hôte, dans une vacuole parasitophore (VP), formée très rapidement après l'invasion, à partir de constituants cellulaires et parasitaires. La VP est caractérisée par un réseau de nanotubes membranaires (RNM) formé de longs tubules membranaires de 40 à 50 nm de diamètre. Le RNM occupe l'espace vacuolaire, connecte les parasites entre eux et les connecte également à la membrane vacuolaire. La fonction du RNM est inconnue : il pourrait jouer un rôle structural et/ou trophique ; il pourrait permettre l'export de protéines parasitaires vers la membrane vacuolaire ou encore être directement lié à la virulence parasitaire. Lorsque j'ai commencé ces travaux, 3 protéines de la famille des protéines GRA (GRA2, GRA6 et GRA9) avaient été identifiées comme sécrétées dans la VP, à partir des granules denses (organites de sécrétion propres au phylum des Apicomplexa) puis ciblées aux membranes du RNM. Cette localisation membranaire est en accord avec le fait qu'elles présentent dans leur séquence, des domaines d'association membranaire (hélice alpha-hydrophobe potentiellement transmembranaire (GRA6) ou des hélices alpha-amphipatiques (ex : GRA2 et GRA9). Cependant, que ce soit dans le compartiment granulaire, avant leur sécrétion, ou après sécrétion dans la VP, les protéines GRA sont partiellement solubles. Leur fonction demeure actuellement inconnue. Néanmoins, une approche indirecte basée sur l'analyse du phénotype de parasites déficients pour l'expression de GRA2 et/ou GRA6 avait montré que ces deux 2 protéines sont indispensables à la formation du RNM. Dans le cadre global de l'étude de la VP, je me suis intéressée au RNM et aux protéines GRA qui y sont associées, en essayant de répondre à 3 questions : 1/ comment ces protéines GRA sont-elles capables d'exister dans la PV, à la fois sous un état soluble et membranaire, alors qu'elles contiennent dans leur séquence en acides aminés, des domaines d'interaction avec les membranes ; 2/ quelle est, dans la VP, la spécificité de l'adressage des protéines GRA aux membranes du RNM et 3/ sachant que GRA2 et GRA6 sont indispensables à la mise en place d'un RNM mature, quelle est leur contribution dans le processus de tubulation membranaire? 1) Mes travaux montrent que les protéines GRA maintiennent leur solubilité avant insertion dans les membranes de la VP, grâce à des interactions hydrophobes, peut être en s'associant à des lipides ou des micelles présents dans l'espace vacuolaire. Dans le cadre de la caractérisation d'une nouvelle protéine GRA associée au RNM, GRA12, j'ai de plus montré que cette protéine n'interagit pas avec GRA2 dans les membranes du RNM. 2) En prenant GRA6 pour modèle d'étude, j'ai contribué à montrer que c'est le domaine N-terminal hydrophile de la protéine qui détermine sa spécificité d'adressage au RNM. 3) L'étude *in vitro* du rôle des protéines GRA2 et GRA6 dans la biogenèse du RNM, abordée grâce à l'utilisation de liposomes, a montré que GRA2, exprimée sous forme recombinante, présente une affinité vis-à-vis de lipides particuliers, en particulier le phosphatidyl inositol (4, 5) diphosphate, avec lequel elle s'associe sans doute *via* ses hélices α -amphipatiques. GRA2 s'associe préférentiellement aux liposomes de forte courbure membranaire, à partir desquels elle génère de courts tubules membranaires. Cette déformation est accentuée en présence de GRA6 qui s'associe aux liposomes, indépendamment de leur diamètre. Ces résultats valident le rôle direct de GRA2 et GRA6 dans la formation du RNM et permettent d'envisager un modèle possible de sa formation, dans lequel GRA6 favoriserait l'assemblage de vésicules lipidiques que GRA2 fusionnerait en tubules membranaires.

Mots clés : *Toxoplasma gondii*, vacuole parasitophore, nanotubes membranaires, protéines GRA, SUVs, PI(4,5)P₂, hélice α -amphipatique

Résumés en caractères comptés

Dans la cellule hôte, *Toxoplasma gondii* se développe dans une vacuole parasitophore (VP) caractérisée par un réseau de nanotubes membranaires (RNM) dont la composition, le mécanisme de formation et la fonction sont obscures. Quelques protéines GRA, dont GRA2 et GRA6, sont sécrétées dans la VP à partir des granules denses puis ciblées au RNM. Cette localisation s'accorde avec l'hélice alpha-hydrophobe de GRA6 et les hélices alpha-amphipathiques de GRA2. Avant et après sécrétion dans la VP, les protéines GRA sont partiellement solubles. Le phénotype de parasites délétés de leur(s) gène(s) GRA2 et/ou GRA6 révèle que ces 2 protéines sont indispensables à la formation du RNM. J'ai montré 1) qu'avant leur insertion dans les membranes de la VP, la solubilité des protéines GRA est préservée grâce à des interactions hydrophobes avec peut être, des micelles de l'espace vacuolaire ; 2) que GRA12, une nouvelle protéine du RNM, n'interagit pas avec GRA2 dans ces membranes. 3) que l'adressage spécifique de GRA6 au RNM est déterminé par son domaine N-terminal hydrophile. 4) J'ai montré que GRA2 recombinante a une affinité pour le phosphatidyl inositol (4, 5) diphosphate avec lequel elle interagit *via* ses hélices α -amphipathiques. GRA2 déforme des liposomes de courbure membranaire importante pour générer de courts tubules membranaires. La tubulation est accentuée par GRA6 qui s'associe aux liposomes, quelque soit leur diamètre. Ces résultats valident le rôle direct de GRA2 et GRA6 dans la formation du RNM et laissent envisager un modèle de sa formation, dans lequel GRA6 favoriserait l'assemblage de vésicules lipidiques que GRA2 fusionnerait en tubules membranaires.

Within the host cell, *Toxoplasma gondii* multiplies in a parasitophorous vacuole (PV) characterized by a membranous nanotubular network (MNN). Its components, the mechanism of its formation and its function remain unknown. A few GRA proteins, including GRA2 and GRA6, are secreted from the dense granules into the PV and are targeted to the MNN. This location is in agreement with the hydrophobic alpha-helix predicted in GRA6 and with the GRA2 amphipathic alpha-helices. However, before and after their secretion in the PV, the GRA proteins are partially soluble. The phenotypic analysis of parasites deleted from their GRA2 and/or GRA6 gene(s) had shown that both these proteins are indispensable for MNN formation. During my thesis, I showed that before their insertion into the PV membranes, the GRA proteins solubility is preserved by establishing hydrophobic interactions, likely with micelles in the PV space. I also showed that GRA12, a novel MNN-associated protein, does not interact with GRA2 within these membranes. Using GRA6 as a model of study, I contributed to demonstrate that the GRA6 specific targeting to the MNN relies on its N-terminal hydrophilic domain. I demonstrated that recombinant GRA2 recognizes inositol (4, 5) biphosphate with which it interacts via its amphipathic alpha-helices. GRA2 deforms liposomes of steep membrane curvature into short membranous tubules. The tubulation is increased by GRA6 which associates with liposomes independently of their diameter. These results validate the direct role of both GRA2 and GRA6 in MNN formation and led us to propose a model in which GRA6 would tether vesicles, the fusion of which would be induced by GRA2.