



HAL
open science

**Développement de systèmes membranaires modèles pour
la vacuole parasitophore de *Toxoplasma
gondii*: Interactions des protéines de granules denses
(protéines GRA) avec des vésicules unilamellaires**

Pauline Ruffiot

► **To cite this version:**

Pauline Ruffiot. Développement de systèmes membranaires modèles pour la vacuole parasitophore de *Toxoplasma gondii*: Interactions des protéines de granules denses (protéines GRA) avec des vésicules unilamellaires. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00177965

HAL Id: tel-00177965

<https://theses.hal.science/tel-00177965>

Submitted on 9 Oct 2007

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.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER — GRENOBLE I
LABORATOIRE DE SPECTROMÉTRIE PHYSIQUE



Thèse

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Physique

Présentée par

Pauline RUFFIOT

**Développement de systèmes membranaires modèles
pour la vacuole parasitophore de *Toxoplasma gondii* :**
**Interactions des protéines de granules denses (protéines GRA)
avec des vésicules unilamellaires**

Soutenue publiquement le 11 juillet 2007 devant le jury composé de

Bertrand FOURCADE

Président du jury

Patricia BASSEREAU

Rapporteur

Jean-François DUBREMETZ

Rapporteur

Marie-France CESBRON-DELAUW

Directrice de thèse

Antoine DELON

Directeur de thèse

Annie VIALLAT

Examinatrice

Remerciements

Je remercie tout d'abord Marie-France Cesbron-Delauw et Antoine Delon qui m'ont permis de faire cette thèse, en m'accueillant au sein de leurs laboratoires et équipes. J'ai grâce à eux pu réaliser tout mon travail de thèse de manière très flexible, entre les deux laboratoires, Laboratoire de Pathogénie et Adaptation des Micro-Organismes (UMR5163 CNRS-Université Joseph Fourier, Grenoble I) et Laboratoire de Spectrométrie Physique (UMR5588 CNRS-Université Joseph Fourier, Grenoble I).

Je remercie ensuite tous les membres du jury de soutenance, en particulier Patricia Bassereau et Jean-François Dubremetz qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs ; Annie Viallat a participé au jury en tant qu'examinatrice, et a également joué un rôle important pour le démarrage de ce travail ; enfin Bertrand Fourcade a accepté de présider ce jury.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et qui m'ont apporté leur aide, au LAPM, au LSP, mais aussi au Laboratoire Plastiques et Différenciation Cellulaire ; toutes ces personnes sont mentionnées dans les chapitres de résultats.

Je tiens enfin à remercier particulièrement Corinne Mercier, qui a été en quelque sorte ma tutrice au LAPM : elle m'a initiée à la biologie en général, et surtout à la parasitologie, tant sur le plan théorique que sur le plan expérimental. Son soutien tout au long de ma thèse m'a permis de prendre le virage délicat de la physique vers la biologie.

Table des matières

Avant-propos	1
Introduction	5
1 La vacuole parasitophore de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> : contexte et intérêt de l'étude.	5
1.1.1 Cycle parasitaire de <i>T. gondii</i>	6
1.1.2 Pathogénicité	8
1.1.3 Prévalence de la toxoplasmose	9
1.1.4 Une seule espèce mais des souches de virulence variable	9
1.1.5 Enjeux de la recherche actuelle sur <i>T. gondii</i>	10
1.1.6 <i>T. gondii</i> : l'Apicomplexa modèle	11
1.2 Biogénèse de la vacuole parasitophore	11
1.2.1 <i>T. gondii</i> : un parasite intracellulaire obligatoire	12
1.2.2 Invasion de la cellule-hôte	13
1.2.3 Maturation de la VP : sécrétion des granules denses.	15
1.2.4 Réplication et évasion	17
1.3 Les protéines de granules denses	20
1.3.1 Une voie de sécrétion complexe	20
1.3.2 Caractérisation moléculaire des protéines GRA	21
1.3.3 Protéines homologues à des protéines eucaryotes	24
1.3.4 Des protéines fortement immunogènes	25
1.4 Protéines GRA et VP	26
1.4.1 Evolution au cours de l'invasion	26
1.4.2 La membrane délimitante de la vacuole (PVM), ses extensions internes (HOSTs) et externes (PVEs)	29
1.4.3 Structures internes de la VP : RNM et corps résiduel	31
1.4.4 Régulation des protéines GRA aux différents stades parasitaires	33
1.4.5 Conclusion : Rôles des protéines GRA	34
2 Problématiques	37
2.1 Solubilisation de protéines de membrane	38

2.1.1	Trafic individuel : repliement	38
2.1.2	Trafic en complexe : protection par des cofacteurs	39
2.2	Mécanismes d'insertion membranaire	40
2.2.1	Critère premier pour l'insertion d'un segment transmembranaire	40
2.2.2	Insertion assistée	40
2.2.3	Insertion spontanée	42
2.2.4	Stabilisation des protéines après insertion	43
2.3	Génération et maintien de courbures membranaires	44
2.3.1	Genèse de la courbure membranaire	44
2.3.2	Courbure générée par mécanisme de courbure spontanée locale	46
2.3.3	Courbure générée par mécanisme de charpentage	47
2.3.4	Rôles du cytosquelette	49
2.3.5	Synergie des mécanismes évoqués	51
3	Stratégie	53
3.1	Membranes-modèles	53
3.1.1	Les différents types de membranes-modèles	55
3.1.2	Applications	56
3.2	Les protéines GRA : état des compétences	57
3.2.1	Fractions ultrasolubles	57
3.2.2	Protéines recombinantes	58
3.2.3	Anticorps disponibles	58
3.3	Stratégie générale	59
3.3.1	Approche biochimique	59
3.3.2	Approche par microscopie de fluorescence	60
	Résultats	63
4	Etude biochimique du système modèle	63
4.1	Le système modèle : Protéines GRA et SUVs	63
4.1.1	Préparation de petites vésicules unilamellaires (SUVs)	63
4.1.2	Production d'extraits contenant les protéines GRA	64
4.2	Protéines GRA sécrétées <i>in vitro</i>	68
4.2.1	Expérience préliminaire : "Binding assay"	68
4.2.2	Solubilité des protéines GRA	70
4.2.3	Etude des protéines GRA par séparation isopycnique	72
4.2.4	Rôle des lipides du sérum	77
4.2.5	Association aux membranes	79
4.2.6	Conclusion générale	82
4.3	Protéines GRA granulaires et vacuolaires	83
4.3.1	Solubilité des protéines GRA des fractions HssTx et HssVac	83

4.3.2	Séparation isopycnique	84
4.3.3	Association aux membranes	88
4.3.4	Conclusion générale : Evolution des caractéristiques des protéines GRA au cours de leur trafic sécrétoire	93
4.4	Interactions membranaires des protéines GRA	94
4.4.1	Influence de la composition lipidique : SUVs HeLa et SUVs EPC	95
4.4.2	Mode d'association	97
4.4.3	Identification de partenaires lipidiques spécifiques	99
4.4.4	Conclusion générale : Interactions membranaires des protéines GRA	102
5	Etude par microscopie de fluorescence	105
5.1	Principe général de l'étude	106
5.1.1	Protocole général pour l'ImmunoFluorescence (IF) indirecte	106
5.1.2	Choix expérimentaux	106
5.2	Développement de la méthode d'IF sur GUVs	109
5.2.1	Contraintes expérimentales propres à notre système	109
5.2.2	Méthodes envisagées	111
5.2.3	Solution retenue : Chambre d'électroformation à flux	114
5.3	IF sur les protéines GRA associées aux GUVs	116
5.3.1	Mode opératoire	116
5.3.2	Contrôles préliminaires	119
5.3.3	Association des protéines GRA2 et GRA6 de HssEs aux GUVs HeLa	122
5.3.4	Association de la protéine GRA7 de HssEs aux GUVs HeLa	124
5.3.5	Association de la protéine GRA3 de HssEs aux GUVs HeLa	126
5.3.6	Association des protéines GRA de HssVac aux GUVs HeLa	126
5.3.7	Conclusion : Association des protéines GRA aux GUVs HeLa	129
5.4	Déformations des GUVs en présence des protéines GRA	130
5.4.1	Suivi des incubations des GUVs HeLa avec la fraction HssEs	131
5.4.2	Structures de surface des GUVs	133
5.4.3	Structures internes	135
5.4.4	Réseau de fils membranaires	136
5.4.5	Conclusion : Déformations membranaires	138
5.5	Conclusion générale	139
	Discussion	143
6	Bilan et perspectives	143
6.1	Bilan des résultats	143
6.1.1	Formes solubles des protéines GRA	143
6.1.2	Association spontanée des protéines GRA à des membranes-modèles	144
6.1.3	Localisation des protéines GRA associées à des membranes	145

6.2	Protéines GRA en solution	146
6.2.1	Dans les granules denses : complexes ou agrégats ?	147
6.2.2	Après sécrétion	147
6.2.3	Scénario potentiel du trafic des protéines GRA dse granules denses à leurs membranes-cibles	148
6.3	Affinités membranaires des protéines GRA	149
6.3.1	Insertion spontanée ?	149
6.3.2	Ségrégation ou agrégation	149
6.3.3	Mécanismes potentiels de ciblage de protéines GRA aux membranes de la vacuole	150
6.4	Protéines GRA et déformations membranaires	151
6.4.1	Le point sur une protéine des HOSTs : GRA7	151
6.4.2	Le point sur les protéines du RNM : GRA2 et GRA6	153
6.4.3	Le point sur une protéine de la PVM : GRA3	153
6.5	Poursuites possibles	154
6.5.1	Comportement des protéines GRA en solution	154
6.5.2	Comportement des protéines GRA en membrane	155
6.6	Conclusion	156
A	Matériel et méthodes	157
A.1	Matériel	157
A.1.1	Souches de toxoplasmes	157
A.1.2	Souches cellulaires	157
A.1.3	Anticorps	157
A.1.4	Protéines purifiées	157
A.1.5	Lipides commerciaux	159
A.2	Méthodes de biologie cellulaire	159
A.2.1	Culture et stockage des tapis cellulaires et des parasites	159
A.2.2	Préparation de protéines ultrasolubles de granules denses (HssTx) : Fractionnement de parasites	159
A.2.3	Préparation de protéines sécrétées ultrasolubles (HssEs) : Sécrétion <i>in vitro</i> des protéines granulaires	159
A.2.4	Préparation de protéines vacuolaires ultrasolubles (HssVac) : Fractionnement de cellules infectées	160
A.2.5	Extraction de lipides cellulaires	160
A.3	Préparation de membranes-modèles : SUVs et GUVs	160
A.3.1	Conservation des lipides	160
A.3.2	Choix des solutions de formation	161
A.3.3	Electroformation des GUVs	161
A.3.4	Préparation de SUVs	162
A.4	Méthodes de biochimie	163

A.4.1	Effets des incubations : Fractionnement et Binding assay	163
A.4.2	Extractions Urée et NP40	163
A.4.3	Séparation isopycnique	163
A.4.4	SDS-PAGE et détection des protéines par immunoblot	164
A.4.5	Analyses par Dot Blot	165
A.4.6	Superposition protéines/lipides	165
A.5	Méthodes de microscopie optique	165
A.5.1	Immunomarquage des protéines GRA associées aux GUVs	165
A.5.2	Observation par microscopie de fluorescence	166
A.5.3	Observation par microscopie à contraste de phase	166

Liste des abréviations

DG	Granule dense
FCS	Spectroscopie à corrélation de fluorescence
GRA	Famille des protéines de granules denses
GUV	Vésicule unilamellaire géante
HOST	Tubules de séquestration d'organites de la cellule-hôte
HSP	Culot de centrifugation haute vitesse
HSS	Surnageant de centrifugation haute vitesse
HssEs	Fraction ultrasoluble sécrétée <i>in vitro</i>
HssTx	Fraction ultrasoluble de parasites extracellulaires
HssVac	Fraction ultrasoluble de cellules infectées
IF	Immunofluorescence
KOGRAn	Parasite mutant n'exprimant pas la protéine GRAn
LSP	Culot de centrifugation basse vitesse
LSS	Suranageant de centrifugation basse vitesse
PVE	Extensions de la membrane de la vacuole parasitophore
PVM	Membrane délimitante de la vacuole parasitophore
RB	Corps résiduel
RE	Reticulum endoplasmique
RNM	Réseau de nanotubes membranaires
SUV	Petite vésicule unilamellaire
TEM	Microscopie électronique à transmission
TMD	Domaine transmembranaire
VP	Vacuole parasitophore

Avant-propos

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire qui se développe au sein d'un compartiment spécialisé, la vacuole parasitophore. Ce compartiment est indispensable à sa prolifération car il tient lieu d'interface entre le parasite et la cellule-hôte, de qui il dépend pour un certain nombre d'éléments vitaux (acides aminés, acides gras, acides nucléiques). Le développement de ce compartiment est orchestré par la sécrétion minutée de différentes familles de protéines inhabituelles chez les eucaryotes. En particulier, les protéines GRA sont sécrétées dans la vacuole juste après sa formation. La famille des protéines GRA regroupe une dizaine de protéines de fonction inconnue mais qui sont localisées, pour la plupart, aux structures membranaires internes à la vacuole : un rôle dans la biogénèse de ces structures est envisagé pour certaines d'entre elles. Ces protéines, bien que membranaires, existent sous une forme soluble jusqu'à leur contact avec leurs membrane-cibles. Cette caractéristique inhabituelle met en lumière la possibilité d'étudier leurs interactions membranaires dans le cadre de membranes-modèles.

L'objectif de ma thèse a été de développer un système d'étude *in vitro* mimant la vacuole parasitophore de *T. gondii*. Ce système modèle doit permettre la caractérisation des interactions membranaires des protéines GRA. Dans ce but, un projet multidisciplinaire a été élaboré entre des biologistes, spécialistes en parasitologie, et des physiciens, spécialistes en physique des vésicules géantes et en méthodes de spectroscopie. L'idée initiale de ce projet est l'utilisation de membranes-modèles, en particulier de vésicules géantes unilamellaires (GUVs), pour suivre les interactions membranaires des protéines GRA. Autour de cette ligne directrice s'est développé tout un travail de caractérisation biochimique des protéines GRA au cours de leur trafic hors du parasite et de leurs capacités d'association membranaire. Le travail réalisé a donc des caractéristiques mixtes, impliquant à la fois un travail fondamental en biochimie et le développement d'une approche d'interface, permettant l'implication de physiciens au projet.

Dans une première partie, une introduction présentera le contexte biologique de l'étude, le parasite *T. gondii* au sein de la vacuole parasitophore, puis les caractéristiques moléculaires des protéines GRA et leurs rôles possibles dans les membranes de la vacuole. Une recherche bibliographique précisera les problématiques abordées et leur place dans le champ actuellement très actif de l'étude des interactions protéine-membrane. Cela m'amènera à décrire la stratégie mise en place afin d'aborder les questions soulevées : comment les protéines GRA sont-elles solubilisées avant d'atteindre leurs membranes-cibles ? Par quel processus s'insèrent-elles dans les membranes-modèles ? Ont-elles un effet de déformation sur les membranes-modèles ? Des éléments de réponse et des pistes d'étude

seront apportés par deux volets expérimentaux, basés sur la reconstitution *in vitro* de ces processus : l'un basé sur l'utilisation de petites vésicules unilamellaires (SUVs) et l'analyse biochimique des interactions protéines GRA-membranes, l'autre sur l'utilisation de vésicules géantes et la détection par fluorescence des protéines GRA associées. Les apports au sujet biologique, ainsi que les enjeux générés pour les physiciens d'interface, seront discutés dans un bilan général recoupant les données des divers volets de cette étude.

Introduction

Chapitre 1

La vacuole parasitophore de *Toxoplasma gondii*

L'objectif de ce chapitre est de décrire l'arrière-plan biologique du travail réalisé durant ma thèse. Nous allons découvrir les caractéristiques principales du parasite intracellulaire *T. gondii* et du compartiment spécialisé dans lequel il se développe, la vacuole parasitophore (VP), qui constitue le modèle biologique de ce travail. Une fois ces informations présentées, nous pourrions aborder la description des protéines GRA et de leur relation avec les structures membranaires et les fonctions de la VP.

1.1 *Toxoplasma gondii* : contexte et intérêt de l'étude.

Toxoplasma gondii est un protozoaire du phylum Apicomplexa, qui inclut de nombreux pathogènes d'importance médicale ou vétérinaire, parmi lesquels *Plasmodium falciparum*, responsable de la malaria chez l'humain et *Eimeria tenella*, responsable de coccidioses chez les aviaires (Fig.1.1). Les Apicomplexa sont des parasites intracellulaires obligatoires : ils doivent vivre à l'intérieur d'une cellule pour survivre. Une fois le parasite installé dans une cellule-hôte, celle-ci lui assure de larges ressources en nutriments, qu'il ne pourrait pas obtenir en quantité suffisante du milieu extracellulaire, ainsi qu'une protection contre le système immunitaire de l'hôte.

Alors que la plupart des Apicomplexa ont une gamme restreinte d'hôtes, *Toxoplasma gondii* est remarquable car il peut infecter n'importe quel mammifère ou oiseau, chez lesquels il provoque la toxoplasmose ; il peut par ailleurs infecter tous les types de cellules *in vitro*.

Les données sur le toxoplasme et son épidémiologie ont été acquises très progressivement : le parasite a été d'abord découvert uniquement sous sa forme infectieuse dans les tissus d'un rongeur (*Ctenodactylus gondii*) en Tunisie [Nicolle & Monceaux, 1908] et simultanément au Brésil chez un lapin [Splendore, 1909]. Toutes notions concernant son cycle biologique ou son importance en pathologie humaine et animale sont alors inconnues. Il faut attendre les années 1920-1930 pour voir apparaître les premières descriptions de cas de toxoplasmose humaine. C'est la mise au point des premiers tests sérologiques dans les années 1940 qui a permis de révéler l'importance de la pré-

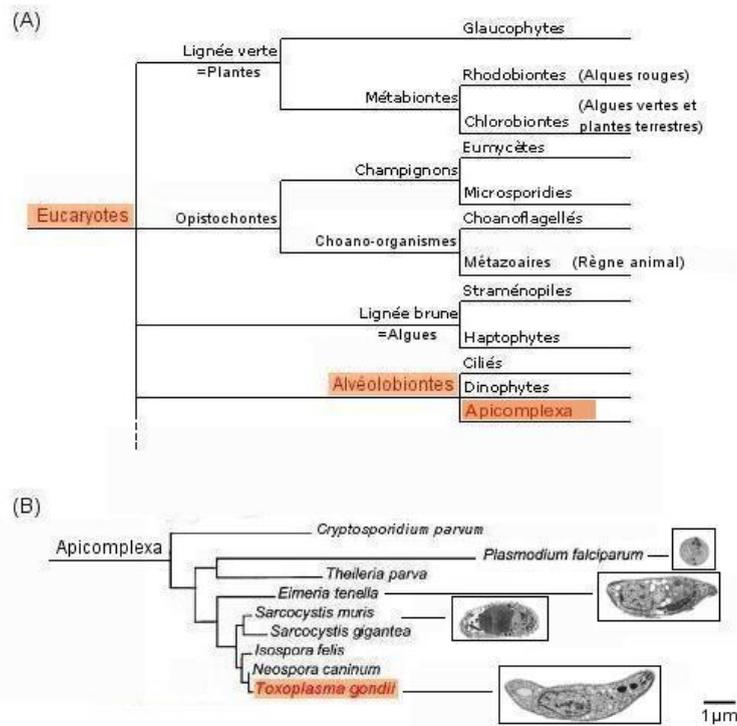


FIG. 1.1: Classification phylogénétique de *T. gondii*. (A) Classification du phylum des Apicomplexa, ou Apicomplexés, parmi les Eucaryotes, d'après [Lecointre & LeGuyader, 2001]. (B) Quelques espèces Apicomplexa, d'après [Zhu et al., 2000]. Les images de microscopie électronique proviennent du site <http://morrissetlab.bio.uci.edu>.

valence de la toxoplasmose humaine. Le cycle de ce parasite et la compréhension des modes de transmission n'a eu lieu qu'au cours des années 1970 [Dubey & Frenkel, 1973].

Je vais tout d'abord décrire le cycle parasitaire de *T. gondii* puis sa pathogénicité, sa prévalence, les différentes souches parasitaires et enfin, l'intérêt et les enjeux actuels de ce système biologique en recherche.

1.1.1 Cycle parasitaire de *T. gondii*

T. gondii ne peut se multiplier de manière sexuée que chez les Félidés, qui constituent ainsi ses hôtes définitifs, bien qu'il puisse infecter tous les animaux homéothermes, dénommés hôtes intermédiaires. Le toxoplasme a un cycle complexe qui implique la transmission entre hôtes par des stades spécialisés pour l'invasion (Fig. 1.2) :

- le stade tachyzoïte, forme proliférative infectieuse chez l'hôte intermédiaire, se développe dans des vacuoles transitoires qui peuvent contenir jusqu'à 128 parasites ;
- le stade bradyzoïte, chez l'hôte intermédiaire, est contenu dans des kystes intracellulaires qui mesurent environ 100 µm de diamètre et contiennent plusieurs milliers de parasites ;
- le stade mérozoïte, chez l'hôte définitif, est le seul stade capable de reproduction sexuée ;
- le stade sporozoïte, résultat de la reproduction sexuée chez l'hôte définitif, est libéré dans l'environnement avec les excréments du chat dans des oocystes de 10 à 15 µm de diamètre qui contiennent 8

sporozoïtes.

Les stades sporozoïte et bradyzoïte correspondent à des formes de résistance et de dissémination du parasite car les kystes et les oocystes protègent dans une certaine mesure, les parasites qu'ils contiennent des variations de température, de pH, etc.. *T. gondii* peut alterner entre ces stades en fonction de son hôte et de son contexte, par un processus de différenciation.

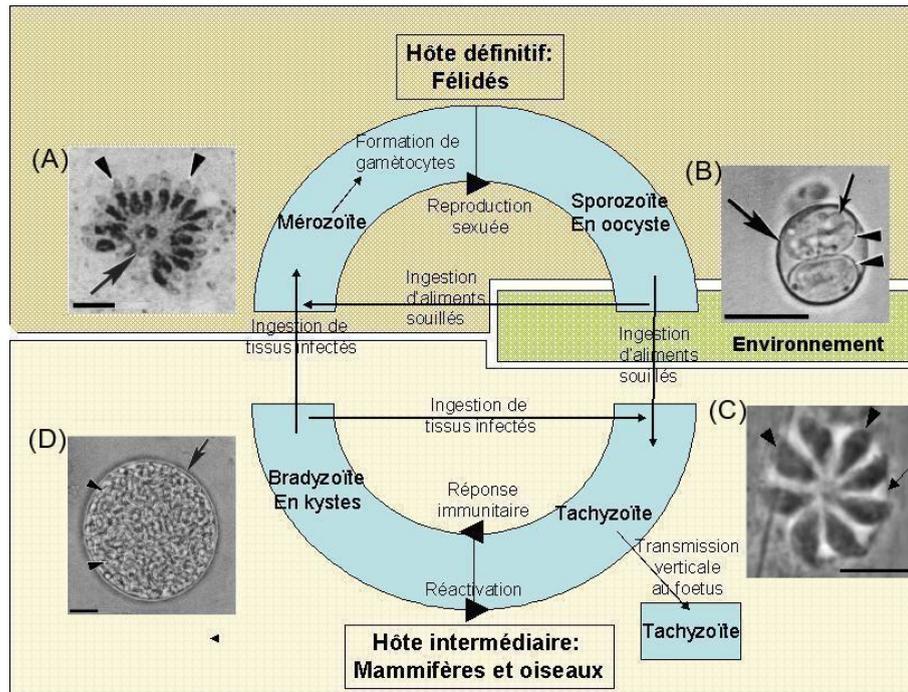


FIG. 1.2: Cycle vital de *T. gondii*. (A) Mérozoïtes (têtes de flèches) contenus dans une vacuole transitoire (flèche). (B) Sporozoïtes (têtes de flèches) contenus dans un oocyste, dont la paroi est indiquée par une flèche. (C) Tachyzoïtes (têtes de flèches) contenus dans une vacuole parasitophore (flèche). (D) Bradyzoïtes (têtes de flèches) contenus dans un kyste à paroi épaisse (flèche). Les images A,B,D sont tirées de [Hill & Dubey, 2002], et l'image C du site <http://morrissettelab.bio.uci.edu>. Barres 10 μm .

La transmission de *Toxoplasma gondii* à un nouvel hôte peut avoir lieu 1) par ingestion de tissus infectés contenant des kystes, 2) par ingestion d'oocystes libérés dans l'environnement ou 3) verticalement, de la mère au fœtus.

Chez l'hôte intermédiaire, des kystes ou oocystes ingérés se rompent en passant dans le tube digestif et libèrent les parasites qui se redifférencient en tachyzoïtes. Ceux-ci envahissent les cellules et s'y multiplient rapidement, en particulier dans les macrophages¹, déclenchant une phase sanguine de dissémination : l'hôte développe la toxoplasmose. Les cellules envahies sont lysées après un certain nombre de cycles de réplication, relâchant des parasites qui réenvahissent de nouvelles cellules.

La réponse immunitaire de l'hôte restreint ensuite la dissémination des tachyzoïtes mais le parasite persiste à vie, sous forme latente, enkysté dans les cellules où la réponse immunitaire est la plus faible (cellules nerveuses, rétiennes et musculaires). Il semble qu'il y ait périodiquement une réactivation spontanée des parasites enkystés qui se redifférencient en tachyzoïtes, dont la dissé-

¹Les macrophages sont des cellules de l'immunité infiltrant les tissus. Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes.

mination est normalement réprimée par la réponse immunitaire. Un équilibre entre réactivation et enkystement se met en place, contrôlé par le système immunitaire de l'hôte.

1.1.2 Pathogénicité

L'infection par *T. gondii* présente deux phases : une phase aigue lors de la primo-infection (forme tachyzoïte proliférative) qui est endiguée par la réponse immunitaire de l'hôte et est généralement bénigne, suivie d'une phase chronique asymptomatique (forme bradyzoïte enkystée) qui provoque peu d'effets connus et stimule une immunité protectrice contre une réinfection [Yap & Sher, 1999]. Les lésions observées au cours de la toxoplasmose sont directement liées à la prolifération des tachyzoïtes et à la lyse des cellules qu'ils infectent. Les kystes, contenant des bradyzoïtes, n'entraînent pas directement de lésions tissulaires mais sont susceptibles de réactiver à la faveur d'un déficit immunitaire. Des études récentes relient aussi l'infection par *T. gondii* au déclenchement de troubles neurologiques, en particulier la schizophrénie. Ces troubles pourraient être dus à la capacité de *T. gondii* d'établir une infection permanente dans le système nerveux central sous forme enkystée [Webster et al., 2006]. Certaines données suggèrent plus généralement que *T. gondii* modifierait le comportement de l'hôte parasité : prédation facilitée du rat infecté, allongement du temps de réaction chez l'homme infecté [Webster, 2001].

Formes graves de la toxoplasmose

La toxoplasmose est habituellement bénigne mais c'est une affection redoutable chez les sujets fragiles, dont la réponse immunitaire ne peut pas endiguer la dissémination des parasites. Dans ce cas, la réactivation des parasites dans le cerveau, les yeux, les muscles, peut provoquer des lésions dramatiques. La transmission ou le développement de formes graves ne sont pas systématiques et semblent dépendre de nombreux facteurs, dépendant de l'hôte, du parasite et de l'environnement.

- Système immunitaire immature : infection pendant la grossesse.

L'infection par le toxoplasme peut être responsable de graves malformations foetales, si la primo-infection de la mère a lieu pendant la grossesse car le parasite est capable de passer la barrière placentaire et peut donc être transmis au fœtus [Remington & Desmonts, 1983]. La gravité des manifestations (choriorétinites, atteintes cérébrales), peut aller jusqu'à l'avortement spontané, selon le stade de la grossesse au cours duquel l'infection se produit. Cette forme congénitale de la toxoplasmose reste un problème majeur de santé dans les pays développés [Rorman et al., 2006]. C'est aussi un problème vétérinaire important, car la toxoplasmose congénitale est responsable de très nombreux cas d'avortements spontanés dans les élevages ovins et caprins.

- Système immunitaire déficient : réactivation chez des personnes sous chimiothérapie, traitement immuno-dépresseur ou atteintes par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

T. gondii est un des pathogènes opportunistes majeurs chez les sujets immuno-déficients [Kasper & Buzoni-Gatel, 1998]. Les parasites enkystés, en particulier ceux du système nerveux, peuvent se réactiver, suite à une déficience du système immunitaire et à la rupture de l'équilibre

entre enkystement et réactivation. Ces réactivations provoquent une encéphalite, mortelle si elle n'est pas rapidement traitée. [Luft et al., 1984].

1.1.3 Prévalence de la toxoplasmose

Au vu de la vaste prévalence² d'infections chroniques, les troubles liés à *T. gondii* représentent un enjeu de santé important dans de nombreux pays. La toxoplasmose est probablement la parasitose la plus répandue, avec une séroprévalence variable d'un pays à l'autre (de 7 à 80 %) et parfois à l'intérieur d'un même pays [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. Les données disponibles viennent donc généralement des diagnostics prénataux, qui ne sont systématiques qu'en France, en Autriche, en Belgique, en Suisse et en Suède. Les statistiques obtenues sont donc à considérer avec précaution.

Les prévalences inférieures à 30 % s'observent principalement en Amérique du Nord, en Grande-Bretagne, en Scandinavie et en Asie du Sud-Est. Les prévalences supérieures à 60 % s'observent principalement en Afrique et en Amérique Latine. En France, la séroprévalence a longtemps été élevée (82% en 1960, 66% en 1982), mais elle a diminué régulièrement depuis 40 ans pour atteindre 54% en 1995 et 44% en 2003, avec des variations régionales encore mal expliquées [Afssa, 2006]. Les conditions climatiques mais aussi d'autres facteurs de risques liés aux modes de vie et à l'alimentation ont été évoqués pour expliquer ces variations.

En France, 2700 nouvelles infections surviennent chaque année chez les femmes enceintes. Il est estimé que 600 enfants naissent avec une toxoplasmose congénitale chaque année (soit environ 1 naissance sur 100), dont 175 auront des séquelles. Chez les patients développant un SIDA, le nombre de cas déclarés de toxoplasmose est environ de 200 par an, après avoir sensiblement diminué entre 1992 (800 cas) et 1997 (250 cas) avec l'avènement des trithérapies. La prévention de la toxoplasmose est une priorité du programme d'action de l'Institut de Veille Sanitaire [Afssa, 2006].

On peut ajouter que sur le plan de l'industrie agricole, la prévalence est également élevée de manière générale (supérieure à 50% en France pour le bétail). Le taux élevé d'avortements spontanés liés à la toxoplasmose dans les élevages ovins et caprins a des conséquences économiques importantes [Buxton, 1998].

1.1.4 Une seule espèce mais des souches de virulence variable

Bien qu'une seule espèce, *T. gondii*, soit décrite au sein du genre *Toxoplasma*, plus de 200 isolats ou souches ont bénéficié à ce jour d'analyses génotypiques. La pathogénicité des souches est définie par l'étude de la virulence chez la souris : détermination des DL50 et DL100, doses de

²La prévalence est une mesure de l'état de santé d'une population donnée vis-à-vis d'une affection. Elle est calculée en rapportant à la population totale le nombre de cas de maladies présentes à un moment donné dans cette population.

parasites minimales entraînant la mort de 50% ou de 100% des souris infectées.

La plupart des isolats analysés (95%) sont généralement regroupés en 3 génotypes principaux (types I, II et III) en fonction de leur virulence [Howe & Sibley, 1995, Howe et al., 1996]. Ces souches diffèrent très peu génétiquement (moins de 1%). Le génotype I est très virulent (e.g. souche RH) : la DL100 est de 1 ou 2 parasites. Les génotypes II (e.g. souche Prugniaud) et III (e.g. souche C) sont avirulents ou de virulence intermédiaire ($DL_{50} \geq 10^3$). La souche RH, que j'ai utilisé au cours de ma thèse, a été isolée par Sabin en 1941, à partir d'un cas d'encéphalite humaine aigue [Sabin, 1941]. C'est l'une des souches les plus virulentes mais aussi des mieux caractérisées : une souris infectée par un parasite meurt en moins de 15 jours [Howe et al., 1996].

1.1.5 Enjeux de la recherche actuelle sur *T. gondii*

Développement de vaccins et de traitements

Au vu de la forte prévalence de la toxoplasmose humaine ainsi qu'animale, la mise au point de vaccins ou traitements contre la toxoplasmose est actuellement un enjeu fort. Dans les dernières années, un progrès significatif a été réalisé dans l'identification de molécules induisant une réponse immunitaire protectrice et pouvant donc être considérées comme des candidats vaccinaux. Ces molécules sont surtout des antigènes de surface ainsi que des antigènes sécrétés par *T. gondii*. Ces candidats, seuls ou en cocktail, en sont au stade expérimental sur des modèles animaux. Certains ont démontré une protection significative [Bout et al., 2002, Tarleton, 2005]. Un vaccin commercial (Toxovac®, AgVax Developments Ltd.) basé sur l'infection par une forme atténuée de tachyzoïtes *T. gondii* est employé avec succès contre l'infection congénitale chez la brebis [Buxton & Innes, 1995] mais la vaccination par des parasites vivants atténués ne peut pas être envisagée pour l'homme, en particulier à cause des risques de réactivation potentiels.

Il existe des traitements permettant d'éliminer les tachyzoïtes, limitant ainsi leur dissémination, mais ces traitements n'ont pas d'effet les kystes. Il faut donc des thérapies à long terme, en prévention des réactivations. Les traitements les plus courants combinent l'action d'un antibiotique (e.g. la sulfonamide) et d'inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique (e.g. la pyriméthamine qui a un effet parasiticide sur les tachyzoïtes de *T. gondii* à de très faibles concentrations) [Tenant-Flowers et al., 1991]. Cependant ces inhibiteurs agissent également sur la synthèse de l'acide folique de l'hôte³, et sont donc interdits chez la femme enceinte.

Récemment, la découverte chez *T. gondii* d'un organite d'origine végétale spécifique des Apicomplexa, l'apicoplaste, a ouvert de nouvelles voies de recherche pharmacologique (herbicides) mais aucune des nouvelles molécules actives sur ces voies métaboliques n'a encore franchi le cap des études expérimentales [Bisanz et al., 2007, Mazumdar et al., 2006].

³L'acide folique est nécessaire à la synthèse d'acides nucléiques.

1.1.6 *T. gondii* : l'Apicomplexa modèle

En plus des enjeux médicaux et économiques forts concernant directement *T. gondii*, ce parasite émerge comme un modèle expérimental précieux pour l'étude du parasitisme intracellulaire. En effet, *T. gondii* remplit plusieurs critères essentiels pour ce rôle :

- la forme tachyzoïte est facilement cultivée *in vitro* car le parasite est capable d'envahir et de se multiplier dans de nombreux types cellulaires ;
- le génome de *T. gondii* est complètement séquencé et en cours d'assemblage (ToxoDataBase : <http://www.toxodb.org>) ;
- les transfections⁴ transitoires et stables sont possibles ; en particulier la création de parasites "knock-out" (KO)⁵ permettant l'arrêt de l'expression d'un gène en réponse à un agent chimique peut être réalisée ;
- des modèles animaux (souris, rats) respectivement sensibles ou résistants à l'infection par *T. gondii* sont identifiés.

Malgré des différences importantes de biologie cellulaire et de métabolisme au sein du genre Apicomplexa, *T. gondii* s'impose donc comme un modèle crucial pour comprendre la biologie des Apicomplexa, en particulier pour l'étude du mécanisme d'invasion et le développement de drogues anti-parasitaires [Kim, 2004].

Contexte du sujet : le parasite intracellulaire *T. gondii*

T. gondii est un protozoaire intracellulaire appartenant au phylum des Apicomplexa. La toxoplasmose, due à ce parasite, est une des infections parasitaires les plus répandues : il est estimé qu'environ 50% de la population adulte mondiale est infectée. La gravité de cette infection est liée d'une part, au risque de transmission foetale du parasite en cas de contamination en cours de grossesse et d'autre part, au risque différé de réactivation d'une infection antérieurement acquise, sous l'effet d'une immunodépression. Le manque de vaccins ou de traitement éradiquant l'infection en fait l'une des priorités des programmes de veille sanitaire.

1.2 Biogénèse de la vacuole parasitophore

L'invasion d'une cellule-hôte est un événement essentiel pour le tachyzoïte car il ne peut se développer et proliférer qu'intracellulairement, au sein de la vacuole parasitophore (VP). En effet il exploite les ressources de la cellule-hôte pour certains de ses besoins fondamentaux : je présenterai la nature de ces échanges entre le parasite et la cellule-hôte. Afin de comprendre la nature de ce compartiment particulier, il est nécessaire de connaître le cycle intracellulaire du parasite, et

⁴Introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes.

⁵Délétion d'un gène.

les relations qu'il entretient avec la cellule-hôte. Le cycle intracellulaire de *T. gondii*, à partir de l'invasion jusqu'à l'évasion d'une cellule-hôte, dure environ 48h. Ce cycle présente trois phases principales. La VP est tout d'abord formée lors de l'invasion de la cellule-hôte, puis mûrie après l'entrée complète du parasite. Ceux-ci vont alors s'y multiplier, jusqu'à encombrement de la cellule, et éventuellement la lyser pour ré-envahir de nouvelles cellules (Fig.1.3) [Black & Boothroyd, 2000, Lebrun et al., 2007].

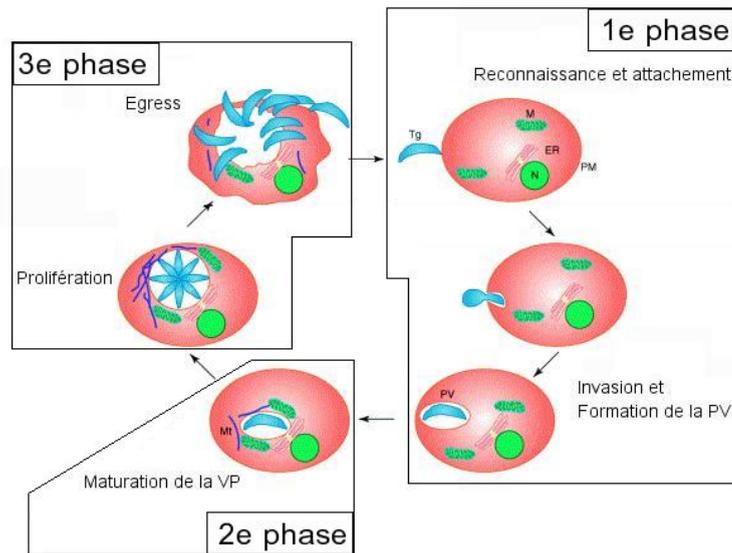


FIG. 1.3: Cycle de prolifération de *T. gondii*. D'après [Hoff & Carruthers, 2002].

La mise en place de la vacuole implique la sécrétion orchestrée de protéines stockées dans des organites spécifiques aux Apicomplexa : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses (Fig.1.4 A). Cette cascade de sécrétion régulée apparaît extrêmement complexe et sophistiquée [Dubremetz et al., 1993, Carruthers, 1999]. Ainsi, les protéines sécrétées par *T. gondii* sont fonctionnellement compartimentées de manière à leur permettre d'être déployées précisément au moment où elles sont nécessaires et délivrées en des emplacements spécifiques où elles peuvent remplir leurs fonctions :

- décharge des micronèmes et du cou des rhoptries au moment de l'attachement apical ;
- extrusion des rhoptries durant la formation de la VP ;
- exocytose des DGs lors de la maturation de la VP.

1.2.1 *T. gondii* : un parasite intracellulaire obligatoire

T. gondii est autonome pour la plupart de ses besoins de synthèse et de transport mais il est obligatoirement intracellulaire car il dépend de la cellule-hôte pour un certain nombre de nutriments essentiels pour lesquels il ne dispose pas de voie métabolique propre.

Comme toute cellule eucaryote, *T. gondii* possède toute la machinerie nécessaire à la synthèse et au transport de protéines. Ceci comprend un noyau, un reticulum endoplasmique (ER) périnucléaire

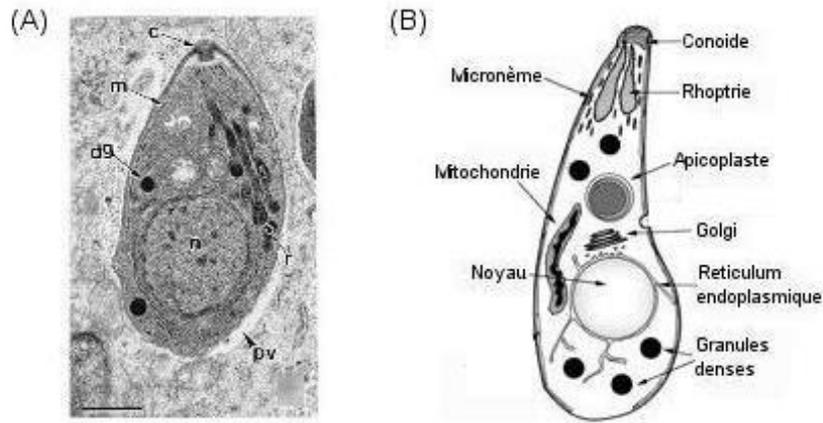


FIG. 1.4: Ultrastructure parasitaire. (A) Tachyzoïte intracellulaire. Image en microscopie électronique, barre 0.8 μ m, d'après [Dubey, 1996]. **c** conoïde, **dg** granules denses, **m** micronème, **n** noyau, **pv** vacuole parasitophore, **r** rhoptries. (B) Schéma structural du parasite, d'après [Black & Boothroyd, 2000].

[Hager et al., 1999], un appareil de Golgi réticulé [Coppens et al., 1999, Pelletier et al., 2002] ainsi qu'une mitochondrie unique inhabituelle parmi les eucaryotes, dont le rôle n'est pas bien compris (Fig.1.4 B) [Köhler, 2006]. Par ailleurs, les données génomiques ont permis l'identification de nombreuses protéines orthologues à des composants impliqués dans le trafic et le tri protéique en différents points de la voie de sécrétion des Mammifères [Chaturvedi et al., 1999]. Cependant, certains acides aminés, briques élémentaires des protéines, doivent être importés à partir de la cellule-hôte.

T. gondii synthétise également la plupart de ses lipides ainsi que des nucléosides phosphatés tels que l'ATP [Denton et al., 1996], à partir de petites molécules (précurseurs lipidiques, bases azotées) importées du cytoplasme cellule-hôte [Charron & Sibley, 2002, Gupta et al., 2005] [Schwartzman & Pfefferkorn, 1981]. Cependant *T. gondii* n'a pas les enzymes nécessaires à la synthèse des stérols et de la choline, il doit donc importer ces lipides intacts de la cellule-hôte [Coppens et al., 2000]. Les mécanismes d'import de ces différentes molécules ne sont pas tous encore bien identifiés ; les hypothèses seront présentées dans la section suivante qui détaille la mise en place de la VP dans la cellule-hôte.

1.2.2 Invasion de la cellule-hôte

L'invasion par *T. gondii* est très rapide (15 à 30s). C'est un processus actif initié par l'attachement du parasite à la cellule-hôte et dont la force motrice est fournie par le parasite.

Attachement à la surface de la cellule-hôte

La première étape de l'invasion d'une cellule-hôte implique la reconnaissance de récepteurs cellulaires. Le contact avec la cellule-hôte est initialement établi de manière transitoire par des antigènes de surface du parasite [He et al., 2002]. Ce contact déclenche la sécrétion des micronèmes à la surface du parasite, par le biais du cou des rhoptries avec lequel elles fusionnent (Fig.1.5 (1)) [Carruthers et al., 1999, Alexander et al., 2005]. Les protéines sécrétées (protéines MIC) servent de

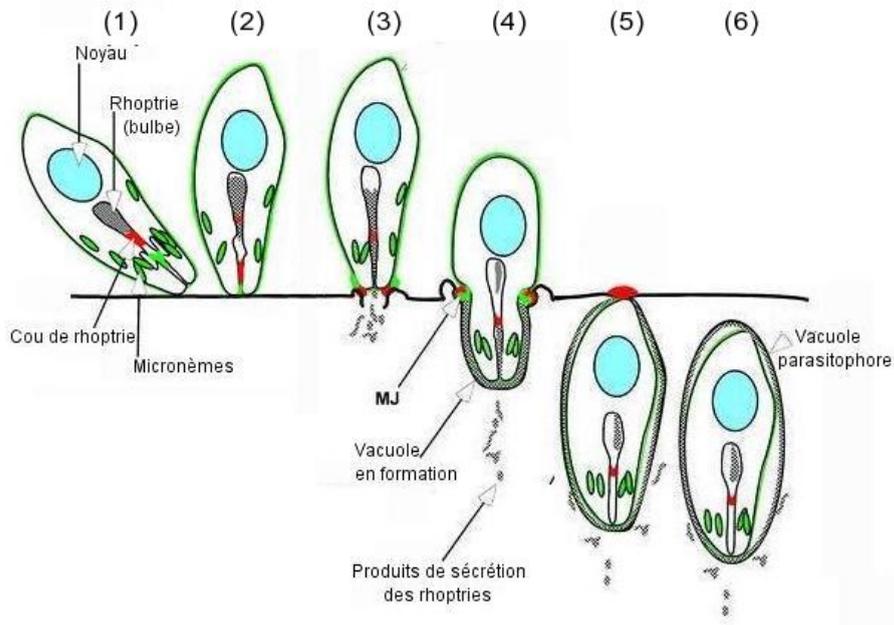


FIG. 1.5: Attachement à la cellule-hôte et invasion. (1) Lors du contact avec la membrane de la cellule-hôte, les protéines des micronèmes (en vert) et du cou des rhoptries (en rouge) sont sécrétées en surface du parasite, permettant (2) l'association serrée et la réorientation du parasite. (3) Le contenu du bulbe des rhoptries (en gris) est alors sécrété à son tour : des vésicules sont libérées dans le cytoplasme de la cellule-hôte, préluant à la formation de la vacuole. La jonction mobile (MJ), constituée se forme dans la zone de contact entre le parasite et la cellule-hôte, empêchant le passage dans la membrane de la VP naissante, de la plupart des protéines intégrales de membrane de la cellule-hôte. (4) Le parasite se propulse dans la cellule-hôte, formant la VP par invagination de la membrane plasmique. (5) Lorsque le parasite est complètement rentré dans la vacuole, (6) celle-ci se referme en relâchant le complexe de jonction mobile. D'après [Alexander et al., 2005].

ligands, reconnaissant d'une part, la surface de la cellule-hôte et d'autre part, la machinerie de motilité du parasite. L'attachement par les protéines MIC permet au parasite d'initier un mouvement directif et une réorientation qui résulte en la juxtaposition du conoïde du parasite et de la membrane de la cellule-hôte (Fig.1.5 (2)) [Dubremetz et al., 1993, Carruthers & Sibley, 1997].

Formation de la VP

Immédiatement après l'attachement apical, juste avant la pénétration du parasite dans la cellule-hôte, les rhoptries déchargent le contenu de leur partie bulbe, composé de protéines (protéines ROP) et lipides organisés en vésicules multilamellaires (Fig.1.5 (3)). Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique et sont retrouvées en partie dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Bien qu'il n'existe pas de preuve formelle du rôle des rhoptries dans la formation de la VP, la sécrétion de leur contenu semble être le facteur déclencheur de la déformation de la membrane plasmique de la cellule-hôte [Håkansson et al., 2001] : la membrane plasmique s'invagine sous l'action du parasite, formant petit à petit la VP (Fig.1.5 (4)). Une fois entré complètement dans la cellule, le parasite s'immobilise et la vacuole se ferme à son extrémité postérieure (Fig.1.5 (5), (6)) [Suss-Toby et al., 1996]. La membrane délimitante de la VP est donc initialement formée à partir de la membrane de la cellule-hôte, modifiée par la sécrétion du contenu lipidique et protéique des rhoptries [Saffer et al., 1992].

Sélection des protéines de la cellule-hôte au cours de l'invasion

Des complexes macromoléculaires formés par des protéines de rhoptries et de micronèmes, sécrétées dès l'attachement du parasite à la cellule-hôte, forment un anneau de jonction entre le parasite et la cellule-hôte, appelé jonction mobile (MJ) (Fig.1.5 (3) à (5)) [Alexander et al., 2005]. Au niveau de cette jonction a lieu un mécanisme de tri moléculaire qui permet de sélectionner les molécules d'origine cellulaire qui vont passer dans la membrane de la VP. Ce système permet au parasite d'éviter la dégradation par l'appareil endolysosomal de la cellule-hôte (acidification, fusion avec des lysosomes ou des vésicules endocytiques) en excluant de la membrane vacuolaire les protéines membranaires de la cellule-hôte en particulier celles impliquées dans ces processus (pompes à protons, protéines de fusion vésiculaire). Les protéines MIC présentes à la surface du parasite sont également exclues, tandis que certaines protéines de la cellule-hôte, en particulier les protéines à ancre phosphatidylinositol glycosylée (GPI), sont autorisées à passer [Mordue et al., 1999, Charron & Sibley, 2004].

|| La VP ainsi formée est un compartiment d'origine mixte (cellulaire et parasitaire), non fusogénique et donc de pH neutre.

1.2.3 Maturation de la VP : sécrétion des granules denses.

La VP nouvellement formée migre vers le noyau par un mécanisme encore inconnu. Les granules denses, troisième jeu d'organites sécrétoires, libèrent leur contenu dans la zone sub-apicale en fusionnant avec la membrane plasmique du parasite (Fig.1.6 A) [Dubremetz et al., 1993]. Les protéines sécrétées (protéines GRA), mais également les protéines des rhoptries (protéines ROP), pourraient être impliquées dans les événements de maturation de la vacuole qui se produisent quelques minutes après invasion.

Association de la VP au cytosquelette de la cellule-hôte

La VP s'associe rapidement à des éléments du cytosquelette de l'hôte : microtubules et filaments intermédiaires [Melo et al., 2001, Halonen & Weidner, 1994]. Le cytosquelette de la cellule-hôte est fortement remodelé lors de l'invasion et les microtubules de l'hôte semblent se réorganiser autour de la VP, et le centrosome⁶ y être recruté [Coppens et al., 2006]. Des extensions membranaires de la PVM dans le cytosol de la cellule-hôte, appelées PVEs (pour Parasitiphorous Vacuole Extensions), ont été observées dès les premières études par immunofluorescence sur les protéines GRA [Dubremetz et al., 1993], mais n'ont jamais fait l'objet d'analyses plus approfondies. Elles semblent s'étendre le long des microtubules de la cellule-hôte, allant parfois jusqu'au centrosome, mais la nature exacte et la fonction de ces extensions membranaires restent à déterminer [Coppens et al., 2006]. Des extensions topologiquement inverses, invaginations de la PVM dans la vacuole, sous-tendues par des microtubules de la cellule-hôte, ont également été observées. Les

⁶Le centrosome est le centre cellulaire organisateur des microtubules (MTOC), à partir duquel s'effectue la nucléation des microtubules. Il représente le point ralliement de tous les microtubules, ce qui lui confère un rôle primordial dans le trafic intracellulaire.

structures tubulaires membranaires ainsi formées, appelées HOSTs (pour Host Organelles Sequestering Tubules), pourraient avoir une fonction de transport de type endocytaire pour l'import de molécules de la cellule-hôte dans la VP [Coppens et al., 2006]. Les HOSTs semblent en particulier chargées d'acheminer des endolysosomes⁷ à l'intérieur de la vacuole.

Association de la VP à des organites de la cellule-hôte

La VP recrute des mitochondries et des portions du reticulum endoplasmique lisse⁸ (RE) de l'hôte (Fig.1.6 C) [Sinai et al., 1997]. L'association PVM-organite est établie rapidement après invasion et n'augmente pas avec le temps de résidence intracellulaire [Magno et al., 2005b]. Cette association pourrait permettre le détournement de lipides (cholestérol et choline) et/ou acides gras de la cellule infectée pour lesquels le parasite est auxotrophe⁹ [Coppens et al., 2000]. L'association du RE à la PVM semble essentielle pour le développement intracellulaire du parasite [Nakaar et al., 2003].

Formation du RNM dans l'espace intravacuolaire

Des vésicules multilamellaires sont libérées dans la vacuole 10 à 20 minutes post-invasion, probablement depuis une invagination spécialisée de la membrane plasmique à l'extrémité postérieure du parasite (Fig.1.6 B). Ce matériel membranaire se déploie ensuite, par un mécanisme inconnu qui semble impliquer les protéines GRA, à travers tout le lumen de la vacuole jusqu'à la PVM [Sibley et al., 1986, Sibley et al., 1995]. Il forme alors le Réseau de Nanotubes Membranaires, appelé RNM, dont le rôle n'est pas bien compris. Ce réseau est formé de tubules homogènes en taille et en morphologie (diamètre de 30 à 35 nm) qui apparaissent d'une part, en contact avec les parasites et d'autre part, en contact avec certains points de la PVM. Ces caractéristiques ont amené à envisager un rôle trophique¹⁰ pour cette structure ; cette hypothèse n'a pas été confirmée jusqu'à présent. Bien qu'il constitue une caractéristique architecturale prédominante de la VP, le RNM n'apparaît pas essentiel pour la prolifération in vitro des parasites [Mercier et al., 2002].

L'influence des protéines libérées par les granules denses (protéines GRA) dans les événements de maturation de la VP n'est pas bien déterminée. Elles apparaissent cependant associées aux éléments de la vacuole (PVM, HOSTs, RNM). Ces protéines font l'objet de notre étude ; la prochaine section est consacrée à leurs caractéristiques moléculaires, tandis que la dernière détaillera les hypothèses quant à leur fonction dans la vacuole.

⁷Les lysosomes sont des compartiments acides de dégradation. Ils sont présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes. Les endolysosomes constituent une voie particulière : ils contiennent des produits d'endocytose, en cours de dégradation après avoir été acheminés à l'appareil de Golgi.

⁸Le réticulum endoplasmique présente des zones rugueuses (RER) et des zones lisses (REL) qui sont impliquées dans des processus différents. Alors que le RER est couvert de ribosomes qui assemblent les acides aminés en chaînes protéiques, le REL intervient dans plusieurs processus métaboliques. Il participe à la synthèse de lipides et joue un rôle important dans le métabolisme des glucides, la détoxification des cellules et le stockage du calcium.

⁹Un organisme auxotrophe a perdu la capacité de biosynthèse d'un métabolite essentiel donné. Il est donc complètement dépendant d'un apport extérieur en ce métabolite

¹⁰Impliqué dans l'échange de nutriments entre la cellule-hôte et les parasites.

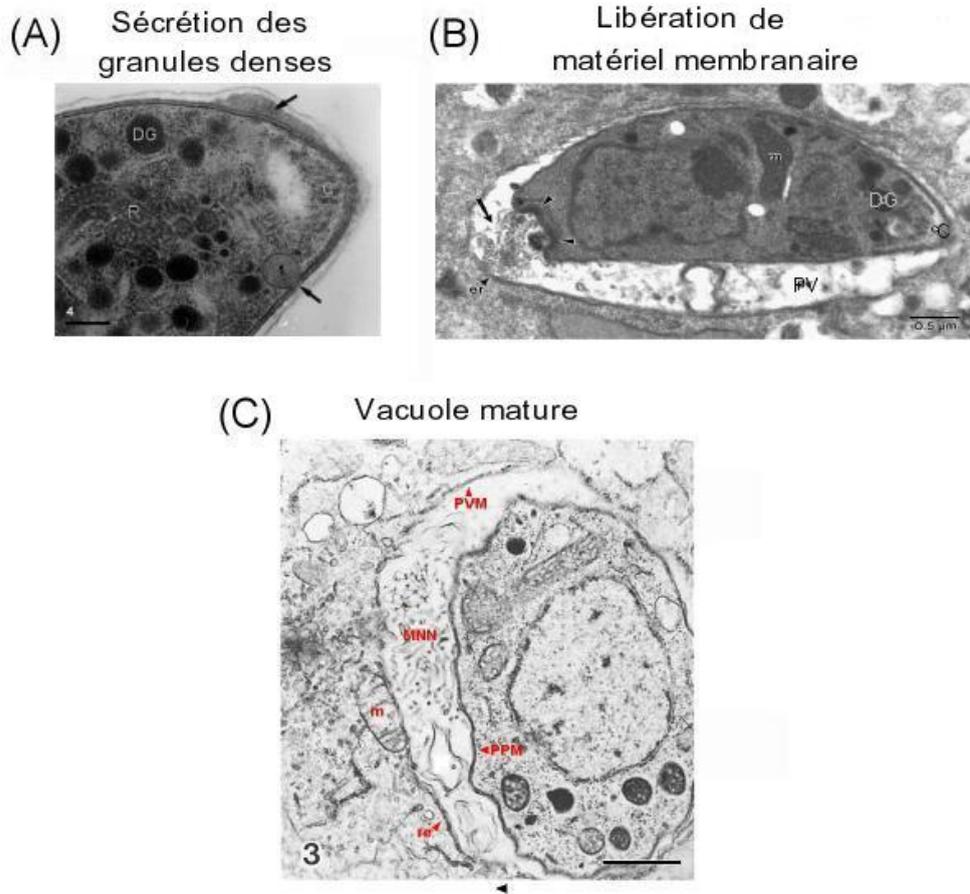


FIG. 1.6: Maturation de la VP. Etapes de la maturation de la VP : (A) Sécrétion du contenu des granules denses latéralement au pôle apical. Les flèches indiquent des granules denses en cours d'exocytose. D'après [de Souza, 2006] (Courtesy of J.F. Dubremetz). Barre=0.35 μ m. (B) Mise en place de matériel membranaire en extrémité postérieure. D'après [Sibley et al., 1995]. Barre=0.5 μ m. (C) Vacuole parasitophore 10 minutes après invasion d'un macrophage. La lumière de la vacuole contient un réseau de nanotubules membranaires développé (RNM). Barre 1 μ m. PPM membrane plasmique du parasite ; DG granules denses ; C conoïde ; R rohoptries ; PVM membrane délimitante de la vacuole. m mitochondrie de la cellule-hôte ; re reticulum endoplasmique de la cellule-hôte. D'après [Sibley et al., 1986].

1.2.4 Réplication et évation

Une fois installé dans sa cellule-hôte et ayant établi des connections métaboliques avec celle-ci, le parasite entame des cycles de réplication par un processus de réplication asexuée appelé endodyogénie. Le tachyzoïte est la forme de prolifération de *T. gondii* ; en effet, sous cette forme, il se multiplie à un rythme rapide : 3 à 4 fois par 24h. Cette phase mène à la production exponentielle (2^n parasites pour n cycles) d'environ 128 parasites dans une seule vacuole. Les parasites se multiplient jusqu'à réception d'un signal émanant du parasite ou de l'hôte, correspondant probablement à l'encombrement maximal de la cellule-hôte. En fonction de la réponse immunitaire de l'hôte, cela aura pour conséquence l'enkystement ou l'évasion du parasite.

Réplication

L'endodyogénie est un processus de réplication inhabituel : deux cellules-filles sont assemblées dans une cellule-mère intacte et polarisée ; quand les cellules-filles sont complètement formées, la cellule-mère se désintègre progressivement à partir du pôle apical, jusqu'à l'extrémité postérieure où un corps résiduel (RB, pour Residual Body) persiste [van der Zypen & Piekarski, 1967, Hu et al., 2002]. Le RB est connecté à l'extrémité postérieure des parasites proliférants et aux tubules du RNM (Fig.1.7 B) [Magno et al., 2005a]. Les parasites continuent de se multiplier avec leurs extrémités apicales pointant vers l'extérieur, en adoptant une formation hélicale compacte, appelée rosette, autour du RB. Le RNM se développe progressivement pendant le séjour intracellulaire de *T. gondii* et ses cycles endodyogéniques [Magno et al., 2005a]. Les travaux très récents de Muniz-Hernandez et al. indiquent un rôle essentiel du corps résiduel dans la synchronisation des réplifications parasites et la compaction dans la vacuole [Muniz-Hernandez et al., 2007].

La VP est un compartiment dynamique dont le volume augmente en fonction des cycles de multiplication parasite, maintenant en permanence une compaction maximale.

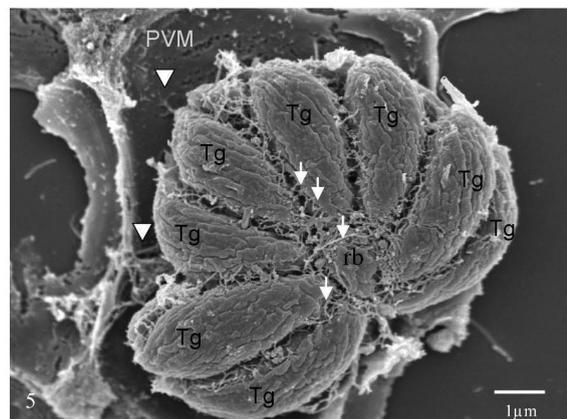


FIG. 1.7: Organisation en rosette d'une vacuole à 16 parasites, 24h après invasion. Les tubules du RNM (flèches) apparaissent essentiellement connecter les parasites au corps résiduel, mais on distingue aussi des connexions du RNM à la membrane de la vacuole (PVM) (pointes de flèches). Images de microscopie électronique d'émission de champ à balayage, Barre 1µm, d'après [Magno et al., 2005a]. **rb** corps résiduel ; **Tg** parasites.

Enkystement chez l'hôte immunocompétent

En présence d'une réponse immunitaire dirigée contre *T.gondii*, il y aura différenciation du parasite vers le stade bradyzoïte et enkystement (Fig.1.8 B). La paroi kystique est structurellement assez proche de la paroi cellulaire à base de cellulose des cellules végétales : elle est composée de chitine¹¹, un polysaccharide polymère qui forme une couche dure protégeant le kyste [Weiss & Kim, 2000].

¹¹La chitine est présente dans la paroi cellulaire de nombreux champignons. C'est aussi l'un des principaux composants de l'exosquelette, ou carapace, des insectes et autres arthropodes (crustacés, arachnides, etc.).

C'est la modification de la structure de la VP qui conduit à la formation de la paroi du kyste mais ces modifications restent mal caractérisées ; elles impliquent certainement une partie des protéines sécrétées dans la vacuole, en particulier les protéines GRA qui sont retrouvées aux deux stades.

Evasion chez l'hôte immunodéficient

En absence de réponse immunitaire efficace, il y aura évasion (ou egress) des parasites de la vacuole (Fig.1.8 C). Pour *T. gondii*, cette sortie est un processus rapide (<60 s) qui aboutit à la lyse de la cellule-hôte et relâche des parasites très mobiles. Les parasites forcent le passage à travers les membranes de la cellule-hôte et également à travers la cage formée par le cytosquelette de l'hôte. Une fois hors de la cellule-hôte lysée, les parasites envahissent rapidement les cellules voisines, complétant ainsi le cycle.

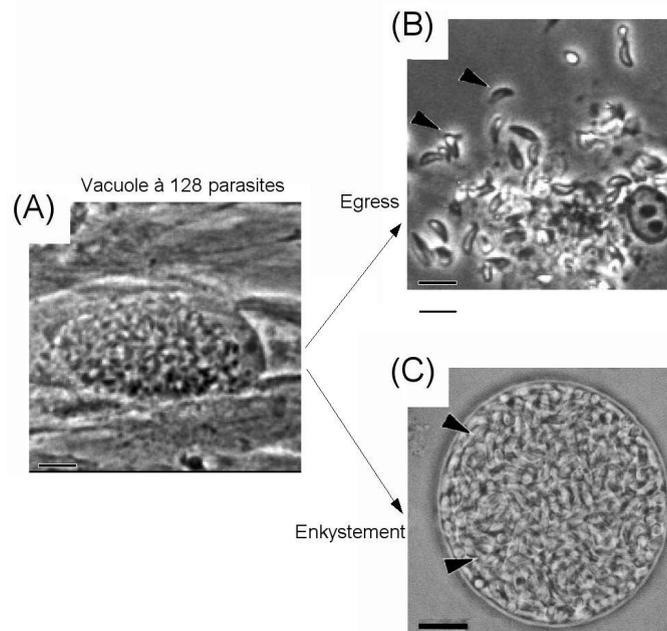


FIG. 1.8: Egress ou enkystement. (A) Vacuole à 128 parasites. Observation en microscopie à contraste de phase, Barre 10µm, d'après [Moudy et al., 2001]. (B) Evasion *in vitro* provoqué artificiellement par perméabilisation de la cellule-hôte. Barre 10µm, d'après [Moudy et al., 2001]. (C) Kyste contenant des milliers de parasites au stade bradyzoïte (pointes de flèches). Barre 20µm, d'après [Hill & Dubey, 2002].

La vacuole parasitophore de *T. gondii*

La VP est formée activement par le parasite lors de l'invasion de la cellule-hôte, par invagination de sa membrane plasmique. Les caractéristiques finales du compartiment, et particulièrement de la membrane qui le délimite, sont mixtes, provenant à la fois de la cellule-hôte et de produits sécrétés par le parasite. Les protéines GRA font partie des éléments sécrétés, intervenant de manière centrale dans le processus de formation de la VP, lors de sa maturation, juste après invasion. Nous allons maintenant résumer les données disponibles sur la nature et la fonction des protéines GRA.

1.3 Les protéines de granules denses

Les granules denses (DGs) sont des organites particuliers de *T. gondii*, dont des équivalents n'ont pas pu être clairement identifiés jusqu'à présent chez certains Apicomplexa, entre autres *Plasmodium*, *Eimeria*, *Cryptosporidium*. Le protéome des granules denses n'est pas complètement décrit à ce jour. En effet, la purification des granules denses est restée jusqu'ici sans succès. La plupart des séquences des protéines de granules denses, appelées protéines GRA, ont été identifiées par des stratégies de clonage conventionnel¹². A l'exception de quelques protéines ayant une activité enzymatique définie, la majorité des protéines de granules denses identifiées à ce jour ne présente pas de similarité significative avec des protéines connues. Suivant la nomenclature proposée par Sibley et al., celles-ci ont été nommées protéines GRA [Sibley et al., 1991].

Après avoir décrit le trafic sécrétoire des protéines de granules denses, l'essentiel de cette section, basée sur les revues de Mercier et al. [Mercier et al., 2005, Mercier et al., 2007], sera consacré aux données d'analyses de séquences réalisées sur les protéines des granules denses identifiées à ce jour. Je distinguerai les protéines GRA, de fonctions indéterminées, des protéines de granules denses homologues à des protéines eucaryotes connues. En dernier lieu seront évoquées les propriétés immunogènes des protéines GRA, qui en constituent un aspect important.

1.3.1 Une voie de sécrétion complexe

Après synthèse, les protéines GRA sont acheminées et stockées dans les granules denses. L'acheminement aux granules denses constitue la voie par défaut : toute protéine soluble précédée d'un peptide signal est délivrée aux granules denses et ensuite sécrétée dans la vacuole parasitophore [Karsten et al., 1998]. Les DGs constituent une voie particulière de sécrétion, dont les caractéristiques sont inhabituelles chez les eucaryotes¹³. Le contenu des granules denses est libéré dans la vacuole naissante, juste après invasion, impliquant la fusion de la membrane délimitant les DGs avec la membrane plasmique du parasite ou bien son complexe membranaire interne¹⁴. Ce processus d'exocytose des DGs requiert la machinerie universelle de fusion vésiculaire NSF/SNAP/SNARE (N-ethylmaleimide sensitive factor/synaptosome-associated protein/soluble NSF attachment receptor), très conservée chez les eucaryotes [Chaturvedi et al., 1999].

- Une salve de sécrétion est observée durant la première heure après invasion, suggérant un méca-

¹²Technique qui consiste à isoler un fragment d'ADN et à le multiplier à l'identique en l'insérant dans une molécule d'ADN porteuse appelée vecteur permettant son amplification.

¹³Chez les eucaryotes sont distingués deux régimes de sécrétion :
 - régime constitutif, existant chez toutes les celluleseucaryotes : les produits sont acheminés de leur lieu de synthèse (RER) vers la membrane plasmique et le milieu extracellulaire au fur et à mesure de leur synthèse ;
 - régime régulé : les produits à sécréter sont accumulés et stockés dans des granules de sécrétion, et leur libération dans le milieu externe (exocytose), souvent massive et synchrone, ne se fait que sous l'impulsion d'un stimulus extracellulaire. Cette voie régulée se trouve chez certains types cellulaires spécialisés des métazoaires (animaux), et beaucoup plus rarement chez les protozoaires : elle n'a été observée que chez les Apicomplexa et les Ciliés (e.g. Paramecium).

¹⁴Le complexe membranaire interne (IMC) est composé de vésicules aplaties suturées ensemble, situées juste en-dessous de la membrane plasmique du parasite [Morrissette et al., 1997]. L'IMC court sous la surface du parasite et s'interrompt aux extrémités antérieure et postérieure. Il est interaction d'une part avec le cytosquelette et d'autre part avec la membrane plasmique, par le biais de protéines transmembranaires.

nisme régulé directement lié à la formation de la VP [Dubremetz et al., 1993].

- L'exocytose apparaît de plus continuer pendant tout le séjour du parasite dans la cellule, à plus bas niveau [Dubremetz et al., 1993].

Le taux de sécrétion de ces organites est donc nécessairement modulé de manière substantielle, en réponse à un stimulus. La sécrétion de parasites extracellulaires peut être induite par la présence de serum dans le milieu de culture, mais le composant du serum directement impliqué n'a pu être isolé à ce jour [Darcy et al., 1988, Coppens et al., 1999]. Les granules denses semblent stocker des protéines sous forme soluble et également sous forme agrégée [Labruyere et al., 1999], à la différence de granules sécrétoires eucaryotes habituels dont le contenu est condensé lors de la maturation de la granule (voie régulée). Cette compaction mixte pourrait être à l'origine des deux niveaux de sécrétion : la fraction non agrégée pourrait être libérée en permanence, tandis que la fraction agrégée serait libérée uniquement en réponse à un signal. L'état d'agrégation des protéines constituerait ainsi un verrou de régulation.

Dans un tel mécanisme, les protéines GRA périphériques ou non agrégées pourraient être sécrétées de manière constitutive pendant le développement intravacuolaire du parasite, tandis qu'un mécanisme régulé prendrait place rapidement après invasion pour assurer une décharge massive et rapide des protéines de DGs dans la vacuole, au moment précis où elles sont nécessaires en grande quantité pour la mise en place d'une vacuole fonctionnelle.

1.3.2 Caractérisation moléculaire des protéines GRA

Les protéines GRA forment un groupe de relativement petites protéines (21 à 41 kDa) de fonctions indéterminées. Des recherches BLAST¹⁵ pratiquées sur les séquences GRA ne révèlent pas d'homologies significatives avec des protéines de fonctions connues. Même parmi les Apicomplexa, des protéines homologues aux protéines GRA n'ont pu être identifiées que chez *Neospora caninum*, très proche phylogénétiquement de *T. gondii*. Cependant des analyses pratiquées sur les séquences des protéines GRA ont permis d'identifier des motifs et des propriétés potentielles (Fig.1.9) : peptides signaux, domaines transmembranaires, domaines de fixation, glycosylations et phosphorylations.

Peptide signal

Toutes les protéines sécrétées de *T. gondii* dont la séquence est connue possèdent une séquence hydrophobe N-terminale¹⁶. Cette séquence hydrophobe, retrouvée dans toutes les protéines sécrétées eucaryotes, constitue un peptide signal qui dirige la protéine vers la voie de sécrétion. Les DGs sont la voie par défaut [Karsten et al., 1998], les protéines des rhoptries et micronèmes possédant, en plus de leur peptide signal, des signaux d'adressage spécifiques.

¹⁵BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est un algorithme qui permet de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés.

¹⁶Les séquences de protéines sont caractérisées par une extrémité N-terminale terminée par un groupe amine libre (-NH₂) et une extrémité C-terminale terminée par un groupe carboxyle (-COOH).

Domaines membranaires

L'analyse de la structure secondaire des protéines GRA prédit pour la plupart d'entre elles des capacités d'association membranaire. Pour les protéines GRA3, 4, 5, 6, 7, 8, des segments hydrophobes (15 acides aminés minimum) ont été mis en évidence ; ils sont suffisamment longs pour être des domaines transmembranaires (TMD). Des segments hydrophobes ont également été mis en évidence pour la protéine PotGRA10¹⁷, mais ils semblent trop courts pour traverser une membrane. Pour les protéines GRA2 et 9, la formation d'hélices- α amphipathiques est prédite (2 pour GRA2 et 1 pour GRA9) : les chaînes latérales des acides aminés se trouvant d'un même côté ont une nature hydrophile ou chargée tandis que celles se trouvant de l'autre côté ont une nature hydrophobe (Fig.1.9 Encart). Ces domaines leur permettent également l'association à des membranes. L'hélice- α de GRA9 et deux de celles de GRA2 sont suffisamment longues pour traverser une membrane. Dans le cas de GRA2 et GRA5, l'expression chez *T. gondii* de mutants de délétion de la protéine privés d'une hélice amphipathique (GRA2) ou du TMD (GRA5), a montré que ces domaines sont directement responsables de l'association membranaire des protéines en question [Mercier et al., 1998b, Lecordier et al., 1999]. On peut enfin ajouter que les protéines associées à la PVM (3, 5, 7, 8) sont toutes prédites comme ayant une topologie de type I : la partie N-terminale de la protéine est dans le cytosol de la cellule-hôte et la partie C-terminale dans la vacuole. Cette topologie a été confirmée au moins pour GRA5 [Lecordier et al., 1999].

La plupart des protéines GRA contiennent des domaines susceptibles d'interagir avec des membranes :

- un domaine transmembranaire pour GRA3,4,5,6,7,8 ;
- des hélices- α amphipathiques pour GRA2,9.

Motifs et domaines de fixation

L'analyse globale des acides aminés montre que les résidus cystéine¹⁸ sont faiblement représentés dans les séquences GRA. Cela suggère que s'il existe des complexes de protéines GRA dans les DGs ou dans la VP, il est improbable qu'ils reposent sur la formation de ponts disulfures.

Au-delà de cette analyse, des motifs particuliers ont été identifiés. En effet deux EF-Hands impliquées dans la fixation du calcium¹⁹ sont prédites pour GRA1 [Cesbron-Delauw et al., 1989]. Ce motif est trouvé dans de nombreuses protéines régulées par le calcium. De plus, une P-loop²⁰ (domaine de fixation du phosphate), impliquée dans la fixation d'ATP/GTP, est prédite pour GRA4 [Karsten et al., 2004]. Un motif adhésif RGD²¹ a été identifié dans GRA7 et PotGRA10 [Jacobs et al., 1998, Ahn et al., 2005]. Ce motif est souvent impliqué

¹⁷La protéine potentielle GRA10, récemment identifiée par Ahn et al. [Ahn et al., 2005], n'a pas été clairement démontrée appartenir à la famille de protéines de granules denses. Il faut pour cela que sa co-localisation dans les granules denses avec les autres protéines GRA soit démontrée.

¹⁸La cystéine est un acide aminé qui possède un groupement sulfhydryle ou thiol. Les cystéines sont présentes dans la plupart des protéines, bien que seulement en petites quantités. La présence de cet acide aminé permet la formation de ponts disulfures (liaisons covalentes entre deux cystéines), qui jouent un rôle primordial dans la formation de complexes protéiques.

¹⁹Les EF-Hands sont des motifs composés de deux hélices jointes par une boucle qui lie les ions Ca^{2+} .

²⁰Une P-loop consiste en une séquence riche en glycine, acide aminé qui interagit avec le phosphate.

²¹Un motif RGD est composé de la séquence d'acides aminés (Arg-Gly-Asp).

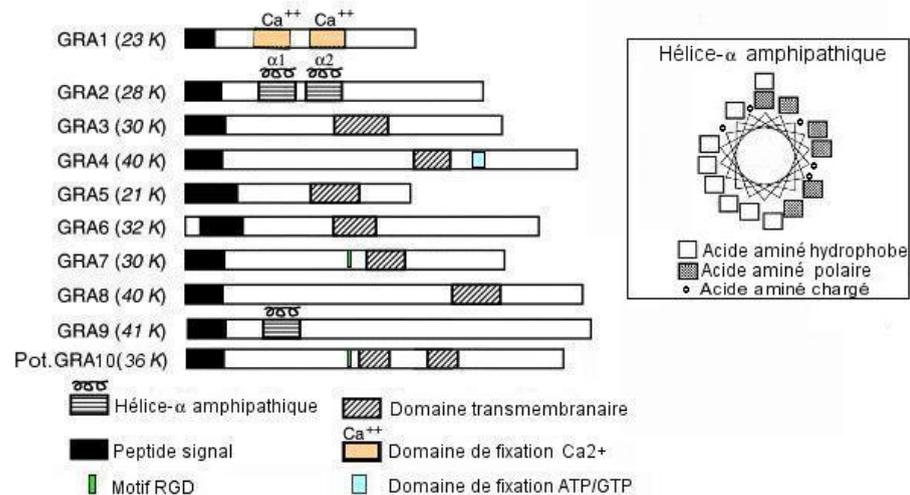


FIG. 1.9: Représentation schématique des domaines potentiels des protéines GRA de *T. gondii*. Pot-GRA10 : Protéine potentielle de granules denses. En encart, représentation schématique d'une hélice alpha-amphipathique : les acides aminés hydrophobes sont tous rangés d'un même côté de l'hélice, les acides aminés polaires de l'autre. D'après [Mercier et al., 2005].

dans la reconnaissance et l'attachement cellulaire. Il est présent sur de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire. Il permet de lier des protéines exposées à la surface des cellules, en particulier les intégrines. Enfin, certaines protéines GRA sont riches en proline (GRA4 12%, GRA8 24%, PotGRA10 10%). Cet acide aminé présente une rigidité conformationnelle beaucoup plus importante que celle des autres acides aminés, amenant des conditions de repliement très particulières²².

Modifications co- et post-traductionnelles

De nombreux sites de N- et O-glycosylation²³ sont prédits dans les séquences GRA. Des O-glycosylations ont été effectivement mises en évidence sur certaines d'entre elles : GRA2, GRA4 et GRA6 [Zinecker et al., 1998, Achbarou et al., 1991] [Travier et al., non publié]. Ces modifications pourraient expliquer en partie la solubilisation partielle de ces protéines qui contiennent pourtant des segments hydrophobes.

Des sites potentiels de phosphorylation²⁴ sont également prédits ; GRA2 [Mercier et Sibley, com-

²²La proline contient une fonction amine secondaire cyclique. En conséquence elle crée des angles brusques dans les structures secondaires. Deux isomères existent (*cis* et *trans*), distingués par la position de la fonction cyclique. Le passage d'une forme à l'autre, appelé isomérisation *cis-trans*, joue un rôle clé dans le repliement des protéines. Ce processus est très lent et peut perturber le repliement de la protéine mais il peut être assisté par des enzymes (prolyl isomérases) qui catalysent l'isomérisation.

²³La glycosylation est l'addition de saccharides sur certains acides aminés (Asparagine pour la N-glycosylation ; Sérine et Thréonine pour la O-glycosylation). Cette modification joue un rôle dans la signalisation et la reconnaissance cellulaire, ainsi que dans le repliement de la protéine : les résidus polaires des saccharides aident à solubiliser des intermédiaires de repliement, de la même façon que les protéines chaperones. La N-glycosylation, la plus courante chez les mammifères, est impliquée dans la stabilité de la protéine, en la protégeant de la dégradation. Ces modifications ont généralement lieu au cours de la traduction ou du repliement chez les eucaryotes.

²⁴La phosphorylation est l'addition d'un groupe phosphate (PO_4) à une protéine, catalysée par une protéine kinase. La phosphorylation peut changer radicalement les propriétés d'hydrophobicité d'une protéine. Ce processus et son inverse (déphosphorylation par une phosphatase) constituent chez les eucaryotes un mécanisme très fréquent de régulation d'activité (enzymes, récepteurs), en particulier lors de la transduction de signaux.

munication personnelle] et GRA6 [Labruyere et al., 1999] sont effectivement phosphorylées après sécrétion dans la VP tandis que GRA9 l'est dans le cytoplasme du parasite [Adjogble et al., communication personnelle]. Ces données suggèrent que l'activité de ces protéines serait régulée au cours de leur trafic sécrétoire.

1.3.3 Protéines homologues à des protéines eucaryotes

Quelques protéines présentant des homologies avec des protéines caractérisées (cyclophiline, protéine 14-3-3) ou même une activité enzymatique observée (NTPases, inhibiteurs de protéase), ont été localisées dans les granules denses. Ces protéines sont libérées dans la vacuole dans les mêmes conditions que les protéines GRA décrites ci-dessus. L'étude de leur fonctions potentielles peut indiquer des pistes quant aux fonctions des protéines GRA.

|| L'activité *in vitro* des enzymes a été extensivement caractérisée mais la fonction vacuo-
|| laire de ces protéines reste un sujet de débat.

NTPases. Deux nucléosides triphosphate hydrolases²⁵ ont été identifiées : NTPase I et II [Bermudes et al., 1994, Asai et al., 1995]. Elles sont probablement impliquées dans la récupération de purines (bases azotées A, G) pour lesquelles *T. gondii* est auxotrophe. Les NTPases sont nécessaires à la réplication des parasites [Nakaar et al., 1999]. Ces enzymes sont de plus impliquées dans l'initiation de l'évasion du parasite, signalée par une déplétion en ATP [Moudy et al., 2001]. Une régulation serrée de l'activité des NTPases dans la VP est donc nécessaire pour éviter une déplétion rapide du stock vacuolaire d'ATP, ce qui provoquerait une évasion prématurée des parasites de la vacuole.

Inhibiteurs de protéases. Deux inhibiteurs de sérine protéases, TgPI-1 et -2, ont été identifiés. Il sont actifs *in vitro* envers les enzymes digestives [Pszenny et al., 2000, Pszenny et al., 2002, Morris & Carruthers, 2003]. Ces molécules, éventuellement libérées dans l'environnement extracellulaire durant la lyse de la cellule-hôte, pourraient protéger les parasites des protéases lors de la traversée du conduit gastro-intestinal [Morris et al., 2002].

Cyclophiline Cy-18. Une cyclophiline²⁶ de 18 kDa (Cy-18) a été identifiée [High et al., 1994]. Cette protéine montre une activité *in vitro* d'isomérase peptidyl-prolyl *cis/trans* (repliement des protéines). Elle pourrait ainsi être impliquée dans la régulation de l'assemblage de complexes protéiques dans la VP, en particulier en intervenant sur les protéines riches en proline GRA4, GRA8 et potGRA10. De manière très intéressante, il a été montré que cette protéine, libérée par des parasites extracellulaires, peut moduler le système immunitaire de l'hôte, en déclenchant la production de molécules de signalisation (cytokine Interleukine-12) par des cellules de l'immunité, par le biais de la liaison à des récepteurs spécifiques de la cellule-hôte [Aliberti et al., 2003].

²⁵Les NTPases sont des enzymes qui peuvent lier et hydrolyser les nucléotides phosphatés (ATP, GTP) par déphosphorylation.

²⁶Les cyclophilines sont généralement impliquées dans le repliement de protéines et plus largement, dans la médiation d'interactions protéine-protéine dans les gros complexes protéiques. Leur site actif lie des séquences spécifiques, riches en proline.

Protéine 14-3-3. Le rôle de la protéine 14-3-3²⁷ identifiée dans les granules denses [Assossou et al., 2003, Assossou et al., 2004] n'est pas clairement défini actuellement. L'implication des protéines 14-3-3 dans les mécanismes de signalisation chez la plupart des eucaryotes suggère des interactions de la protéine 14-3-3 de *T. gondii* avec la cellule-hôte.

1.3.4 Des protéines fortement immunogènes

Les antigènes excrétés-sécrétés (appelés ES), dont les composants majeurs sont les protéines de granules denses [Charif et al., 1990], constituent la majeure partie des antigènes détectables en circulation durant la phase aigue de l'infection [Hughes & van Knapen, 1982]. Ils jouent un rôle-clé dans la stimulation du système immunitaire de l'hôte [Decoster et al., 1988]. Le trafic des protéines de granules denses à travers la PVM jusque dans le cytosol de l'hôte n'a jamais été mis en évidence mais il existe sans doute : puisque ces protéines jouent un rôle dans l'immunité, elles sont vraisemblablement présentées à la surface des cellules infectées.

Le rôle des antigènes ES dans l'induction d'une immunité protectrice a été démontré dans différents modèles expérimentaux [Darcy et al., 1988, Duquesne et al., 1990, Zenner et al., 1999]. Une approche vaccinale contre *T. gondii* pourrait donc être basée sur l'utilisation d'antigènes ES sous forme recombinante²⁸, ou sous forme de peptides synthétiques, qui idéalement protégeraient l'hôte de tous les stades du parasite [Zenner et al., 1999]. Il a été montré que GRA2 joue un rôle important dans la virulence des parasites de la souche RH [Mercier et al., 1998b]. Son utilisation pour l'élaboration d'un vaccin paraît donc particulièrement envisageable [Prigione et al., 2000, Zhou et al., 2006, Golkar et al., 2007].

Bilan : Caractéristiques des protéines GRA

Il apparaît au travers des données présentées dans cette section qu'il reste encore de larges zones d'ombre dans la caractérisation des protéines GRA. Le protéome des granules denses n'est pas encore déterminé ; les protéines GRA identifiées à ce jour ne sont connues que par leur séquence, mais on n'a actuellement accès ni à leur structure ni à leur fonction. Elles semblent jouer un rôle dans la stimulation du système immunitaire bien que leur exposition à la surface des parasites ou des cellules infectées n'ait jamais été mise en évidence. Par contre, leur association aux membranes de la vacuole est bien caractérisée : elles jouent un rôle certain, du moins certaines d'entre elles, dans la maturation du compartiment nouvellement formé. C'est ce dernier aspect que nous allons explorer à présent.

²⁷Les protéines 14-3-3 constituent une famille de protéines régulatrices, très conservées chez les eucaryotes. Elles peuvent lier une multitude de protéines de signalisation très diverses fonctionnellement (e.g. transduction du signal, transport vésiculaire).

²⁸Une protéine recombinante est produite par un organisme (souvent une bactérie) après que la séquence ADN codant pour cette protéine ait été insérée dans son génome.

1.4 Protéines GRA et VP

La fonction des protéines de granules denses reste largement inconnue. Dans *T. gondii*, leur pic de sécrétion dans la VP durant la première heure après invasion de la cellule-hôte, et leur association aux structures membranaires de la VP, suggèrent qu'elles contribuent de manière significative à la mise en place de ce nouveau compartiment et/ou auraient d'importantes fonctions dans le métabolisme vacuolaire [Dubremetz et al., 1993].

De plus, les granules denses et leurs protéines ne semblent exister que chez certains Apicomplexa (*T. gondii* et *Neospora caninum* en particulier) : elles pourraient représenter une spécialisation du développement intracellulaire et de la relation hôte-parasite. L'organisation de la VP semble dépendre de certaines protéines GRA mais la découverte d'activités enzymatiques parmi les protéines de DGs pourrait les relier à un rôle dans le métabolisme de la VP. L'objectif de cette section est d'analyser l'implication des protéines GRA dans les structures et les fonctions de la VP. Cette analyse s'appuie en grande partie sur des approches par construction de parasites mutants "knock-out" (KO)²⁹. Tous les mutants étudiés ont été réalisés dans la souche virulente RH. Trois d'entre eux ont été construits au LAPM et extensivement caractérisés structuralement par microscopie électronique : KO-GRA2, KO-GRA6, KO-GRA5 [Mercier et al., 1998b, Mercier et al., 2001, Mercier et al., 2002]. Un mutant KO-GRA7 a également été construit par Coppens et al. en 2006 mais sa caractérisation reste à compléter [Coppens et al., 2006].

Nous allons tout d'abord suivre les caractéristiques des protéines GRA à différents stades de leur trafic sécrétoire, avant de rentrer dans le détail de leur association aux structures vacuolaires et de leurs implications possibles. Cela nous amènera à cibler les questions majeures auxquelles nous voulons apporter des éléments de réponse.

1.4.1 Evolution au cours de l'invasion

Dans un premier temps, nous allons suivre la localisation et la solubilité des protéines GRA au cours de leur trafic sécrétoire : lorsqu'elle sont contenues dans les parasites extracellulaires, puis dans la vacuole, juste après invasion puis à maturité.

Localisation des protéines GRA au cours de l'invasion

Des études par immunofluorescence et microscopie électronique, couplées à des études biochimiques sur parasites isolés et cellules infectées, ont permis la reconstitution de ce qui semble être les évènements pré- et post-sécrétoires des protéines GRA, au stade tachyzoïte (Fig.1.10) :

1) Dans le parasite (Fig.1.10 A), les protéines GRA sont toutes détectées dans les mêmes compartiments de stockage, les granules denses (DGs), à la fois sous forme soluble et sous forme agrégée [Sibley et al., 1995, Ferguson et al., 1999, Labruyere et al., 1999]. Le stockage sous forme soluble

²⁹Les parasites "knock-out" sont délétés d'un gène codant pour une protéine donnée ; e.g. une souche mutante RH-KO-GRA2 est construite par délétion du gène codant pour GRA2 dans la souche RH.

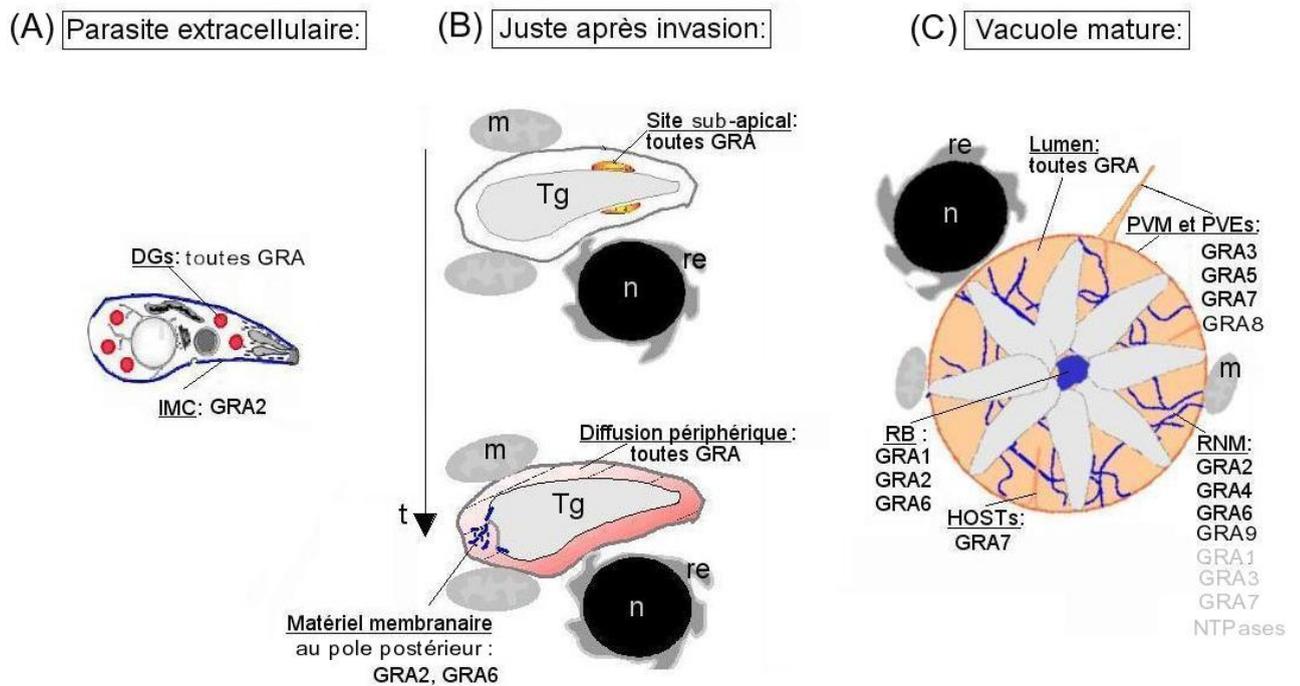


FIG. 1.10: Représentation schématique de la localisation des protéines GRA avant (parasite extracellulaire), pendant (5 min après invasion) et après sécrétion (24 h post-invasion). **DGs** granules denses, **IMC** complexe membranaire interne du parasite, **n** noyau de la cellule-hôte, **re** reticulum endoplasmique de la cellule-hôte, **m** mitochondrie de la cellule-hôte, **Tg** parasites.

de ces protéines, pourtant pour la plupart membranaires, reste mal expliqué : il implique probablement leur inclusion dans des structures de solubilisation. Les protéines GRA sont détectées dans la matrice des DGs ; aucune n'a été montrée associée aux membranes des granules denses. La protéine GRA2 est une exception : elle est également retrouvée associée au complexe membranaire interne du parasite [Charif et al., 1990].

2) Les protéines de granules denses sont sécrétées en tant que protéines solubles (critère de solubilité : les protéines restent dans le surnageant d'une ultracentrifugation à 100 000g pendant 1h) [Lecordier et al., 1999, Adjogble et al., 2004]. Un "calot" sub-apical est observé (Fig. 1.10 B) : il correspond aux sites de fusion des granules denses avec le complexe membranaire interne et la membrane plasmique du parasite. Les protéines diffusent périphériquement dans la vacuole. De plus certaines des protéines GRA (GRA2 et GRA6) apparaissent rapidement recrutées à l'extrémité postérieure du parasite, au niveau du matériel membranaire relargué qui est à l'origine du RNM (en bleu).

3) Après sécrétion dans la VP (Fig. 1.10 C), seules GRA1, les TgPIs et NTPases restent majoritairement solubles dans le lumen de la vacuole [Sibley et al., 1995, Pzenny et al., 2002, Asai et al., 1995]. La plupart des protéines GRA sont détectées en association avec les systèmes membranaires de la VP. Ainsi, les protéines GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9 sont détectées spécifiquement associées au RNM, ainsi qu'une fraction de GRA1, GRA3, GRA7 et des NTPases. Les protéines GRA1, GRA2 et

GRA6 sont de plus détectées au niveau du corps résiduel de division [Muniz-Hernandez et al., 2007]. Les protéines GRA3, GRA5, GRA7 et GRA8 sont détectées préférentiellement associées à la PVM et à ses extensions cytoplasmiques, les PVEs [Achbarou et al., 1991, Lecordier et al., 1993] [Bonhomme et al., 1999, Carey et al., 2000]. GRA7 apparaît de plus, spécifiquement associée aux extensions intravacuolaires, les HOSTs [Coppens et al., 2006].

Bien que les structures membranaires distinguées, PVM, RNM, HOSTs et PVES, semblent contigues dans certaines régions, la partition des protéines membranaires associées suggère qu'elles sont maintenues en domaines séparés. Le RNM provient sans doute uniquement du parasite [Sibley et al., 1995] alors que la PVM et les HOSTs dérivent essentiellement de la membrane plasmique de l'hôte [Suss-Toby et al., 1996, Coppens et al., 2006], suggérant une différence de composition lipidique. Une fraction soluble de chacune de ces protéines sécrétées paraît persister tout le long du développement du parasite dans le compartiment vacuolaire. La sécrétion permanente à bas régime pourrait être responsable de cette fraction soluble, qui pourrait correspondre à des intermédiaires de repliement avant l'interaction des protéines avec les membranes vacuolaires.

Le mécanisme par lequel les protéines GRA passent d'une forme soluble, dans les organites sécrétoires, à une localisation transmembranaire, dans la PVM, le RNM ou les HOSTs, est peu compris mais implique probablement un changement profond de leur conformation.

Interactions membranaires et protéiques dans la vacuole

Même si l'association membranaire après sécrétion est une règle presque générale pour les protéines GRA, la nature de leurs associations membranaires est variable.

Ainsi, alors que GRA1 et les NTPases démontrent une association très lâche avec le RNM [Sibley et al., 1995], l'association de GRA4 semble basée en grande partie sur des liaisons faibles protéine-protéine [Labruyere et al., 1999]. En contraste, GRA2,3,5,6,7,8,9 sont majoritairement stabilisées par des interactions hydrophobes, bien que les interactions protéine-protéine jouent un rôle important [Sibley et al., 1995, Labruyere et al., 1999, Lecordier et al., 1999, Carey et al., 2000, Neudeck et al., 2002, Adjogble et al., 2004]. Il a d'ailleurs été supposé que les protéines GRA2, GRA4 et GRA6 participent à la formation d'un complexe protéique multimérique dans les membranes internes de la vacuole [Labruyere et al., 1999].

Des travaux menés récemment au LAPM [Travier et al., 2007] afin d'identifier les partenaires de GRA2 et GRA5 à la fois dans le toxoplasme, dans les produits sécrétés, et dans la vacuole, mettent en évidence peu d'interactions fortes entre les protéines GRA, mais de nombreuses interactions labiles.

1.4.2 La membrane délimitante de la vacuole (PVM), ses extensions internes (HOSTs) et externes (PVEs)

La PVM constitue la seule barrière entre les parasites et le cytoplasme de l'hôte. Elle intervient donc de manière prépondérante pour la protection des parasites, mais également pour l'acquisition de nutriments. Elle médie l'essentiel des interactions avec la cellule-hôte. Les protéines qui y sont associées interviennent donc probablement dans ces processus.

La PVM dérive essentiellement de la membrane plasmique de l'hôte mais elle est modifiée au fur et à mesure par les objets membranaires sécrétés à partir des rhoptries. Elle est enrichie, dès les premières minutes post-invasion, par le contenu protéique des rhoptries et des granules denses.

|| Les protéines GRA3,5,7,8 sont majoritairement associées à la PVM.

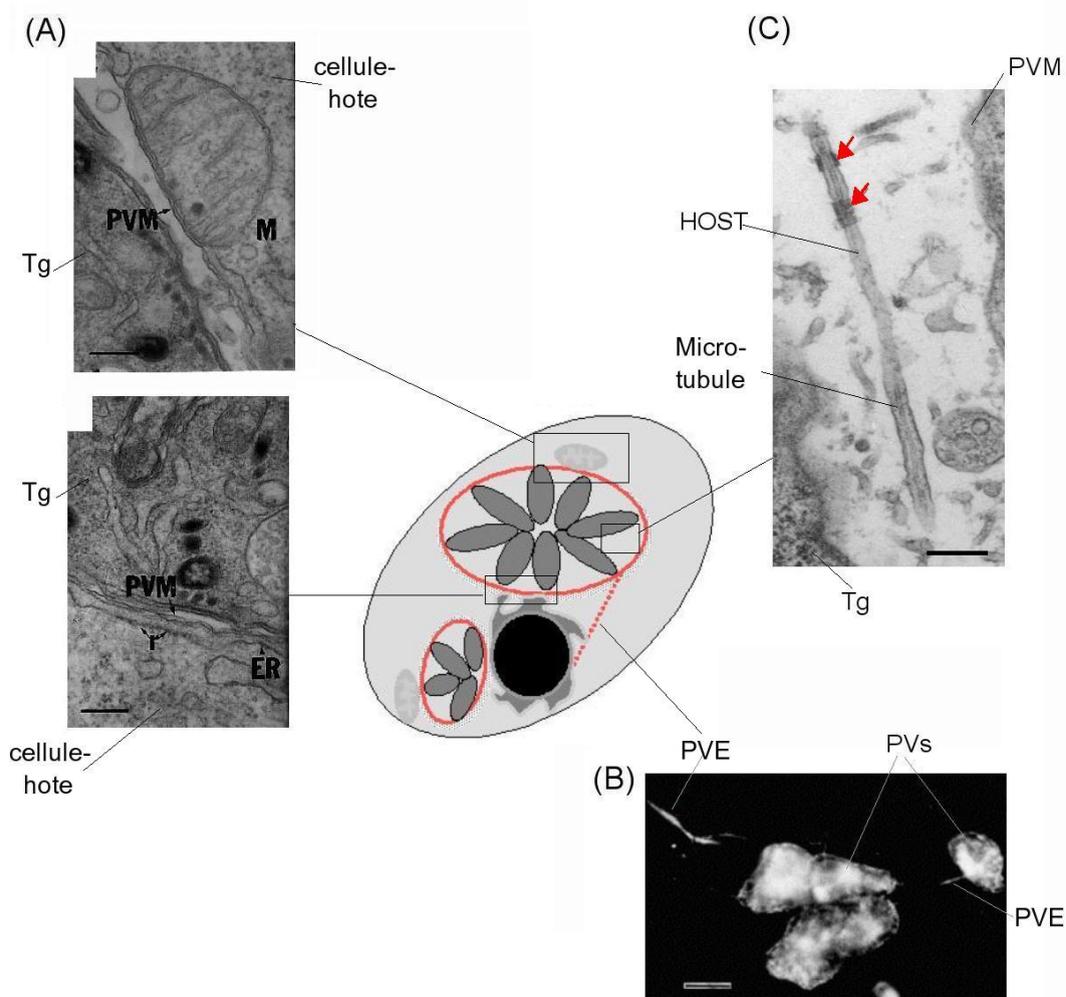


FIG. 1.11: La membrane délimitante de la vacuole parasitophore (PVM), les PVEs et les HOSTs. (A) Association intime du reticulum endoplasmique (ER) et des mitochondries (M) de la cellule-hôte avec la VP. D'après [Sinai et al., 1997]. Barre 500nm. (B) PVEs dans une cellule infectée, mises en évidence par immunofluorescence dirigée contre GRA7. Barre 1µm, d'après [Jacobs et al., 1998]. (C) HOST : invagination de la PVM dans l'espace vacuolaire. On distingue dans ce HOST un microtubule de la cellule-hôte. Les HOSTs sont couverts d'un manteau dense aux électrons régulièrement espacé (flèches). Barre 100nm. D'après [Coppens et al., 2006]. ER réticulum endoplasmique de la cellule-hôte, M mitochondrie de la cellule-hôte, Tg parasite.

Tamis moléculaire

La PVM permet la diffusion passive de molécules de poids inférieur à 1300-1900 Da [Schwab et al., 1994], ce qui implique l'existence de pores dans la membrane. Les assemblages de type pore impliquent généralement un arrangement circulaire de sous-unités protéiques homologues assemblées de manière compacte autour d'un pore aqueux ; l'oligomérisation observée de GRA3 dans la vacuole en fait une candidate pour la formation d'un tel assemblage [Ossorio et al., 1994].

Interactions avec les organites de la cellule-hôte

La PVM est en contact intime avec les mitochondries et le reticulum endoplasmique de la cellule-hôte immédiatement après invasion (Fig. 1.11 A). Ces interactions PVM-organites sont morphologiquement similaires aux interactions observées chez les eucaryotes entre mitochondrie et réticulum endoplasmique, qui permettent le transfert direct de lipides. Pour ces dernières, un mécanisme d'interaction a été proposé : une protéine ancrée dans un organite pourrait "capturer" un autre par insertion dans sa membrane ou par formation d'un pont [Voelker, 2005].

Certaines protéines ROP et GRA apparaissent impliquées. La protéine ROP2, qui possède une séquence d'adressage mitochondrial [Sinai & Joiner, 2001], a été montrée nécessaire à l'association des mitochondries de la cellule-hôte à la VP [Hajj et al., 2006, Nakaar et al., 2003]. Il a été montré qu'elle expose son domaine N-terminal dans le cytosol de la cellule-hôte, et que ce domaine N-terminal est transféré de l'autre côté de la membrane externe mitochondriale [Sinai & Joiner, 2001]. Du côté des protéines GRA, l'implication de GRA3 est envisagée : elle possède un motif dilysine (KKXX) qui constitue un signal pour le transport rétrograde³⁰ vers le RE [Henriquez et al., 2005], et elle apparaît associée à des éléments du RE de la cellule-hôte [Sinai et al., 1997]. Il faut cependant préciser qu'une étude récente d'un parasite KOGRA3 remet en cause cette hypothèse [Craver & Knoll, 2007] : il a été montré que l'absence de cette protéine n'a pas d'effet sur l'association des organites à la PVM, ni sur la croissance du parasite.

Interactions avec le cytosquelette de la cellule-hôte : les HOSTs et les PVEs

Après sa formation, la VP est rapidement encagée dans les microtubules et les filaments intermédiaires de la cellule-hôte [Melo et al., 2001]. Leur mode de recrutement et d'association à la VP est peu connu, mais les microtubules sont à l'origine de deux types d'extensions membranaires observés dans la vacuole, les PVEs et les HOSTs (Fig. 1.11 B,C).

Les protéines GRA associées à la PVM, GRA3,5,7 sont également associées aux PVEs, extensions membranaires de la PVM dans le cytosol [Dubremetz et al., 1993, Fischer et al., 1998]. L'association de GRA8 n'a pas été observée jusqu'ici.

Les HOSTs, extensions de la PVM dans la vacuole, sont décorées d'un manteau protéique qui comprend la protéine GRA7. Aucune autre protéine GRA n'a pu y être détectée [Coppens et al., 2006]. Un parasite mutant qui n'exprime pas la protéine GRA7 a été construit [Coppens et al., 2006]. Ce

³⁰Transport vésiculaire depuis l'appareil de Golgi vers le reticulum endoplasmique.

mutant, dans des conditions normales de culture *in vitro*, ne présente pas d'altérations des processus d'invasion, de croissance et de réplication. Par contre, ces parasites KOGRA7 marquent de graves altérations phénotypiques si le milieu de culture est déplété en serum : croissance ralentie par rapport à la souche sauvage, vacuolisation du parasite et perte d'organites. Ce résultat peut être interprété dans le sens d'un rôle important de GRA7 dans le rôle endocyttaire supposé des HOSTs. Cependant, le comportement des autres protéines GRA et la formation des autres structures membranaires de la vacuole n'ont pas été caractérisées dans cette étude : il est possible que toute la phase de maturation de la vacuole soit altérée.

Manipulation des fonctions de la cellule-hôte

Des études très récentes [Molestina & Sinai, 2005, Hajj et al., 2006] suggèrent que la PVM pourrait servir de plateforme de signalisation pour manipuler les fonctions de la cellule-hôte (pour revue [Martin et al., 2007]). Des kinases parasitaires localisées à la PVM peuvent en particulier moduler l'activation de molécules de signalisation de la cellule-hôte impliquées dans le mécanisme d'inhibition de l'apoptose, afin d'éviter la mort prématurée de la cellule-hôte. Le rôle de certaines protéines ROP a été mis en évidence [Carey et al., 2004] mais aucune protéine GRA n'a jusqu'ici été impliquée dans ce type d'activité.

Bilan : Protéines GRA de la PVM

Des rôles vacuolaires sont envisagés pour GRA7 (impliquée dans la fonction endocyttaire des HOSTs), ainsi que pour GRA3, de manière plus hypothétique (association avec le RE de la cellule-hôte, formation de pores). Quant aux protéines GRA5 et GRA8, aucune hypothèse n'est formulée actuellement. Un mutant délété de la protéine GRA5 a été réalisé mais aucun effet de cette délétion n'a pu être mis en évidence dans des conditions normales de culture [Mercier et al., 2001] : cette protéine associée à la PVM pourrait être impliquée dans les processus évoqués mais n'y jouerait pas un rôle essentiel. Un mutant délété de la protéine GRA8 reste à réaliser.

1.4.3 Structures internes de la VP : RNM et corps résiduel

Le réseau de nanotubules membranaires (RNM) se déploie dans la vacuole entre les parasites, établissant des connections d'une part, avec le corps résiduel (RB), qui attache ensemble tous les parasites d'une vacuole par leur extrémité postérieure et d'autre part, avec la PVM (Fig. 1.12).

Ce sont essentiellement les protéines GRA2,4,6,9 qui sont associées au RNM mais on y retrouve aussi les autres protéines GRA, en plus ou moins grande proportion, y compris GRA1, protéine hydrophile. Les protéines GRA1,2,6 apparaissent également au niveau du corps résiduel.

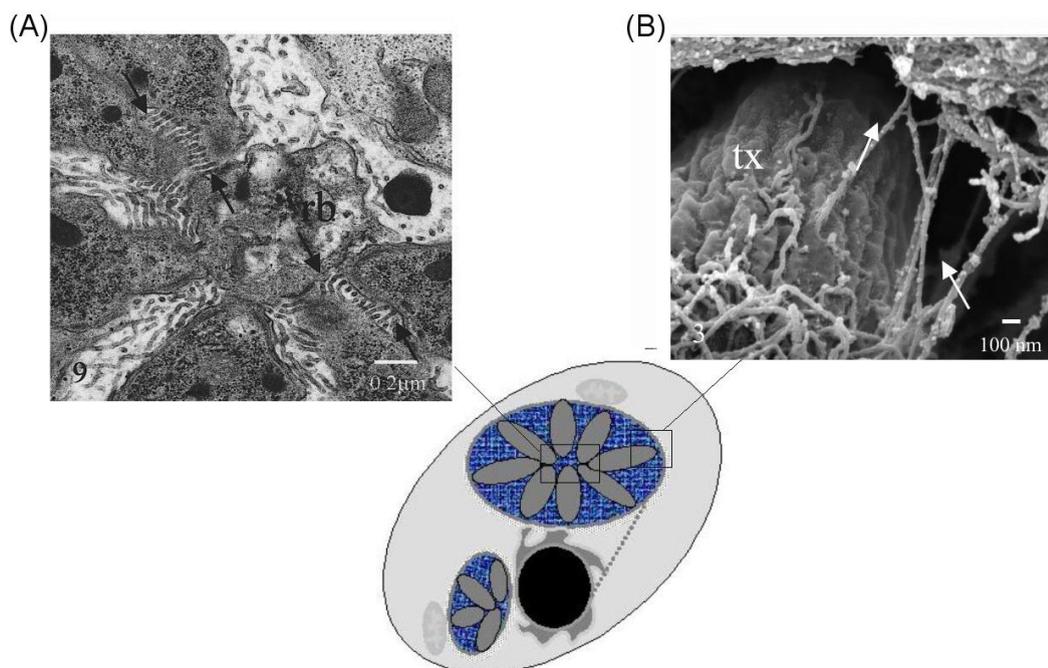


FIG. 1.12: Structures internes de la vacuole parasitophore : RNM et RB. (A) Parasites organisés en rosette autour du RB. Dans certains plans d'observation, les tubules du RNM apparaissent régulièrement espacés (flèches). Sections ultrafines de cellules infectées observées par microscopie électronique à transmission. D'après [de Souza, 2005]. (B) RNM : réseau de nanotubules membranaires. Le RNM apparaît connecté à la PVM par endroits (flèches). Cellules infectées fracturées afin d'exposer la portion interne de la cellule, puis observées par microscopie électronique d'émission de champ à balayage. tx tachyzoïte, rb corps résiduel. D'après [de Souza, 2005].

Formation du RNM et du RB

La sécrétion des protéines de granules denses coïncide avec la biogénèse de ce réseau et celui-ci est décoré de protéines GRA (GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9) à maturité, suggérant l'implication de ces protéines dans son processus de formation [Charif et al., 1990, Lecordier et al., 1995, Labruyere et al., 1999, Adjogble et al., 2004]. Une étude basée sur la construction de mutants délétés des protéines GRA2 ou GRA6 a montré que ces deux protéines sont nécessaires pour le développement du RNM dans la vacuole. Le matériel membranaire est bien assemblé dans la PV mais n'adopte pas la structure spécifique en tubules. En l'absence de GRA2, il reste granulaire et non structuré (Fig. 1.13 Δ GRA2); en l'absence de GRA6, il s'assemble en grands feuilletés et grosses vésicules (Fig. 1.13 Δ GRA6). Dans le cas de GRA2, il a été montré que la délétion d'une seule hélice- α amphipathique de sa séquence empêche complètement le développement du RNM [Mercier et al., 2002].

Implication des protéines GRA dans le rôle des structures internes

Plusieurs hypothèses ont été évoquées précédemment (voir Section 1.2.3 "Formation du RNM") quant au rôle des structures de la PV. La connaissance des protéines GRA qui y sont associées, ainsi que les études détaillées des mutants délétés de GRA2 et GRA6, ont fait évoluer les idées [Muniz-Hernandez et al., 2007]. En effet, en l'absence de GRA2, le RB ne se forme pas : les pa-

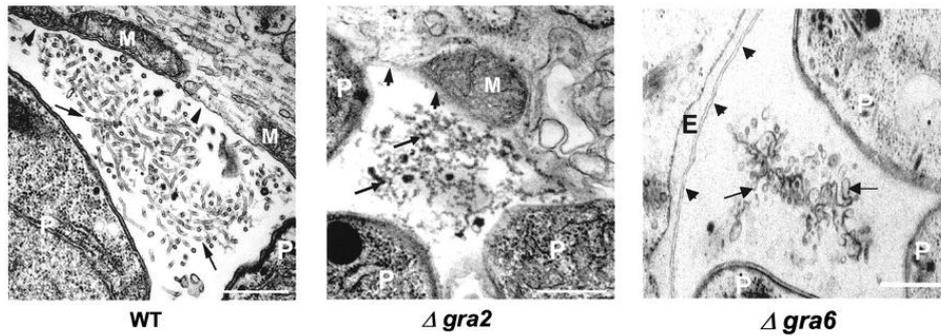


FIG. 1.13: Altérations ultrastructurales du RNM après délétion de la protéine GRA2 ou GRA6. Observation de cellules fixées 24h après infection. Les flèches indiquent le RNM et les pointes la PVM. Barres 500nm. D'après [Mercier et al., 2002].

parasites se multiplient de manière asynchrone et perdent leur cohésion, formant une structure peu compacte. Il apparaît donc que le RB est nécessaire à une compaction efficace des parasites dans la vacuole et que la protéine GRA2 est indispensable à sa formation. En l'absence de GRA6, malgré l'absence d'un RNM structuré, le RB se forme correctement et les parasites sont organisés et bien compactés dans la vacuole, ce qui suggère que le RNM n'est pas non plus nécessaire à l'organisation de la PV. Cependant, l'absence de GRA2 ou GRA6 ne modifie ni les capacités d'invasion, ni la croissance, ni l'évasion des parasites [Mercier et al., 2002, Muniz-Hernandez et al., 2007], ce qui relativise l'importance de la structuration de la vacuole, du moins *in vitro*.

Enfin, la présence de la protéine GRA1 (deux domaines de fixation pour le Ca^{2+}) au niveau du RNM et du RB renforce l'idée d'un rôle de stockage du calcium et de régulation de la vie intracellulaire du parasite pour ces structures membranaires [de Souza, 2005].

Bilan : Protéines GRA du RNM

Il apparaît que la protéine GRA2 est nécessaire au bon développement du RNM ainsi que du RB, affirmant un rôle de structuration membranaire. La protéine GRA6 n'apparaît nécessaire qu'au développement du RNM, son absence empêchant la tubulation des membranes intravacuolaires. Cependant, ces protéines apparaissent dispensables au développement du parasite cultivé *in vitro*. Pour les autres protéines GRA (GRA1, GRA4, GRA9), des études sur les parasites KO restent à réaliser.

1.4.4 Régulation des protéines GRA aux différents stades parasitaires

La plupart des études sur les protéines de granules denses ont été réalisées au stade tachyzoïte. Cependant l'expression des protéines GRA varie entre les différents stades, selon des schémas complexes et peu expliqués [Ferguson, 2004, Ferguson et al., 1999, Tilley et al., 1997, Coppin et al., 2003, Mercier et al., 2007]. Ces données mettent à jour la possibilité que l'expression des protéines GRA soient régulées au cours du développement parasitaire. Cette régulation de l'expression résulterait

de l'adaptation du parasite et du type de vacuole mis en place, en fonction des tissus envahis (tissus de l'hôte intermédiaire ou epithelium intestinal de l'hôte définitif, efficacité de la réponse immunitaire). En particulier, le processus d'enkystement montre une localisation des protéines GRA dans la paroi kystique. Il est possible que les structures intravacuolaires contribuent à la formation de cette paroi en se redistribuant contre la membrane délimitant la vacuole.

1.4.5 Conclusion : Rôles des protéines GRA

1/ Des protéines non essentielles :

La plupart des protéines GRA, bien qu'elles soient sécrétées en grande quantité juste après l'invasion, apparaissent dispensables au bon fonctionnement de la vacuole et au développement parasitaire *in vitro*, puisque la délétion de GRA2, GRA6, GRA3, GRA5 ou GRA7 ne modifie ni les capacités d'invasion, ni les capacités de prolifération, ni l'évasion des parasites en conditions normales de culture. Les protéines GRA2, 5 et 6, même successivement éliminées dans une même construction [Mercier et al., non publié], ne sont pas nécessaires pour le développement *in vitro* du parasite.

2/ Rôle de structuration membranaire :

Coppens et al. (2006) ont démontré que les antigènes excrétés-sécrétés (ES), dans lesquels les protéines GRA sont majoritaires, suffisent à déformer des liposomes, pour aboutir à de fins tubules membranaires [Coppens et al., 2006]. Cela confirme un rôle de structuration membranaire pour certaines d'entre elles.

3/ Régulation en fonction du stade du parasite :

Certaines protéines GRA pourraient jouer un rôle plus primordial à des stades parasitaires autres que le stade tachyzoïte ; en particulier au stade bradyzoïte où elles pourraient contribuer à la formation de la paroi kystique.

4/ Rôle dans la virulence :

Le trafic des protéines de granules denses à travers la PVM jusque dans le cytosol de l'hôte n'a jamais été mis en évidence mais il pourrait être nécessaire pour la présentation des protéines immunogènes à la surface des cellules. Cela pourrait en particulier être le cas des protéines GRA2 et GRA3, qui jouent un rôle certain dans la virulence du parasite [Mercier et al., 1998a, Craver & Knoll, 2007]. Pour comparaison, de nombreuses protéines de *Plasmodium falciparum* sont exportées à l'extérieur de sa vacuole [Epp & Deitsch, 2006, Lingelbach & Przyborski, 2006].

D'autre part certaines protéines GRA pourraient, si elles sont transportées dans son cytosol, intervenir dans des processus de la cellule-hôte. Ahn et al. [Ahn et al., 2006] ont cherché à identifier par une technique de double-hybride³¹ des protéines de cellules humaines interagissant avec les protéines GRA. De nombreuses interactions seraient possibles avec des enzymes, des

protéines structurelles et fonctionnelles d'organites. La spécificité de ces interactions reste à confirmer et leur interprétation à préciser dans le contexte d'une infection parasitaire.

Ce chapitre aboutit à la mise en lumière des enjeux biologiques menant mon travail de thèse, centré sur l'étude des interactions des protéine GRA avec les membranes de la vacuole :

- (i) comment des protéines membranaires comme les GRA sont-elles stockées et sécrétées sous forme soluble ?
- (ii) comment les protéines GRA passent-elles de leur forme granulaire soluble à leur forme vacuolaire membranaire ?
- (iii) quels sont les mécanismes qui permettent le ciblage spécifique et l'association à des membranes vacuolaires particulières ?
- (iv) quelles sont les fonctions des protéines GRA dans la vacuole ?

Chapitre 2

Problématiques autour du trafic et de la fonction des protéines GRA

L'objet de cette étude est la famille des protéines de granules denses de *T. gondii*, leurs rôles et leur évolution, depuis les granules denses jusqu'aux membranes de la vacuole. Sur ce sujet très générique, des questions majeures ont été soulignées, et ce chapitre a pour but de les préciser.

Trafic des protéines GRA jusqu'à leurs membranes-cibles de la vacuole. Les protéines GRA, comme toutes les protéines sécrétées, sont synthétisées au niveau du reticulum endoplasmique (RE) puis acheminées à leur compartiment de stockage [Karsten et al., 2004]. La plupart des protéines contenant des TMD sont insérées au cours de leur synthèse dans la membrane du RE, puis acheminées par transport vésiculaire au cours de leur trafic, jusqu'à leur membrane-cible. Par contraste, les protéines GRA, bien que présentant des TMD (potentiels) semblent exister tout au long de leur trafic sous des formes non membranaires : elles sont retrouvées sous forme soluble et sous forme agrégée dans les granules denses, puis sécrétées sous forme essentiellement soluble dans la vacuole. De plus, l'observation par microscopie électronique du matériel sécrété par les granules denses dans la vacuole [de Souza, 2006] ne met pas en évidence des vésicules de transport.

De quelle façon les protéines GRA sont-elles transportées des granules denses jusqu'aux membranes de la vacuole ?

Association des protéines GRA aux membranes de la vacuole Une fois sécrétées dans la vacuole, les protéines GRA sont ciblées vers leur localisation spécifique dans la vacuole. Leur association aux membranes de la vacuole relève donc de mécanismes d'insertion post-traductionnels. Elles vont, en grande partie, s'associer aux structures membranaires de la vacuole : essentiellement GRA2,4,6,9 au RNM, GRA7 aux HOSTs, GRA3,5,7,8 aux PVEs et PVM. Leur répartition variée laisse entendre qu'il existe un mécanisme de ciblage permettant leur association préférentielle à certaines structures membranaires.

Quel mécanisme permet leur association aux membranes ? Comment sont-elles ciblées dans les membranes de la vacuole ?

Biogénèse des structures membranaires de la vacuole Peu d'indices sont disponibles quant à la fonction exacte remplie par les protéines GRA dans la vacuole. Ce qui ressort le plus clairement des travaux les concernant est que certaines d'entre elles sont impliquées dans la formation des structures membranaires particulières de la vacuole. En effet, les protéines GRA2 et GRA6 sont indispensables à la formation correcte du RNM [Mercier et al., 2002]. Par ailleurs, GRA7 semble jouer un rôle dans la forme des HOSTs [Coppens et al., 2006].

De quelle façon sont-elles impliquées dans la formation des différentes structures membranaires de la vacuole ?

Les principes physiques qui sont à la base du trafic, l'insertion de protéines dans des membranes, ou de la génération de formes membranaires sont universels ; le but de cette section est de décrire ces principes et de considérer leur réalisation dans un contexte biologique particulier : la vacuole parasitophore de *T. gondii*.

2.1 Solubilisation de protéines de membrane

Les segments fortement apolaires qui vont former des hélices transmembranaires doivent éviter l'agrégation avant d'atteindre leur membrane de destination. C'est pourquoi presque toutes les protéines de membrane sont insérées dès leur synthèse dans la membrane du reticulum endoplasmique, après quoi elles peuvent atteindre leur membrane-cible par transport vésiculaire. Cependant, dans certains cas, la protéine ne nécessite de manifester son caractère hydrophobe qu'une fois qu'elle a atteint sa membrane-cible ; les séquences hydrophobes doivent donc être enfouies, à l'intérieur de la protéine ou au sein d'un complexe, afin d'éviter l'agrégation de la protéine. Au moment du contact avec la membrane, il faut qu'il y ait changement de conformation de la protéine, soit par contact direct (reconnaissance de lipides ou d'éléments protéiques spécifiques), soit par le biais d'une protéine chaperone, afin que le segment à insérer soit exposé.

2.1.1 Trafic individuel : repliement

Certaines protéines replient leurs hélices hydrophobes à l'intérieur de leur structure tertiaire lorsqu'elles sont dans leur conformation soluble : les séquences hydrophobes ne sont ainsi exposées à la surface de la protéine qu'après un changement de conformation. C'est le cas par exemple de protéines impliquées dans le trafic membranaire intracellulaire, telles que l'epsine, la protéine G Sar1, l'annexine B12 [Horvath et al., 2007, Lee et al., 2005, Fischer et al., 2007], ou de certaines toxines bactériennes, telles que la toxine diphtérique et la colicine [Parker & Pattus, 1993, Facey & Kuhn, 2004]. Les facteurs de déclenchement du changement de conformation semblent variés : pour les toxines bactériennes, un pH bas ou la présence dans la membrane de lipides chargés négativement ; pour la

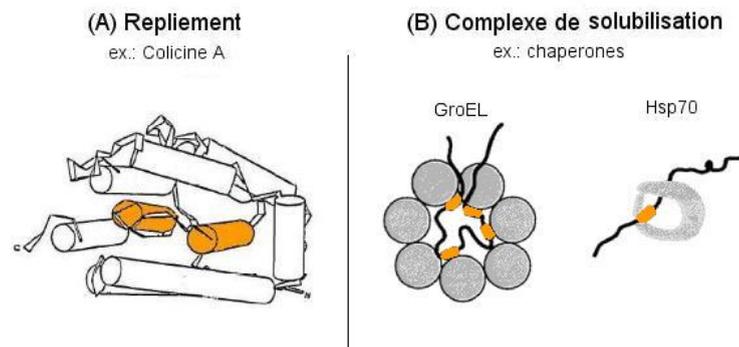


FIG. 2.1: Formes de solubilisation de protéines à domaines transmembranaires. (A) Forme de solubilisation individuelle : structure tridimensionnelle d'un fragment de la colicine A. Les cylindres représentent des hélices, ceux en orange, hydrophobes, sont complètement enfouis dans la structure ternaire de la protéine, dans cette conformation. (B) Complexe de solubilisation. En exemple, l'interaction de certains complexes protéiques chaperons (en gris) : GroEL et Hsp70. Ces complexes permettent la solubilisation et le repliement de protéines (en noir) possédant des segments hydrophobes (en orange). D'après [Lakey et al., 1992, Bukau & Horwich, 1998].

GTPase Sar1, l'interaction avec le GTP ; pour l'epsine ou l'annexine B12, la reconnaissance préliminaire de certains lipides de la membrane. Le changement de conformation est caractérisé par un dépliement partiel transitionnel, connu sous le nom d'état "molten globule", car il correspond à une forme peu structurée de la protéine. Généralement, les hélices hydrophobes ne se forment qu'au moment du contact avec la membrane ; leur organisation globale (orientation relative, compaction des hélices) est également modifiée pour l'exposition des segments hydrophobes [Shai, 1999].

Les protéines GRA ne contiennent pour la plupart qu'un seul TMD. Ce sont par ailleurs de petites protéines (<50kDa) : il n'est donc pas évident qu'elles puissent adopter une conformation enfouissant complètement les résidus hydrophobes.

2.1.2 Trafic en complexe : protection par des cofacteurs

La formation de complexes de solubilisation avec des cofacteurs peut également permettre d'isoler des domaines hydrophobes du milieu environnement. Ces complexes peuvent être formés par des protéines qui fonctionnent ensemble dans la membrane-cible. Ces complexes peuvent également impliquer des cofacteurs qui servent uniquement à la solubilisation pendant le transport de la protéine. Par exemple, les protéines chaperones assistent le repliement, l'assemblage, le transport et la dégradation de protéines mais elles n'interagissent pas fonctionnellement avec les protéines dont elles assurent le transport. Elles protègent donc les protéines d'un repliement inadéquat ou de l'agrégation pendant leur trafic. Pour exemple, il a été montré *in vitro* que le complexe chaperon GroEL peut solubiliser une protéine intégrale de membrane, la bactériorhodopsine [Deaton et al., 2004].

Les protéines GRA, d'après certains travaux récents au LAPM [Travier et al., 2007], sont trouvées en interactions entre elles dans la vacuole. De plus la présence d'une cyclophiline, protéine impliquée dans le repliement de protéines riches en prolines, laisse envisager que les protéines GRA soient assistées par des cofacteurs pour leur trafic jusqu'aux membranes de la vacuole.

2.2 Mécanismes d'insertion membranaire

Certaines protéines membranaires échappent à la voie classique d'insertion co-translationnelle. Elles sont insérées post-translationnellement, à une étape beaucoup plus tardive de leur trafic. Les processus d'insertion et de stabilisation d'une protéine dans une membrane font intervenir les préférences des acides aminés pour différentes portions de la bicouche, les énergies des interactions au sein de la protéine elle-même ainsi que les interactions entre la protéine et la bicouche. Le processus d'insertion de la protéine est le plus souvent assisté par une machinerie protéique mais semble également pouvoir se produire de manière spontanée. L'insertion effective d'une protéine nécessite une deuxième étape afin de stabiliser la protéine dans la bicouche, par divers réarrangements.

2.2.1 Critère premier pour l'insertion d'un segment transmembranaire

Le coeur hydrophobe d'une membrane est large d'environ 30Å dans une bicouche typique et il est dominé par les chaînes aliphatiques des lipides. La région interfaciale de la membrane comprend les têtes polaires des lipides et une grande quantité de molécules d'eau liées ; cette région est large d'environ 15Å et constitue donc également une caractéristique majeure de l'environnement d'une protéine membranaire. La condition élémentaire pour l'insertion d'une protéine est qu'elle possède un segment d'hydrophobicité générale assez forte pour s'accomoder de l'environnement apolaire du coeur de la bicouche,. Ce segment doit être également suffisamment long pour traverser la bicouche lipidique. Un segment de 20 aa en conformation hélicale (conformation la plus courante) est juste assez long pour traverser le coeur hydrocarboné d'une bicouche typique [Popot & Engelman, 1990]. Cependant, à ce modèle simplifié peut être ajoutée la prise en compte de l'inhomogénéité de la bicouche [Wimley & White, 1996]. Comme la membrane n'est pas un environnement homogène, la probabilité d'insertion ne dépend pas uniquement de l'hydrophobicité globale du TMD mais aussi 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 coeur de la bicouche, va contribuer à abaisser la barrière. La translocation de segments hydrophiles à travers la membrane va au contraire défavoriser le processus.

|| Les protéines GRA2 à 9 ont au moins un segment hydrophobe ou amphipathique suffisamment long pour traverser une membrane.

2.2.2 Insertion assistée

L'insertion des protéines membranaires semble être le plus souvent assistée par une machinerie protéique spécialisée, appelée translocon (Fig.2.2). C'est un complexe de protéines intégrales de membrane qui peut guider les segments protéiques à la fois à travers (translocation¹) et au sein-même (insertion) de la bicouche lipidique environnante. Ce mécanisme assisté et consommateur d'énergie concerne en particulier toutes les protéines insérées co-translationnellement, par le biais des translocons Sec61 chez les eucaryotes ou SecY chez les procaryotes [Alder & Johnson, 2004,

¹La translocation est le fait de faire passer des segments d'une protéine d'un côté à l'autre d'une membrane.

von Heijne, 1997]. Il concerne également bon nombre de protéines insérées post-traductionnellement, par le biais de translocons présents dans diverses membranes intracellulaires (complexe importomer associé aux peroxysomes, complexes TIM22, TIM23, TOM et OXA dans les membranes mitochondriales) [Rayapuram & Subramani, 2006, Paschen & Neupert, 2001].

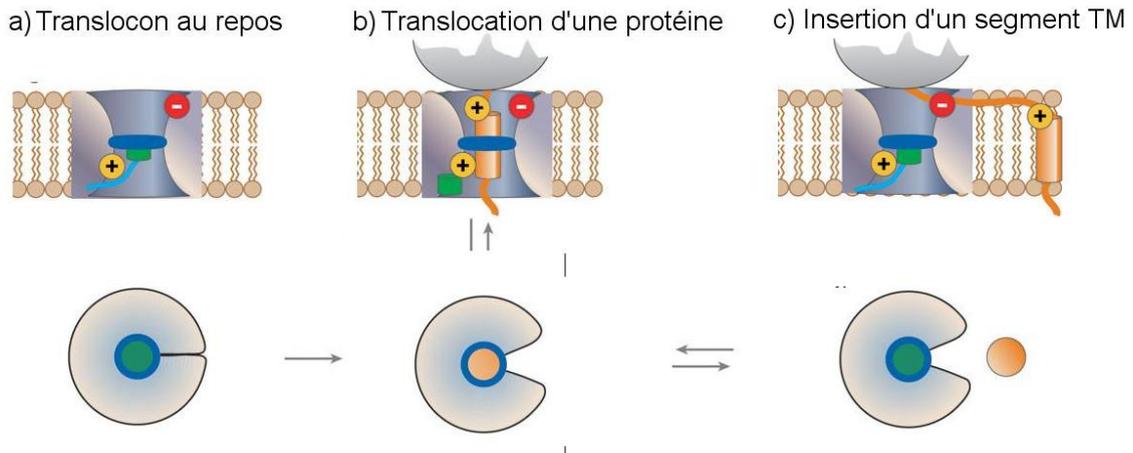


FIG. 2.2: Processus d'insertion assistée. a) Vue schématique de côté et de dessus du translocon Sec61 montrant la localisation des charges, l'hélice qui ferme le canal en l'absence de protéine en vert, et les colliers hydrophobes en bleu foncé. b) Une protéine (en orange) se présente pour être insérée, émergeant d'un ribosome, ou d'un complexe chaperon (en gris). Un résidu positivement chargé aide à définir la topologie de la protéine comme N-terminal en premier. c) Le translocon ouvre une porte latérale afin que l'hélice puisse sortir dans la membrane si la partition est favorable. D'après [Bowie, 2005].

Insertion des segments hydrophobes et translocation des segments polaires. On peut voir le translocon comme un dispositif destiné à abaisser la barrière d'activation pour la translocation de résidus chargés et polaires à travers la membrane en fournissant un canal aqueux, tout en rendant possible pour des segments de la protéine de faire des "excursions latérales" à partir du canal afin de tester si l'énergie libre d'insertion membranaire est favorable ou non. Les premiers résultats disponibles de la structure du translocon Sec61, situé dans la membrane du reticulum endoplasmique, semblent indiquer que les segments transmembranaires quittent le canal à travers une porte latérale dans la paroi du canal [den Berg et al., 2004, Beckmann et al., 2001] (Fig.2.2 b). Différents composants de ce mécanisme très orchestré ont été identifiés, y compris des GTPases qui fournissent l'énergie nécessaire au processus ; cependant, l'environnement moléculaire précis et les détails mécaniques derrière la reconnaissance d'hélices transmembranaires sont encore obscurs [Bowie, 2005, White & von Heijne, 2005].

Topologie de la protéine. Le translocon aide non seulement à la décision d'insertion d'un segment mais également, à la décision de la topologie de la protéine, généralement selon la règle du "positive-inside" [von Heijne, 1986] : l'extrémité chargée positivement de la protéine reste du côté cytoplasmique de la membrane. Cette préférence peut résulter en partie d'une différence de potentiel électrostatique entre les deux compartiments et/ou de la composition lipidique, mais le translocon

lui-même joue un rôle important, étant chargé positivement du côté externe et négativement à l'intérieur [Goder et al., 2004].

L'analyse du génome de *T. gondii* a mis en évidence des séquences homologues à celles des composants majeurs des machineries de translocation eucaryotes (entre autres Sec61, Sec63, Sec11, chaperones du RE) [Ajioka, 1998], suggérant la fonctionnalité de mécanismes d'insertion assistée chez le parasite. L'insertion assistée des protéines GRA pourrait permettre de préserver une spécificité de ciblage des protéines dans les différentes membranes de la vacuole. En effet chez les eucaryotes il a été montré que différentes membranes d'un même organe peuvent avoir des machineries de translocation post-traductionnelle propres (e.g. les membranes internes et externes des mitochondries). Cette hypothèse nécessiterait soit la sécrétion dans la vacuole des composants des machineries de translocation concernées (*via* les rhoptries, les granules denses, ou encore associées aux vésicules pré-ludant au RNM), soit l'utilisation de machineries de la cellule-hôte ; aucun de ces points n'a été démontré.

2.2.3 Insertion spontanée

L'insertion d'une protéine dans une membrane peut également se produire de manière spontanée et sans apport d'énergie (Fig.2.3). Dans ce cas, le processus est essentiellement basé sur les interactions hydrophobes entre protéine et membrane. Ce mécanisme a été montré possible *in vitro* pour des protéines de propriétés très variées, qui partagent celle de s'insérer post-traductionnellement : toxines bactériennes, protéines de manteau de phage, protéines de thylakoïdes, Annexine B12, cytochrome b5 [Zakharov et al., 1998, Kiefer & Kuhn, 1999, Mant et al., 2001, Ladokhin et al., 2002, Brambillasca et al., 2005]. Cependant il a été montré que certaines de ces protéines utilisent des machineries de translocation pour leur insertion *in vivo* [Samuelson et al., 2000]. Bien que la pertinence biologique de ce mécanisme ne soit pas avérée, certains travaux récents soulignent sa vraisemblance [Brambillasca et al., 2006, Cola et al., 2005, van Dalen & de Kruijff, 2004].

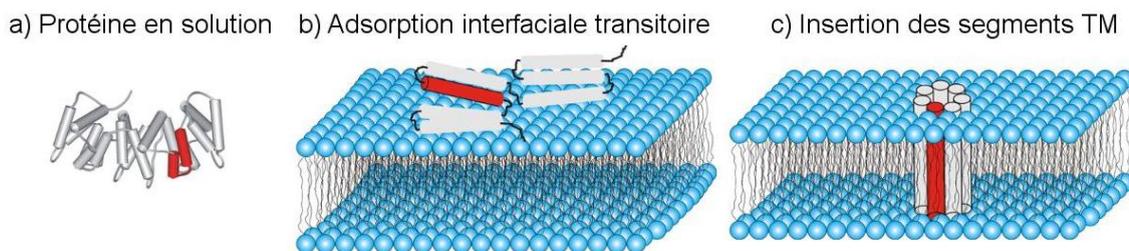


FIG. 2.3: Processus d'insertion spontanée. Exemple de l'insertion spontanée de la protéine Annexine B12. a) La protéine est sous forme monomère en solution. Les régions rouges ont une structure hélice-boucle-hélice dans la forme soluble. b) La protéine s'adsorbe à l'interface de la bicouche lipidique, ayant subi un changement de conformation qui transforme les deux hélices rouges en une seule hélice continue amphipathique. c) La protéine transfère ses segments hydrophobes et amphipathiques dans la bicouche, et les boucles hydrophiles de l'autre côté : la protéine est insérée. D'après [Fischer et al., 2007].

Etat intermédiaire interfacial. L'insertion spontanée d'une protéine implique un état intermédiaire "molten globule" où la protéine s'adsorbe à la surface de la bicouche (Fig.2.3 b) [White et al., 2001]. Dans cette configuration, les structures secondaires à insérer s'organisent (formation des hélices) mais il manque encore les contacts tertiaires entre hélices, contacts qui sont spécifiques de l'état final inséré. Cette configuration a pu être observée pour certaines protéines, telles que la colicine E1 ou l'annexine B12 [Zakharov et al., 1998, Ladokhin et al., 2002].

Insertion. Pour une translocation membranaire de la protéine réussie, l'interaction hydrophobe entre le segment transmembranaire et le coeur hydrocarboné de la bicouche doit servir de source d'énergie pour la translocation d'une des queues hydrophiles. Le potentiel électrochimique de la membrane peut servir de source additionnelle d'énergie pour la translocation si la partie hydrophile à transférer est chargée [Kiefer & Kuhn, 1999]. Ainsi, l'insertion des TMDs des protéines catalyse la translocation de leur propre domaine C-terminal ou N-terminal polaire, pourvu que la bicouche lipidique soit suffisamment désorganisée et que la longueur du domaine polaire ne soit pas excessive (jusqu'à environ 100 acides aminés dans les travaux de Brambillasca et al. sur la protéine cytochrome b5) [Brambillasca et al., 2005, Brambillasca et al., 2006].

Topologie. La topologie de la protéine dans la membrane pourrait être guidée par les interactions électrostatiques entre la protéine et la bicouche, en prévenant ou en promouvant la translocation de segments polaires chargés [Gallusser & Kuhn, 1990, van Klompenburg & de Kruijff, 1998]. La longueur du TMD, ainsi que la longueur des segments polaires à transférer à travers la membrane, influent également de manière importante sur la topologie [Brambillasca et al., 2006].

Les protéines GRA sont courtes et ne contiennent qu'un seul TMD ; il est donc tout à fait envisageable qu'elles s'insèrent de manière spontanée dans des membranes, du moins *in vitro*.

2.2.4 Stabilisation des protéines après insertion

La protéine doit trouver une conformation stable, native, au cours de ou après son insertion. Cela se produit par le réarrangement de segments de la protéine, éventuellement insérés dans la membrane *a posteriori*. Plusieurs types d'interaction entrent en jeu [Lee, 2004] : 1) des forces non spécifiques de la bicouche agissant sur la conformation de la protéine, mais également réciproquement de la protéine agissant sur la structure membranaire ; 2) des interactions entre hélices voire entre protéines. Le réarrangement de la protéine dans la membrane vise à minimiser toutes les forces en jeu.

Interactions protéine-lipides. La composition lipidique de la membrane-hôte peut déterminer le sort des protéines en cours d'association, puisqu'elle peut affecter non seulement l'efficacité de translocation et la topologie de la protéine de membrane résultante de l'opération, mais également sa stabilité, son assemblage en complexes oligomériques et son activité [Schneider & Toulmay, 2007]. Un premier effet majeur provient de l'adéquation de la longueur du TMD à l'épaisseur du coeur hydrocarboné de la bicouche : une inadéquation entre les deux serait à l'origine d'une tension de

décalage hydrophobe. Un autre effet majeur est lié à l'adéquation entre la forme de la bicouche et celle de la protéine : une forme particulière, non cylindrique, de la protéine, insérée dans une phase lipidique lamellaire, va générer une frustration de courbure, c'est-à-dire une surcompaction dans le coeur hydrocarboné ou dans la région des têtes polaires [Gruner, 1985]. Ces deux effets peuvent se résoudre de diverses façons, en particulier par l'agrégation des protéines insérées ou par la ségrégation de ces protéines dans des domaines membranaires contenant des lipides adaptés [Killian & Nyholm, 2006]. On peut enfin ajouter que les lipides sont des cofacteurs d'un grand nombre de protéines. Certains peuvent être nécessaires pour l'insertion-même des protéines, d'autres pour leur stabilisation et leur fonctionnalité dans la membrane.

Interactions protéine-protéine. Un des éléments-clés de la recherche de la conformation stable est la compaction des hélices insérées de manière stable dans la membrane, en particulier par le biais d'interactions polaires entre les "arêtes" centrales des hélices [Adamian & Liang, 2002]. Le réarrangement de la protéine pourrait même induire des translocations complémentaires de segments dans ou à travers la membrane.

Des exigences spécifiques des protéines GRA en matière de forme, d'épaisseur, ou de composition de la bicouche lipidique pourraient expliquer leurs ciblage sur des membranes particulières. Des interactions spécifiques protéine-lipide ont été mises en évidence pour la protéine GRA7, avec des phosphoinositides [Coppens et al., 2006].

2.3 Génération et maintien de courbures membranaires

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 & Kozlov, 2006] analyse en détail les mécanismes supposés de déformations membranaires et leur pertinence biologique. Il ressort de cette analyse que des déformations importantes des membranes peuvent être générées (1) par la formation d'inhomogénéités dans la membrane produisant un effet sur la courbure locale ; mais aussi par une force imposée de l'extérieur : (2) constriction par un manteau de protéine ou (3) forces exercées par le cytosquelette (Fig.2.4).

2.3.1 Genèse de la courbure membranaire

Avant d'explorer l'impact de la courbure sur l'organisation membranaire, nous allons introduire brièvement les paramètres physiques permettant de décrire les processus de déformation d'une membrane. En n'importe quel point d'une membrane générique, dans l'espace à trois dimensions, on peut déterminer les rayons de courbure principale r_1 et r_2 , ou les courbures locales $c_1 = 1/r_1$ et $c_2 = 1/r_2$ (Fig.2.5 A). Ainsi des vésicules sphériques ont une courbure uniformément positive ; le

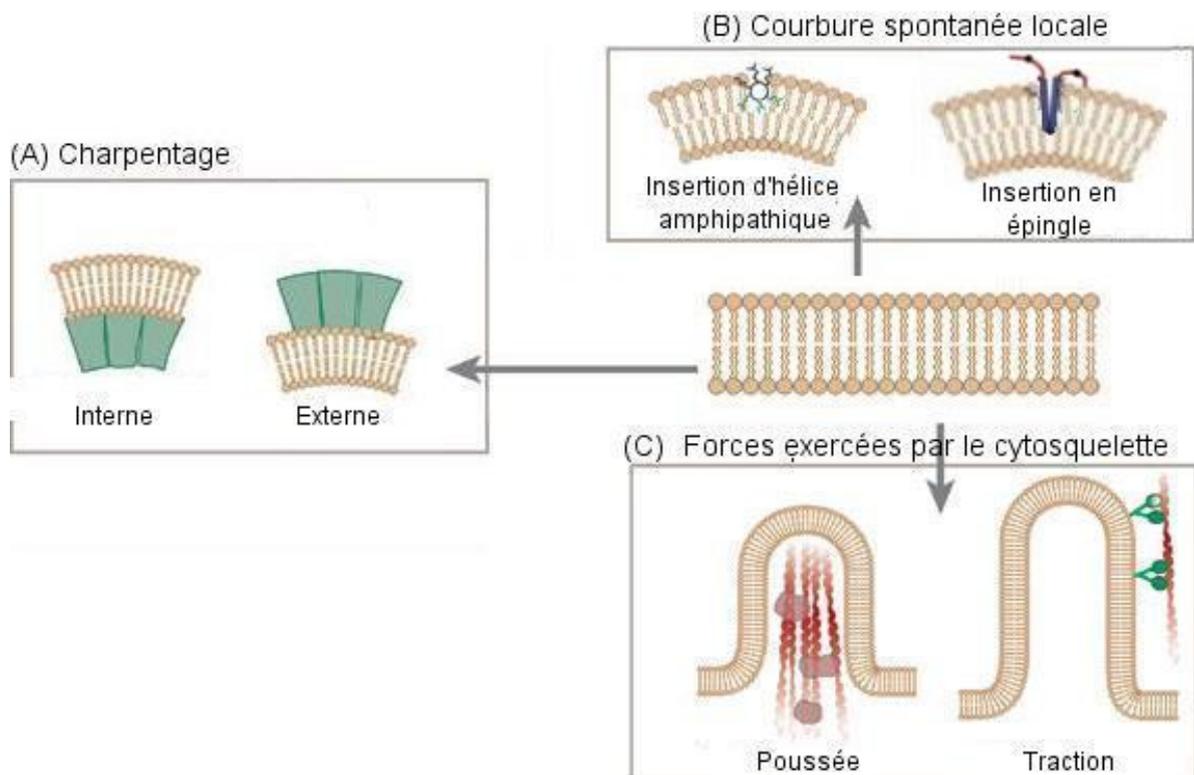


FIG. 2.4: Mécanismes de déformations membranaires. (A) Mécanisme de charpentage. (B) Mécanisme de courbure spontanée locale. (C) Mécanisme de traction ou poussée par le cytosquelette. D'après [McMahon & Gallop, 2005].

cou d'une vésicule encore attachée à une membrane a une forme dite en point de selle, caractérisée par une courbure positive selon un axe et une courbure négative selon l'autre. Pour les membranes biologiques, la définition de courbure positive ou négative est arbitraire : par convention, on définit comme positive la courbure d'une région renflée vers l'extérieur du volume enclos (la cellule, l'organite).

Une membrane biologique au repos a une composition homogène et peut donc être caractérisée par une seule courbure caractéristique, qu'on appelle sa courbure spontanée c_0 . La valeur de la courbure spontanée provient de deux sources : la forme des molécules lipidiques elles-mêmes, et les différences entre les deux feuillets qui composent la bicouche (Fig.2.5 B). Les protéines membranaires contribuent à la courbure spontanée de la membrane et à l'énergie nécessaire à l'incurver, exactement de la même façon que les lipides, par leur forme, leur répartition, et par leurs interactions entre elles et avec les lipides au sein de la membrane (Fig.2.5 C).

Energie nécessaire pour courber une membrane

Le coût énergétique par unité de surface associé au fait d'incurver une membrane, d'après Helfrich [Helfrich, 1973], est donné par la somme de deux termes, l'un dépendant de la courbure totale, $c_1 + c_2$, et l'autre de la courbure gaussienne, $c_1 \cdot c_2$:

$$E_c = (1/2)k_c(c_1 + c_2 - 2c_0)^2 + k_G c_1 c_2.$$

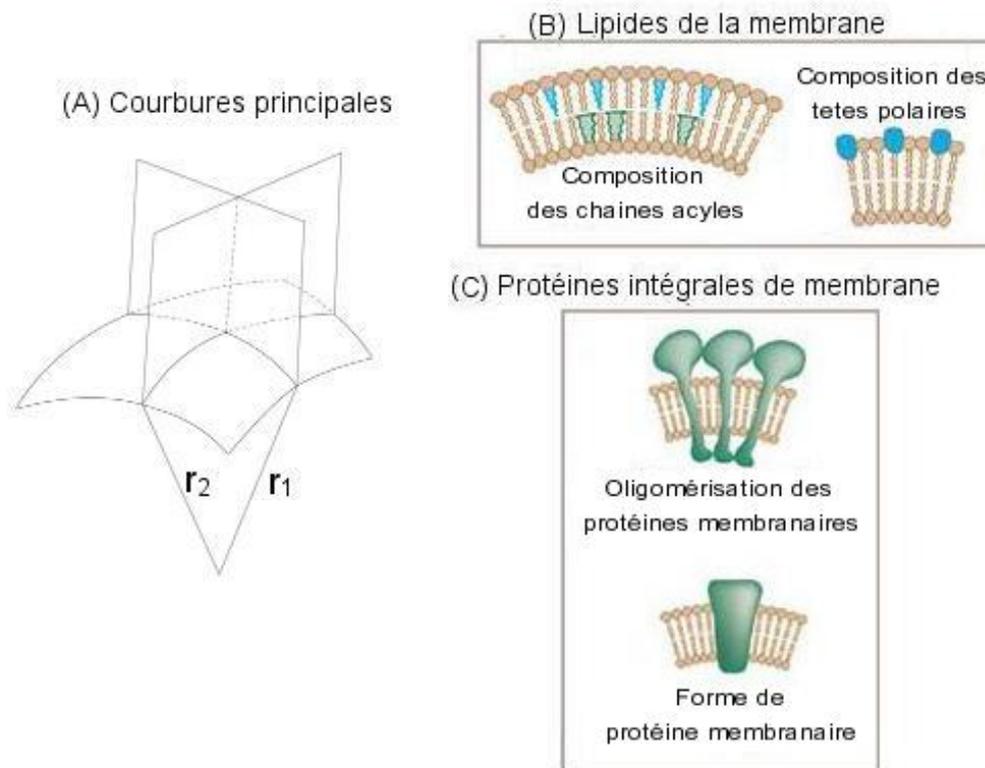


FIG. 2.5: Courbure d'une membrane. (A) Définition des courbures principales d'une membrane, r_1 et r_2 . (B) Contribution des lipides à la courbure spontanée de la bicouche. (C) Contribution des protéines intégrales de membrane à la courbure spontanée de la bicouche. D'après [McMahon & Gallop, 2005].

Cette expression permet de mettre en évidence les paramètres décisifs pour la courbure de la membrane : k_c , le module de courbure, qui caractérise la résistance de la membrane à la courbure en sphère, et k_G , le module de courbure Gaussienne, qui caractérise la résistance de la membrane à la courbure en point de selle. Ces deux modules sont fixés par les interactions entre les molécules de la membrane.

2.3.2 Courbure générée par mécanisme de courbure spontanée locale

Insertion partielle d'une hélice amphipathique

Un des mécanismes majeurs de déformation de membranes est l'insertion partielle ou interfaciale d'une hélice amphipathique. L'insertion superficielle d'une hélice amphipathique dans la partie supérieure d'un feuillet membranaire agit comme un coin inséré dans le feuillet, ce qui perturbe la compaction des têtes polaires et résulte en une déformation locale (Fig.2.6 A). De telles hélices sont trouvées chez de nombreuses protéines impliquées dans des événements de trafic, telles que l'epsine [Ford et al., 2002], de petites protéines G (e.g. Sar1 [Lee et al., 2005]), et des protéines à domaines BAR (décrits plus loin) : endophiline [Farsad et al., 2001, Gallop et al., 2006], amphiphysine [Peter et al., 2004]. Ce mécanisme a été observé expérimentalement pour diverses hélices amphipathiques : domaines ENTH (ex epsine), protéine Sar1 [Ford et al., 2002, Horvath et al., 2007, Lee et al., 2005] (Fig.2.6 B).

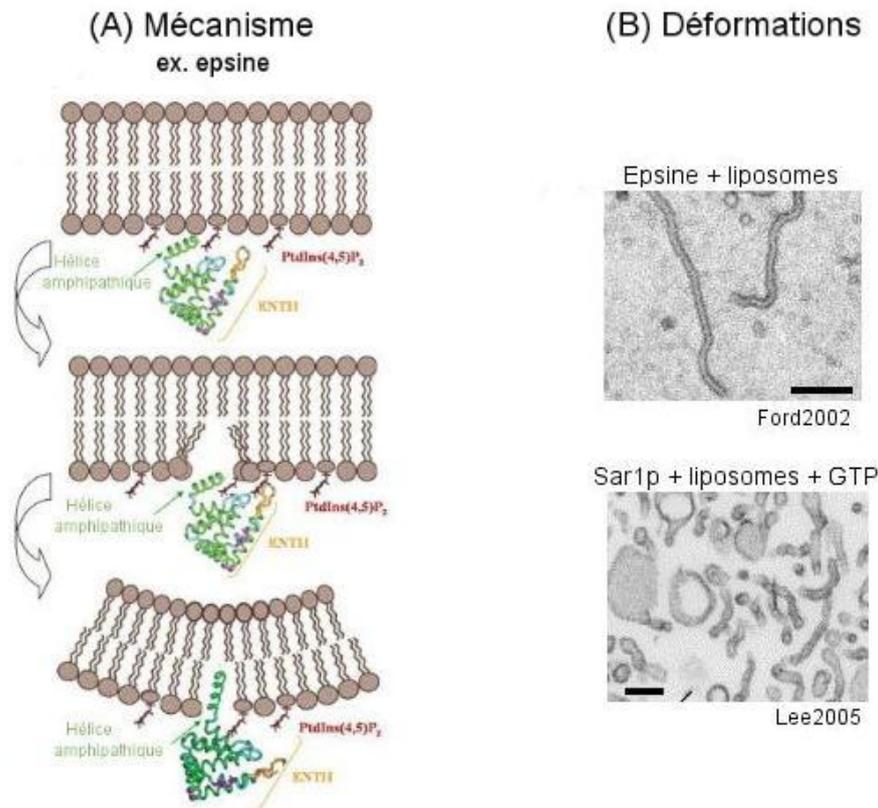


FIG. 2.6: Courbure générée par insertion d'hélice amphipathique. (A) Mécanisme de courbure spontanée locale : Exemple de l'epsine. L'epsine, sous forme soluble, a un site de reconnaissance spécifique du phosphoinositide PI(4,5)P₂, qui lui permet de se lier à la membrane. Le changement de conformation permettant l'exposition de son hélice amphipathique se produit alors. L'hélice est insérée comme un coin dans le feuillet externe, 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 à hélices amphipathiques : epsine ou Sar1p. Barres 100nm. D'après [Horvath et al., 2007, Ford et al., 2002, Lee et al., 2005].

La protéine GRA2, qui a été montrée impliquée dans la biogénèse du RNM [Mercier et al., 2002], contient deux hélices amphipathiques : on pourrait envisager qu'elle ait cette action sur les membranes du RNM.

Insertion d'un segment hydrophobe en épingle

L'insertion de segments hydrophobes formant une "épingle à cheveux" (hairpin) dans la membrane peut provoquer un effet identique à l'insertion d'une hélice amphipathique. Cela semble être le cas en particulier pour des protéines impliquées dans la re-formation du reticulum endoplasmique après mitose : Rtn4a/NogoA et DP1-Yop1p [Voeltz et al., 2006].

2.3.3 Courbure générée par mécanisme de charpentage

Le second mécanisme médié par des protéines est le charpentage d'une membrane par un manteau protéique, qui contraint la membrane et lui impose une courbure. Cela implique que les composants du manteau forment une structure incurvée, de rigidité suffisante pour contrer la tendance de la membrane à revenir à son état initial de courbure spontanée. Le manteau doit également avoir

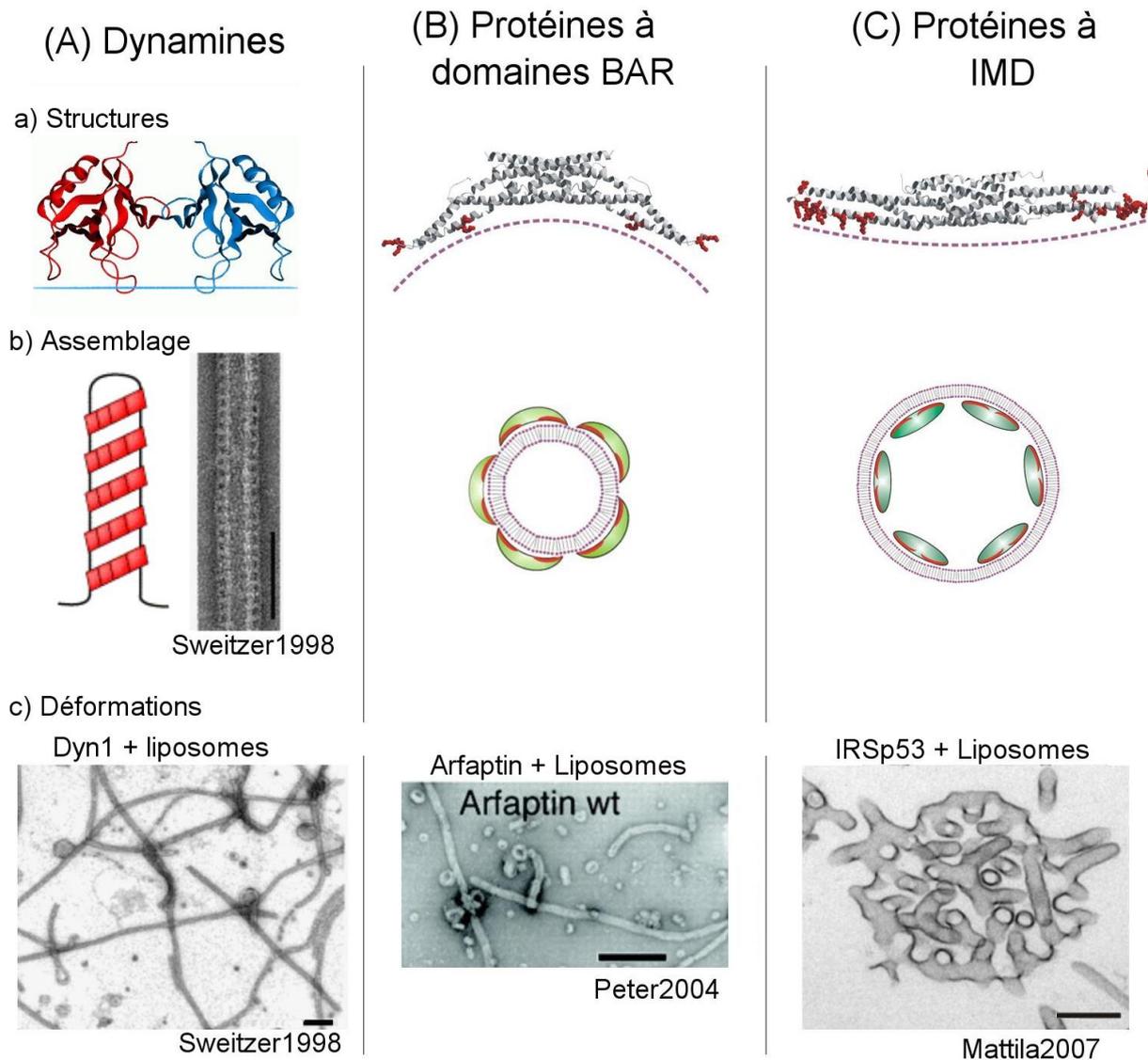


FIG. 2.7: Courbure générée par mécanisme de charpentage. (A) Charpentage par les protéines de la famille des dynamines. (B) Charpentage par les protéines à domaine BAR. (C) Charpentage par les protéines à IMD. a) Les dynamines, tout comme les protéines à domaines BAR et IMDs, doivent d'assembler en dimères pour que leur courbure apparaisse. b) Lorsqu'elle s'oligomérisse autour de membranes, la dynamine s'assemble en hélice (barre 100nm), 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 : protrusions en présence de dynamine-1 ou en présence d'arfaptine ; invaginations en présence d'IRSp53. Barres 300nm. D'après [Lomize et al., 2006, Mattila et al., 2007, Farsad et al., 2003, Sweitzer & Hinshaw, 1998, Peter et al., 2004].

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

Dynamines

Les protéines de la famille des dynamines s'assemblent en hélices et peuvent s'associer aux membranes en liant les phosphoinositides, procurant une forme cylindrique aux membranes (Fig.2.7

A) [Praefcke & McMahon, 2004, Takei et al., 1995, Hinshaw & Schmid, 1995, Sweitzer & Hinshaw, 1998]. D'autres assemblages protéiques impliqués dans le transport membranaire forment des manteaux autour de membranes : clathrine et adaptateurs, complexes COPI, COPII. La capacité de ces assemblages à générer une courbure membranaire reste cependant débattue [Antonny, 2006] [Zimmerberg & Kozlov, 2006].

Protéines à domaine BAR et protéines à IMD

Certaines protéines à domaines BAR (Bar/Amphiphysin/Rvs) semblent également capables d'incurver des membranes par le mécanisme de charpentage (Fig.2.7 B). Ces protéines sont mêlées à de très nombreux processus de tubulation, e.g. la formation de T-tubules musculaires [Lee et al., 2002] et plus largement, des événements de fusion, fission etc. [Ren et al., 2006]. Ces protéines, assemblées en dimères, présentent une structure concave formée par leurs domaines BAR. Ce domaine se lie aux membranes par le biais d'interactions électrostatiques. De plus, ces protéines ont fréquemment des sites de liaison à des lipides particuliers (e.g. phosphoinositides).

Le cas est souvent compliqué par le fait que de nombreuses protéines à domaines BAR contiennent également une ou plusieurs hélices amphipathiques qui jouent un rôle majeur dans la déformation des membranes. Cependant, certaines ne contiennent aucune hélice amphipathique et sont cependant capables de tubuler des membranes (e.g. arfaptin) ; d'autres dont l'hélice amphipathique a été enlevée (par mutagenèse dirigée) sont toujours capables de déformer efficacement des membranes (e.g. domaine BAR de l'amphiphysine) [Peter et al., 2004].

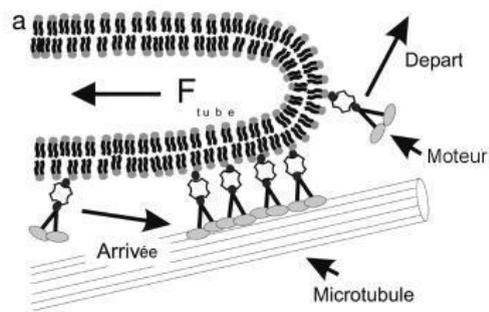
On peut enfin évoquer des protéines nouvellement étudiées, appelées génériquement protéines à IMD (IRSp53/MIM domain), qui présentent une forme incurvée de manière inverse aux domaines BAR. Ces domaines sont également capables de générer des déformations membranaires mais de topologie inverse à celles des domaines BAR (Fig.2.7 C) : les domaines BAR génèrent des protrusions vers l'extérieur des liposomes ou des cellules, tandis que les domaines IMD génèrent des invaginations vers l'intérieur [Mattila et al., 2007, Millard et al., 2007, Suetsugu et al., 2006]. Ces protéines formeraient donc une charpente à l'intérieur des tubules formées.

La protéine GRA7 semble nécessaire pour déformer des membranes *in vitro* et elle lie certains phosphoinositides. Elle apparaît de plus, former des anneaux autour des tubules des HOSTs. Elle a donc été comparée aux structures formées par la dynamine [Coppens et al., 2006].

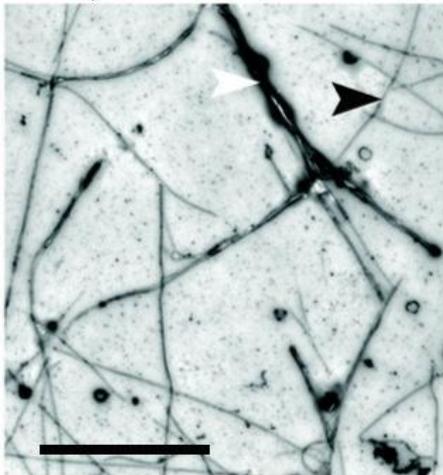
2.3.4 Rôles du cytosquelette

Les microtubules et les filaments d'actine sont susceptibles d'exercer sur les membranes (1) des forces de traction, par le biais de moteurs moléculaires en déplacement, ou (2) des forces de poussée par polymérisation, impliquant l'attachement des membranes à l'extrémité en croissance (Fig.2.8). Des moteurs moléculaires (e.g. kinésine, dynéine) attachés à une membrane et en circulation sur un microtubule exercent une force localisée qui tire la membrane. Les moteurs fournissent ainsi la force nécessaire à la formation du tube [Zimmerberg & Kozlov, 2006, Koster et al., 2003]. Il a été vérifié

(A) Traction de la membrane

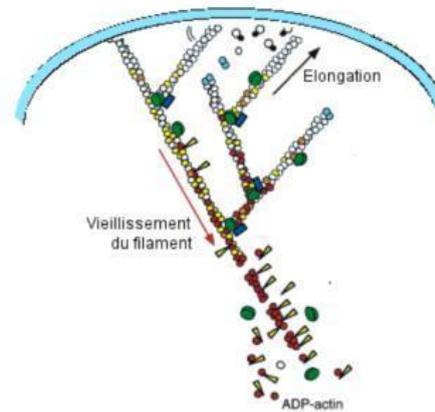


Moteurs moléculaires attachés à des liposomes en présence de microtubules

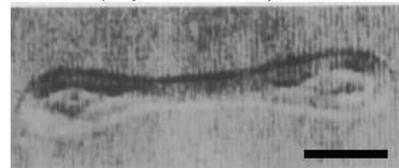


Roux2002

(B) Poussée de la membrane



Actine polymérisée en liposomes



Miyata1992

FIG. 2.8: Courbure générée par le cytosquelette. (A) Force de traction exercée par des moteurs moléculaires, attachés à une membrane, en déplacement sur des microtubules. Des déformations tubulaires (flèche blanche) sont étirées à partir des membranes, le long du réseau de microtubules (flèche noire). Barre $5\mu\text{m}$. (B) Force de poussée de filaments d'actine en polymérisation continue. L'élongation des filaments d'actine en polymérisation peut exercer une poussée sur la membrane. La polymérisation d'actine encapsulée dans un liposome le déforme, lui donnant une forme en haltère. Barre $5\mu\text{m}$. D'après [Koster et al., 2003, Roux et al., 2002, Pollard & Borisy, 2003, Miyata & Hotani, 1992].

expérimentalement, sur des membranes-modèles, que des tubes membranaires peuvent être tirés par des moteurs moléculaires associés à des microtubules [Roux et al., 2002, Koster et al., 2003]. *In vivo*, ce mécanisme semble être en jeu dans la formation de zones tubulaires du système endosomal et lysosomal [Cole & Lippincott-Schwartz, 1995]. Il semble que les microtubules en croissance peuvent également agir sur les membranes directement : soit par traction d'une membrane attachée à l'extrémité positive du microtubule ; soit par poussée sur une membrane. Ces processus pourraient être impliqués entre autres dans l'organisation du réticulum endoplasmique [Waterman-Storer & Salmon, 1998] [Waterman-Storer et al., 1995].

Il est envisagé que ces deux mécanismes soient transposables sur des filaments d'actine. L'étirement de membrane par déplacement de moteurs moléculaires est évoqué dans les processus d'endocytose [McMahon & Gallop, 2005, Buss et al., 2002]. La force de poussée sur la membrane a été observée,

entre autres, dans la formation de lamellipodes [Pollard & Borisy, 2003].

Les HOSTs de la vacuole sont des invaginations de la PVM dans lesquelles sont présentes des microtubules de la cellule-hôte. Il est très probable qu'ils jouent un rôle actif dans la formation de ces invaginations, en exerçant une poussée sur la membrane. Une force d'attachement doit probablement être en jeu entre le microtubule et la face cytoplasmique de la PVM.

2.3.5 Synergie des mécanismes évoqués

Les mécanismes évoqués ci-dessus interviennent fréquemment en coopération pour la génération et le maintien de courbure membranaire, qui sont ainsi des processus extrêmement régulés. Pour les protéines N-BAR, qui contiennent une hélice amphipathique N-terminale et un domaine BAR, les deux parts du processus semblent comprises dans un seul composant. Dans de nombreux cas, les protéines BAR travaillent en coopération avec le cytosquelette et également avec la dynamine, bien que chacun de ces composants suffise *in vitro* à générer et stabiliser des formes membranaires de forte courbure.

Ces coopérations impliquent également d'autres protéines de charpente qui semblent jouer un rôle dans la sélection de la courbure et sa stabilisation. Par exemple la formation de vésicules de transport antérograde est initiée par l'association de la petite protéine G Sar1 à la membrane plasmique ; les protéines du manteau COPII permettant la stabilisation des vésicules endocytiques [Lee et al., 2005, Antony et al., 2003]. Les processus de régulation font également intervenir des protéines uniquement impliquées dans la reconnaissance de la courbure, telles que la protéine ArfGAP1 qui intervient dans la dissociation du manteau COPI [Drin et al., 2007].

Ce chapitre bibliographique précise les problématiques en jeu dans mon travail de thèse et fournit les outils permettant l'interprétation des résultats à venir. Les protéines GRA sont placées dans le contexte des travaux actuels sur les protéines de membrane. Ce fond bibliographique servira de trame pour la discussion finale des résultats.

Chapitre 3

Stratégie

Un modèle *in vitro* pour l'étude des interactions membranaires des protéines GRA

Le projet est basé sur une approche multidisciplinaire, associant des compétences en parasitologie cellulaire et moléculaire au LAPM et en spectrométrie optique ainsi qu'en physique des vésicules géantes au LSP (Fig.3.1). Les enjeux du projet concernent les interactions des protéines GRA avec les membranes de la vacuole parasitophore. De nouveaux moyens d'étude y sont développés, par l'utilisation de membranes-modèles et l'application de méthodes de spectroscopie optique.

Le projet, dont les détails seront développés en dernière partie de ce chapitre, consiste à développer un système d'étude *in vitro* des interactions des protéines GRA, sous leur forme soluble, avec des membranes. Le système développé doit permettre d'étudier les modalités de ces interactions 1) par le biais de marquages fluorescents des protéines et l'application de méthodes quantitatives de spectroscopie ; 2) par le biais de méthodes de biochimie. Ce travail devrait permettre également d'aborder la question de la fonction des protéines GRA, en étudiant leurs effets sur les membranes. Le développement d'un système biomimétique pour l'insertion membranaire des protéines GRA *in vitro*, devrait permettre de disséquer les mécanismes impliqués d'une part, dans l'insertion membranaire des protéines vacuolaires et d'autre part, dans la formation des structures membranaires de la vacuole.

Afin de préciser les modalités de mise en oeuvre de ces volets d'étude, je vais d'abord présenter les différents types de membranes-modèles et leurs applications pour l'étude d'interactions protéine-membrane. Je présenterai ensuite la stratégie générale adoptée, adaptée aux spécificités de ce projet.

3.1 Membranes-modèles

La construction de systèmes modèles artificiels, qui miment de manière rudimentaire les membranes naturelles, ouvre des voies pour l'étude du fonctionnement des membranes biologiques. La biophysique des membranes est maintenant un domaine de recherche arrivé à maturité, grâce à l'application de nombreuses techniques élégantes incluant la spectroscopie, la biochimie membranaire,

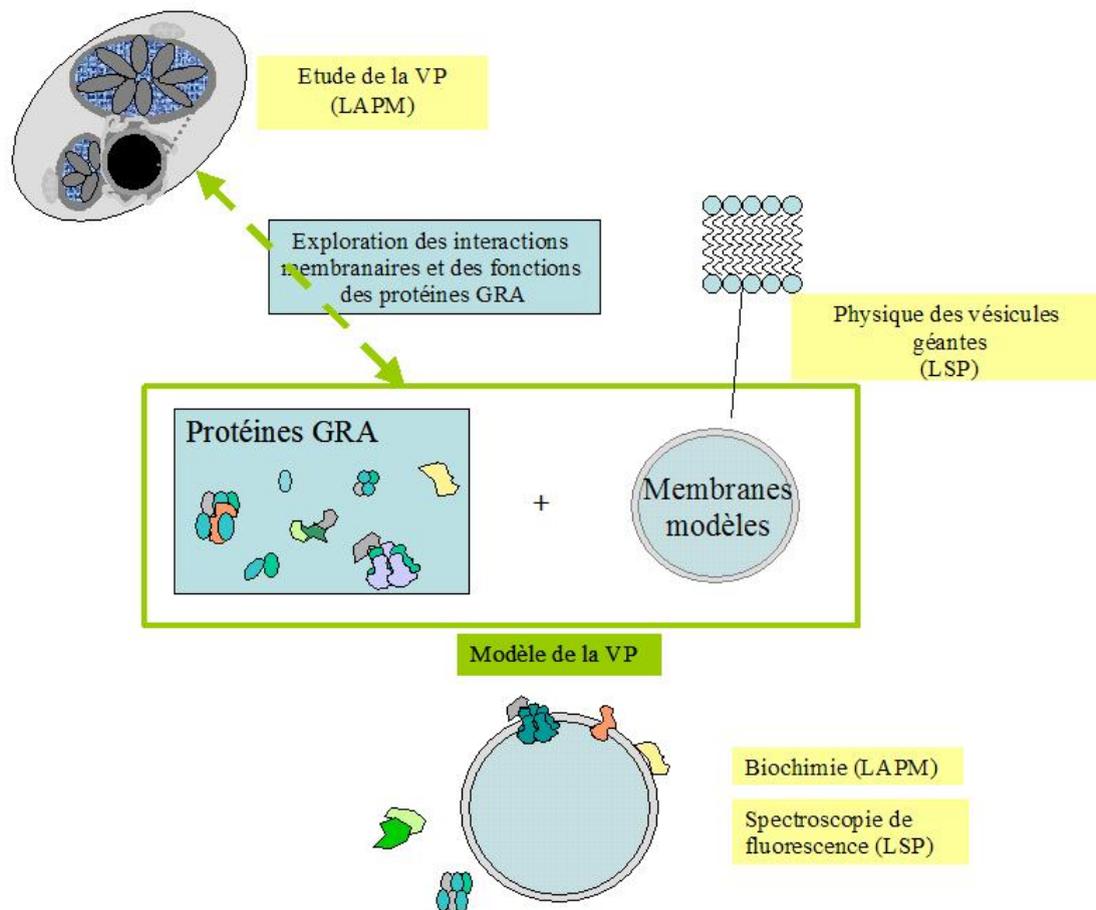


FIG. 3.1: Contexte et construction du projet.

les méthodes de patch-clamp, la reconstitution de membranes. Cette vision modulaire est bien évidemment simpliste mais permet d'approcher aujourd'hui, la construction de systèmes reconstitués extrêmement complexes mais contrôlés : des cellules minimales, ayant la complexité suffisante pour manifester des caractéristiques des systèmes vivants (réplication, division, fabrication de protéines, production d'énergie) [Oberholzer et al., 1999]. Différents types de membranes-modèles, ayant des applications différentes, ont été développés.

Auto-assemblage de molécules lipidiques

Les lipides appartiennent à une famille particulière de molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire, donc hydrophile, chargée ou non, et au moins une chaîne aliphatique, hydrophobe. Du fait de la nature amphiphile des lipides et du fait que l'eau soit le solvant biologique, les lipides tendent à s'auto-assembler spontanément en structures supramoléculaires afin que les parties hydrophobes soient isolées de l'eau. Cet auto-assemblage peut être à l'origine de nombreuses phases de morphologie différentes, dépendant de la concentration des molécules amphiphiles et de la température, mais aussi en grande partie du paramètre de forme des molécules lipidiques $PP = V/aL_c$, où V est le volume de la partie hydrophobe ; L_c la longueur de la chaîne hydrophobe et a la surface occupée par la tête polaire. Cette définition de paramètre de forme est une façon pratique de représen-

ter la structure des lipides en termes géométriques. Dans cette vision, la plupart des phospholipides, composants majeurs des membranes cellulaires, peuvent être représentés par un cylindre : l'aire de la tête hydrophile des lipides est à peu près équivalente à la section de la chaîne aliphatique. Ils forment des bicouches en phase liquide ordonnée : ils s'assemblent donc spontanément en vésicules multilamellaires en milieu aqueux (Fig.3.2 A). Les lipides non cylindriques, tels que le cholestérol et la sphingomyéline, peuvent s'intégrer à des bicouches. Ils forment des phases liquides ordonnées, également appelées rafts.

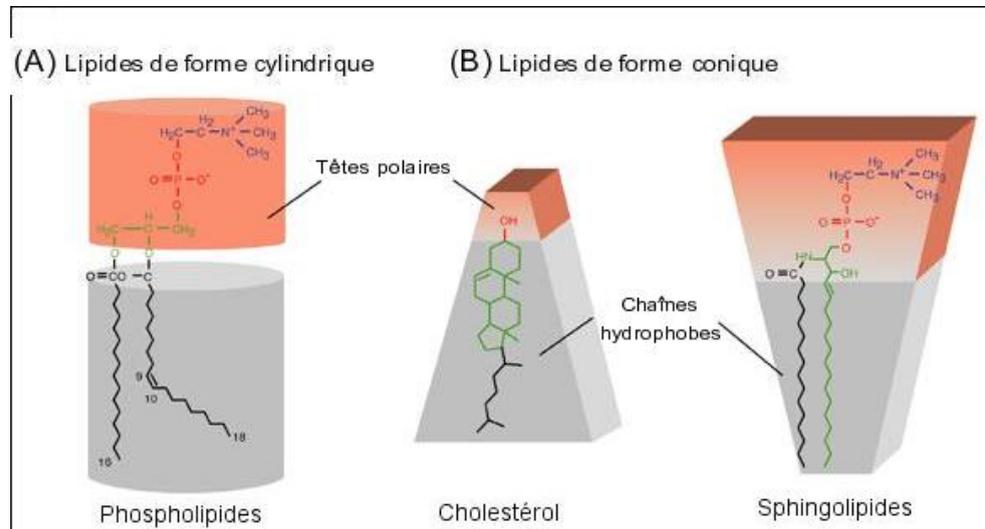


FIG. 3.2: Formation de bicouches lipidiques. (A) Représentation d'un phospholipide de forme cylindrique. (B) Représentation de lipides de formes coniques : cholestérol et sphingomyéline. Les têtes polaires sont indiquées en rouge et les chaînes hydrocarbonées en gris. D'après [Fantini et al., 2002].

3.1.1 Les différents types de membranes-modèles

Le développement de méthodes sophistiquées de formation a permis d'arriver à contrôler les caractéristiques des vésicules obtenues, distinguées selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques concentriques (Fig.3.3) :

- (i) les vésicules multilamellaires appelées MLVs pour "multilamellar vesicles" (200nm à 1 μ m de diamètre) (ce type de vésicules relève d'une utilisation marginale et ne sera plus mentionné) ;
- (ii) les vésicules unilamellaires de petite taille, appelées SUVs pour "small unilamellar vesicles" (20 à 200nm de diamètre) ;
- (iii) les vésicules unilamellaires de grande taille, appelées LUVs pour "large unilamellar vesicles" (200 nm à 1 μ m de diamètre) ;
- (iv) et enfin les vésicules géantes, appelées GUVs pour "giant unilamellar vesicles" (5 à 100 μ m de diamètre).

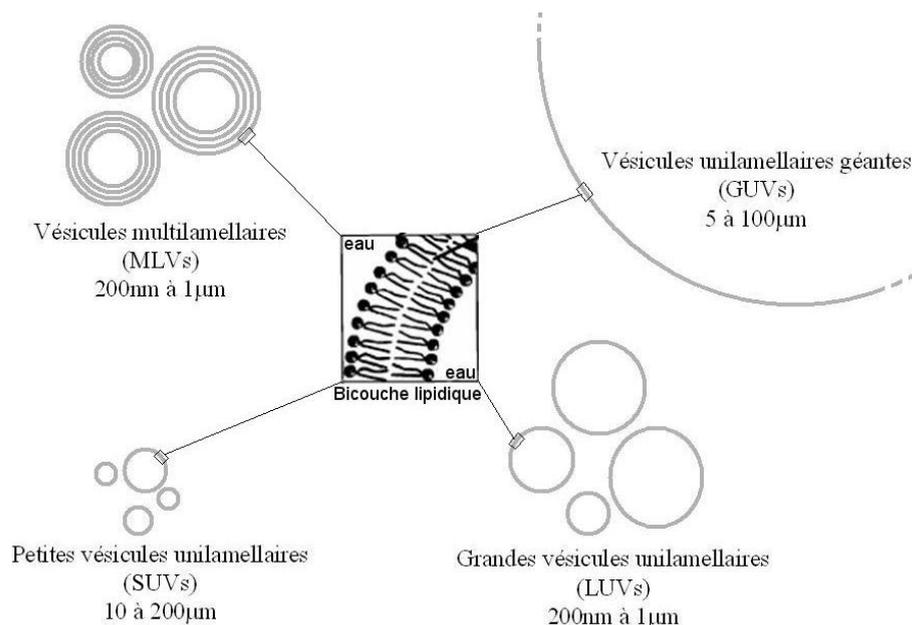


FIG. 3.3: Classification des membranes-modèles. (A) Représentation d'une bicouche lipidique. (B) Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille.

3.1.2 Applications

Les liposomes (SUVs et LUVs) : méthodes standard de biochimie

Les SUVs et LUVs, souvent considérées de manière indiscernée sous le terme de liposomes, sont largement utilisées par les biochimistes et les microscopistes électroniques depuis les années 60 [Bangham et al., 1965, Bangham, 1993]. Elles ont tout d'abord permis des avancées importantes dans l'étude des propriétés biochimiques et biophysiques des membranes, à l'origine des théories principales de physique des membranes développées au cours des années 1970 [Singer & Nicolson, 1972]. Ces structures de petite taille et de grande cohésion moléculaire sont facilement manipulables par diverses méthodes déjà employées en biochimie moléculaire. Un large éventail de techniques a ainsi été adapté : techniques de centrifugation, de chromatographie d'exclusion de taille et bien sûr, observation par microscopie électronique. Leurs méthodes de préparation permettent d'obtenir des populations de vésicules de propriétés contrôlées et peu polydisperses. Leur robustesse et la maîtrise actuelle de ces objets les rend particulièrement intéressants dans les domaines pharmacologiques et cosmétiques, pour la vectorisation de molécules actives [Lanao et al., 2007, Gregoriadis et al., 2002]. Les liposomes sont largement utilisés pour l'étude d'interactions protéine-membrane. Les techniques de production de protéines recombinantes et de purification de protéines, en pleine expansion, permettent la mise en place de systèmes minimaux, réunissant seulement les composants indispensables à la réalisation d'un processus [Matsuoka et al., 1998].

Les GUVs : des outils adaptés aux méthodes du physicien

Les méthodes d'obtention des GUVs ont été mises au point beaucoup plus récemment [Angelova & Dimitrov, 1986] et leur maîtrise est donc moins avancée. Bien que leur champ d'appli-

cation recouvre celui des "liposomes", les méthodes d'étude sont radicalement différentes. Les GUV constituent en effet un outil adapté aux méthodes du physicien, en particulier elles sont observables en microscopie optique. Tout comme les liposomes, ce sont des objets aux propriétés maîtrisées et modulables, pouvant être complexifiés de manière contrôlée [Menger & Keiper, 1998].

Les GUVs, comme les liposomes, sont largement utilisées pour l'étude des propriétés des membranes, mais elles sont également beaucoup utilisées pour l'étude d'interactions avec des protéines, impliquant des techniques subtiles pour la reconstitution de protéines membranaires dans les membranes des vésicules [Girard et al., 2004, Engelhard et al., 1978]. Les études basées sur l'utilisation des GUVs s'attaquent généralement à des protéines bien identifiées, produites sous forme recombinante¹ et purifiées ; elles sont ensuite reconstituées dans les membranes au moment de la formation des vésicules. La plupart de ces études sont basées sur des méthodes de fluorescence, tirant parti de la taille des GUVs, adaptée à la microscopie optique [Bacia et al., 2004, Girard et al., 2004, Kahya et al., 2005, Doeven et al., 2005]. Pour ces études, un fluorophore est généralement attaché de manière covalente à la protéine d'intérêt juste après purification, permettant ainsi l'observation immédiate des protéines associées aux membranes.

Les SUVs, LUVs et GUVs sont couramment utilisées pour l'étude des interactions protéine-membrane mais les méthodes d'études appropriées sont différentes. La plupart du temps, les études sur GUVs arrivent après la caractérisation biochimique des protéines à étudier.

3.2 Les protéines GRA : état des compétences

Je vais maintenant présenter les formes sous lesquelles les protéines GRA sont disponibles, ainsi que les anticorps disponibles pour les détecter.

3.2.1 Fractions ultrasolubles

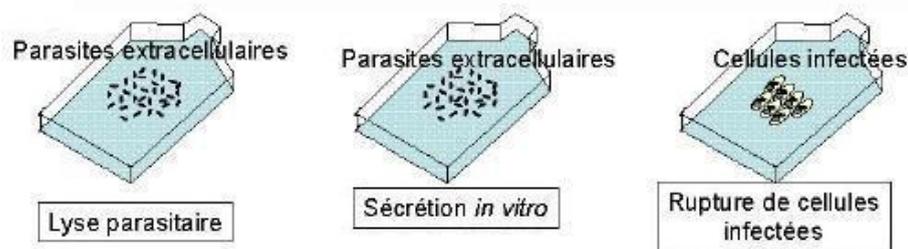


FIG. 3.4: Fractions contenant les protéines GRA.

¹Cette technique de biologie moléculaire consiste à isoler un fragment d'ADN et à le multiplier à l'identique en "l'insérant" dans une molécule d'ADN appelée vecteur, permettant ainsi son amplification. Des modifications peuvent facilement être apportées à la séquence, permettant par exemple l'insertion d'un résidu cystéine qui va permettre de lier de manière covalente, une molécule particulière (e.g. fluorophore) à la protéine après purification.

Alors que la plupart des études *in vitro* sur protéines membranaires requièrent leur reconstitution forcée dans des membranes, les protéines GRA peuvent être obtenues sous trois formes solubles correspondant à différents stades de leur trafic sécrétoire (Fig.3.4) :

- forme de stockage dans les granules denses, par lyse de parasites extracellulaires ;
- forme sécrétée, par sécrétion induite artificiellement à partir de parasites extracellulaires ;
- forme vacuolaire, par rupture de cellules infectées.

Afin de s'affranchir des membranes présentes dans les produits ainsi obtenus, seule la fraction ultrasoluble (surnageant d'une ultracentrifugation à 100 000g pendant 1h) en est utilisée. Malgré cette précaution, le contenu des fractions ultrasolubles utilisées (HssTx, HssEs, HssVac) n'est pas bien défini. Elles contiennent toutes des protéines GRA mais également un très grand nombre de structures (protéines, lipides) ultrasolubles annexes : elles contiennent respectivement toutes les protéines ultrasolubles parasitaires (HssTx), les protéines sécrétées ainsi que celles du sérum utilisé pour induire la sécrétion (HssEs), ou les protéines de la cellule-hôte et de la vacuole (HssVac). Des méthodes pour la purification des protéines GRA à partir de ces fractions sont actuellement en cours de développement au LAPM [Travier et al., 2007].

3.2.2 Protéines recombinantes

Certaines des protéines GRA peuvent également être obtenues sous une forme recombinante, purifiées à partir d'*Escherichia coli* : GRA1,2,6 -GST² (produites au LAPM) et GRA9-His³ (en collaboration avec K.D.Z. Adjogle, Heinrich Universität, Düsseldorf). Cependant, la mise au point d'un protocole sans détergent (donc compatible avec les membranes-modèles) et la caractérisation des formes obtenues sont encore en cours de développement (travaux en cours d'Amina Bittame au LAPM, stage Master2 Biologie, Univ. Joseph Fourier - Grenoble I). Ainsi ces formes ont été très peu utilisées au cours de ce travail.

3.2.3 Anticorps disponibles

Des anticorps monoclonaux ou polyclonaux⁴ dirigés contre les protéines GRA1 à 7 et GRA9 sont disponibles au LAPM. Ces anticorps, produits au LAPM ou fournis par d'autres laboratoires, sont utilisés sous forme de serum complet ou d'ascites non purifiés car la purification des anticorps à partir de ces fractions diminue fortement leur efficacité.

²La protéine Glutathion-S-Transférase (GST), de *Shistosoma japonicum* est souvent fusionnée aux séquences recombinantes, car elle permet une bonne solubilisation des protéines.

³Un tag His consiste en six histidines permettant la purification de la protéine.

⁴Les anticorps sont généralement obtenus *in vivo* en injectant chez un animal (ici souris ou lapin) un antigène donné et en recueillant les anticorps, dans son sang, dont on isole la partie liquide, appelée serum. Les anticorps ainsi obtenus sont appelés polyclonaux, car ils reconnaissent plusieurs épitopes d'un antigène. Afin d'augmenter le rendement de la production d'anticorps, il est possible de récupérer des lymphocytes T de l'animal inoculé, qui produisent ces anticorps, et de les fusionner à une cellule tumorale. La cellule hybride obtenue est injectée dans la cavité péritonéale d'une souris où la cellule se multiplie ; cela induit la formation d'une tumeur dont on prélève le liquide d'ascite, qui contient les anticorps appelés monoclonaux.

Dans notre étude, l'intérêt et la difficulté du modèle se recoupent : étudier un système modèle en présence de toute une batterie de molécules. Notre modèle ne répond donc plus au critère de "minimalisme". Ainsi, un grand nombre de paramètres du système-modèle mis en place ne sont pas déterminés, et encore moins contrôlés. C'est l'étude elle-même qui devra les préciser. Autant que possible, je tâcherai de mener les études sur plusieurs des protéines GRA en parallèle afin de tirer parti de nos conditions particulières.

3.3 Stratégie générale

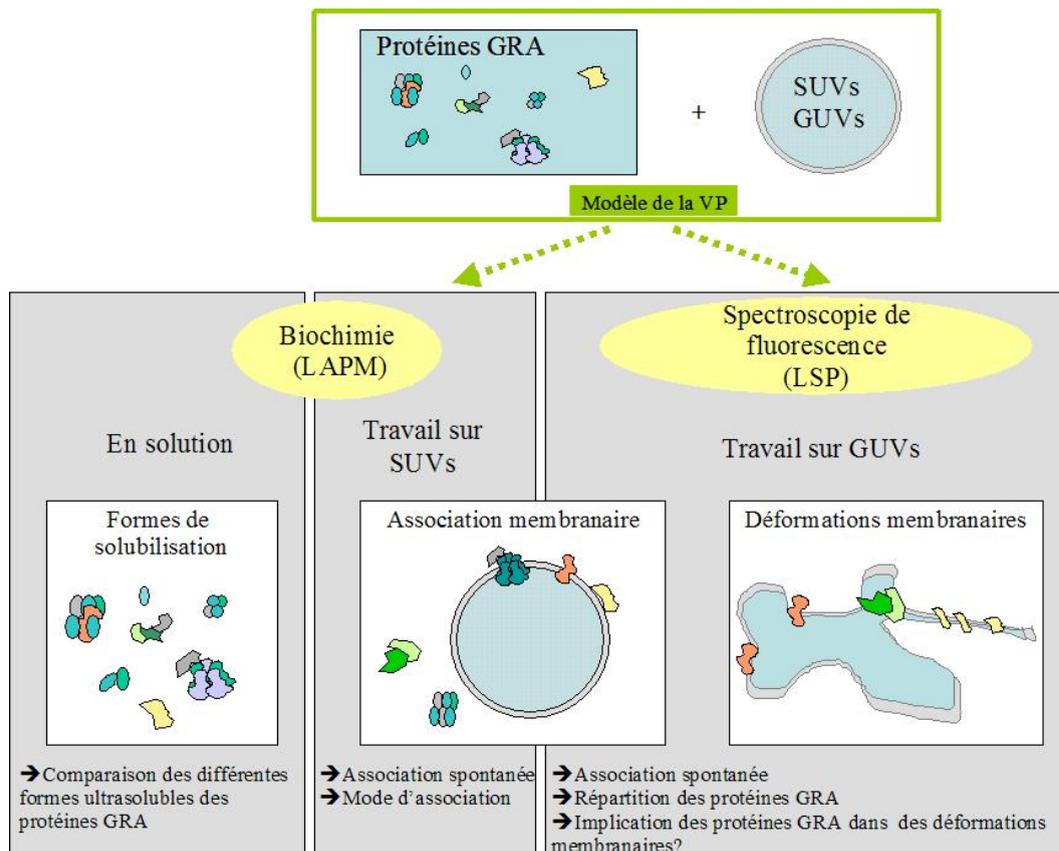


FIG. 3.5: Principaux axes d'étude.

La stratégie mise en oeuvre se base sur la complémentarité des méthodes sur SUVs et sur GUVs, en se déployant sur deux volets d'étude : l'un basé sur des méthodes de biochimie, l'autre sur des méthodes de microscopie de fluorescence (Fig. 3.5).

3.3.1 Approche biochimique

Formes de solubilisation : étude par séparation isopycnique Le fait que les fractions contenant les protéines GRA soient peu caractérisées, est vite apparu comme un obstacle majeur à la compréhension du comportement des protéines GRA : sous quelles formes sont-elles solubilisées dans

ces fractions ? Nous avons abordé cette question en mettant en oeuvre une méthode susceptible de mieux définir les structures impliquées : la séparation isopycnique, qui permet de caractériser chaque protéine par sa densité isopycnique. Ce type d'approche est particulièrement intéressant dans notre cas, où les comportements manifestés par chacune des protéines vont pouvoir être interprétés par une comparaison systématique entre elles. Cette approche offre également l'avantage de permettre une comparaison des différentes formes de solubilisation dans les fractions utilisées.

Insertion et interactions membranaires : travail sur SUVs Le travail par des méthodes biochimiques a permis d'évaluer les paramètres importants pour l'association des protéines GRA aux membranes, puisqu'il peut se baser sur des méthodes standard, au contraire du travail sur GUVs. Ainsi, j'ai testé les capacités d'association des protéines GRA des fraction ultrasolubles décrites ci-dessus à des SUVs. L'ensemble des protéines GRA a été suivi de manière systématique, afin de choisir au mieux, les protéines d'intérêt pour le second volet de mon travail expérimental.

3.3.2 Approche par microscopie de fluorescence

Le second volet de mon travail expérimental a consisté à développer un système *in vitro*, à base de GUVs incubées avec les fractions ultrasolubles décrites ci-dessus. La détection en fluorescence des protéines GRA ne peut être réalisée que par immunomarquage indirect puisque ni les protéines, ni leurs anticorps ne peuvent être marqués directement par un fluorophore. L'application de cette méthode inhabituelle sur des GUVs a demandé le développement d'un protocole spécifique. Sa mise en oeuvre a permis de déterminer l'association des protéines GRA aux GUVs et leurs répartitions particulières. J'ai également cherché à mettre en évidence d'éventuelles déformations des membranes sous l'effet des protéines.

Résultats

Chapitre 4

Etude biochimique du système modèle :

Formes de solubilisation et interactions membranaires

des protéines GRA

Cette première partie de mon travail de thèse est basée sur des méthodes standard de biochimie dans le but de caractériser les formes de solubilisation ainsi que les interactions membranaires des protéines GRA. J'ai utilisé pour ce faire, des membranes-modèles d'usage courant en biochimie : de petites vésicules unilamellaires (SUVs, pour Small Unilamellar Vesicles), mises en contact avec des fractions riches en protéines GRA. L'étude a d'abord été centrée sur la forme sécrétée des protéines GRA qui, en cellules infectées, paraît essentiellement destinée à interagir avec les membranes de la vacuole lors de sa maturation. Le développement de méthodes d'analyse adaptées a impliqué une meilleure compréhension des formes de solubilisation des protéines GRA sécrétées *in vitro*, pour aboutir à l'étude de leurs interactions membranaires. Il est alors apparu intéressant de suivre l'évolution des protéines GRA au cours du cycle prolifératif du tachyzoïte, en comparant leurs caractéristiques de solubilisation et d'interactions aux étapes précédant et suivant la sécrétion. Enfin, j'ai cherché à caractériser les interactions membranaires mises en évidence, afin d'établir une base solide pour l'étude par immunofluorescence sur vésicules géantes.

4.1 Le système modèle : Protéines GRA et SUVs

4.1.1 Préparation de petites vésicules unilamellaires (SUVs)

Composition lipidique

Les lipides nécessaires à l'association et à la fonctionnalité des protéines GRA n'étant pas connus, j'ai opté pour un extrait lipidique total de cellules humaines HeLa afin d'optimiser les possibilités d'interactions. L'inconvénient majeur de ce mélange préparé au LAPM est que les lipides qui le composent n'ont pas pu être identifiés et quantifiés. Cet extrait lipidique étant de plus difficile à obtenir en grandes quantités, j'ai également utilisé un lipide commercial neutre, la lécithine d'oeuf

(EPC), pour la mise au point des protocoles. Ce lipide, également appelé phosphatidylcholine, est le phospholipide majeur des membranes plasmiques de cellules mammifères. Il a l'avantage d'être purifié et bien caractérisé. Cependant, c'est un lipide neutre qui forme uniquement des phases lamellaires désordonnées, qui pourraient se révéler peu propices à des réarrangements membranaires permettant l'association efficace des protéines GRA.

Formation des SUVs

Les SUVs sont formées à partir de ces lipides en Tampon KCl (KCl 100mM, Hepes 10mM pH7.4) afin d'approcher des conditions d'osmolarité et de salinité physiologiques. L'EPC est hydraté à 2 mg de lipides par ml de tampon tandis que pour les lipides HeLa, un dépôt de lipides correspondant à une boîte de culture de 180cm² de cellules HeLa confluentes est repris dans 0.3ml de tampon. Des vésicules multilamellaires se forment spontanément lors de l'hydratation du film lipidique par le Tampon KCl. La solution obtenue est soniquée afin d'obtenir une population de vésicules unilamellaires de diamètre généralement inférieur à 100nm : les SUVs. Ces caractéristiques ont été vérifiées par observation en microscopie électronique à transmission (TEM) (Fig.4.1). Pour cela, les SUVs ont été déposées sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone, et colorées négativement à l'acétate d'uranyle¹.

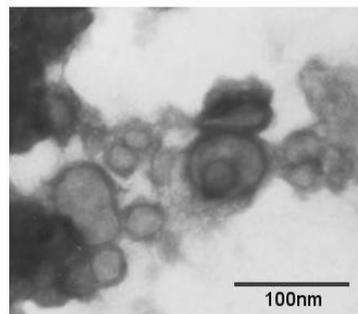


FIG. 4.1: Observation par microscopie électronique à balayage des SUVs formées à partir de lipides HeLa. Un film de lipides HeLa, équivalent à une boîte de culture de 180cm² de cellules, a été hydraté par 300µl de Tampon KCl. Des vésicules se forment progressivement pendant 30min sur glace, en vortexant régulièrement. La solution a été soniquée sur glace, pendant 10 min à faible puissance, afin d'obtenir des vésicules unilamellaires et de petite taille. Les SUVs HeLa obtenues ont été diluées dans 2 volumes de PBS et "colorées" négativement à l'acétate d'uranyle puis imagées par microscopie électronique à balayage.

4.1.2 Production d'extraits contenant les protéines GRA

Les protéines GRA peuvent être obtenues sous trois formes correspondant à différents stades de leur trafic sécrétoire :

- forme de stockage dans les granules denses, à partir de parasites extracellulaires ;
- forme sécrétée : sécrétion induite artificiellement à partir de parasites extracellulaires ;
- forme vacuolaire, obtenue à partir de cellules infectées.

¹Ce composé se fixe sur les contours des objets adsorbés sur la grille, qui apparaissent ainsi en blanc, détournés en noir.

Certaines protéines GRA peuvent également être obtenues sous une forme recombinante, exprimées puis purifiées à partir d'*Escherichia coli* : GRA1,2,6 (produites au LAPM) et GRA9 (en collaboration avec D. Adjogble, Heinrich Universität, Düsseldorf). Cependant, ces protéines sont très peu caractérisées jusqu'à présent ; comme elles ne subissent pas les mêmes modifications post-traductionnelles que les protéines naturelles, leur repliement et leurs propriétés pourraient être gravement altérés. Elles ont donc été peu utilisées au cours de ces travaux.

Production des extraits

Les protocoles permettant d'obtenir les fractions contenant les protéines GRA peuvent être résumés de la manière suivante (Fig.4.2 A) :

- Les protéines parasitaires, stockées dans les granules denses, sont obtenues par lyse de parasites extracellulaires, par choc thermique (**Tx**).
- Pour obtenir des protéines sous leur forme sécrétée (**Es**), des parasites extracellulaires sont incubés pendant 3h à 37°C en milieu DMEM complété par 10% de sérum de veau foetal (D10), selon le protocole établi par Darcy et al. en 1988 [Darcy et al., 1988].
- Les protéines vacuolaires sont obtenues par rupture de la membrane de cellules infectées, par passage au travers d'une aiguille de 27G et élimination des parasites libérés par centrifugation à basse vitesse (**Vac**).

Les extraits ainsi obtenus sont d'abord fractionnés à basse vitesse (2 500 g) en un culot (Low Speed Pellet, ou LSP) et un surnageant (Low Speed Supernatant, ou LSS). Ce surnageant subit une ultracentrifugation à haute vitesse (100 000 g ; 1h) qui sépare la fraction ultrasoluble (High Speed Supernatant, ou HSS) du culot (High Speed Pellet, ou HSP). Sauf indication contraire, les fractions ultrasolubles obtenues ont été conservées à 4°C et utilisées rapidement (dans les 48h au maximum).

Contrôle des fractions obtenues

Le produit final ultrasoluble HSS de chaque production, ainsi que les culots des centrifugations LSP et HSP, ont été contrôlés systématiquement par immunoblot. Tous ces produits ont été déposés sur gel en mêmes quantités calculées en équivalent-parasites. En effet la concentration en protéines GRA ne peut pas être dosée dans ces fractions qui contiennent d'autres protéines (autres protéines du parasite, protéines du sérum utilisé pour la sécrétion, protéines de la cellule-hôte). C'est pourquoi la quantification se fait en équivalent-parasites, les parasites pouvant quant à eux être comptés avant la préparation des extraits. Le dépôt LSP sert de référence puisqu'on doit y retrouver toutes les protéines parasitaires.

Deux critères de qualité du produit final ultrasoluble Hss sont évalués par immunoblot (Fig.4.2), en déposant sur gel toujours les mêmes quantités équivalent-parasites ($5 \cdot 10^6$ par puits) :

(i) la présence de protéines GRA, facilement détectables après un temps d'exposition du film sur la membrane de quelques secondes seulement. Pour comparaison, la fraction HSP testée est pauvre en protéines GRA. Les protéines GRA présentes dans ces fractions ont fait l'objet de nombreuses publications associées au LAPM [Mercier et al., 1993, Lecordier et al., 1993, Lecordier et al., 1995, Lecordier et al., 1999, Labruyere et al., 1999, Adjogble et al., 2004]. Nous ne testons donc en rou-

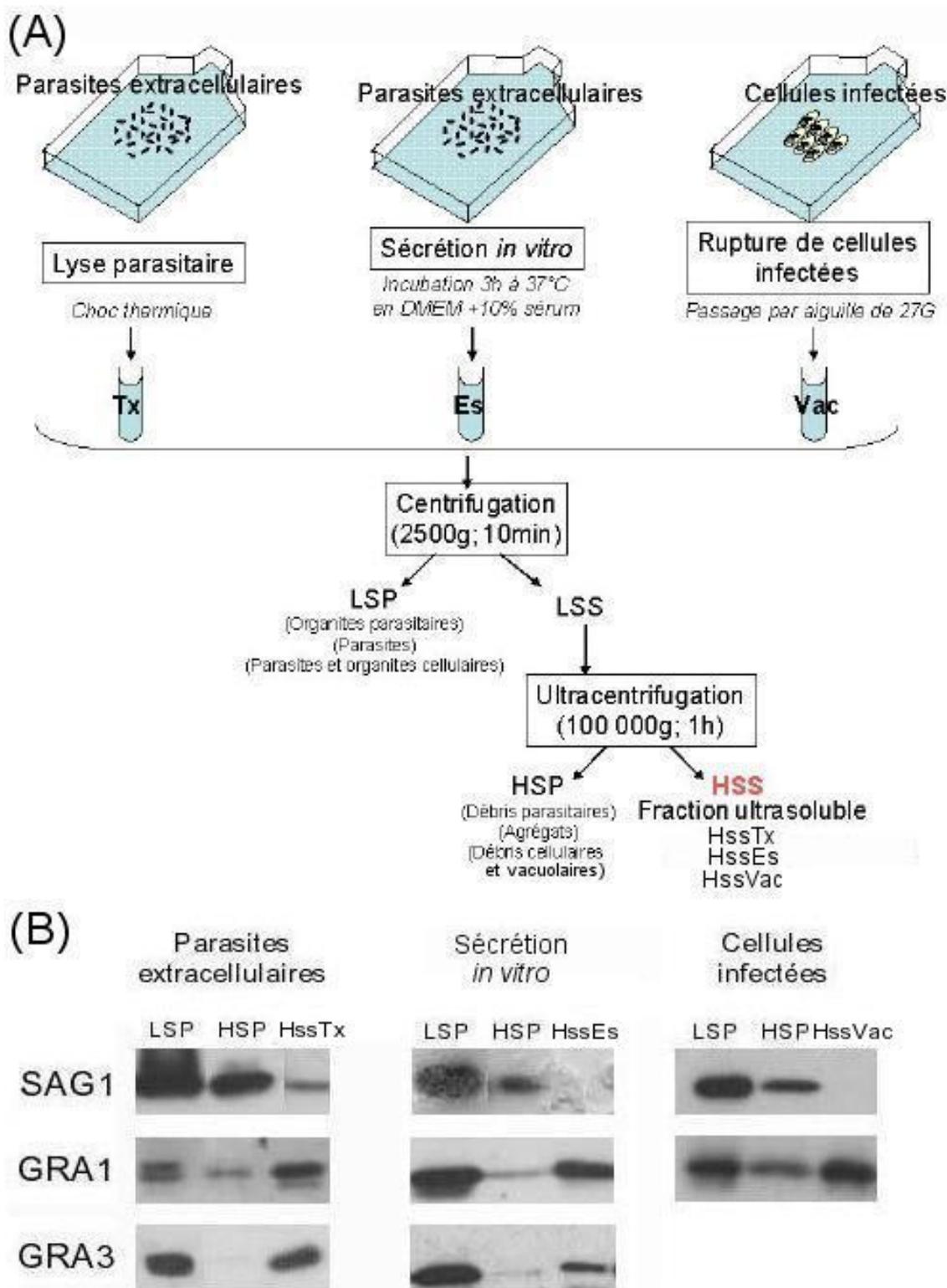


FIG. 4.2: Préparation et contrôles des extraits contenant les protéines GRA. (A) Mode préparatoire des extraits ultrasolubles contenant les protéines GRA. Les extraits ont été obtenus par lyse de parasites extracellulaires (Tx), sécrétion *in vitro* induite par la présence de sérum (Es) ou par rupture de la membrane de cellules infectées (Vac). Ces extraits ont ensuite été centrifugés à 2 500 g pendant 10min afin de sédimenter les plus gros débris (LSP) : parasites, organites, etc. Le surnageant (LSS) a ensuite été séparé par ultracentrifugation à 100 000g pendant 1h en un culot (HSP), qui contient des débris et agrégats, et une fraction ultrasoluble (HSS). (B) Contrôles de qualité des fractions obtenues. Des quantités de $5 \cdot 10^6$ équivalent-parasites des fractions LSP, HSP et HSS ont été analysées par immunoblot révélé par les anticorps monoclonaux anti-SAG1, -GRA1 et -GRA3.

tine qu'une ou deux protéines.

(ii) une faible proportion de protéine SAG1 (protéine de la membrane plasmique du toxoplasme) dans les fractions HSP et HSS. Sa présence en grande quantité dans la fraction Hss indiquerait qu'il y a eu lyse des parasites au cours de la sécrétion ou de la rupture des cellules infectées ; on tolère une plus grande quantité de SAG1 dans la fractions HSPTx puisque cette fraction est préparée par lyse des parasites.

Les différentes fractions ultrasolubles n'ont pas la même teneur en protéines GRA (moyenne pour HssTx, élevée pour HssEs, faible pour HssVac), ce qui n'apparaît pas dans ce contrôle où les conditions de détection sont aisées (quelques secondes d'exposition du film sur la membrane). Les protéines GRA sont les constituants majeurs de la fraction HssEs, mais pas des fractions HssTx et HssVac : pour la suite des expériences, ces deux dernières fractions ont donc été utilisées à des quantités équivalent-parasites plus importantes.

Caractéristiques

Le contenu des fractions ultrasolubles utilisées (HssTx, HssEs, HssVac) n'est pas bien défini. Elles contiennent toutes des protéines GRA mais également un très grand nombre de structures protéo-lipidiques ultrasolubles annexes : elles contiennent respectivement toutes les protéines ultrasolubles parasitaires, les protéines sécrétées ainsi que celles du sérum, ou les protéines de la cellule-hôte et de la vacuole.

Malgré l'ultracentrifugation (100 000 g ; 1h), les fractions obtenues sont riches en matériel protéique et probablement aussi lipidique. Les protéines dites ultrasolubles (à 100 000g) peuvent en effet être incluses dans des structures de taille et densité suffisamment faibles pour ne pas sédimenter lors de l'ultracentrifugation.

Protéines GRA

Au cours de cette étude biochimique, j'ai suivi autant que possible toutes les protéines GRA connues à ce jour, en cherchant à tirer parti de la grande diversité de leurs caractéristiques et en particulier, de leurs comportements vis-à-vis des membranes de la vacuole, résumés ici brièvement :

- GRA1 (essentiellement soluble) ;
- GRA2 (deux hélices amphipathiques, associée au RNM) ;
- GRA3 (un TMD, oligomérisée, associée à la PVM) ;
- GRA4 (un TMD potentiel mais comportement non membranaire, riche en proline, associée au RNM *via* des interactions protéine-protéine) ;
- GRA5 (un TMD, associée à la PVM) ;
- GRA6 (un TMD, associée au RNM) ;
- GRA7 (un TMD, oligomérisée, associée aux HOSTs, au RNM et à la PVM) ;
- GRA9 (une hélice amphipathique, associée au RNM).

Les protéines GRA sont toutes présentes dans les fractions ultrasolubles HssTx, HssEs et HssVac mais elles sont en proportions variables selon la nature de l'extrait. Les protéines GRA de la

fraction ultrasoluble parasitaire (HssTx) sont sous une forme de stockage, au moins partiellement agrégée ; la fraction ultrasoluble cellulaire (HssVac) est plus pauvre en protéines GRA mais on peut supposer qu'elles sont alors très susceptibles d'interagir avec des membranes. Par contraste, les protéines GRA de la fraction ultrasoluble sécrétée *in vitro* (HssEs) sont présentes en concentration facilement détectable. De plus, à ce stade juste après sécrétion, elles n'ont pas encore interagi avec leurs membranes-cibles et devraient donc être sous une forme optimale pour l'interaction avec des membranes.

Notre choix pour l'élaboration d'un système modèle s'est porté initialement sur la fraction ultrasoluble sécrétée HssEs, dont les constituants majeurs sont les protéines GRA.

4.2 Protéines GRA sécrétées *in vitro*

La mise au point d'un système modèle se base généralement sur des conditions minimales. Dans notre cas, ne disposant des protéines GRA purifiées, ce travail a été réalisé à partir de la fraction HssEs riche en protéines GRA mais de nature peu déterminée. Il a donc fallu adopter une démarche prudente dans l'application des méthodes classiques de biochimie. La caractérisation des formes de solubilisation des protéines GRA a donc été abordée préalablement à la question de leurs interactions membranaires.

4.2.1 Expérience préliminaire : "Binding assay"

La première étape de ce travail de caractérisation a consisté à mettre en oeuvre des méthodes simples permettant d'étudier l'association des protéines GRA à des membranes modèles. Il existe des méthodes standard de biochimie pour déterminer l'association de molécules à des liposomes, rassemblées sous le terme générique " binding assay ". Sous sa forme la plus simple, ce test consiste en un fractionnement par centrifugation différentielle suite à l'incubation des protéines testées avec des liposomes : les liposomes, de taille et densité importantes, sédimentent plus vite que les molécules solubles. Celles-ci restent dans le surnageant (S) tandis que les liposomes et les protéines éventuellement associées se rassemblent dans le culot (P). Les conditions d'ultracentrifugation doivent être déterminées en fonction des molécules à séparer. Nous avons choisi les conditions d'ultracentrifugation préparative de la fraction HssEs (100 000g ; 1h) (limite de solubilité de la fraction HssEs).

Pour ce premier essai, nous avons choisi d'utiliser des SUVs formées d'EPC, lipide commercial disponible en grande quantité, contrairement aux lipides HeLa extraits au laboratoire. La fraction HssEs a été incubée avec des SUVs formées à partir d'EPC, en proportion volumique 2 :1 (700 μ l HssEs, soit 9.10⁷équivalent-parasites, pour 350 μ l de SUVs en tampon KCl), pendant 1h à température ambiante, sous agitation douce. Le mélange a ensuite été ultracentrifugé (100 000 g ;1h). En contrôle de la validité de l'expérience, la fraction HssEs a en parallèle été incubée avec du Tampon KCl (tampon de formation des SUVs) puis ultracentrifugée, dans les mêmes conditions.

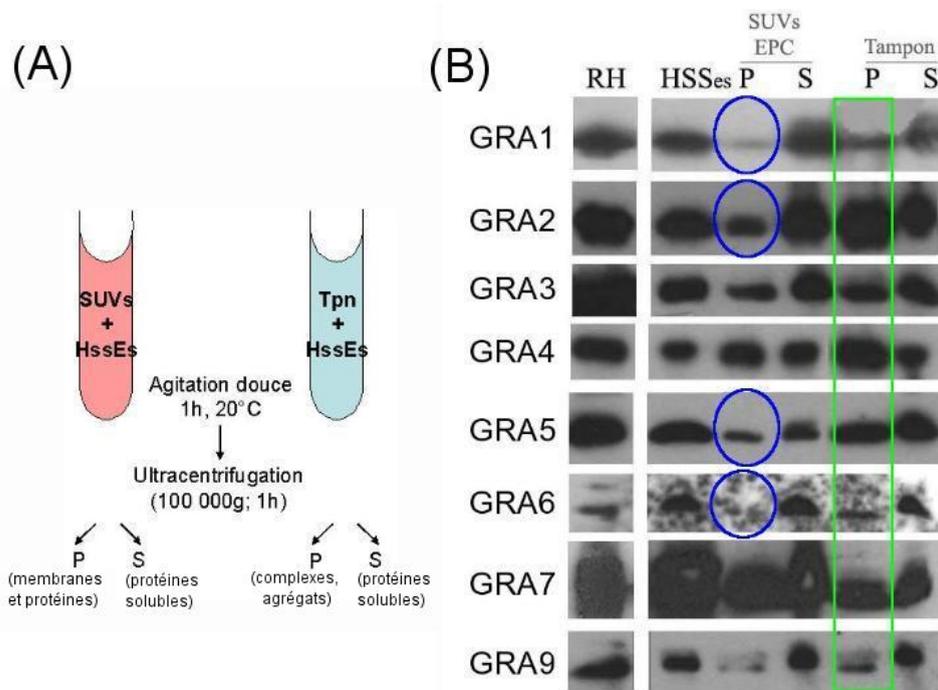


FIG. 4.3: Binding assay : protéines GRA de HssEs et SUVs EPC. (A) Une fraction aliquote de HssEs ($90 \cdot 10^6$ équivalent-parasites) a été incubée en proportion volumique 2 :1 avec des SUVs formées à partir d'EPC (SUVs EPC) ou du tampon KCl sans SUVs (Tampon), pendant 1h et à température ambiante. La fraction membranaire (P) est ensuite séparée des protéines non associées (S) par centrifugation à 100 000 g pendant 1h. (B) Un lysat parasitaire (RH) (dépôt $5 \cdot 10^6$ équivalent-parasites), une fraction aliquote de HssEs (dépôt $5 \cdot 10^6$ équivalent-parasites) de départ ainsi que les fractions P et S (dépôt $45 \cdot 10^6$ équivalent-parasites) ont été analysées par immunoblot révélé à l'aide des anticorps monoclonaux anti-GRA1, -GRA2, -GRA3, -GRA5, -GRA7, et polyclonaux anti-GRA4, -GRA6, -GRA9.

Le résultat de l'incubation sans SUVs a été inattendu : toutes les protéines GRA sédimentent, en proportions variables (Fig. 4.3, cadres verts). Cette sédimentation est plus marquée pour les protéines GRA2, 4 et 7 pour lesquelles la fraction sédimentée est majoritaire (P>S). Cela suggère la formation de complexes de masse suffisante pour sédimenter, du moins partiellement, en 1h à 100000g. La sédimentation des protéines GRA après incubation avec les SUVs n'est donc pas interprétable dans ces conditions.

Ces résultats ne nous ont donc pas permis de conclure quant à l'association des protéines GRA avec les SUVs EPC. La méthode de " binding assay " ne semble pas adaptée car il y a un important recouvrement des caractéristiques de sédimentation des protéines GRA seules et des SUVs. Cette expérience soulève la question de la forme de solubilisation des protéines GRA. En effet, le phénomène de sédimentation en l'absence de SUVs semble indiquer que les protéines GRA sont incluses dans des structures de masse assez importante pour sédimenter dans les conditions appliquées ici.

4.2.2 Solubilité des protéines GRA

Nous avons cherché à caractériser quantitativement et qualitativement le phénomène de sédimentation des protéines GRA observé ci-dessus. J'ai suivi le devenir de six des protéines GRA, en excluant GRA5 et GRA9 dont l'anticorps est peu affiné et la détection plus difficile.

Analyse quantitative de la sédimentation des protéines GRA

Afin d'évaluer la sédimentation naturelle des protéines GRA, le fractionnement par ultracentrifugation différentielle (100 000 g ; 1h) a été reproduit sur une fraction HssEs sans ajout de tampon ni incubation préalable (Fig.4.4 A). Une gamme de dilution des fractions P et S a été réalisée afin d'obtenir des résultats quantitatifs. Les quantités déposées sont exprimées en équivalent-parasites : 50.10^6 , 25.10^6 , 10.10^6 , 5.10^6 , 2.10^6 .

Dans les mêmes conditions d'exposition du film sur la membrane, le signal de la fraction S est nettement détectable jusqu'à la dilution équivalente à 5.10^6 parasites, tandis que le signal de la fraction P n'est bien détectable, pour toutes les protéines GRA, qu'à la première dilution, soit 50.10^6 parasites. Ces résultats sont compatibles avec le contrôle de qualité du produit de sécrétion présenté en section 4.1.2 : les quantités déposées correspondaient à 5.10^6 parasites, ce qui correspond ici aussi à une fraction P non détectable ou faible devant la fraction S. Il semble donc qu'il existe une proportion constante de protéines GRA sédimentées au cours d'ultracentrifugations successives. Cette fraction sédimentée reste cependant assez faible (10 à 20%).

On peut noter que les protéines GRA3 et GRA7 ont une plus grande tendance à la sédimentation, puisqu'elles sont également bien détectées dans le dépôt équivalent à 25.10^6 parasites. Cela est compatible avec leur oligomérisation démontrée dans la vacuole [Ossorio et al., 1994, Coppens et al., 2006].

On peut noter enfin que les protéines apparaissent sédimenter en beaucoup plus grande proportion dans l'expérience précédente, après incubation en Tampon KCl (Fig.4.3) ; en particulier GRA2 sédimenterait majoritairement dans ce dernier cas. L'incubation en Tampon KCl renforce donc significativement la tendance à la sédimentation des protéines GRA.

Nature des complexes sédimentés

Afin de déterminer la nature des interactions qui stabilisent les objets sédimentés, des traitements par un agent chaotropique (Urée), par un détergent non ionique (NP40) ou en contrôle, par le tampon de lavage (Tris 50mM pH8), ont été réalisés sur la fraction sédimentée obtenue lors de l'expérience précédente : la fraction P a été redispersée en Urée 6M, NP40 1% ou en tampon Tris, incubée 30 minutes sur glace puis ultracentrifugée (100 000 g ; 1h) afin de séparer la fraction solubilisée par le traitement (S) de celle restée non soluble (P) (Fig.4.4B).

Le traitement Urée, destiné à casser les liaisons hydrogène entre protéines, solubilise partiellement la protéine GRA4 mais pas les protéines caractérisées par un domaine TM ou des hélices- α amphipathiques (GRA2,3,6,7).

Le traitement NP40, qui agit sur les interactions hydrophobes, solubilise majoritairement toutes les protéines testées, jusqu'à la totalité des protéines GRA2,6,7. Il reste un résidu non solubilisé pour la

(A) Fractionnement sans incubation préalable

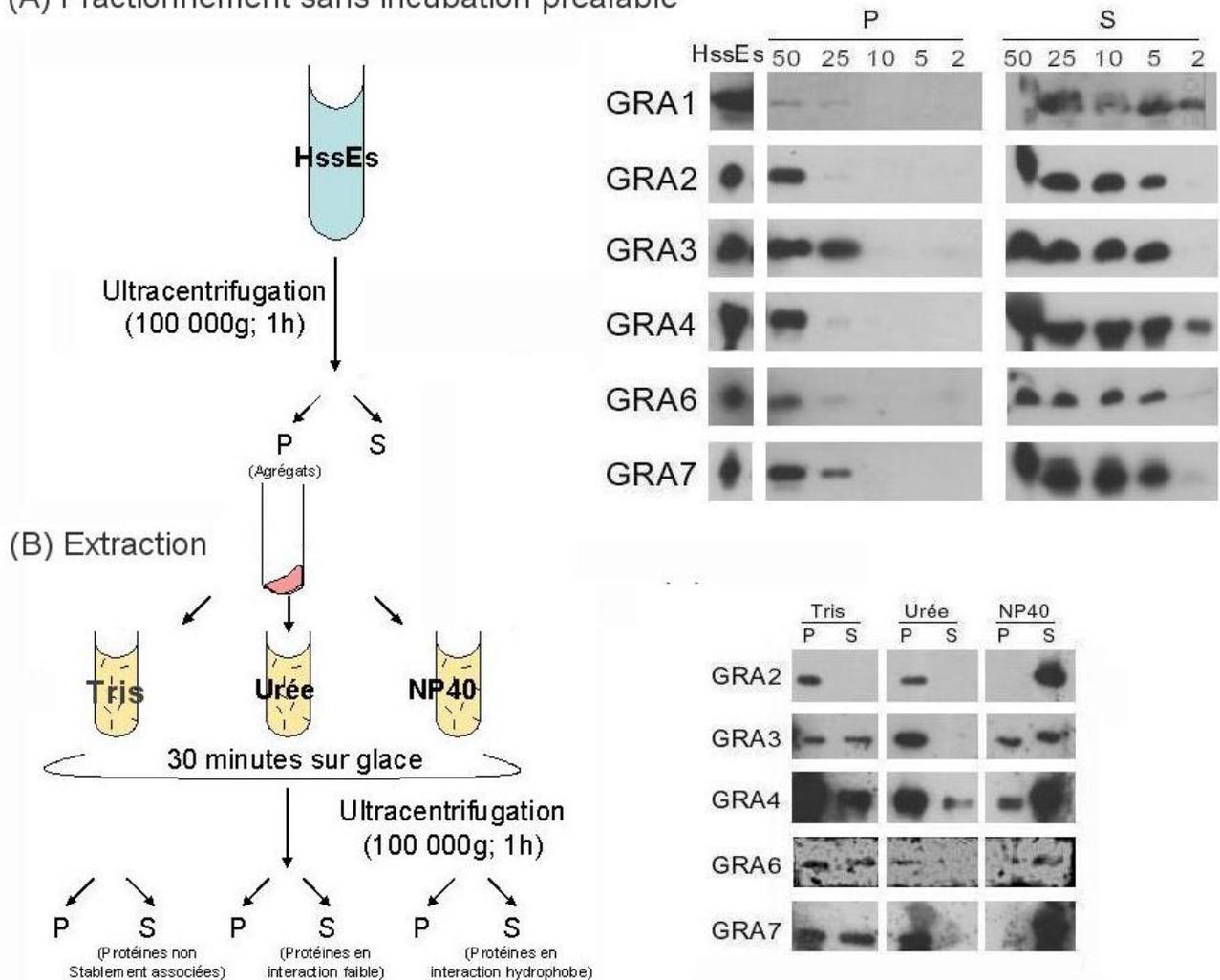


FIG. 4.4: Sédimentation des protéines GRA de HssEs. (A) L'extrait ultrasoluble HssEs fraîchement préparé a été directement fractionné et analysé comme décrit en figure 4.3, sans incubation préalable en Tampon KCl. Les fractions P et S obtenues ont été diluées de manière à déposer les quantités équivalent-parasites suivantes : $50 \cdot 10^6$, $25 \cdot 10^6$, $10 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$. (B) Le culot P obtenu en (A) a été repris en Urée 6M, NP40 1% ou en tampon Tris et incubé sur glace pendant 30 minutes, puis fractionné par ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1h. Toutes les fractions P et S obtenues ont été déposées sur gel ($45 \cdot 10^6$ équivalent-parasites par dépôt) et analysées par immunoblot révélé à l'aide des anticorps monoclonaux anti-*GRA1*, -*GRA2*, -*GRA3*, -*GRA7* et polyclonaux anti-*GRA4* et -*GRA6*.

protéine *GRA4*, qui est probablement stabilisée en bonne part par des interactions protéine-protéine. C'est également le cas pour *GRA3* qui n'est pourtant pas extraite à l'Urée ; cela pourrait indiquer son association à des phases lipidiques insolubles en détergents (type rafts).

On peut noter que les protéines *GRA*, à l'exception de *GRA2*, sont solubilisées en bonne partie par le traitement contrôle Tris : les structures étudiées sont peu stables ou de masse limite pour leur sédimentation². Cela n'invalide pas l'interprétation qualitative des autres résultats. L'exception constituée par *GRA2* indique qu'elle est incluse dans des structures différentes des autres protéines testées.

²Dans ce cas, seuls les objets les plus proches du fond du tube ont le temps de sédimenter.

Ces résultats montrent que les interactions hydrophobes sont prédominantes et essentielles à la stabilisation des structures contenant les protéines GRA, les interactions protéine-protéine n'intervenant que pour la protéine particulière GRA4 qui n'a pas un comportement de protéine membranaire en cellule mais est associée aux membranes par le biais d'interactions protéine-protéine [Labruyere et al., 1999].

Bilan : solubilité des protéines GRA

Les protéines GRA sécrétées *in vitro* apparaissent incluses dans des structures à la limite du critère d'ultrasolubilité appliqué ici (100 000g ; 1h). Ces structures semblent de plus, susceptibles de s'agréger au cours d'incubations en tampon salin à température ambiante. Les expériences de solubilisation par des traitements montrent qu'elles sont maintenues essentiellement par des interactions hydrophobes, ce qui permet d'envisager leur transport en complexes, au sein desquels seraient repliés les segments hydrophobes.

4.2.3 Etude des protéines GRA par séparation isopycnique

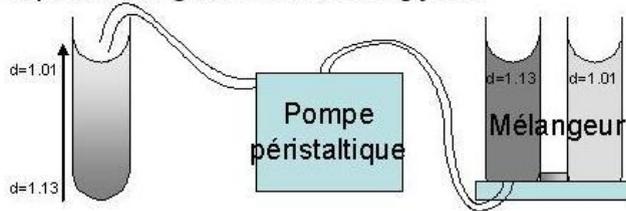
Les résultats précédents indiquent que les protéines GRA sécrétées *in vitro* sont comprises dans des complexes lipidiques et/ou protéiques qui provoquent leur sédimentation partielle après ultracentrifugation (100 000g ; 1h). Pour caractériser ces structures, il est nécessaire de mettre en oeuvre une méthode d'approche plus fine que l'ultracentrifugation différentielle : la séparation isopycnique sur gradient de densité linéaire. Ce procédé consiste à déposer l'extrait à analyser sur un gradient de concentration croissante d'une molécule non réactive (sucrose, glycérol...), centrifugé à haute vitesse jusqu'à l'équilibre, c'est-à-dire jusqu'à stabilisation des structures lipidiques/protéiques jusqu'à leur densité isopycnique. Par ce moyen, les protéines, au lieu d'être séparées en deux fractions seulement (culot et surnageant), se répartissent en fonction de leur densité sur l'ensemble du gradient dont on récupère ensuite le contenu entier en une série de fractions. Il est intéressant d'employer cette méthode d'analyse car elle va nous permettre d'identifier les protéines GRA et leurs structures de solubilisation par un paramètre caractéristique, leur densité isopycnique. Il faut prendre en compte que ce paramètre dépend du type de gradient, les interactions des protéines avec le solvant jouant un rôle important. Ce type d'expérience ne donne donc qu'une valeur relative, mais qui peut permettre des comparaisons entre les différentes protéines GRA et leurs différentes formes de solubilisation.

Ce travail a été mis en place au LAPM avec l'aide de Ludovic PELOSI (actuellement au Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, UMR 5092 CNRS-CEA-UJF, CEA-Grenoble) et en parallèle au Laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes (UMR 5575 CNRS-UJF) avec l'aide de Jean-Pierre ALCARAZ.

Mode opératoire

Le produit à analyser est déposé directement sur un gradient linéaire de glycérol de densité 1.01 (au sommet) à 1.12 (au fonds), préalablement stabilisé pendant au moins 30 minutes à 4°C. Le

1) Préparation du gradient linéaire de glycérol



2) Dépot de l'échantillon

HssEs

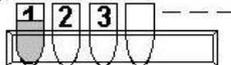
Centrifugation
(100 000g; 17h)

3) Elution des fractions

T

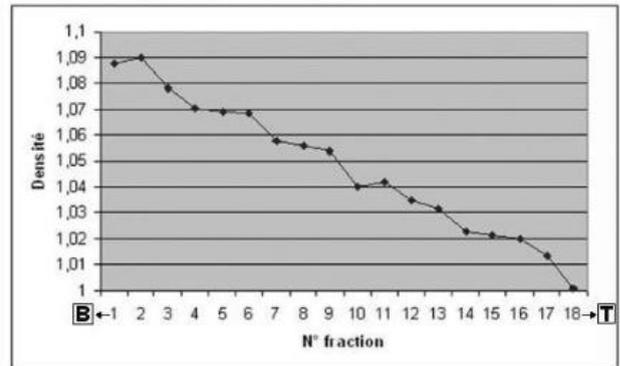


B



4) Pesée et analyse des fractions

Pesée

Analyse par Western Blot
-> détection des protéines GRA

Analyse par Dot Blot

-> détection de la concentration globale de protéines

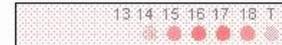


FIG. 4.5: Préparation, centrifugation et analyse d'un gradient linéaire de glycérol. Le gradient de glycérol est coulé puis stabilisé pendant 30 minutes à 4°C. Après dépôt de l'échantillon à séparer, le gradient est centrifugé à 100 000g pendant 17h puis son contenu est collecté par fractions de 500 à 700 μ l. Ces fractions sont numérotées depuis le fond vers le haut du gradient et pesées pour déterminer leur densité, à l'exception des fractions extrêmes, B (fond) et T (sommets), récoltées en dernier et dont la densité n'est pas significative. Les fractions sont ensuite analysées par Dot Blot, pour déterminer leur concentration globale en protéines, et par immunoblot, afin de localiser les protéines GRA dans les fractions.

gradient est immédiatement centrifugé à 100 000 g jusqu'à l'équilibre, soit 17h minimum dans les expériences réalisées. Le gradient est élué par le fond du tube en une vingtaine de fractions de 500 à 700 μ l, numérotées à partir du fond, à l'exception des deux fractions extrêmes qui sont notées B (fond) et T (sommets) (Fig.4.5).

La séparation de protéines par gradient de densité présente des points délicats sur le plan technique, en particulier en ce qui concerne la préparation des gradients et l'élué des fractions après centrifugation. Le profil de densité des gradients produits n'étant pas reproductible, les fractions éluées ont été pesées systématiquement. Seuls les gradients présentant une linéarité suffisante, tels que celui présenté sur la Figure 4.5 "Pesée", ont été retenus pour l'analyse. Les fractions sont analysées par immunoblot pour la localisation des protéines GRA et également, dans la plupart des cas, par Dot Blot : dépôt direct sur membrane de nitrocellulose, sans dénaturation préalable des protéines, puis marquage au Rouge Ponceau, pour la détection globale des protéines présentes dans les fractions.

La mise au point du protocole a été faite sur le produit HssEs étudié dans cette section : la répartition des protéines GRA en fonction de la densité s'est avérée extrêmement reproductible sur toutes les expériences réalisées. A chaque changement de conditions de l'expérience (changement du volume des gradients, changement des solutions de glycérol), un gradient HssEs centrifugé puis analysé en parallèle des autres a servi à contrôler la reproductibilité des résultats.

Profil de sédimentation des protéines GRA de HssEs

Le marquage en Rouge Ponceau du Dot Blot indique que les protéines présentes dans la fraction HssEs se concentrent essentiellement dans la zone de densité $d=[1.01 \rightarrow 1.05]$ (Fig.4.6 A) ; les protéines GRA apparaissent toutes rassemblées essentiellement dans cette zone. Pour faciliter la lecture des résultats, je me suis efforcée de distinguer des zones de densité rassemblant des groupes particuliers de protéines, en prenant en compte les bandes les plus intenses. Quatre groupes majeurs comprenant des protéines GRA peuvent être distingués dans les fractions analysées après séparation isopycnique de la fraction HssEs :

- $d < 1.01$, en vert : GRA1 et GRA5 ;
- $d=[1.01 \rightarrow 1.025]$, en bleu : GRA1, GRA2, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9 ;
- $d=[1.03 \rightarrow 1.035]$, en rouge : GRA3, GRA5(bande à 37kDa) ;
- dans les hautes densités ($d=1.10$ et $d=1.13$), en orange : GRA9 faiblement détectable.

- Les protéines GRA, considérées dans leur ensemble, présentent un dessin de répartition complexe sur ces gradients. Ce motif, très reproductible, constitue une sorte de signature de la fraction ultrasoluble HssEs, qui va permettre des comparaisons fines des protéines GRA présentes dans les fractions HssTx et HssVac.
- L'analyse globale des résultats montre que les protéines GRA sont localisées essentiellement dans la zone de densité $d=[1.01 \rightarrow 1.04]$, qui contient la majeure partie de toutes les protéines de HssEs d'après le marquage Ponceau.
- La seule protéine hydrophile, GRA1, se démarque des autres protéines testées par la densité particulièrement basse à laquelle elle se stabilise : elle est détectée majoritairement dans les fractions les moins denses ($d < 1.01$). Elle constituera donc un bon contrôle de localisation des protéines "solubles" dans les gradients analysés.

Interprétation

Les protéines du groupe bleu, situées dans une zone de densité assez faible, sont probablement sous des formes monomères ou de petits assemblages. Par contraste, les protéines du groupe rouge, dans une zone de densité plus élevée, pourraient être multimérisées. Enfin, on note que la protéine GRA9 existe sous une forme de haute densité, assez peu détectable, qui se démarque complètement des autres protéines GRA. Ce profil pourrait correspondre à une forme agrégée.

Les deux groupes majeurs constitués par les protéines GRA sont évocateurs de leur répartition dans les membranes de la vacuole :

- GRA2,4,6,9, ainsi que GRA3 et GRA5 de manière non majoritaire, associées aux structures mem-

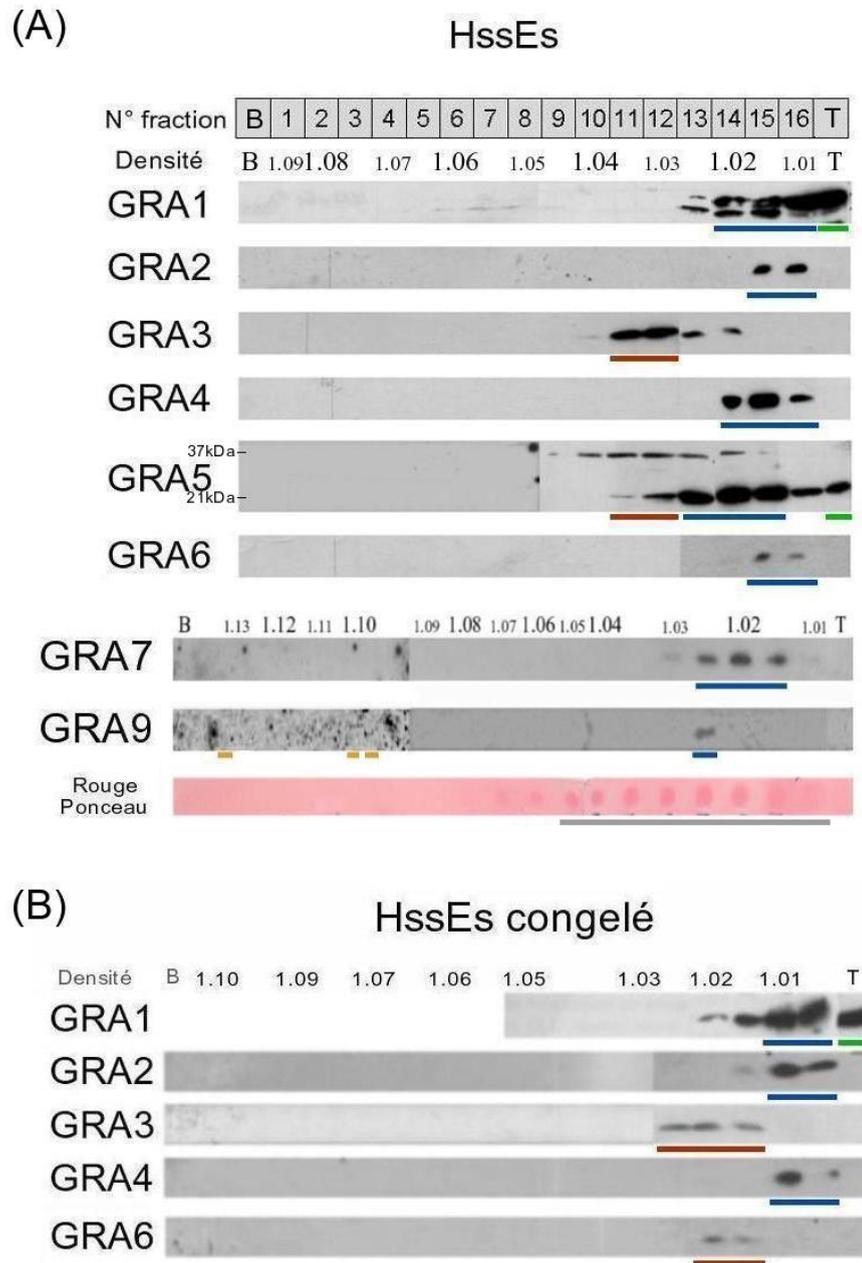


FIG. 4.6: Séparation isopycnique des protéines GRA de la fraction HssEs, fraîche ou congelée. Une fraction aliquote ($120 \cdot 10^6$ équivalent-parasites) de HssEs, fraîchement préparée (**A**) ou conservée à -20°C (**B**), a été déposée sur gradient linéaire de glycérol puis centrifugé jusqu'à l'équilibre ($100\,000\text{ g}$; 17h). Les contenus des gradients ont été collectés par fractions de 500 à $700\ \mu\text{l}$, les fractions B (fond) et T (sommet) en dernier. Ces fractions ont été pesées puis analysées par immunoblot, en révélant les protéines à l'aide des anticorps monoclonaux anti- GRA1 , - GRA2 , - GRA3 , - GRA5 , - GRA7 et polyclonaux anti- GRA4 , - GRA6 , - GRA9 , et par Dot Blot marqué au Rouge Ponceau.

branaires internes de la vacuole, sont comprises dans la zone bleue ;

- GRA3,5, associées majoritairement à la membrane délimitante de la vacuole, sont comprises en grande partie dans la zone rouge.

Ces profils de sédimentation similaires peuvent suggérer des structures de solubilisation similaires, voire communes, pour les protéines de chacun des groupes. Ces structures pourraient jouer un rôle dans le ciblage des protéines GRA vers différentes membranes de la vacuole.

La protéine GRA7 est associée à toutes les structures membranaires de la vacuole : sa sédimentation dans le groupe des protéines du réseau est à mettre en marge mais ne contredit pas cette hypothèse, car de plus elle est assez faiblement détectée dans cette expérience.

Effet de la conservation à -20°C

Les expériences de biochimie se sont déroulées autant que possible à partir de protéines fraîchement préparées et conservées à 4°C (48h maximum). Par contre, les expériences de fluorescence se déroulant dans un autre laboratoire, je ne pouvais qu'utiliser des stocks congelés à -20°C de la fraction HssEs. L'analyse de la densité des protéines la fraction HssEs après congélation a donc été entreprise, en se restreignant à quelques protéines représentant les trois groupes majeurs distingués dans l'analyse précédente : [GRA1], [GRA2, 4 et 6], [GRA3].

De même que pour la fraction HssEs fraîchement préparée, trois sous-ensembles de protéines peuvent être distingués dans les basses densités, mais ils sont décalés vers des densités plus faibles (Fig.4.6 **B**) :

- Sommet du gradient : GRA1 (souligné en vert) ;
- d=[1.005→1.01] : GRA2, GRA4, GRA1 (souligné en bleu) ;
- d=[1.015→1.025] : GRA3, GRA6 (souligné en rouge foncé).

Une nette diminution de l'intensité du signal est constatée par comparaison avec les résultats précédents (voir Fig.4.6A). Cette observation est sans doute expliquée par la dégradation d'une partie des protéines suite à la congélation/décongélation.

Le décalage global des bandes observées vers les zones de faible densité semble indiquer que certaines interactions faibles au sein des structures de solubilisation sont cassées par le processus de congélation-décongélation. Cela ne perturbe apparemment pas la solubilisation puisqu'aucune des protéines n'apparaît précipitée. Il est à remarquer que seule GRA6 échappe à cette altération : elle est retrouvée dans la zone d=[1.015-1.020] comme pour le produit HssEs non congelé. Cela suggère qu'elle serait associée à des structures robustes, peut-être par son domaine transmembranaire, mais indépendamment de GRA2 et GRA4 qui colocalisaient pourtant dans la même zone de densité pour la fraction sécrétée fraîchement préparée.

Les protéines GRA apparaissent partiellement altérées par la congélation : dégradation et rupture de certaines structures. Cependant, elles restent facilement détectables et correctement solubilisées, leur densité diminuant peu.

Bilan : Analyse par sédimentation isopycnique

La séparation isopycnique apparaît être un outil de choix pour l'analyse des comportements des protéines GRA en solution. En effet, cette méthode donne accès à une signature de la fraction testée. Les bornes de densité utilisées permettent de distinguer des groupes différents de protéines GRA, ce qui permet d'évaluer les possibilités d'interactions entre les protéines de la fraction testée.

4.2.4 Rôle des lipides du sérum

Le milieu de sécrétion D10 est riche en protéines et lipides du sérum (sérum de veau) qui peuvent interférer avec les protéines sécrétées *in vitro*. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier leur influence sur la solubilisation des protéines GRA. Le sérum étant nécessaire à l'induction de la sécrétion *in vitro* [Darcy et al., 1988], j'ai testé une alternative : le sérum déplété en lipides, afin d'évaluer le rôle de ces lipides dans l'induction de la sécrétion et la solubilisation des protéines GRA.

Sécrétion *in vitro* en milieu déplété en lipides

Le protocole classique de sécrétion *in vitro* (voir Paragraphe 4.1.2 "Production des extraits") a été transposé en milieu de culture complété de 10% SVF délipidé (D10-L). Des sécrétions dans le milieu classique (D10) et le milieu délipidé (D10-L) ont été menées et analysées en parallèle (Fig. 4.7) : la teneur en protéines GRA et SAG1 des fractions basse vitesse (LSP) et haute vitesse (HSP et HSS) obtenues lors de la préparation, comme en Sous-section 4.1.2, a été évaluée.

Le contrôle SAG1, de faible intensité dans les fractions HSP et HSS, montre que les parasites ont subi peu de lyse au cours de l'incubation malgré la modification du protocole. Ce contrôle valide la comparaison entre les protéines obtenues par incubation en D10 et D10-L.

Alors que les protéines GRA1,2,4,9 sont aussi bien détectées en HssEs(D10-L) qu'en HssEs(D10), les protéines GRA3,5,6,7 qui toutes, possèdent des régions hydrophobes potentiellement transmembranaires, sont faiblement présentes dans la fraction ultrasoluble HssEs(D10-L) (Fig. 4.7 encadrés rouges). Elles sont cependant présentes dans la fraction sédimentée HSP(D10-L), ce qui indique qu'elles sont effectivement sécrétées, mais sous une forme plus propice à la sédimentation.

Les protéines GRA à domaines transmembranaires sont donc affectées par l'absence de lipides du sérum après sécrétion : elles semblent mal solubilisées.

Solubilisation : étude par sédimentation isopycnique

Les formes de solubilisation des protéines GRA de cette fraction ont été étudiées par une analyse sur gradient isopycnique dont les résultats ont été comparés à ceux de la figure 4.6 HssEs.

Les quatre protéines possédant des régions hydrophobes sont peu (GRA3, GRA7) ou pas (GRA5, GRA6) détectables, comme observé dans le paragraphe précédent. Les protéines détectées se répartissent de la manière suivante (Fig. 4.8) :

- $d < 1.01$, en vert : GRA1 ;

- $d = [1.01 \rightarrow 1.02]$, en bleu : GRA1, GRA2, GRA4, GRA7 et GRA9 ;

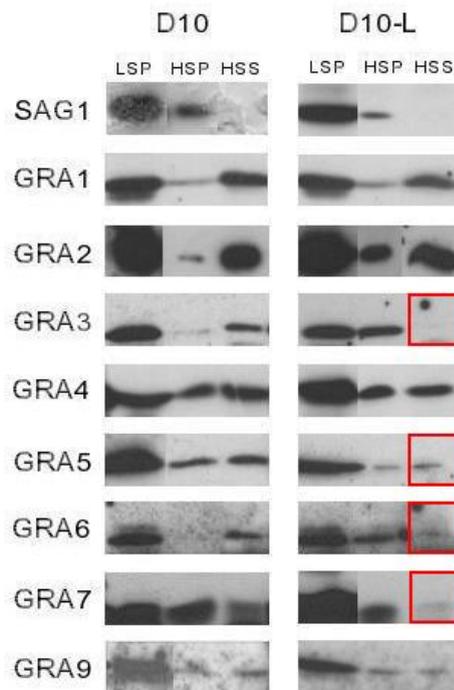


FIG. 4.7: Sécrétion *in vitro* en sérum délipidé. (A) Le produit HssEs(D10-L) a été préparé selon le protocole standard de sécrétion *in vitro*, mais en milieu complété en 10% SVF délipidé. Les protéines sécrétées ont été fractionnées par une centrifugation basse vitesse (**LSP**) puis une ultracentrifugation haute vitesse (100 000g ; 1h) (**HSP**, **HSS**) et contrôlées comme indiqué en Figure 4.2. Les fractions LSP, HSP et HSS obtenues ont été déposées sur gel à 5.10^6 équivalent-parasites par puits et analysées par immunoblot à l'aide des anticorps monoclonaux anti-**GRA1**, -**GRA2**, -**GRA3**, -**GRA5**, -**GRA7**, et polyclonaux anti-**GRA4**, -**GRA6**, -**GRA9**.

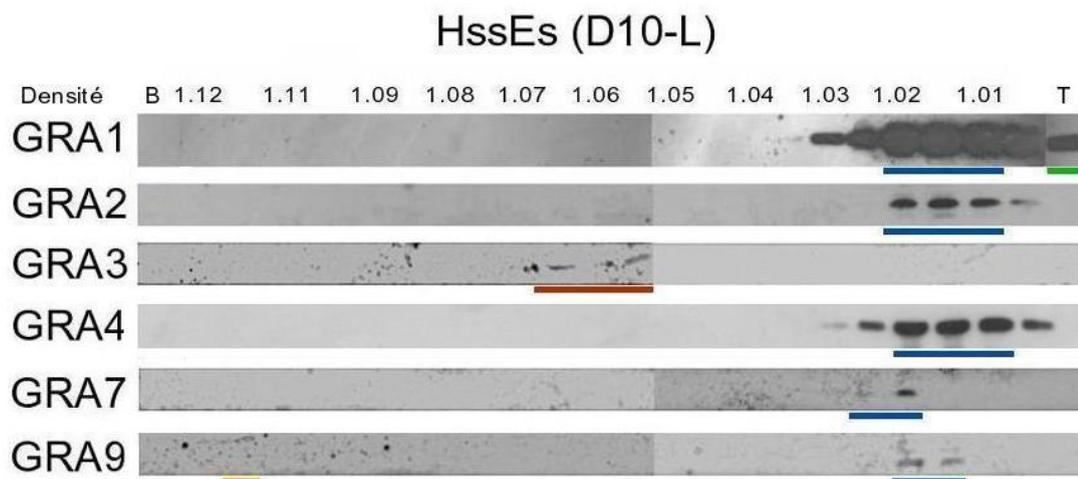


FIG. 4.8: Séparation isopycnique des protéines GRA de la fraction HssEs produite en sérum délipidé. Une fraction aliquotée de HssEs(D10-L) (120.10^6 équivalent-parasites) a été déposée sur un gradient linéaire de glycérol puis centrifugée jusqu'à l'équilibre (au moins 17h). Le contenu du gradient a été collecté par fractions de 500 à 700 μ l qui ont été pesées à l'exception des fractions B (fond) et T (sommets). Ces fractions ont été pesées puis analysées par immunoblot à l'aide des anticorps monoclonaux anti-**GRA1**, -**GRA2**, -**GRA3**, -**GRA5**, -**GRA7** et polyclonaux anti-**GRA4**, -**GRA6**, -**GRA9**. L'encart correspond à un temps plus long d'exposition du film sur la membrane.

- $d=[1.045 \rightarrow 1.065]$, en rouge : GRA3 ;
- $d=1.12$, en orange : GRA9 ;
- $d > 1.12$ (culot), en noir : GRA4 et GRA1.

Comparaison avec les protéines sécrétées en D10 La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus en Figure 4.6 montre que les profils de sédimentation des protéines GRA détectées sont diversement altérés suite à la déprivation en lipides :

- (i) GRA3 est décalée vers des zones de plus haute densité ;
- (ii) GRA7, malgré sa diminution en quantité, reste dans la même zone de densité ;
- (iii) GRA2, GRA9, GRA4 et GRA1 se stabilisent dans leur région initiale de densité.

Le comportement de GRA3 confirme un problème de solubilisation après sécrétion en l'absence des lipides du sérum, tandis que la fraction restée soluble de GRA7 ne paraît pas altérée. Les autres protéines détectées ne semblent pas non plus altérées.

Bilan : rôle des lipides du sérum

Lors de l'étude de la solubilisation des protéines GRA sécrétées *in vitro* en D10 (section 4.2.2), j'ai mis en évidence l'inclusion des protéines GRA dans des structures de solubilisation stabilisées par des interactions essentiellement hydrophobes, ce qui évoque la présence de lipides dans ces structures. Il apparaît dans ces derniers résultats que les lipides apportés par le sérum, inducteur de la sécrétion, jouent un rôle majeur auprès des protéines à TMDs GRA3,5,6,7 en contexte acellulaire, puisque leur absence altère la stabilisation de ces protéines. Ces résultats suggèrent l'inclusion de ces protéines GRA sécrétées *in vitro* dans des complexes protéo-lipidiques qui stabiliseraient et solubiliseraient les protéines.

4.2.5 Association aux membranes

La question centrale de ce travail, quant aux capacités d'interactions membranaires des protéines GRA, peut être abordée maintenant que le comportement des protéines GRA contenues dans la fraction HssEs est caractérisé et que des méthodes d'analyse adaptées ont été choisies. L'analyse par sédimentation isopycnique, particulièrement adaptée à la séparation des protéines associées à des SUVs d'une part et des protéines solubles d'autre part, a été utilisée. Les analyses effectuées au Paragraphe 4.2.3 ("Etude de la solubilisation des protéines GRA par sédimentation isopycnique") sur les protéines sécrétées ont servi à la comparaison des profils de sédimentation avec et sans SUVs. Pour cette expérience décisive, j'ai utilisé des SUVs formées à partir de l'extrait lipidique de cellules HeLa, afin d'optimiser les possibilités d'association SUVs-protéines GRA. La fraction HssEs fraîchement préparée a été incubée avec les SUVs HeLa, en proportion volumique 2 : 1 (700 μ l HssEs, soit $90 \cdot 10^6$ équivalent-parasites, pour 350 μ l de SUVs HeLa en Tampon KCl), pendant 1h à température ambiante et sous agitation douce. L'échantillon a ensuite été séparé de manière isopycnique sur gradient linéaire par centrifugation (100 000 g ; 17h), selon le mode opératoire décrit au paragraphe 4.2.3. Les fractions éluées ont ensuite été pesées et analysées (Fig.4.9).

Afin de déterminer l'association des protéines GRA aux SUVs, l'analyse s'est déroulée en trois étapes. J'ai d'abord localisé les SUVs, puis les protéines GRA, afin de déterminer si certaines co-localisent avec les SUVs. Pour confirmer l'association, la dernière étape a consisté à vérifier la variation de densité des protéines GRA avant et après incubation avec les SUVs.

Localisation des SUVs

La localisation des SUVs dans le gradient a été obtenue par une méthode non conventionnelle, basée sur l'analyse des fractions par Dot Blot non dénaturant (dépôt direct des fractions sur membrane de nitrocellulose), coloré au Rouge Ponceau. (Fig.4.9 A, **Ponceau**). Le Rouge Ponceau marque toutes les protéines présentes, donnant une teinte rouge-rose à toute la membrane. Dans le cas des gradients avec SUVs, des dépôts blancs sont apparus en contraste sur certains dots, indiquant la présence de lipides des SUVs. Les membranes des SUVs, non dénaturées, ne se fixent pas à la nitrocellulose mais s'adsorbent seulement à sa surface, disparaissant ainsi après quelques lavages de la membrane en PBS.

|| Les SUVs HeLa apparaissent ainsi localisées majoritairement dans la zone de densité $d=[1.04 \rightarrow 1.05]$, délimitée en pointillés.

Localisation des protéines GRA

Les fractions éluées ont également été analysées par immunoblot. D'après les résultats obtenus, il est difficile de distinguer des sous-groupes clairement définis. Je propose la lecture suivante (Fig.4.9 A) :

- $d < 1.02$, en vert : GRA1 ;
- $d = [1.02 \rightarrow 1.03]$, en bleu : GRA4 ;
- $d = [1.03 \rightarrow 1.05]$, en rouge : GRA2, GRA3, GRA5, GRA6 et GRA7.

La protéine GRA9 n'était pas détectable, suggérant sa dégradation rapide. De même, la forme de 37 kDa détectée précédemment (voir Fig.4.6) par l'anticorps monoclonal anti-GRA5 n'est pas détectable non plus.

Hormis GRA1 et GRA4, les protéines GRA sont particulièrement rassemblées dans la zone $d = [1.03 \rightarrow 1.06]$, avec un profil de répartition assez étalé, qui correspond également à la zone de concentration maximale de la globalité des protéines de HssEs, observée sur le marquage Ponceau. Les protéines GRA sont localisées majoritairement dans la même zone de densité que les SUVs, sur une zone plus étalée.

|| Les protéines GRA2,3,5,6,7 sont localisées majoritairement dans la même zone de densité que les SUVs HeLa, sur une zone plus étalée.

Association des protéines GRA aux SUVs HeLa

Pour confirmer l'association des protéines GRA2,3,5,6,7 aux SUVs HeLa, il est nécessaire de vérifier que leur densité propre a varié suite à l'incubation avec les SUVs. Afin de comparer la sédimentation isopycnique des protéines GRA en présence ou absence de SUVs, un tableau de répartition a été réalisé (Fig.4.9 B) : il superpose les résultats obtenus pour HssEs après incubation

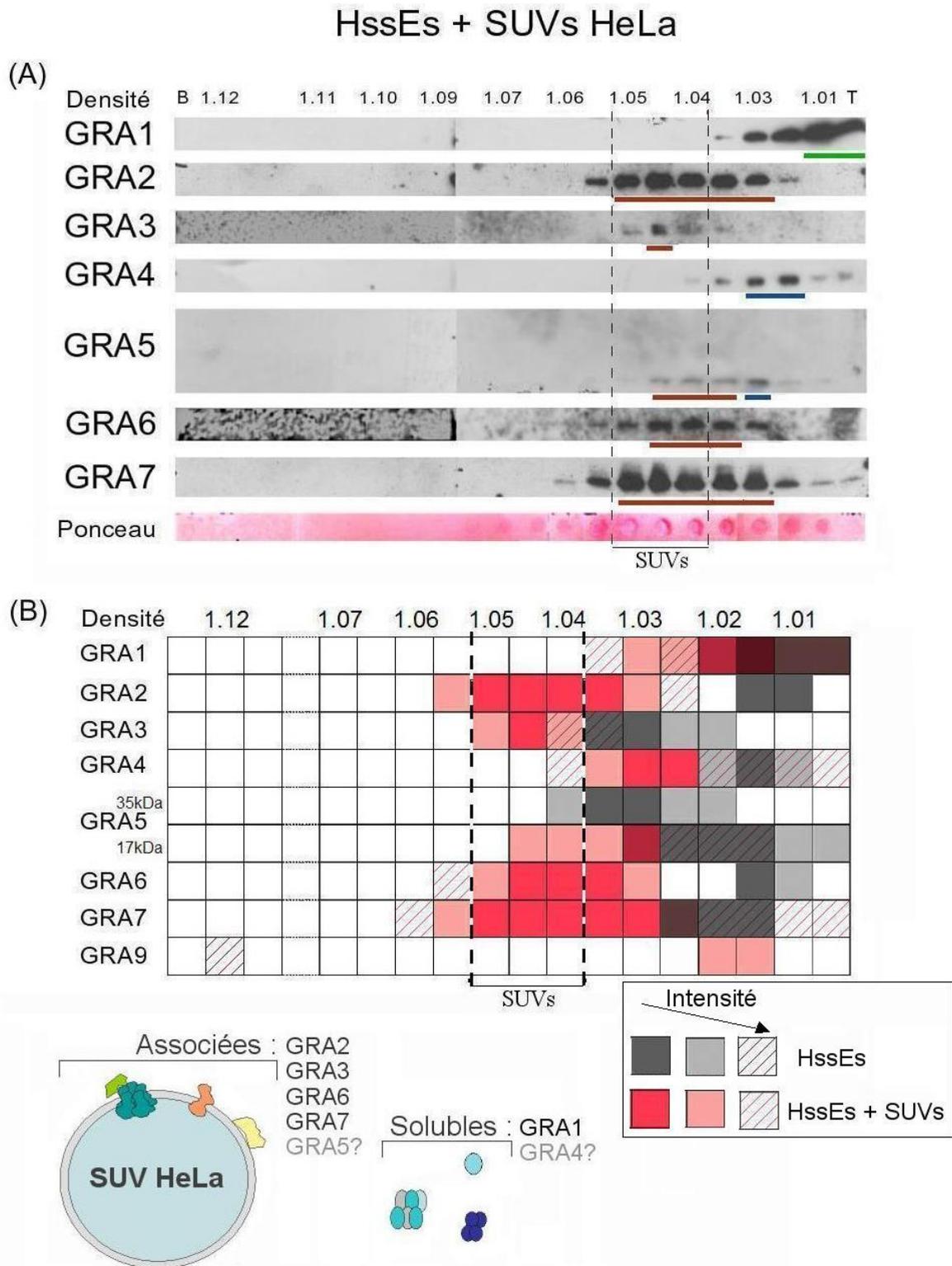


FIG. 4.9: Séparation isopycnique des protéines GRA de HssEs après incubation avec des SUVs HeLa. (A) Une aliquote de la fraction HssEs ($90 \cdot 10^6$ équivalent-parasites) a été incubée avec des SUVs HeLa (en proportion volumique 2 : 1) pendant 1h à température ambiante. L'ensemble a ensuite été déposé sur un gradient linéaire de glycérol puis centrifugé pendant 17h à 100 000 g. Les fractions éluées ont été pesées puis analysées par immunoblot à l'aide des anticorps monoclonaux anti-*GRA1*, -*GRA2*, -*GRA3*, -*GRA5*, -*GRA7*, et polyclonaux anti-*GRA4*, -*GRA6*. Les protéines présentes dans les fractions ont également été analysées par dépôt non dénaturé sur membrane de nitrocellulose, révélée au Rouge Ponceau. (B) Tableau de répartition des protéines GRA. Les résultats de la sédimentation après incubation avec les SUVs HeLa (rouge) sont superposés à ceux de la sédimentation sans incubation préalable, présentés à la Figure 4.6 (gris).

avec les SUVs HeLa (en rouge), à ceux obtenus précédemment pour HssEs seul (voir Fig.4.6) (en gris).

La répartition des zones rouges du tableau de répartition montre que suite à l'incubation avec les SUVs, les protéines GRA2,3,5,6,7 présentent un net décalage vers les hautes densités.

Par contraste, les protéines GRA1 et GRA4 présentent une répartition légèrement décalée vers les hautes densités après incubation avec des SUVs, mais elles ne migrent pas jusqu'à la zone de stabilisation des SUVs, délimitée en pointillés. Cela peut signifier qu'elles sont seulement entraînées par le flux de sédimentation des SUVs, sans y être associées.

|| La densité propre des protéines GRA2,3,5,6,7, qui colocalisent avec les SUVs, augmente effectivement suite à l'incubation.

Bilan : Association des protéines GRA aux SUVs HeLa

Ces derniers résultats valident notre système-modèle puisque toutes les protéines GRA décrites comme présentant des associations membranaires dans la vacuole parasitophore, ont la capacité de s'associer de manière stable aux SUVs : la protéine GRA2, qui contient des hélices amphipathiques, et les protéines GRA3,5,6,7, qui possèdent des domaines transmembranaires, peuvent s'associer spontanément à des membranes constituées de lipides complexes, hors de leur contexte cellulaire.

4.2.6 Conclusion générale

L'ensemble des résultats acquis dans cette section d'étude sur les protéines GRA sécrétées *in vitro* a permis d'atteindre les conclusions suivantes, dessinant les axes majeurs de cette étude :

1/ Les protéines GRA de la fraction HssEs apparaissent incluses dans des complexes protéo-lipidiques maintenus par des interactions de nature essentiellement hydrophobe. L'étude de leur sécrétion en milieu déplété en lipides a mis en évidence le rôle majeur des lipides du sérum dans la solubilisation et la stabilisation des protéines GRA après sécrétion *in vitro*.

2/ L'association spontanée a pu être démontrée pour toutes les protéines GRA pour lesquelles un comportement membranaire a été observé dans la vacuole parasitophore : GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7.

3/ L'ensemble de cette analyse a montré les limites de l'utilisation de cette fraction pour l'étude biochimique de l'association des protéines GRA avec les SUVs. D'une part, les protéines GRA apparaissent solubilisées dans des structures peu définies. D'autre part, l'analyse par séparation isopycnique, qui a permis de démontrer les interactions SUVs-protéines GRA, est une méthode lourde à mettre en oeuvre et qui ne permet pas facilement des analyses plus poussées de ces interactions. Cela m'a conduit à analyser d'autres fractions enrichies en protéines GRA : fractions ultrasolubles de parasites extracellulaires ou de cellules infectées.

4.3 Protéines GRA granulaires et vacuolaires

La poursuite de ce travail a consisté à étudier les fractions contenant les protéines GRA sous d'autres formes, et utilisables pour les analyses *in vitro* avec les membranes-modèles : formes de stockage dans les granules denses et formes vacuolaires. Les fractions ultrasolubles de parasites extracellulaires (HssTx) et de cellules infectées (HssVac) ont ainsi été analysées par les mêmes méthodes de caractérisation que celles utilisées dans la partie précédente pour les protéines sécrétées *in vitro* : comportement en ultracentrifugation différentielle, densité isopycnique, capacité d'association aux SUVs HeLa.

4.3.1 Solubilité des protéines GRA des fractions HssTx et HssVac

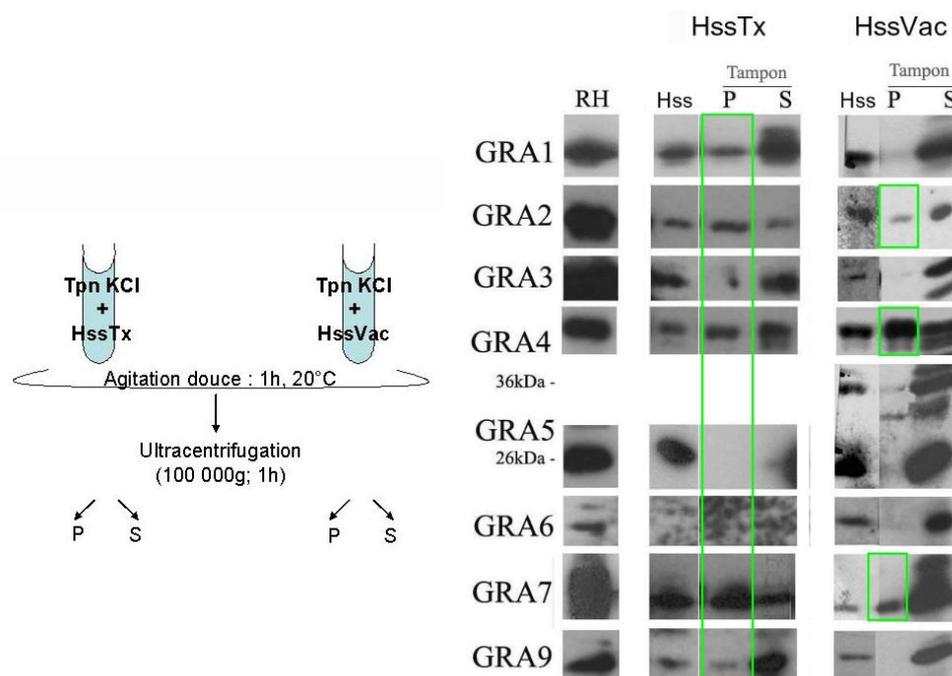


FIG. 4.10: Fractionnement des protéines GRA de HssTx ou HssVac. Les fractions HssTx et HssVac ont été incubées avec du Tampon KCl en proportion volumique 2 : 1 ($700\mu\text{l}$ Hss, soit $3,5 \cdot 10^8$ équivalents parasites pour HssVac, et $4 \cdot 10^8$ pour HssTx, pour $350\mu\text{l}$ de Tampon KCl), pendant 1h à température ambiante. Les protéines peu solubles (P) sont ensuite séparées des autres protéines (S) par centrifugation à $100\,000\text{ g}$ pendant 1h. Les fractions obtenues ont été analysées par immunoblot ($2 \cdot 10^8$ équivalent-parasites par puits pour HssTx, $1,5 \cdot 10^8$ équivalent-parasites par puits pour HssVac) révélé à l'aide des anticorps monoclonaux anti-GRA1, -GRA2, -GRA3, -GRA5, -GRA7, et polyclonaux anti-GRA4, -GRA6, -GRA9.

La première étape de cette étude comparative a été l'analyse par ultracentrifugation différentielle réalisée lors de l'expérience de "binding assay". Cette méthode est simple à mettre en oeuvre et s'est révélée informative quant à la solubilité des protéines GRA sécrétées *in vitro*, en section précédente ; seul le fractionnement contrôlé après incubation en Tampon KCL est nécessaire pour cela. Les fractions protéiques HssTx et HssVac ont été incubées avec du tampon KCl (proportion volumique 2 : 1) pendant 1h à température ambiante, sous agitation douce, puis fractionnées en un culot P et un surnageant S par ultracentrifugation ($100\,000\text{ g}$; 1h).

Dans le cas de la fraction HssTx, la plupart des protéines GRA sédimentent, en proportions variables, dans les conditions d'ultracentrifugation appliquées (Fig.4.10 "HssTx", encadrés verts). En effet, les protéines GRA2,4,7 se retrouvent en forte proportion dans le culot, alors que les protéines GRA1,3,4,9 sédimentent plus faiblement. Le cas des protéines GRA5 et GRA6 apparaît plus difficile à évaluer car elles sont peu détectables dans les fractions P et S.

Dans le cas de la fraction HssVac, seules les protéines GRA2,4,7 sont retrouvées dans le culot d'ultracentrifugation (Fig.4.10 "HssVac", encadrés verts) : GRA4 sédimente majoritairement tandis que GRA2 et GRA7 sédimentent plus faiblement. Les autres protéines testées restent dans le surnageant ultrasoluble.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus précédemment pour HssEs (voir Fig.4.3), bien que les quantités de protéines soient différentes dans les différents cas, montre une forte similarité entre les comportements des protéines granulaires et ceux des protéines sécrétées *in vitro* en D10 : en effet, les protéines GRA de ces deux fractions ont une forte tendance à la sédimentation. Par contre, les protéines GRA vacuolaires restent majoritairement solubles dans cette expérience et apparaissent ainsi solubilisées différemment, dans des complexes de densité/taille plus faible.

4.3.2 Séparation isopycnique

L'analyse par séparation isopycnique des fractions HssTx et HssVac a permis une comparaison plus poussée des formes de solubilisation des protéines GRA. Les fractions HssTx et HssVac fraîchement préparées ont été séparées sur des gradients linéaires de glycérol centrifugés à l'équilibre (100 000g ; 17h). Les fractions éluées ont été analysées par immunoblot et Dot Blot non dénaturant révélé au Rouge Ponceau. Le mode opératoire est le même que celui détaillé en section précédente (voir Paragraphe4.2.3).

a) Profils de sédimentation des protéines GRA de HssTx

L'analyse de la fraction HssTx sur gradient de glycérol met en évidence plusieurs groupes de protéines GRA (Fig.4.11) :

- $d \leq 1.01$, en vert : GRA1 ;
- $d = [1.015 \rightarrow 1.025]$, en bleu : GRA1,2,4,5,6,7 ;
- $d = [1.025 \rightarrow 1.05]$, en rouge : GRA3,6,7 sur une zone très étalée (jusqu'à 1.07 pour GRA7) ainsi que GRA9 ;
- $d = 1.10$, en orange : GRA9.

Le Dot Blot marqué au Rouge Ponceau indique que les protéines de la fraction HssTx sont essentiellement concentrées dans la zone soulignée en rouge, c'est-à-dire la zone où sont concentrées les protéines présentes dans la fraction HssTx : $d = [1.025 \rightarrow 1.05]$.

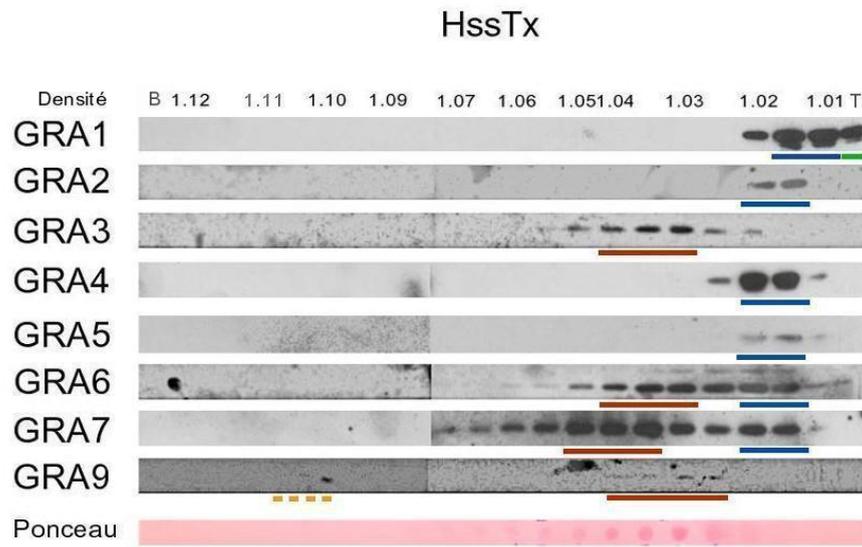


FIG. 4.11: Séparation isopycnique des protéines GRA de HssTx. Une fraction aliquote de HssTx (6.10^8 équivalent-parasites) fraîchement préparée a été déposée sur gradient linéaire de glycérol puis centrifugé (100 000 g ; 17h). Le contenu du gradient a été récupéré par fractions de 500 à 700 μ l, qui ont été pesées, à l'exception des fractions B (fond) et T (sommet). Elles ont été analysées par immunoblot à l'aide des anticorps monoclonaux anti-GRA1, -GRA2, -GRA3, -GRA5, -GRA7 et polyclonaux anti-GRA4, -GRA6, -GRA9, Les fractions ont également été analysées par Dot Blot non dénaturant révélé au Rouge Ponceau.

b) Profils de sédimentation des protéines GRA de HssVac

L'analyse des protéines GRA vacuolaires ultrasolubles a été assez délicate à réaliser. Dans cette fraction qui contient majoritairement des protéines cellulaires, les protéines GRA ne sont pas prépondérantes : elles sont difficiles à détecter, d'autant que cette fraction HssVac semble plus sensible à la dégradation protéasique³ que les autres.

Seules les protéines GRA1, GRA4, GRA6 et GRA7 ont pu être détectées (Fig.4.12A) :

- $d=[1.01 \rightarrow 1.02]$, en bleu : GRA1,4,6, 7 (toutes les protéines testées) ;

- $d=1.11$, en orange : GRA7 faiblement présente.

Le Dot Blot marqué au Rouge Ponceau indique que les protéines solubles des cellules infectées sont présentes essentiellement dans la zone de densité $[1.02 \rightarrow 1.04]$. De façon intéressante, cette zone n'inclut pas la zone de sédimentation des protéines GRA. Ce résultat rappelle que les protéines GRA ne sont pas majoritaires dans la fraction HssVac, riche en protéines cellulaires. Cela peut expliquer la difficulté de détection, voire la dégradation des protéines GRA qui sont normalement protégées des protéines de la cellule infectée par la membrane de la vacuole.

Une autre expérience de séparation isopycnique réalisée suite à une incubation pendant 30 minutes en tampon KCl a permis de détecter toutes les protéines GRA, à l'exception de GRA5 qui est particulièrement peu présente dans la fraction HssVac et dont l'anticorps est peu affiné (Fig.4.12 "+KCl") :

³Dégradation médiée par des protéases, enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines.

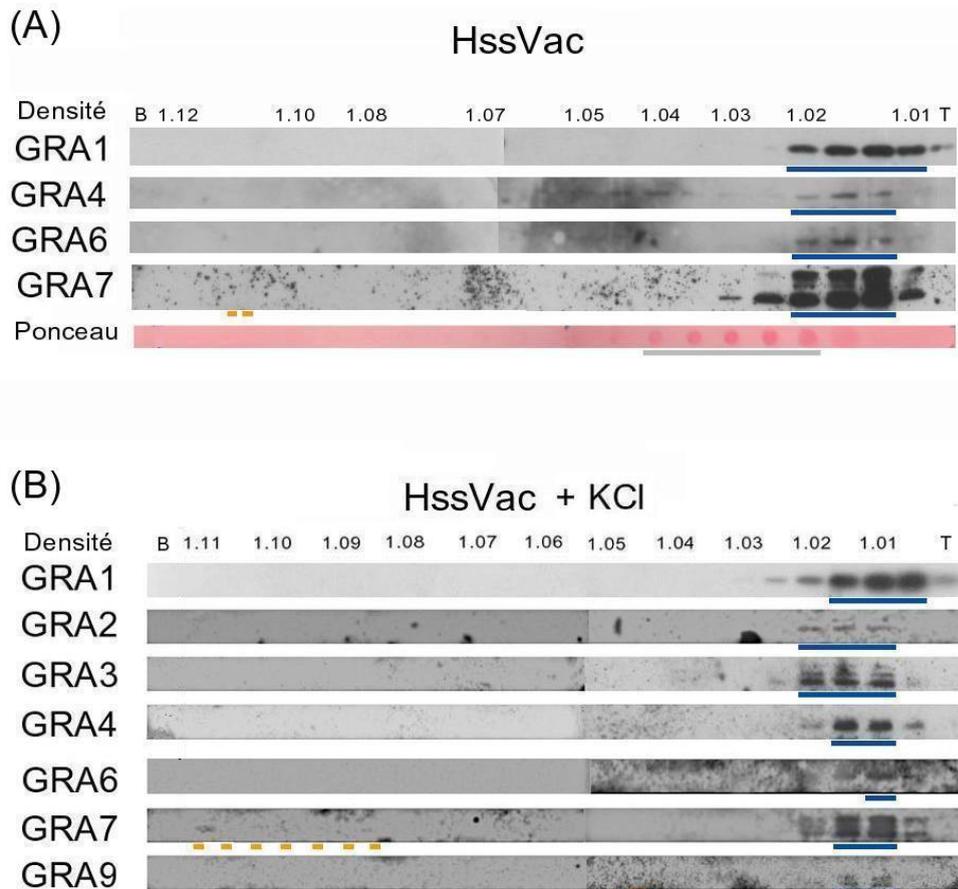


FIG. 4.12: Séparation isopycnique des protéines GRA vacuolaires ultrasolubles. Une fraction aliquote de HssVac fraîchement préparée ($12, 5 \cdot 10^8$ équivalent-parasites) (**A**), ou incubée 30 min à température ambiante avec du tampon KCl en proportion volumique 2 :1 ($8 \cdot 10^8$ équivalent-parasites) (**B**), a été déposée sur gradient linéaire de glycérol puis centrifugé ($100\ 000\ g$; 17h). Le contenu du gradient a été récupéré par fractions de 500 à 700 μl , qui ont été pesées, à l'exception des fractions B (fond) et T (sommets). Les fractions ont été analysées par immunoblot à l'aide des anticorps monoclonaux anti-*GRA1*, -*GRA2*, -*GRA3*, -*GRA7* et polyclonaux anti-*GRA4*, -*GRA6*, -*GRA9*. Les fractions du gradient (**A**) ont également été analysées par Dot Blot non dénaturant révélé au Rouge Ponceau.

- $d=[1.01 \rightarrow 1.02]$, en bleu : toutes les protéines GRA ;
- $d=1.045$, en orange : *GRA9* ;
- $d=[1.085 \rightarrow 1.11]$, en orange : *GRA7*.

Toutes les protéines GRA détectables sont ainsi présentes majoritairement dans la zone de densité $d=[1.01 \rightarrow 1.02]$. L'incubation en tampon KCl ne modifie pas les caractéristiques de sédimentation isopycnique des protéines *GRA1*, *GRA4*, *GRA6* et *GRA7* détectées dans les deux cas. Il semble donc qu'on puisse compléter les résultats obtenus pour HssVac sans incubation (Fig.4.12A) par ces derniers. Le fait que les protéines soient plus facilement détectables dans ces conditions d'expérience (incubation préalable en Tampon KCl) reste difficile à expliquer.

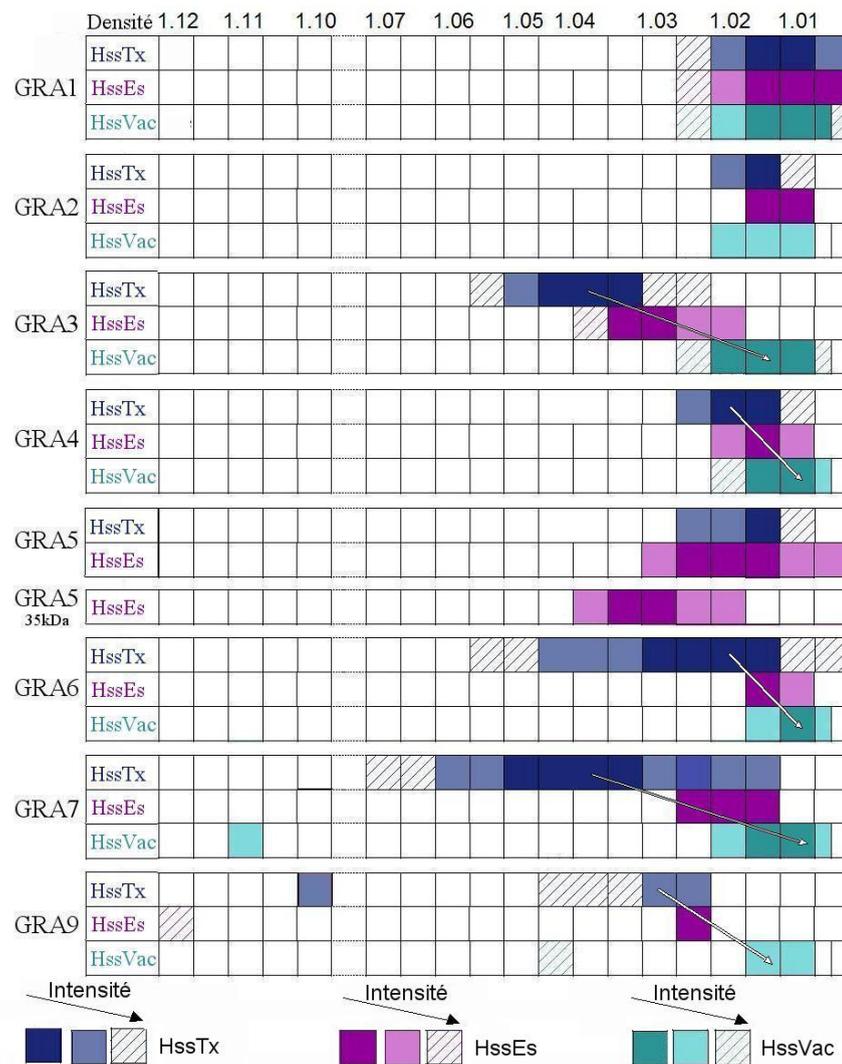


FIG. 4.13: Evolution des profils de sédimentation des protéines GRA avant, pendant et après sécrétion. Les résultats des analyses par séparation isopycniqne obtenus en Figures 4.11, 4.6 et 4.12 ont été représentés dans un tableau de répartition : en bleu pour HssTx, en violet pour HssEs et en turquoise pour HssVac. Les cases plus claires puis hachurées correspondent à une intensité de signal décroissante.

c) Bilan comparatif : formes de solubilisation des protéines GRA

Afin de faciliter la comparaison des résultats obtenus pour les protéines GRA granulaires, sécrétées *in vitro* et vacuolaires, un tableau résumant les résultats a été réalisé (Fig.4.13). Il rassemble les trois profils de sédimentation pour chacune des protéines GRA sous leur formes ultrasolubles : granulaire (en bleu), sécrétée (en violet) et vacuolaire (en turquoise). Les cases plus claires et hachurées correspondent à une intensité de signal de plus en plus faible.

- La protéine GRA1 maintient en tous cas un comportement de protéine soluble monomère.
- Les résultats obtenus pour la fraction HssVac se démarquent par l'homogénéité de la répartition des protéines dans les faibles densités, indiquant que toutes les protéines GRA sont solubilisées sous des formes très similaires dans la fraction soluble vacuolaire : leur faible densité indique qu'elles sont sous forme monomère ou en petits assemblages.
- En laissant de côté les résultats marginaux observés dans les hautes densités ($d > 1.10$), on

observe que la densité de la zone de sédimentation de plusieurs protéines GRA diminue d'une forme à l'autre : $d(Tx) < d(Es) < d(Vac)$ pour GRA3,4,6,7,9. Cette diminution de leur densité isopycnique peut correspondre à un changement progressif de conformation de ces protéines suite à leur sécrétion dans un environnement propice à leur insertion dans les membranes : depuis leur forme agrégée, pour le stockage dans les granules denses, à une forme moins complexe susceptible d'interagir avec les membranes vacuolaires.

- La protéine GRA2 se stabilise quant à elle, dans une zone de densité constante dans les trois formes étudiées : [1.01→1.03]. Il semble donc qu'elle soit toujours sous une forme monomère ou peu complexe, ce qui pourrait signifier qu'elle est disponible à tout moment pour le parasite.

La protéine GRA5 est la seule pour laquelle on ne peut pas conclure, car les résultats obtenus ne s'accordent avec aucun des cas évoqués, et de plus elle n'était pas détectable dans la fraction vacuolaire.

Bilan : Formes des protéines GRA au cours de leur trafic

La comparaison menée dans cette section sur les formes ultrasolubles laisse entendre que toute un groupe de protéines GRA (GRA3,4,6,7,9) évolue depuis une forme dense stockée dans les granules, jusqu'à une forme plus soluble dans la vacuole, en passant par des intermédiaires de dissociation. Par contraste la protéine GRA2 garde une forme de densité stable (faible) dans tous les cas, suggérant qu'elle n'est pas stockée de la même façon que les autres.

4.3.3 Association aux membranes

Il reste enfin à tester les capacités d'interaction des protéines GRA granulaires et vacuolaires avec des membranes modèles. Les fractions HssTx et HssVac ont été incubées avec des SUVs HeLa, en proportion volumique 2 :1, pendant 1h à température ambiante et sous agitation douce. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gradient linéaire de glycérol par centrifugation jusqu'à l'équilibre (100 000 g ; 17h). Les fractions éluées ont été pesées puis analysées par immunoblot ou par dépôt direct sur membrane révélée ensuite au Rouge Ponceau (Fig.4.14). Les résultats ont été représentés dans des tableaux de répartition : les résultats obtenus en présence de SUVs HeLa, en rouge, ont été superposés à ceux obtenus dans le paragraphe précédent pour les fractions HssTx (voir Fig.4.11) et HssVac seules (voir Fig.4.12), en gris.

a) SUVs HeLa + HssTx

Localisation des protéines GRA et des SUVs. Quatre groupes de protéines GRA peuvent être distingués (Fig.4.14 A) :

- $d < 1.01$, en vert : GRA1 ;
- $d = [1.01 \rightarrow 1.03]$, en bleu : GRA1, GRA4, GRA5, GRA9 ;
- $d = [1.04 \rightarrow 1.06]$, en rouge sombre : GRA2, GRA3, GRA4, GRA6, GRA7, GRA9 ;
- $d = [1.07 \rightarrow 1.09]$, en rouge hachuré : GRA4, GRA7 ;
- $d = [1.10 \rightarrow 1.11]$, en orange : GRA9 faiblement présente.

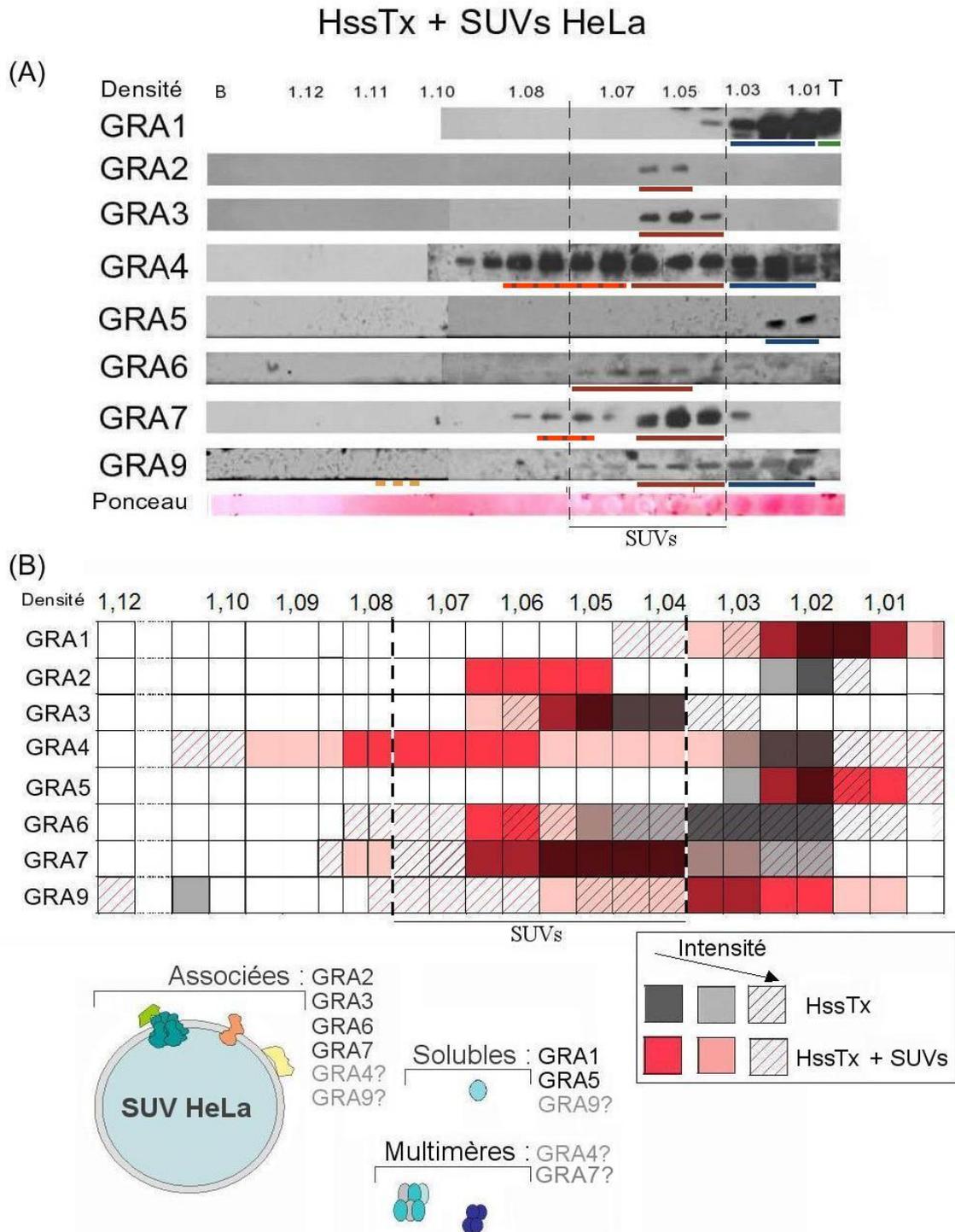


FIG. 4.14: Séparation isopycnique des protéines GRA de HssTx après incubation avec des SUVs HeLa. Une aliquote de la fraction HssTx ($4.2 \cdot 10^8$ équivalent-parasites) a été incubée avec des SUVs HeLa, en proportion volumique 2 :1, pendant 1h, à température ambiante. Le tout a été déposé sur un gradient linéaire de glycérol puis centrifugé ($100\,000\text{ g}$; 17h). Le contenu du gradient a été récupéré par fractions de 500 à 700 μl , qui ont été pesées pour déterminer la densité puis analysées par immunoblot à l'aide des anticorps monoclonaux anti-GRA1, -GRA2, -GRA3, -GRA5, -GRA7 et polyclonaux anti-GRA4, -GRA6, -GRA9. Les fractions ont également été analysées par Dot Blot révélé au Rouge Ponceau. (B) Tableau de répartition des protéines GRA. Les résultats de la sédimentation isopycnique après incubation avec les SUVs HeLa, en rouge, sont superposés à ceux présentés sur la figure 4.11 (sédimentation isopycnique des protéines de la fraction HssTx sans incubation), en gris.

Le marquage Ponceau (Fig.4.14 A, "Ponceau") indique que, alors que la globalité des protéines parasitaires ultrasolubles (tâches rouges) s'équilibre dans la zone $d=[1.01 \rightarrow 1.05]$, les SUVs (tâches blanches) sont localisés dans la zone $d=[1.05 \rightarrow 1.075]$, délimitée par des pointillés. Le groupe souligné en rouge sombre, composé de GRA2,3,4,6,7,9 apparaît ainsi centré sur la même zone que les SUVs, avec un profil de répartition d'étalement variable $d=[1.05 \rightarrow 1.075]$.

Association. Les zones rouges du tableau de répartition (Fig.4.9 B) montrent que la plupart des protéines GRA (GRA2,3,4,6,7) subissent un net décalage vers les hautes densités après incubation avec des SUVs. Cette zone démarquée correspond à la localisation des SUVs. Cette augmentation de densité des protéines GRA2,3,6,7 en présence des SUVs indique qu'elles sont bien en interaction avec les membranes. Par contre, les profils de sédimentation de GRA4 et GRA7 sont très étalés et s'étendent jusqu'à des densités très élevées ($d=1.09$), ce qui évoque une oligomérisation spontanée de ces protéines provoquées par l'incubation (zone rouge hachurée). L'implication des SUVs dans cette oligomérisation n'est pas évidente, bien que la répartition des protéines GRA oligomérisées et des SUVs se recouvrent en partie.

Les localisations de GRA1 et GRA5 paraissent assez conservées en absence ou en présence de SUVs. Elles n'interagissent donc probablement pas avec les SUVs. Le cas de GRA9 est plus compliqué : elle est beaucoup plus facilement détectée que dans HssTx seul et est étalée sur une très large zone qui recouvre celle des SUVs. Cependant, elle reste toujours concentrée dans la même zone de densité avec ou sans SUVs : ces résultats ne permettent donc pas de conclure clairement quant à une association aux SUVs.

|| On peut finalement conclure à l'association stable aux SUVs HeLa, des protéines granulaires GRA2, GRA3, GRA6, GRA7.

b) SUVs HeLa + HssVac

Localisation des protéines GRA et des SUVs On distingue 3 sous-groupes (protéines GRA5 et GRA9 non détectables) (Fig.4.15 A) :

- $d < 1.01$, en vert : GRA1 ;
- $d=[1.01 \rightarrow 1.03]$, en bleu : GRA4, GRA6 ;
- $d=[1.03 \rightarrow 1.07]$, en rouge : GRA2, GRA3, GRA7.

Le marquage en Rouge Ponceau (Fig.4.15 A "Ponceau") indique que la majeure partie des protéines ultrasolubles des cellules infectées (tâches rouges) est localisée essentiellement dans la zone $d=[1.02 \rightarrow 1.05]$, qui recouvre le second groupe des protéines GRA, souligné en bleu, tandis que les SUVs (tâches blanches) apparaissent concentrées dans la zone $d=[1.05 \rightarrow 1.07]$, dans la même zone que le groupe de protéines GRA souligné en rouge.

Association. Le tableau de répartition (Fig.4.15B) montre que les protéines GRA2, GRA3 et GRA7 présentent un net décalage vers les hautes densités après incubation avec les SUVs HeLa. Comme de plus, elles co-localisent avec les SUVs, on peut conclure à leur association aux membranes. Les protéines GRA4 et 6, bien qu'absentes de cette zone riche en SUVs, sont également

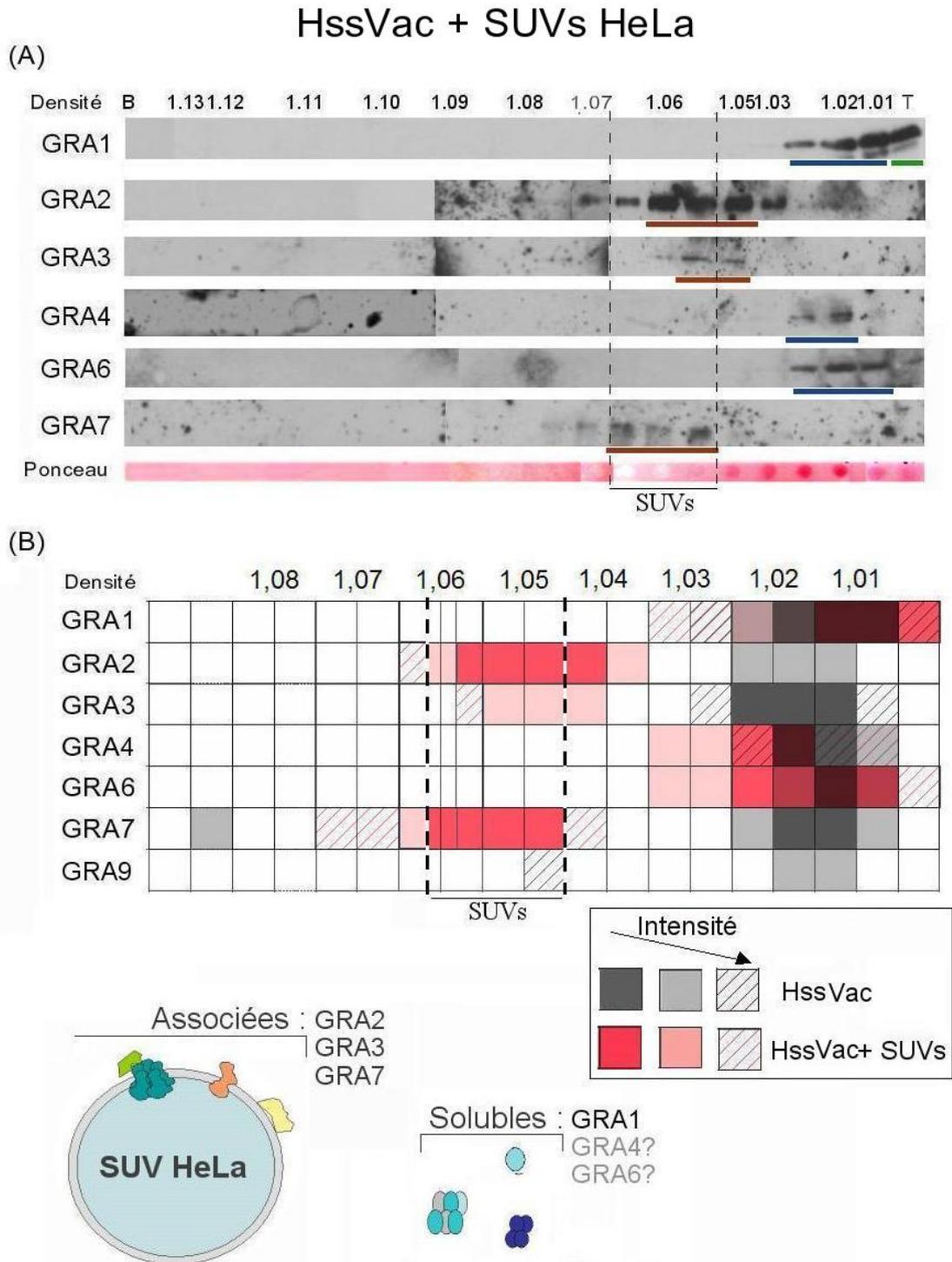


FIG. 4.15: Séparation isopycnique des protéines GRA de HssVac après incubation avec des SUVs HeLa. Une aliquote de la fraction HssVac ($8 \cdot 10^8$ équivalent-parasites) a été incubée avec des SUVs HeLa, en proportion 2 :1, pendant 1h, à température ambiante. Le tout a été déposé sur un gradient linéaire de glycérol puis centrifugé ($100\,000\text{ g}$; 17h). Le contenu du gradient a été récupéré par fractions de 500 à 700 μl , qui ont été pesées pour déterminer leur densité puis analysées par immunoblot à l'aide des anticorps monoclonaux anti-*GRA1*, -*GRA2*, -*GRA3*, -*GRA7* et polyclonaux anti-*GRA4*, -*GRA6*. Les fractions ont également été analysées par Dot Blot révélé au Rouge Ponceau. (B) Tableau de répartition des protéines GRA. Les résultats de la sédimentation après incubation avec les SUVs HeLa, en rouge, sont superposés à ceux présentés sur la figure 4.12 (sédimentation naturelle des protéines de la fraction HssVac), en gris.

légèrement décalées vers les hautes densités, ce qui indique qu'elles ont subi des modifications suite à l'incubation mais ne démontre pas leur association.

On peut remarquer que les formes de haute densité de GRA7 observées en absence de SUVs (voir Fig.4.12) n'ont pas été détectées. Cependant, le signal pour GRA7 est nettement plus faible, ce qui peut expliquer que ces bandes moins intenses soient passées au-dessous de la limite de détection.

On peut conclure à l'association stable aux SUVs HeLa, des protéines vacuolaires GRA2, GRA3 et GRA7.

c) Bilan comparatif : Evolution des capacités d'interaction membranaire des protéines GRA

Les résultats des analyses par séparation isopycnique après incubation avec des SUVs HeLa obtenus sur les figures 4.14 (SUVs HeLa + HssTx), 4.9 (SUVs HeLa + HssEs) et 4.15 (SUVs HeLa + HssVac) ont été représentés dans un tableau de répartition : en bleu, les protéines GRA ultrasolubles granulaires (HssTx) ; en violet, les protéines ultrasolubles sécrétées (HssEs) ; en turquoise, les protéines ultrasolubles vacuolaires (HssVac). Les pointillés noirs et blancs indiquent la localisation des SUVs HeLa dans le gradient correspondant (Fig.4.16). Des constantes de comportement vis-à-vis des SUVs HeLa ressortent de cette comparaison :

- GRA1 n'est jamais associée aux SUVs HeLa. Elle garde, en toutes conditions, un comportement de protéine "soluble" : elle surnage dans les fractions les moins denses. Ses caractéristiques semblent donc proches de celles observées dans la vacuole, où elle ne manifeste pas d'interaction membranaire [Sibley et al., 1995].
- GRA2, 3 et 7 (entourées en rouge), qui possèdent des hélices- α amphipatiques ou des domaines transmembranaires, apparaissent s'associer aux SUVs HeLa dans les trois cas. En effet, leur répartition suit de très près celle des SUVs dans les gradients étudiés. Cela semble indiquer une grande affinité de ces protéines pour les membranes, quelle que soit leur forme de solubilisation (HssTx, HssEs ou HssVac).
- Les autres protéines, GRA4, GRA5, GRA6 et GRA9, ont des comportements variables et difficiles à interpréter, qui ne permettent pas de conclure quant à leurs capacités d'interactions membranaires.

Les zones où s'équilibrent les SUVs, dans les 3 cas, varient mais se recouvrent en partie, ce qui indique que des types vésiculaires similaires peuvent être retrouvés après incubation avec les protéines GRA granulaires, sécrétées ou vacuolaires. La large zone de répartition des SUVs en interaction avec les protéines granulaires peut indiquer qu'il existe plusieurs sous-populations de vésicules de densités variables. Cette variabilité peut être due à des différences de chargement protéique (par exemple, la fraction HssTx est utilisée sous une forme très concentrée en protéines GRA, dont certaines ont une tendance à la multimérisation, ce qui peut rendre les liposomes plus denses), mais aussi à des modifications de forme et de taille des membranes.

Bilan : Capacités d'association aux membranes des protéines GRA

La capacité d'association membranaire semble conservée pour certaines protéines GRA (GRA2,3,7), sous leurs différentes formes.

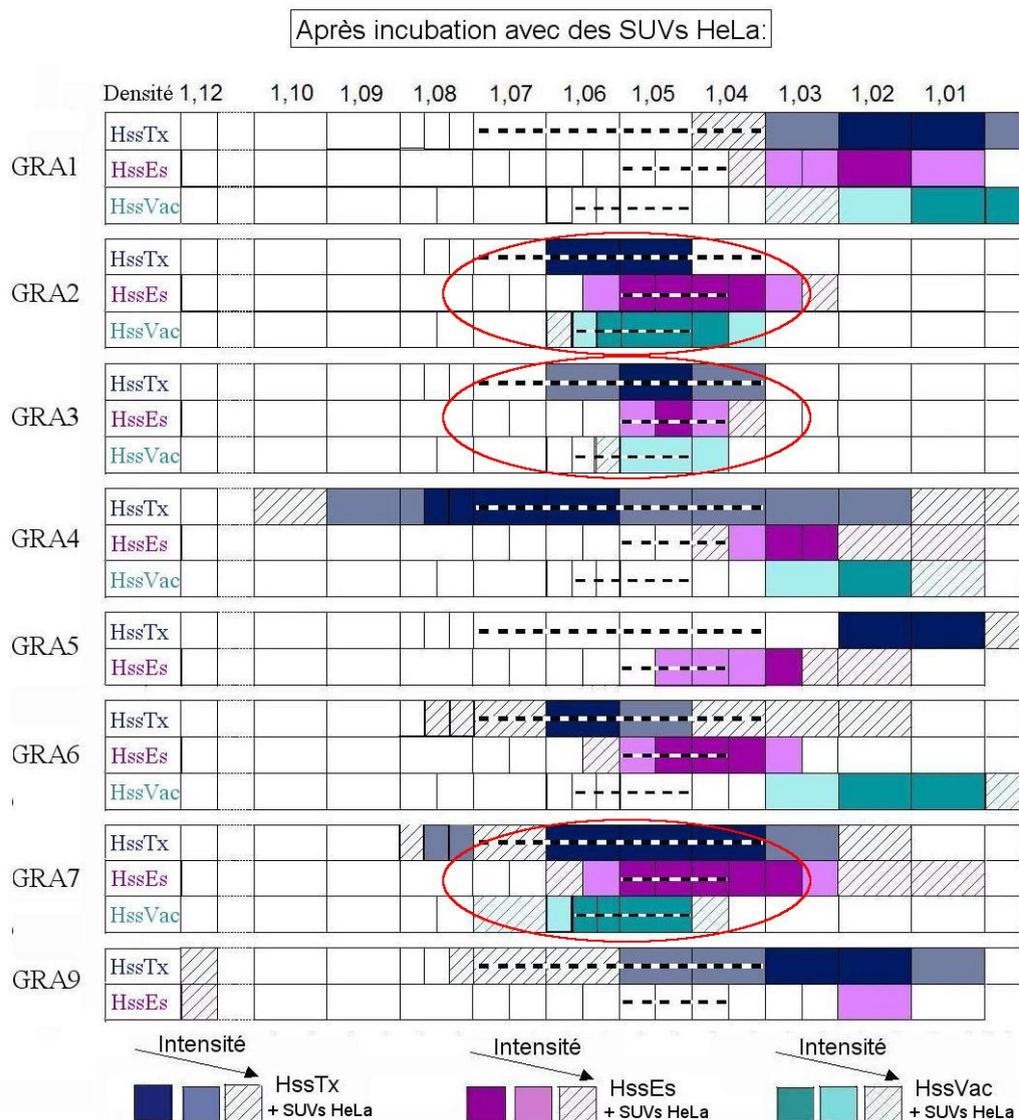


FIG. 4.16: Evolution des profils de sédimentation des protéines GRA après incubation avec des SUVs HeLa. Les résultats des analyses par séparation isopycnique obtenus en Figure 4.14, 4.9 et 4.15 ont été représentés sur un diagramme de répartition : en bleu pour HssTx, en violet pour HssEs et en turquoise pour HssVac. Les cases de couleur plus claire et celles hachurées correspondent à des signaux détectés de plus en plus faibles. Les pointillés noir et blanc indiquent la localisation des SUVs.

4.3.4 Conclusion générale : Evolution des caractéristiques des protéines GRA au cours de leur trafic sécrétoire

1/ Certaines protéines GRA (GRA3,4,6,7,9) sont caractérisées par une diminution de leur densité isopycnique avant, pendant et après sécrétion, suggérant qu'elles passent de formes plus agrégées dans les granules à des formes plus solubles dans la vacuole, en passant par des formes de décompaction juste après sécrétion. Cette analyse comparative met en lumière l'ambiguïté de la notion de "solubilité" d'une protéine,

déterminée par des conditions particulières d'ultracentrifugation. Les protéines GRA en question, bien qu'en partie ultrasolubles à 100 000g, sont sous une forme plus compacte, probablement agrégée lors de leur stockage dans les granules denses. Ces résultats confirment ceux de Labruyère et al. [Labruyere et al., 1999].

2/ La protéine GRA2 a par contre une densité isopycniqne constante, assez faible, sous toutes les formes étudiées. On peut donc supposer qu'elle est disponible en permanence et ne nécessite pas de passer par des formes intermédiaires de dissociation. De plus GRA2 a une forte affinité membranaire sous toutes ses formes.

3/ Les capacités d'association membranaire des protéines GRA3 et GRA7 sont indépendantes de leur forme de solubilisation. En effet, elles sont capables de s'associer aux SUVs sous leurs trois formes, tout comme GRA2, bien que leurs densités isopycniqnes varient beaucoup : bien qu'agrégées dans les granules denses, elles sont en permanence capables d'interagir avec les SUVs HeLa. Ces protéines semblent donc particulièrement affines pour les membranes.

4.4 Etude des interactions membranaires des protéines GRA

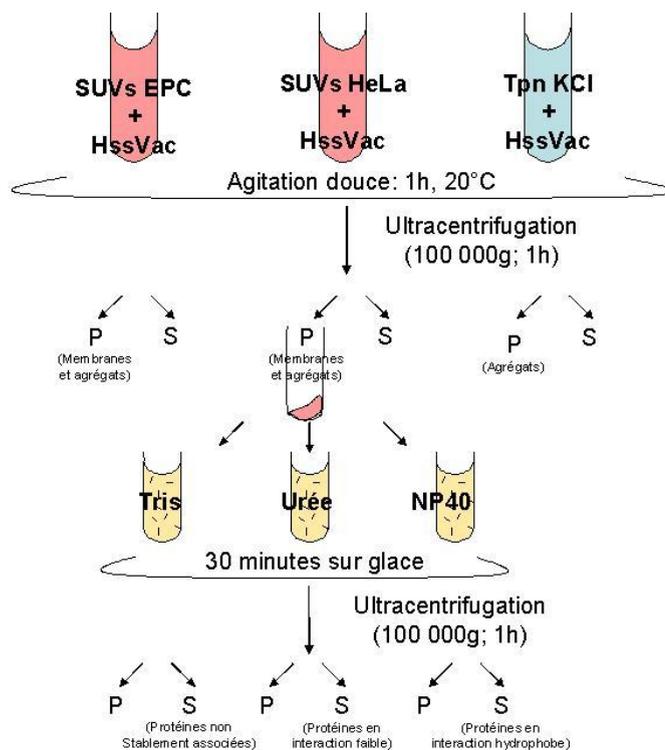


FIG. 4.17: Caractérisation des interactions membranaires des protéines GRA. Mode opératoire.

L'association spontanée de certaines des protéines GRA à des SUVs formées de lipides HeLa a été démontrée. L'extrait lipidique HeLa utilisé jusqu'ici, a permis l'association de toutes les protéines GRA connues pour leur comportement membranaire sous au moins une de leurs formes de solubilisation. Nous avons donc cherché à étudier quelques caractéristiques des interactions mises en évidence : j'ai tout d'abord étudié l'importance de la composition lipidique des SUVs, en testant l'association des protéines GRA à deux types de SUVs ; puis j'ai analysé la nature des interactions entre protéines GRA et SUVs HeLa (Fig.4.17).

Ces deux expériences ont été menées à partir de la fraction ultrasoluble vacuolaire HssVac. En effet, les protéines GRA de cette fraction ne sédimentent presque pas dans les conditions de fractionnement du binding assay (voir paragraphe 4.3.1), ce qui permet d'utiliser cette méthode beaucoup plus simple à mettre en oeuvre que la séparation isopycnique, pour séparer les protéines associées aux membranes des protéines restées solubles. Bien que l'association de toutes les protéines GRA membranaires de cette fraction aux SUVs HeLa n'ait pas pu être mise en évidence, il a été démontré que les trois protéines GRA2, GRA3 et GRA7 s'associent aux SUVs HeLa, ce qui suffit à justifier ce choix. Enfin, les résultats d'une étude préliminaire, ayant pour but l'identification de partenaires lipidiques des protéines GRA, seront présentés.

4.4.1 Influence de la composition lipidique : SUVs HeLa et SUVs EPC

Afin de déterminer l'importance de la composition lipidique des SUVs pour l'association des protéines GRA, l'expérience de "binding assay" a été réalisée en utilisant en parallèle deux types de SUVs : des SUVs formées à partir de l'extrait total Hela ou des SUVs formées à partir de lécithine d'oeuf (EPC). Les SUVs formées de lipides HeLa ou d'EPC ont été incubées avec la fraction ultrasoluble HssVac pendant 1h à température ambiante, puis la fraction sédimentée (P) contenant les membranes a été séparée de la fraction soluble (S) par ultracentrifugation (100 000 g ; 1h) (Fig.4.17).

Association aux SUVs HeLa

L'analyse par fractionnement de la fraction HssVac après incubation avec des SUVs HeLa (Fig.4.18) montre que :

- GRA1 et GRA5 restent solubles ;
- GRA2,3,7 sédimentent majoritairement ;
- GRA6,9 et la forme de 37kDa de GRA5 sédimentent plus faiblement ;
- GRA4 sédimente fortement après incubation avec les SUVs mais aussi dans le contrôle sans SUVs.

Les interactions entre les protéines GRA de la fraction HssVac et les SUVs HeLa ayant déjà été étudiées par séparation isopycnique (voir Fig.4.15), il est intéressant de mettre en relation les résultats obtenus par les deux méthodes. La sédimentation majoritaire des protéines GRA2,3,7 confirme leur association membranaire. Les résultats coïncident aussi pour GRA1 qui reste soluble dans toutes les expériences ainsi que pour GRA4 qui sédimente constamment avec ou sans SUVs, ce qui confirme sa propension à la multimérisation déjà évoquée.

Le cas de GRA6 est plus compliqué puisqu'elle apparaissait, dans l'expérience de séparation isopycnique, absente de la zone de localisation des SUVs, bien que sa densité ait augmenté en leur présence. Cette augmentation de densité se reflète dans cette expérience puisqu'une faible part de GRA6 sédimente. Elle est donc manifestement influencée par la présence des SUVs. On peut envisager son association à une sous-population de SUVs moins denses. La protéine GRA9 et la forme à 37kDa de GRA5, qui n'étaient pas détectables dans l'expérience de séparation isopycnique, présentent ici un comportement similaire à celui de GRA6 : sédimentation faible. Elles sont donc peut-être dans le même cas.

Une forte proportion des protéines associées GRA2,3,7 reste soluble. Cependant, l'expérience de sédimentation isopycnique a montré que ces protéines sont rassemblées dans une seule population de densité $d=[1.04 \rightarrow 1.06]$, qui correspond à la densité des SUVs. Les protéines sédimentées et non sédimentées de l'expérience en cours ont donc la même densité. Les structures non sédimentées doivent donc être de nature similaire aux SUVs : elles pourraient être des SUVs de taille un peu plus petite ; on peut également envisager qu'il se produise des déformations sur les membranes des SUVs, pouvant altérer leurs caractéristiques de sédimentation.

Comparaison : SUVs HeLa - SUVs EPC

Après incubation avec des SUVs EPC :

- GRA1,2,5,6,9 restent solubles ;
- GRA3,7 et GRA5(37kDa) sédimentent en partie ;
- GRA4 sédimente fortement après incubation avec les SUVs mais également dans le contrôle sans SUVs.

Les trois protéines possédant un domaine transmembranaire et associées à la membrane de la vacuole (GRA3, GRA5 et GRA7), s'associent aux SUVs HeLa et également aux SUVs EPC. Elles peuvent donc apparemment s'associer à une bicouche homogène de phospholipides neutres, en phase lamellaire désordonnée. On peut tout de même remarquer qu'elles sont présentes en plus faible proportion dans la fraction sédimentée EPC que dans la fraction sédimentée HeLa, suggérant que certains arrangements membranaires leur sont plus favorables que la phase lamellaire formée par l'EPC. Une autre hypothèse est que des interactions spécifiques avec certains lipides leur sont nécessaires pour s'associer efficacement.

Par contraste, les protéines GRA2,9, associées au réseau de nanotubules de la vacuole, s'associent aux SUVs HeLa mais pas aux SUVs EPC. GRA6 semble être dans le même cas.

La nature des lipides présents dans les SUVs semble être un paramètre important pour l'association effective des protéines GRA. De plus, la différence de spécificité entre les groupes GRA3,5,7 et GRA2,6,9 met en évidence un mécanisme potentiel de ségrégation des protéines GRA dans les différentes structures membranaires de la vacuole.

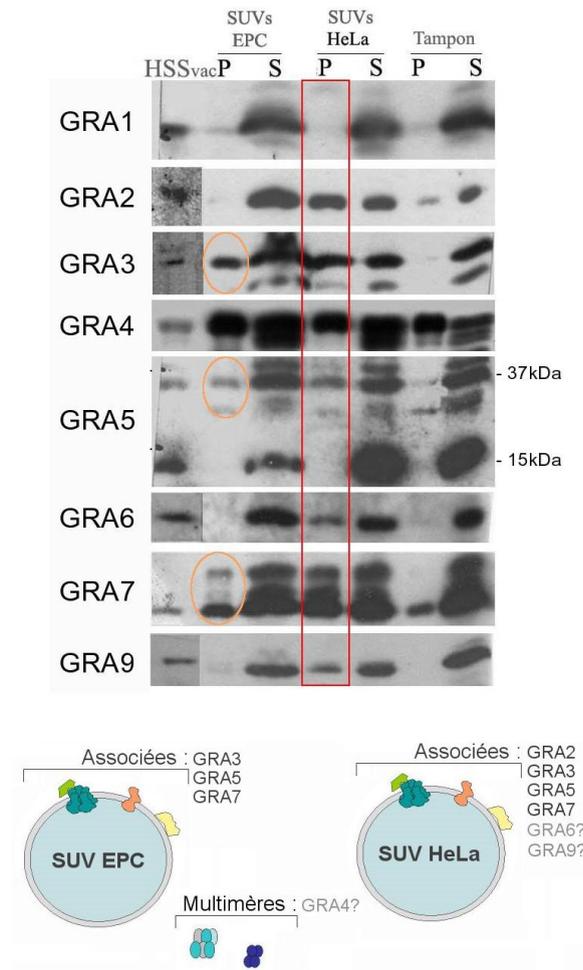


FIG. 4.18: Comparaison de l'association des protéines GRA de HssVac avec des SUVs HeLa ou EPC. Des aliquotes de la fraction HssVac ($3, 5 \cdot 10^8$ équivalent-parasites) ont été incubées, en proportion volumique 2 :1, avec des SUVs formées à partir d'EPC (SUV EPC), des SUVs formées à partir de lipides HeLa (SUVs HeLa) ou du tampon KCl (Tpn), pendant 1h à température ambiante. La fraction membranaire (P) est ensuite séparée des protéines non associées (S) par ultracentrifugation à $100\ 000\ g$ pendant 1h. Le produit protéique (HssVac) (dépôt $0, 2 \cdot 10^8$ équivalent-parasites) et les fractions P et S (dépôt $1, 8 \cdot 10^8$ équivalent-parasites) ont été analysés par immunoblot à l'aide des anticorps monoclonaux anti-*GRA1*, -*GRA2*, -*GRA3*, -*GRA5*, -*GRA7* et polyclonaux anti-*GRA4*, -*GRA6*, -*GRA9*.

4.4.2 Mode d'association

L'association des protéines GRA aux SUVs peut être stabilisée par différents types d'interactions, en particulier protéine-protéine (interactions dissociées par un agent dénaturant, ici l'urée), ou hydrophobes (interactions dissociées par un traitement en détergent non ionique, ici le NP40). Une protéine intégrale de membrane sera solubilisée uniquement par le détergent.

Des extractions à l'Urée et au NP40 ont donc été réalisées sur les protéines GRA de la fraction HssVac associées aux SUVs HeLa afin de déterminer si elles sont insérées dans les membranes des SUVs. Le culot membranaire P/SUVs HeLa obtenu lors de l'expérience de "binding assay" (Fig.4.18) est dispersé en tampon Tris (contrôle), en Urée 6M, ou en NP40 0.1%. Les échantillons ont été incubés sur glace pendant 30 minutes puis ultracentrifugés ($100\ 000\ g$; 1h) afin de séparer la fraction solubilisée par le traitement (S) de la fraction restée non soluble (P) (voir Fig.4.17 pour le schéma du protocole suivi).

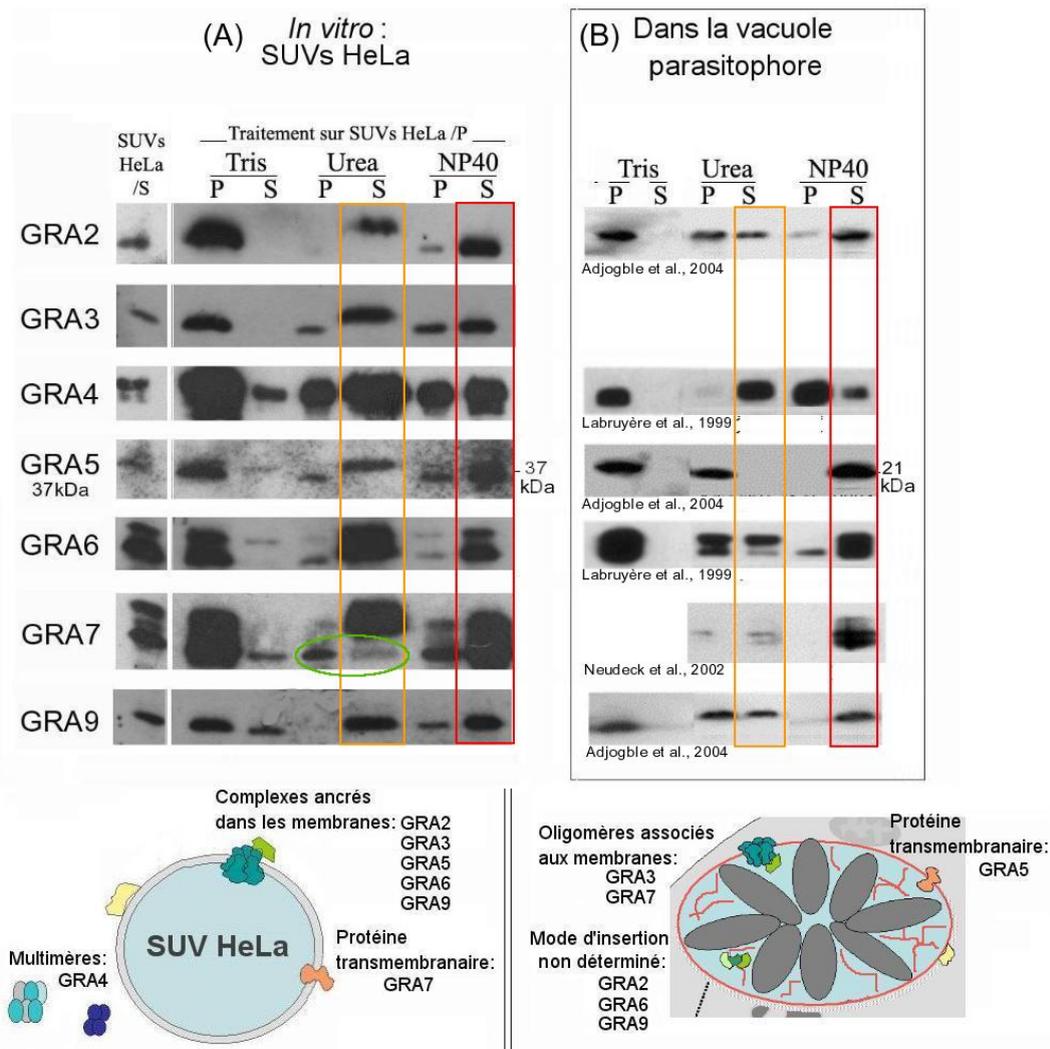


FIG. 4.19: Mode d'association des protéines GRA du HssVac avec des SUVs HeLa. (A) La fraction HssVac a été incubée avec des SUVs formées à partir de lipides HeLa, pendant 1h à température ambiante. La fraction membranaire a ensuite été séparée des protéines non associées (S) par ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1h. Le culot a été redispersé en Urée 6M, NP40 0,1% ou en tampon Tris 50mM. La solution a été incubée sur glace pendant 30 minutes, puis fractionnée par ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1h. Les fractions P et S (dépôt $3, 5 \cdot 10^8$ équivalent-parasites) ont été analysées par immunoblot à l'aide des anticorps monoclonaux anti-GRA2, -GRA3, -GRA5, -GRA7 et polyclonaux anti-GRA4, -GRA6, -GRA9. (B) Nature des interactions membranaires des protéines GRA dans la vacuole. D'après [Adjogble et al., 2004, Labruyère et al., 1999, Neudeck et al., 2002].

Résultats

Les protéines GRA sont solubilisées en bonne partie par le traitement en détergent (Fig.4.19 A, cadre rouge), ce qui souligne leurs interactions hydrophobes avec les membranes. Cependant la plupart d'entre elles sont également largement extraites par le traitement Urée (Fig.4.19 A, cadre orange), ce qui indique une large implication des interactions protéine-protéine pour l'association aux membranes. Cette description générale peut être nuancée pour GRA7 : sa forme détectée en bande basse (Fig.4.19 A, cercle vert) est solubilisée en bonne part par le NP40, mais très peu par l'Urée. Ainsi GRA7 peut être qualifiée de protéine intégrale de membrane. Le traitement contrôle en tampon Tris, qui ne solubilise qu'une fraction minoritaire de chacune des protéines GRA, montre la stabilité de leur association aux membranes des SUVs.

Pour comparaison, la prépondérance des interactions hydrophobes a été démontrée dans la vacuole parasitophore pour la plupart des protéines GRA, en particulier pour GRA5 qui y a un comportement typique de protéine transmembranaire (Fig.4.19) **B**). Cette comparaison met en évidence les limites de ce système "modèle" pour l'insertion des protéines GRA : il est possible que les protéines GRA s'insèrent dans les membranes des SUVs sans s'y stabiliser correctement.

Les interactions protéine-protéine semblent jouer un rôle aussi important que les interactions hydrophobes pour l'association des protéines GRA aux SUVs HeLa, à la différence de ce qui est observé dans la vacuole. Seule l'association de GRA7 aux SUVs semble régier exclusivement par des interactions hydrophobes.

4.4.3 Identification de partenaires lipidiques spécifiques

Les résultats de présentés en section 4.4.1 ("Influence de la composition lipidique : SUVs HeLa et SUVs EPC") indiquent une influence importante de la composition en lipides des SUVs sur les interactions avec les protéines GRA. Cette influence peut être d'ordre structural (fluidité de la membrane, courbure...) ou faire intervenir des interactions plus spécifiques (e.g. site de liaison pour un lipide particulier sur une protéine). Afin d'évaluer l'importance de ces interactions spécifiques protéines-lipides, des expériences de "lipid overlays" ont été menées afin d'identifier des partenaires lipidiques spécifiques des protéines GRA.

Mode opératoire

Cette expérience consiste à faire des dépôts de lipides sur une membrane de nitrocellulose, qui est ensuite incubée avec une solution de protéines. Après incubation, l'interaction protéine-lipide est révélée à l'aide d'anticorps spécifiques des protéines étudiées (Fig.4.20).

Deux formes des protéines GRA ont été utilisées pour cette expérience :

- Des formes recombinantes produites en *E. coli* disponibles au LAPM : GRA1-GST, GRA2-GST, GRA6-GST, GRA9-His. L'avantage de ces protéines recombinantes est qu'elles peuvent être obtenues de manière isolée ; cela permet ainsi une accessibilité maximale de leurs éventuels domaines de reconnaissance. Par contre, ces protéines peuvent être mal conformées, en particulier parce que dans ce système d'expression, elles ne subissent pas les modifications post-traductionnelles de la protéine native, ce qui peut avoir des répercussions sur la spécificité des interactions protéine-lipide.
- Un lysat parasitaire total obtenu par cycles de congélation-décongélation. Il permet de tester les protéines sous leur forme native. Cependant, les domaines de reconnaissance peuvent être inaccessibles ou déjà en interaction. De plus, les résultats peuvent être parasités par des interactions indirectes causées par des protéines partenaires. Il est important de préciser que contrairement à la fraction ultrasoluble HssTx, cet extrait parasitaire est utilisé sous sa forme brute, sans ultracentrifugation préalable.
- La protéine GRA2-HA-FLAG enrichie à partir de l'extrait parasitaire d'une souche de toxoplasmes exprimant de façon stable les protéine GRA2-HA-FLAG [Travier et al., 2007] Les frac-

tions ultrasolubles utilisées jusqu'ici n'ont pas pu être employées dans cette expérience qui requiert une concentration en protéines très élevée.

Les tests ont été menés sur les lipides majoritaires des membranes de cellules de mammifères, telles que les cellules HFF ou HeLa :

- phospholipides : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), acide phosphatidique (PA), phosphatidylinositol (PI) ainsi qu'un dérivé diphosphaté (PI(4,5)P₂) ;
- cholestérol (Chol) ;
- sphingomyéline (SM).

De plus, un glycolipide de plante synthétisé par le parasite, qui pourrait être libéré dans la vacuole [Maréchal et al., 2002, Bisanz et al., 2006], a également été testé : le digalactosyldiacylglycerol (DGDG).

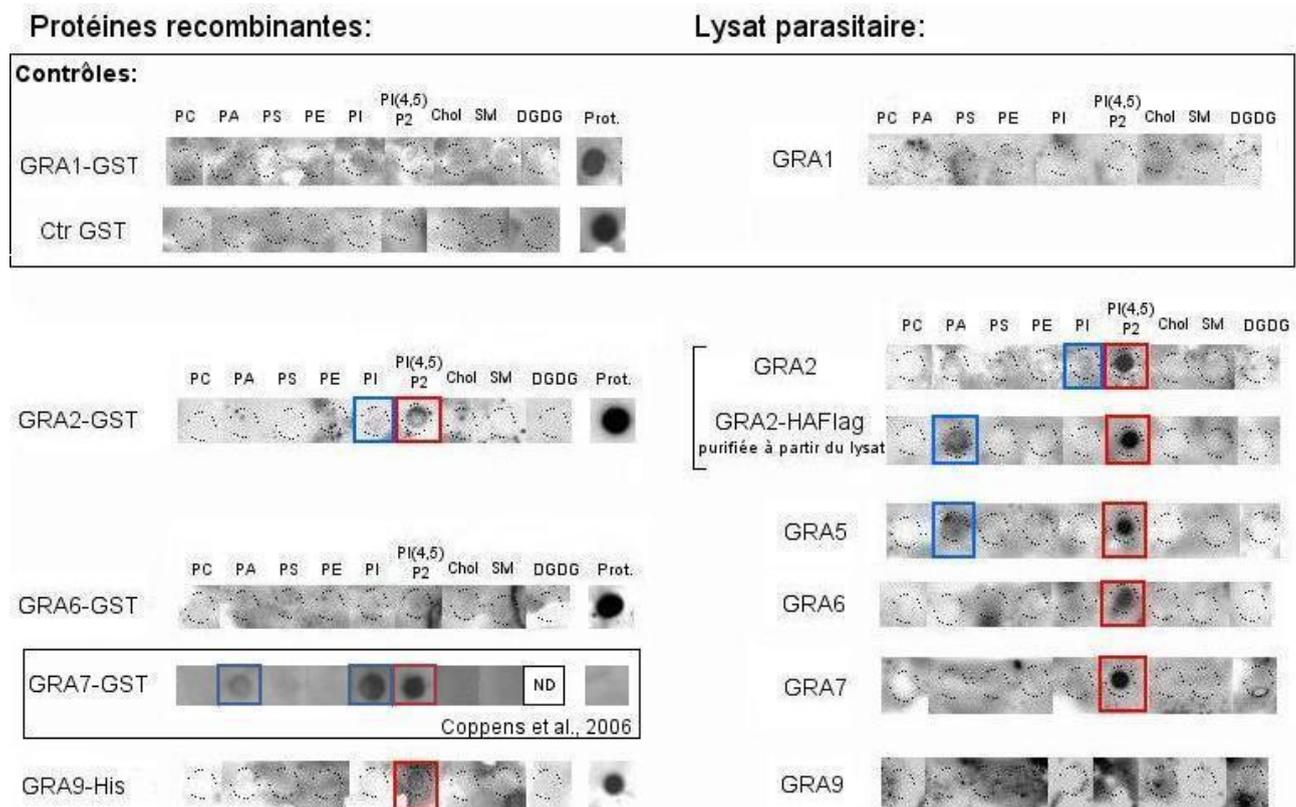


FIG. 4.20: Identification de partenaires lipidiques des protéines GRA. Les lipides solubilisés en butanol ont été déposés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées sur la nuit à 4°C soit avec une solution de protéines recombinantes purifiées GRA2-GST, GRA1-GST, GRA6-GST, GRA9-His ou GST ; soit avec un lysat de parasites sauvages ; soit avec le produit de la purification de GRA2-HA-FLAG à partir du lysat parasitaire. Les protéines associées ont ensuite été révélées à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-GST et -His pour la détection des protéines recombinantes ; d'anticorps monoclonaux anti-GRA2,-GRA5,-GRA7 et polyclonaux anti-GRA6,-GRA9 pour la détection des protéines du lysat sauvage ; d'anticorps monoclonal anti-HA pour la détection de la protéine GRA2-HA-FLAG. Les résultats présentés pour la protéine recombinante GRA7-GST sont ceux publiés par Coppens et al. [Coppens et al., 2006]. PC phosphatidylcholine ; PA acide phosphatidique ; PS phosphatidylsérine ; PE phosphatidyléthanolamine ; PI phosphatidylinositol ; PI(4,5)P₂ phosphatidylinositol diphosphate ; Chol cholestérol ; SM sphingomyéline ; DGDG digalactosyldiacylglycerol.

Résultats

La protéine hydrophile GRA1, sous forme recombinante ou sous forme sauvage dans le lysat, ne lie aucun lipide ; elle permet de contrôler la spécificité des interactions. La protéine GST seule ne lie aucun des lipides testés, démontrant qu'il n'y a pas d'interaction particulière entre ce marqueur et les lipides testés. Ce contrôle permet de valider les résultats obtenus pour les protéines recombinantes en fusion avec la GST.

Les résultats obtenus (Fig.4.20) montrent que les protéines GRA testées, à l'exception de GRA1, montrent toutes une forte affinité pour le PI(4,5)P₂, sous au moins une de leur forme (recombinante ou native). On peut conclure clairement à l'existence d'un domaine de fixation pour les phosphoinositides sur la protéine GRA2, qui lie le PI(4,5)P₂ sous toutes ses formes testées, ainsi que sur la protéine GRA7, dont les affinités lipidiques sont confirmées par les travaux de Coppens et al. [Coppens et al., 2006].

Les résultats obtenus pour GRA5 montrent une interaction de sa forme présente dans le lysat, qui pourrait être indirecte, médiée par d'éventuels partenaires ; ils nécessiteraient d'être complétés par une étude sur une forme recombinante, non disponible actuellement.

La protéine GRA6 du lysat parasitaire lie le PI(4,5)P₂. Cependant cette liaison n'est pas détectée pour sa forme recombinante, ce qui peut suggérer une interaction indirecte médiée par un partenaire dans le lysat parasitaire. Ce partenaire pourrait être en particulier GRA2, qui a été décrite en interaction avec GRA6 dans le parasite [Travier et al., 2007]. Il faut aussi envisager l'explication d'un repliement inadéquat de la protéine recombinante ou de modifications post-traductionnelles inadaptées chez *E. coli*.

La protéine GRA9, sous forme recombinante, lie le PI(4,5)P₂, ce qui n'est pas le cas de sa forme native, présente dans le lysat : il est envisageable qu'un partenaire de GRA9, ou un repliement particulier dans les granules denses, masque le site d'interaction avec le PI(4,5)P₂. Il faudrait cependant contrôler d'éventuelles interactions du marqueur His.

Par ailleurs, d'autres résultats, moins clairs, peuvent être signalés. On observe :

- 1) une faible affinité de GRA2 pour le PI, affinité également observée, de manière plus intense, par Coppens et al. pour GRA7 sous forme recombinante [Coppens et al., 2006] ;
- 2) une affinité de GRA5 pour le PA ; affinité pour le PA également observée pour GRA2-HA-FLAG purifiée à partir d'un lysat, mais qui semble plutôt due dans ce cas au marqueur HA-FLAG.

Bilan : Partenaires lipidiques des protéines GRA

Les protéines GRA2,7 manifestent des interactions spécifiques avec certains lipides, particulièrement les phosphoinositides, qui sont impliqués dans divers processus de régulation et de signalisation cellulaire.

4.4.4 Conclusion générale : Interactions membranaires des protéines GRA

1/ La protéine hydrophile GRA1.

Elle reste essentiellement soluble en présence de SUVs, quelle que soit leur composition.

2/ La protéine GRA4, riche en proline.

Bien qu'elle contienne un TMD potentiel, cette protéine constitue un cas à part : elle semble s'agréger en quantités importantes à des objets indéterminés, certainement par le biais de ses segments riches en proline. L'interaction de GRA4 avec des membranes n'a pas pu être mise en évidence.

3/ Les protéines à domaine transmembranaire associées essentiellement à la PVM : GRA3,5,7.

Les protéines associées à la PVM semblent peu exigeantes quant à la composition des membranes modèles : GRA3, 5(37kDa) et 7 peuvent s'associer aux SUVs HeLa mais également aux SUVs EPC. On remarque que la protéine GRA5, sous sa forme connue de 21kDa, ne paraît dans aucun des cas étudiés, être associée aux membranes. Ce n'est que sous sa forme de 37kDa qu'elle est détectée dans les culots membranaires.

Le mode d'association de ces protéines potentiellement transmembranaires aux SUVs HeLa est variable : alors que GRA7 apparaît typiquement transmembranaire, GRA3 et GRA5(37kDa) présentent un mode d'association similaire, basé essentiellement sur des interactions protéine-protéine, ce qui suggérerait que la formation de complexes protéiques soit nécessaire à leur association aux membranes (oligomères).

4/ Les protéines à comportement membranaire essentiellement associées au RNM : GRA2, GRA6 et GRA9.

Elles ne s'associent pas avec une membrane EPC mais seulement avec un mélange complexe (extrait HeLa), ce qui peut être lié pour GRA2, à un partenariat spécifique avec des phosphoinositides, le PI(4,5)P₂ en particulier. Elles sont complètement solubilisées par l'urée, indiquant la formation de structures d'association complexes.

GRA6 qui possède comme GRA3,5,7 un TMD potentiel mais est essentiellement associée au MNN, ne s'associe pas non plus aux SUVs EPC. On peut envisager que l'association préalable de GRA2 soit nécessaire à son recrutement, comme c'est le cas dans la vacuole. GRA6 présente un mode d'association fortement basé sur des interactions protéine-protéine, malgré son TMD, ce qui renforce l'idée de la formation d'un complexe avec GRA2, complexe nécessaire à son association membranaire.

Vers l'immunofluorescence sur GUVs

Il a été démontré que les protéines GRA sont capables de s'associer aux SUVs de composition lipidique adaptée dans nos conditions expérimentales *in vitro*, malgré le doute subsistant sur l'insertion effective des protéines GRA dans les membranes. Cette avancée majeure nous permet donc d'aborder la partie, plus délicate, de l'immunofluorescence sur GUVs.

Contributions

Corinne Mercier (LAPM) est une des instauratrices du projet, et a largement contribué au développement de ce volet de ma thèse. Elle a en particulier assuré ma formation aux méthodes de biologie cellulaire et biochimie à mon arrivée au LAPM. Cordelia Bisanz (LAPM) m'a formée aux méthodes de préparation d'extrait lipidique, et Karine Musset (LAPM) a assuré l'approvisionnement en cellules et parasites. Laetitia Travier (Thèse LAPM, UFR de Biologie - Grenoble I) a très largement contribué aux expériences de Lipid Overlays. Jean-Pierre Alcaraz (UMR 5575 CNRS - Univ. Joseph Fourier, Grenoble I) et Ludovic Pelosi, rattaché à l'époque au LAPM (actuellement UMR 5092 CNRS - CEA - Univ. Joseph Fourier, Grenoble I), m'ont apporté une aide importante pour la mise en place et le développement des méthodes de séparation de protéines sur gradient de densité. Le Laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes (UMR 5575 CNRS-UJF) a accepté que toute une partie des expériences soient réalisées sur leurs installations. Ricardo Mondragon (CINVESTAV, Mexico, Mexique) nous a permis d'aborder le volet d'analyse par microscopie électronique des liposomes, en nous guidant pour la préparation des échantillons et en réalisant les analyses des lots que nous lui avons envoyés. Enfin Amina Bittame (Stage Master1 Biologie, Univ. Joseph Fourier - Grenoble I) et Laetitia Filippi (Stage BTS, Grenoble) dont j'ai encadré les stages pendant quelques mois, ont contribué à la réalisation d'une partie des expériences présentées.

Chapitre 5

Etude par microscopie de fluorescence :

Interactions membranaires des protéines GRA

La seconde partie de mon travail de thèse a consisté à développer un système modèle permettant l'étude par microscopie de fluorescence, des protéines GRA associées aux membranes de Vésicules Unilamellaires Géantes (GUVs, pour Giant Unilamellar Vesicles).

Je présenterai d'abord les contraintes imposées par le système et le cheminement parcouru afin d'atteindre l'objectif expérimental : développement d'un protocole adapté, dérivé de la méthode d'Immuno-Fluorescence Indirecte (IFI), classiquement utilisé en biologie cellulaire. J'exposerai ensuite les résultats obtenus par les expériences d'IF sur des GUVs incubées en présence des fractions ultrasolubles contenant les protéines GRA ; ces expériences ont été réalisées sur la base des résultats obtenus par des méthodes biochimiques (voir chapitre précédent). Les résultats obtenus mettent en évidence une variabilité de répartition des diverses protéines GRA sur les membranes des GUVs ; cela ouvre la voie à des hypothèses quant au rôle des protéines GRA vis-à-vis des membranes de la vacuole. Je discuterai en particulier, dans une dernière section, la question du rôle possible des protéines GRA dans des processus de déformation membranaire, en observant les effets des incubations sur les GUVs.

Protéines suivies

Dans cette partie il m'a semblé préférable de restreindre la gamme des protéines GRA suivies. J'ai choisi d'étudier plus particulièrement les trois protéines GRA qui s'associent de manière certaine aux SUVs, GRA2, GRA3, GRA7, ainsi que la protéine GRA6 dont l'association aux membranes n'a pas été clairement résolue par la biochimie :

- GRA2, 2 hélices amphipathiques, associée au RNM ;
- GRA3, 1 TMD, associée essentiellement à la PVM, mais aussi au RNM ;
- GRA6, 1 TMD, associée au RNM ;
- GRA7, 1 TMD, associée aux HOSTS, à la PVM et au RNM.

5.1 Principe général de l'étude par microscopie de fluorescence

5.1.1 Protocole général pour l'ImmunoFluorescence (IF) indirecte

Immunomarquage

Le protocole d'immunomarquage consiste en deux étapes d'incubation avec des anticorps primaires puis secondaires, intercalées de lavages destinés à éliminer les molécules restées en solution ainsi que celles associées non spécifiquement aux objets à marquer. Dans notre cas, on réalise tout d'abord une incubation préliminaire des GUVs en présence de la fraction ultrasoluble HssEs, afin que les protéines GRA s'associent aux membranes (Fig.5.1 A). Un lavage est ensuite effectué afin d'éliminer les protéines restées en solution, ainsi que celles qui ne sont pas associées aux membranes de manière stable.

Cette incubation préliminaire est suivie par le protocole général d'immunomarquage (Fig.5.1 B). La première étape consiste à incuber l'échantillon en présence d'un anticorps primaire dirigé spécifiquement contre une protéine. Après un lavage destiné à éliminer les anticorps non associés et ceux fixés non spécifiquement, l'échantillon est incubé en présence de l'anticorps secondaire, conjugué couplé à un fluorophore.

Détection

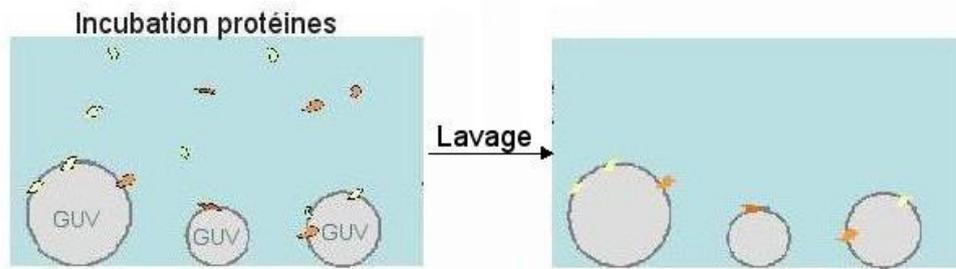
Le fluorophore est un groupe fonctionnel capable d'absorber l'énergie lumineuse à une longueur d'onde spécifique et de ré-émettre un rayonnement à une longueur d'onde différente, mais tout aussi spécifique¹. Ces caractéristiques permettent sa détection par microscopie de fluorescence et donc indirectement, la détection de la protéine immunomarkuée (Fig.5.1 C). La détection en fluorescence permet un large champ d'applications qualitatives ou quantitatives, allant de l'imagerie en microscopie standard ou confocale, jusqu'à l'analyse de cinétiques de diffusion par la spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) ou le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), l'analyse d'interactions entre molécules par le transfert de fluorescence (FRET).

5.1.2 Choix expérimentaux

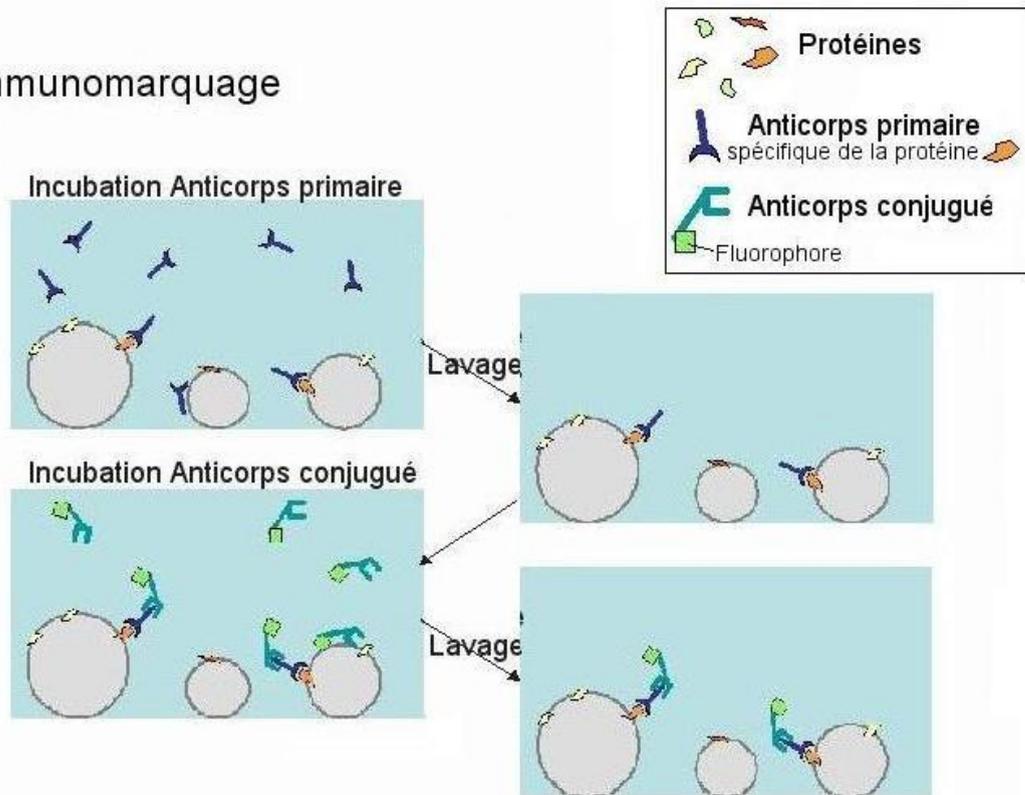
Les choix expérimentaux ont été justifiés par les résultats obtenus au cours des expériences de biochimie, présentées au chapitre précédent. D'une part, le mélange de lipides HeLa est apparu favorable à l'association de certaines protéines GRA des fractions ultrasolubles. Cet extrait lipidique a donc été utilisé pour la formation des GUVs. D'autre part, nous avons continué à concentrer cette étude sur les protéines GRA sécrétées *in vitro*, en utilisant essentiellement la fraction ultrasoluble HssEs qui a été bien caractérisée biochimiquement.

¹Il peut y avoir fluorescence lorsqu'une molécule (le fluorophore) absorbe de la lumière, causant une excitation électronique. La relaxation radiative de l'excitation qui s'ensuit, produit une émission de lumière à des longueurs d'onde plus longues que la longueur d'onde absorbée (décalage de Stokes). Chaque fluorophore présente un spectre caractéristique de longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Parmi les plus connus, on trouve l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et le Texas Red.

(A) Etape préliminaire pour GUVs : Association des protéines



(B) Immunomarquage



(C) Détection par microscopie de fluorescence

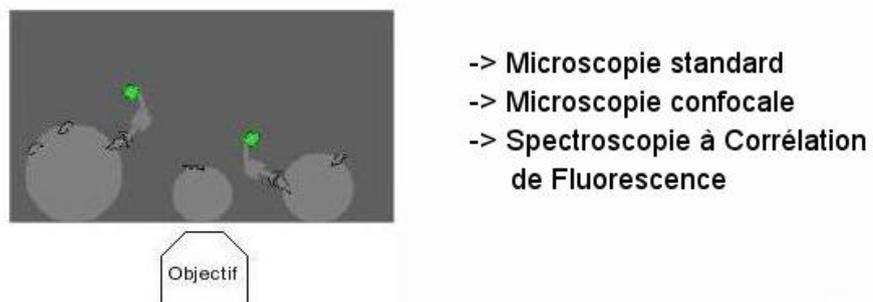


FIG. 5.1: Protocole général de l'immunofluorescence indirecte. (A) Etape préliminaire : Association de protéines aux membranes-modèles. Les GUVs sont tout d'abord incubées en présence des protéines GRA provenant soit de la fraction HssEs, soit de la fraction HssVac. Un lavage est effectué afin d'éliminer les protéines restées en solution, ainsi que celles non stablement associées sur les membranes. (B) Immunomarquage indirect. L'échantillon à marquer est incubé en présence d'un anticorps primaire dirigé contre une des protéines GRA. Après un lavage pour éliminer les anticorps non associés et ceux fixés non spécifiquement, l'échantillon est incubé en présence de l'anticorps couplé à un fluorophore, ce qui permettra sa détection par microscopie de fluorescence. (C) Détection par microscopie de fluorescence.

Fractions ultrasolubles utilisées

Les expériences sur GUVs se déroulant au LSP, tandis que la préparation des fractions ultrasolubles est réalisée au LAPM, il a été choisi de travailler à partir d'aliquotes de la fraction HssEs conservées à -20°C . Rappelons que lors des expériences de biochimie elles étaient conservées à 4°C et utilisées dans les 48h maximum après préparation.

Les modifications après congélation des caractéristiques de solubilisation des protéines GRA de la fraction HssEs ont été observées, au cours du chapitre précédent (voir Paragraphe 4.2.3 "Effet de la conservation à -20°C ") : les protéines congelées apparaissent partiellement dégradées mais ne manifestent qu'une légère variation de densité isopycnique, suggérant que certaines interactions faibles au sein des complexes de solubilisation des protéines GRA ont été détruites lors de la congélation-décongélation.

Idéalement, l'étape préliminaire aux expériences d'IF sur GUVs consisterait à tester l'association des protéines GRA aux GUVs par les méthodes de biochimie qui ont fait leurs preuves au chapitre précédent : binding assay (voir Sous-section 4.2.1 "Expérience préliminaire : Binding assay") ou séparation isopycnique (voir Sous-section 4.2.5 "Association aux membranes"). Ce contrôle n'est cependant pas possible à réaliser car la concentration finale d'une préparation de GUVs (environ $50\mu\text{g}$ de lipides par ml de tampon) est nettement inférieur à la concentration des préparations de SUVs (environ 2mg/ml de tampon). La fraction membranaire serait donc trop faible pour être détectable. La capacité d'association aux membranes sera donc validée directement pas les expériences d'IF.

Préparation de GUVs HeLa

Les Vésicules Géantes Unilamellaires sont préparées par la méthode d'électroformation établie par Angelova et al. [Angelova & Dimitrov, 1986]. Les lipides HeLa sont solubilisés en solvant organique Chloroforme/Méthanol 9 :1, à environ 3 équivalent-T180² par ml, comme pour les SUVs (voir Paragraphe 4.1.1 "Préparation de SUVs"). Quelques μl de cette solution sont déposés sur deux lames recouvertes d'un revêtement conducteur d'ITO³, qui sont ensuite montées en vis-à-vis sur un espaceur pour former une chambre d'environ 0.7ml (Fig. 5.2 A), comme indiqué dans le chapitre "Matériel et Méthodes" (voir Section A.3.3 "Electroformation des GUVs"). Les GUVs sont ainsi obtenues à une concentration finale d'environ $50\mu\text{g}$ de lipides par ml de tampon.

La formation des GUVs est contrôlée par l'application d'un champ alternatif perpendiculaire au film lipidique. Le protocole classique consiste en une rampe de tension qui a dû être adaptée pour les GUVs HeLa qui se forment moins rapidement et moins efficacement que les GUVs de composition lipidique plus simple (e.g. EPC)⁴. Les GUVs ainsi obtenues sont plus polydisperses que lors d'une électroformation classique en EPC : elles ont un diamètre de quelques microns à environ 70 microns (Fig. 5.2 B).

²Boîte de culture de 180cm^2

³Oxyde d'indium dopé à l'étain.

⁴Pour la formation de GUVs HeLa, la tension est montée par paliers de 0.1V puis de 0.2V toutes les 5 minutes, jusqu'à 1.6V. Ce dernier palier est prolongé généralement sur toute une nuit.

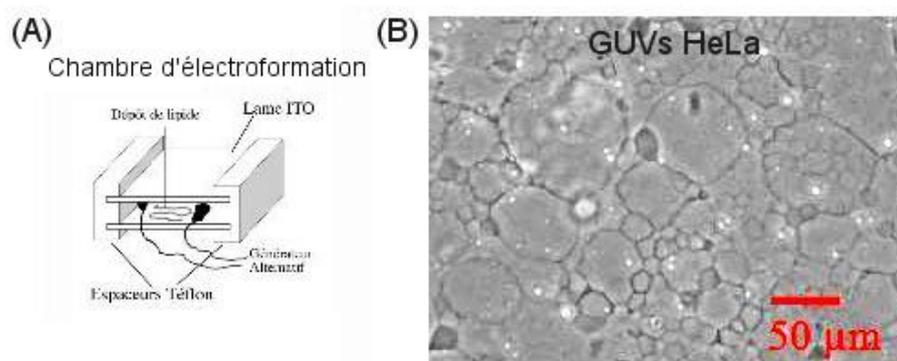


FIG. 5.2: Electroformation de GUVs HeLa. (A) Chambre d'électroformation. D'après [Abkarian, 2002]. (B) GUVs HeLa en fin d'électroformation, en solution de sucrose 270mM.

Osmolarité des solutions d'électroformation et d'incubation

La composition de la solution d'électroformation doit être ajustée afin que les pressions osmotiques interne et externe des GUVs soient équilibrées lors des incubations avec les fractions ultrasolubles. Celles-ci, produites en PBS ou en D10 (DMEM complété de 10% de serum de veau foetal), ont une osmolarité mesurée d'environ 315mOsm. Afin d'éviter une trop grande tension membranaire lors de l'injection des solutions après électroformation, les GUVs sont formées dans une solution de sucrose légèrement hypo-osmotique, à 270mM, soit environ 270mOsm⁵.

Objectif : IF sur GUVs HeLa incubées avec la fraction HssEs conservé à -20°C

La méthode d'étude et les constituants de base des expériences ont été présentés et contrôlés. Le protocole d'IF, classique en biologie cellulaire, va devoir être adapté à nos conditions expérimentales, en particulier en tenant compte de la fragilité des GUVs, par comparaison avec des cellules.

5.2 Développement de la méthode d'immunofluorescence sur GUVs

5.2.1 Contraintes expérimentales propres à notre système

Le protocole d'IF classique est largement appliqué en biologie cellulaire. Cependant, son application à des systèmes plus fragiles que des cellules, les GUVs, requiert des précautions relatives aux étapes d'incubation tout comme à celles de lavage. En premier lieu, il est nécessaire de trouver des conditions d'incubation qui accommodent à la fois les protéines et les GUVs. En deuxième lieu, il est primordial de réaliser des lavages efficaces sur les GUVs pour l'efficacité du protocole d'IF.

⁵Le sucrose ayant une masse molaire importante ($342.3\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, soit 92.4g/l à 270mM), les GUVs remplies de sucrose vont sédimenter au fond de la chambre d'électroformation lorsqu'elles sont injectées dans un milieu à 310mOsm de glucose ($180\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, soit 55.8g/l à 310mM), ou de PBS (11.86g/l).

Stabilité des GUVs en conditions physiologiques

Afin que les protéines soient correctement repliées et fonctionnelles, les incubations sont réalisées dans un milieu de salinité physiologique⁶ : D10 dans le cas de HssEs ; PBS dans le cas de HssTx et HssVac. Or l'incubation de GUVs en milieu salin a des effets importants sur leur stabilité. En particulier, la présence d'ions divalents induit une adhérence forte entre membranes donc l'agrégation des GUVs, et également entre membrane et substrat [Akashi et al., 1998, Marra & Israelachvili, 1985]. Cette adhérence est à l'origine d'une augmentation de la tension de la membrane qui peut provoquer l'explosion de la vésicule.

A titre d'illustration, le comportement de GUVs injectées en D10 a été suivi sur quelques minutes. Des GUVs EPC (formées en sucrose 270mM) ont été injectées dans un milieu salin (NaCl 130mM), tamponné à pH neutre et d'osmolarité adaptée (Fig.5.3). Dès la première minute, les GUVs commencent à se décontraster : ce phénomène est révélateur d'ouverture de pores dans la membrane, suite à une trop grande tension membranaire. Au cours de la 2e minute, pour la GUV du bas, ou 3e minute, pour la GUV du haut, des agrégats membranaires apparaissent en surface des GUVs, ce qui indique leur instabilité. Les instabilités augmentent et les GUVs "s'effondrent" en l'espace de quelques minutes : la membrane n'est plus tendue et elle s'agrège progressivement en formant des résidus membranaires denses. Cette effet peut également être attribué à un choc osmotique, car l'osmolarité de la solution interne aux GUVs a été choisie assez basse afin d'éviter une tension des membranes en milieu salin. Une osmolarité optimale de la solution interne des GUVs, permettant leur stabilité lors de l'injection du milieu salin, n'a pas pu être déterminée au cours de ces expériences.

L'instabilité des GUVs en milieu "physiologique" est un problème majeur pour la réalisation des incubations. Modifier les tampons contenant les protéines GRA risque de nuire à leur solubilisation. Il faut donc trouver un moyen de stabiliser les GUVs sur des temps longs (plusieurs heures) afin qu'elles soient stables tout au long des incubations du protocole d'IF, en PBS comme en D10.

Lavages sur GUVs

L'importance des lavages au cours du protocole d'IF doit être soulignée : l'élimination des molécules n'ayant pas interagi à l'étape précédente est primordiale pour un marquage efficace des protéines par les anticorps primaires dirigés contre elles, puis des anticorps primaires par leurs conjugués. De plus, le lavage final est essentiel pour l'obtention d'un marquage contrasté des membranes. Il existe un exemple dans la littérature d'application d'un protocole d'immunofluorescence sur GUVs [Ruan et al., 2004] : la protéine est reconstituée dans les membranes lors de leur formation, et c'est l'anticorps primaire qui est marqué par un fluorophore, ce qui permet d'établir un protocole d'immunofluorescence directe, en une seule étape. Les travaux de Ruan et al. soulignent bien l'importance du lavage dans ce type de protocole, puisqu'ils montrent l'impossibilité d'obtenir

⁶Le D10 contient 110mM de NaCl, 5mM de KCl, 2.4mM de CaCl₂. Le PBS contient 137mM de NaCl, 2.7mM de KCL, 10mM de phosphates (Na₂HPO₄ et KH₂PO₄).

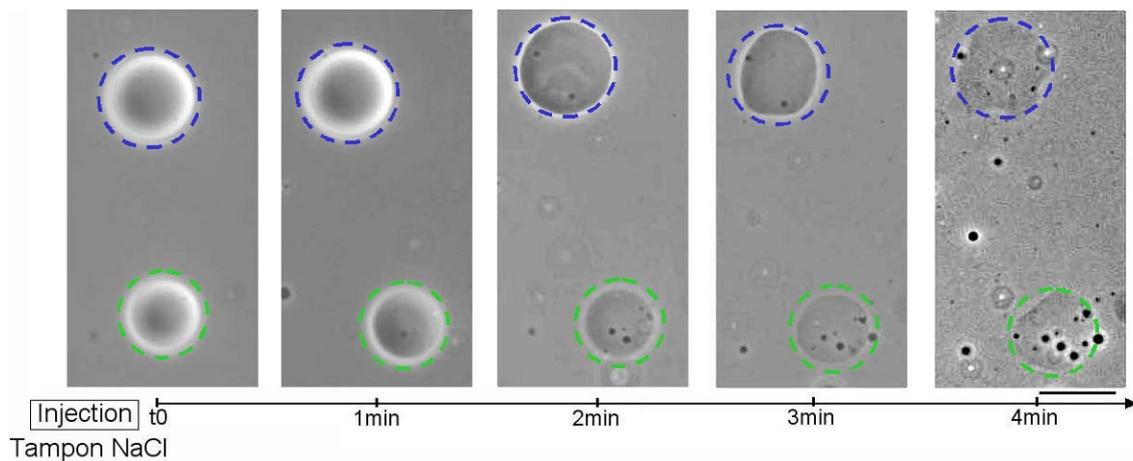


FIG. 5.3: Comportement des GUVs en milieu salin. Des GUVs EPC, électroformées en solution de sucrose à 270mM, ont été injectées en tampon 130mM NaCl tamponné à pH7.4 (soit 310mOsm). Barre 50 μ m.

un marquage contrasté des membranes, le fond étant extrêmement fluorescent. En biologie cellulaire, les opérations de lavage sont facilitées par le fait que les cellules peuvent être simplement rassemblées par une centrifugation basse vitesse puis redispersées dans la nouvelle solution d'incubation, ce qui n'est pas applicable aux GUVs qui sont trop fragiles.

Il faut donc mettre en oeuvre une méthode permettant le changement efficace de la solution externe des GUVs en tenant compte de leur fragilité.

Des méthodes d'incubation et de lavages adaptées aux GUV doivent être développées :

- 1) en contrôlant les interactions des GUVs avec le substrat et entre elles, en contexte salin ;
- 2) en les immobilisant afin de pouvoir changer leur solution externe.

5.2.2 Méthodes envisagées

Nous avons envisagé plusieurs solutions permettant de réaliser les incubations et les lavages du protocole d'IF sur les GUVs. Malgré l'absence de protocole d'IFI sur GUVs, je me suis appuyée sur des méthodes employées en particulier pour la mise en milieu salin de GUVs : passivation/fonctionnalisation du substrat ; micro-injection des protéines ; incubations dans la chambre d'électroformation. Toutes ces solutions ont en commun de permettre l'observation des GUVs en continu, tout au long des incubations, afin de permettre le suivi d'éventuelles déformations des membranes.

Passivation/Fonctionnalisation du substrat

Une première façon de stabiliser les GUVs consiste à éviter leur contact avec le substrat, en passivant⁷ ce dernier par un tapis de polymères (Fig.5.4). Cette méthode est généralement utilisée

⁷La passivation réfère à tous types de procédés visant à rendre un matériau "passif" vis-à-vis d'un autre. Ici, il s'agit de rendre passive la lame de microscope, afin qu'il n'y ait pas d'interaction entre le verre qui la constitue et les membranes qui vont s'y déposer.

pour éviter l'adhérence de cellules sur leurs substrats mais elle est maintenant également utilisée pour contrôler l'adhérence de GUVs [Elbert & Hubbell, 1998, Cuvelier et al., 2003]. L'agrégation des GUVs peut être résolue de manière analogue en incluant dans les membranes, des lipides-PEG qui imposent une répulsion stérique entre GUVs. Cette méthode est utilisée par exemple sur des liposomes-vecteurs (gènes, drogues) afin d'éviter des interactions non contrôlées *in vivo* [Finsinger et al., 2000]. L'immobilisation des GUVs peut être réalisée en créant une adhésion spécifique et contrôlée, par la fonctionnalisation⁸ du substrat ainsi que des membranes (e.g. greffage de têtes streptavidine sur le substrat, combiné à l'ajout de lipides biotinylés dans les GUVs) [Cuvelier et al., 2003]. Le traitement consiste à greffer de manière covalente, des polymères ou des molécules d'adhésion sur le substrat, par le biais de molécules chargées positivement. Le choix de ces petites molécules de greffage (e.g. silanes, polyéthylèneimine (PEI), polylysine) dépend de la nature de la solution saline dans laquelle les GUVs sont incubées. Grâce à des lames passivées fournies par Pierre Nassoy (UMR 168 CNRS / Institut Curie, Paris), nous avons sélectionné un traitement permettant d'obtenir des GUVs stables sur le substrat, après leur injection en milieu salin D10 : ce traitement consiste à attacher des polymères de polyéthylène glycol (PEG) au substrat (lame de microscope) par le biais de molécules de polyéthylèneimine (PEI).

- **Avantages** : Cette méthode permet d'étudier des GUVs en interactions réduites et contrôlées avec leur environnement, donc de minimiser les artefacts potentiels.
- **Inconvénients** : Les lavages nécessitent l'immobilisation des GUVs et donc leur fonctionnalisation (e.g. lipides-PEG, -biotine), ce qui risque d'interférer avec les interactions entre GUVs et protéines.

Microinjection des produits de protéines.

Par cette méthode, la solution saline contenant les protéines est injectée localement au voisinage d'une GUV [Staneva et al., 2004], les GUVs étant immergées en solution non saline iso-osmolaire à la fraction injectée (e.g. glucose 310mM pour injection HssEs) (Fig.5.5). Pour l'immunomarquage, il est envisageable de mettre en pratique des microinjections successives des anticorps, ce qui permet de s'affranchir des lavages.

- **Avantages** : Cette méthode permet de contourner les deux contraintes majeures de notre protocole d'immunomarquage : les GUVs restent stables et aucun lavage n'est nécessaire au cours des successions de micro-injections.
- **Inconvénients** : La micro-injection est lourde à mettre en oeuvre et ne permet l'observation que d'une seule GUV à la fois. Cette méthode semble plus appropriée à l'étude de systèmes déjà bien caractérisés, car elle permet alors le suivi de la dynamique des interactions [Staneva et al., 2004].

Incubations dans la chambre d'électroformation.

La troisième option consiste à réaliser les incubations des GUVs avec les protéines dans leur chambre d'électroformation, en ne les décollant pas du tapis lipidique [Estes & Mayer, 2005]

⁸La fonctionnalisation d'un matériau consiste à y ajouter des propriétés spécifiques et contrôlées.

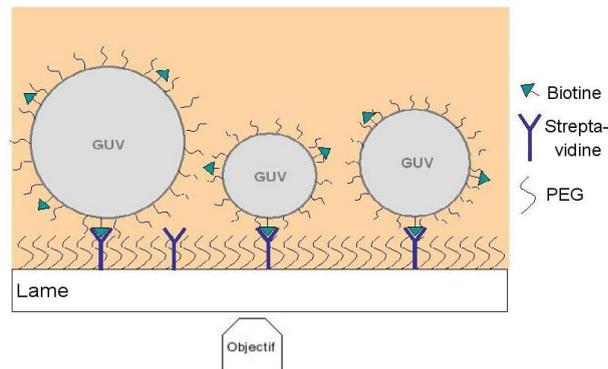


FIG. 5.4: Passivation/Fonctionnalisation du substrat des GUVs. Les substrats (lames de microscope) sont passivés par le greffage de polymères d'éthylène glycol (PEG), et fonctionnalisés par le greffage de molécules de streptavidine. De manière complémentaire, les membranes des GUVs sont fonctionnalisées par la présence de lipides biotinylés qui vont s'associer spécifiquement aux streptavidines présentes sur le substrat. Les membranes des GUVs sont également passivées, afin d'éviter les interactions entre GUVs, en y incluant des lipides-PEG.

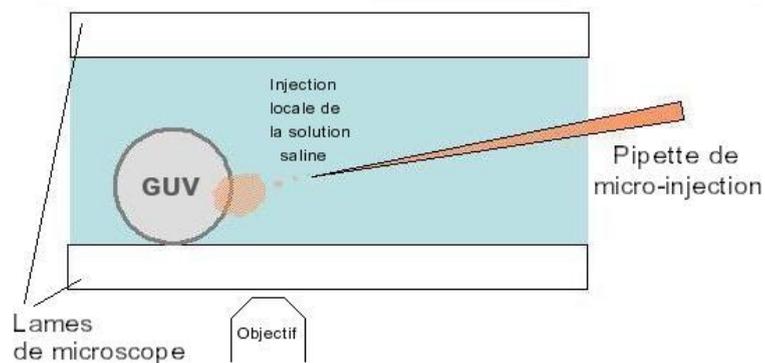


FIG. 5.5: Micro-injection sur GUVs. Principe de la méthode de micro-injection : les produits devant interagir avec les membranes (e.g. fraction HssEs) sont injectés localement au voisinage d'une seule GUV, en faible quantité (de l'ordre quelques dizaines de μl).

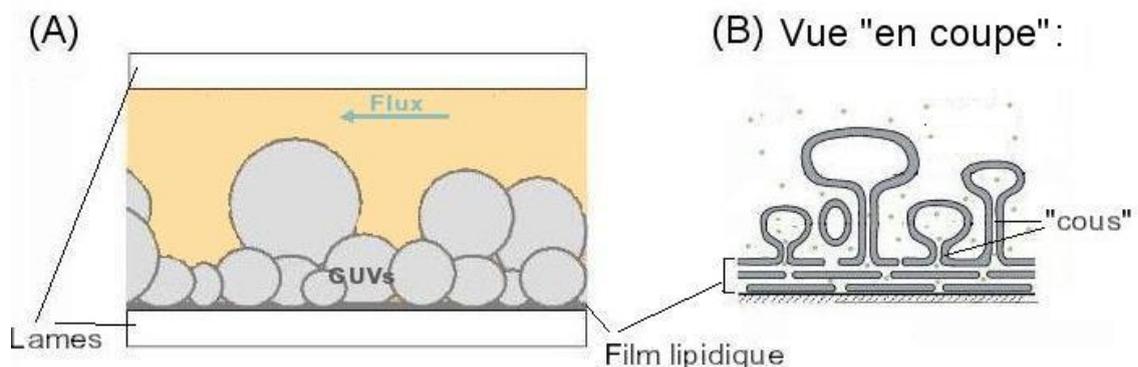


FIG. 5.6: Chambre d'électroformation à flux. (A) Principe. Les GUVs étant attachées au film lipidique qui tapisse le fond de la chambre, la solution externe peut être remplacée par application d'un flux. (B) Les petites molécules en solution peuvent circuler entre les solutions interne et externe de GUVs par le biais des "cous" membranaires qui les rattachent au film lipidique. D'après [Estes & Mayer, 2005].

[Bagatolli et al., 1999, Staneva et al., 2004]. Les GUVs y restent attachées par un "cou" membranaire et sont donc immobilisées sur le substrat. Ainsi, les lavages peuvent être réalisés par simple application d'un flux (Fig.5.6).

- **Avantages** : Les GUVs sont immobilisées par leur attache au film de lipides mais ne sont pas en contact direct avec la lame et restent stables en présence d'ions.
- **Inconvénients** : Le flux appliqué dans la chambre peut créer des perturbations artefactuelles sur les GUVs. Par ailleurs, les GUVs ne peuvent pas être conservées et doivent être formées juste avant chaque expérience.

5.2.3 Solution retenue : Chambre d'électroformation à flux

Nous avons choisi de mettre en oeuvre la dernière solution : la chambre d'électroformation à flux, qui semble répondre le mieux à nos contraintes. Nous avons donc réalisé une chambre sur-mesure au LSP, sur le modèle de la chambre décrite dans l'article récent de Estes et Mayer [Estes & Mayer, 2005]. La validité de ce choix pour l'application du protocole d'IFI aux GUVs HeLa a été confirmée par deux tests :

- 1) remplacement de la solution externe de sucrose par une solution saline ;
- 2) marquage des membranes par un fluorophore hydrophobe.

Réalisation du dispositif

Nous avons dessiné une chambre à flux très simple, conçue et réalisée par Philippe Moreau et l'Atelier de mécanique du LSP : elle consiste en un espaceur en téflon sur lequel se fixent deux lames ITO sur lesquelles vont pousser les GUVs (Fig.5.6 A). Un anneau de pâte à sceller Critoseal, intercalé entre chacune des lames et l'espaceur, assure la fixation et l'étanchéité de l'ensemble. La chambre ainsi formée, maintenue en plus par deux pinces, est étanche pour la durée d'une expérience (une journée). Des ouvertures pratiquées à chaque extrémité de la chambre à flux permettent l'introduction de tubes de faible diamètre qui constituent les entrée et sortie de la chambre à flux. La solution présente dans la chambre peut être remplacée par application d'un flux par une seringue branchée au tube d'entrée, dont le débit est contrôlé par un pousse-seringue.

Remplacement de la solution externe par application d'un flux

Les spécificités du dispositif ont été décrites de manière détaillée par Estes et Mayer [Estes & Mayer, 2005]. Tout d'abord, le flux appliqué dans la chambre doit être ajusté en fonction du type de lipides : à trop fort débit, les GUVs sont emportées par le flux et tirent de longs fils membranaires. Les effets commencent à être visibles au-dessus de 20ml/h pour des GUVs EPC en PBS). Ces résultats montrent aussi que le "cou" membranaire, qui rattache les GUVs au film lipidique, permet l'échange de petites molécules de soluté (masse moléculaire < 4kDa pour des GUVs EPC). On ne peut donc pas contrôler les échanges entre milieux externe et interne, du moins pour les petites molécules.

Ces caractéristiques ont été testées dans nos conditions expérimentales : un flux de 5ml de PBS, à 13ml/h, a été appliqué dans la chambre juste après électroformation de GUVs HeLa (5.7 B). Les

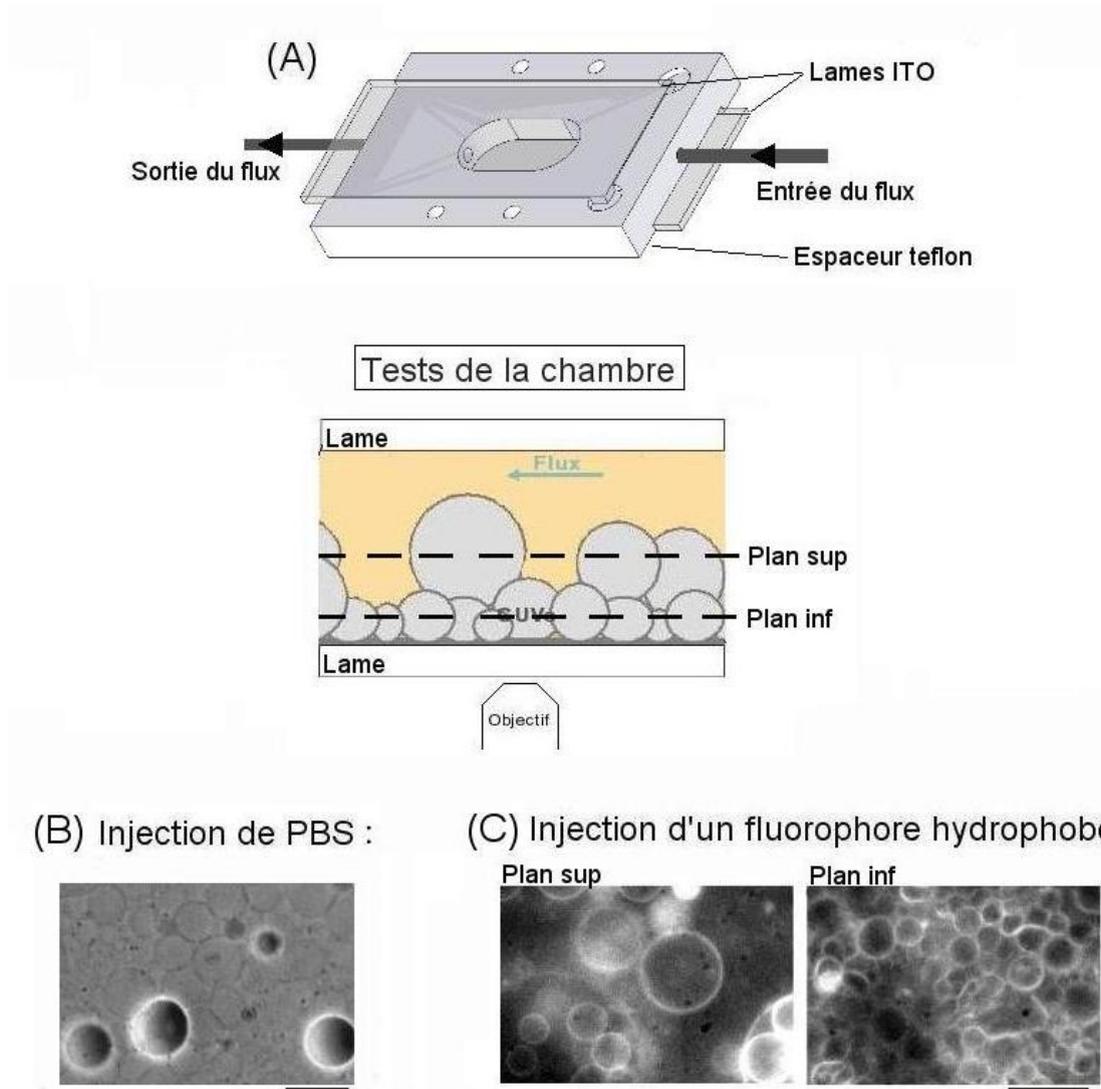


FIG. 5.7: Réalisation et tests de notre chambre d'électroformation à flux. (A) Dessin du prototype. (B) Remplacement de la solution externe. Juste après électroformation de GUVs HeLa en solution de sucrose 270mM, 5ml de PBS ont été passés dans la chambre, à un flux de 13ml/h. (C) Marquage des membranes par un fluorophore hydrophobe. Une solution de D10 contenant du Nile Red à $50\mu\text{M}$ a été incubée avec les GUVs HeLa pendant 1h, puis 5ml de PBS ont été passés dans la chambre pour éliminer les molécules non insérées dans les membranes. Barres $50\mu\text{m}$.

GUVs non détachées restent non contrastées au cours de l'injection de la solution de PBS, indiquant que les solutions interne et externe s'échangent. Certaines GUVs apparaissent cependant contrastées : ces GUVs se sont détachées du film lipidique par le flux et elles se sont déposées sur le tapis constitué par les autres GUVs, où elles semblent rester tout aussi stables que celles formant le tapis. Le flux appliqué semble suffisamment bas puisque les GUVs qui sont emportées par le flux constituent une petite minorité (environ 5%).

Le débit appliqué (13ml/h) permet la stabilité de la grande majorité des GUVs HeLa dans nos conditions expérimentales. Les GUVs se décontrastent mais restent stables en milieu salin.

Marquage des membranes par un fluorophore hydrophobe

Des GUVs HeLa fraîchement électroformées en sucrose 270mM ont été incubées avec un fluorophore à caractère hydrophobe, le Nile Red. Le milieu extérieur a ensuite été lavé par le passage de 5ml de PBS, à un débit de 13ml/heure (5.7 C). Le marquage des membranes apparaît homogène et bien contrasté par rapport à la fluorescence du milieu, ce qui indique que le lavage a été efficace. Il apparaît, de plus, que les GUVs du plan inférieur sont également accessibles aux fluorophores puisqu'elles sont marquées.

Le lavage final permet la détection d'un marquage fluorescent contrasté des membranes des GUVs. Les membranes des GUVs de la chambre apparaissent accessibles aux fluorophores et restent stables lorsque ceux-ci s'intègrent aux membranes.

Bilan : Application du protocole d'IF aux GUVs HeLa

Après évaluation de différentes méthodes permettant la mise en oeuvre du protocole d'IF sur GUVs, nous avons arrêté notre choix sur la réalisation d'une chambre d'électroformation à flux, qui répond aux contraintes imposées : les GUVs sont stables en solution saline et immobilisées. Le protocole d'immunomarquage peut donc leur être appliqué.

5.3 Observation en fluorescence des protéines GRA associées aux GUVs

Une fois le protocole et le dispositif adapté mis au point, l'objectif majeur de ce chapitre a pu être abordé : l'observation par IF des protéines GRA associées aux GUVs. Je détaillerai d'abord le mode opératoire qui a été suivi pour toutes les expériences, puis les contrôles de spécificité des marquages, qui valident les résultats obtenus. Je présenterai ensuite les résultats obtenus par microscopie de fluorescence standard pour chaque protéine GRA étudiée, marquée individuellement, quant à leur association aux membranes et à leur répartition.

5.3.1 Mode opératoire

Préparation de la fraction HssEs et des GUVs HeLa (Fig.5.8)

La fraction HssEs est conservée à -20°C par fractions aliquotes décongelées juste avant utilisation. Après décongélation, des agrégats de taille importante sont visibles en contraste de phase (Fig.5.8, encart). Afin d'éliminer ces agrégats qui gênent l'observation des GUVs, la fraction HssEs est fractionnée par une centrifugation à basse vitesse (5000g ; 5min), dont on n'utilise que le surnageant. La fraction HssEs, produite en D10 non tamponné, a un pH assez basique après décongélation. Le pH, mesuré à 8.5 environ, est ajusté à 7.4 à l'aide de quelques microlitres de KOH concentré.

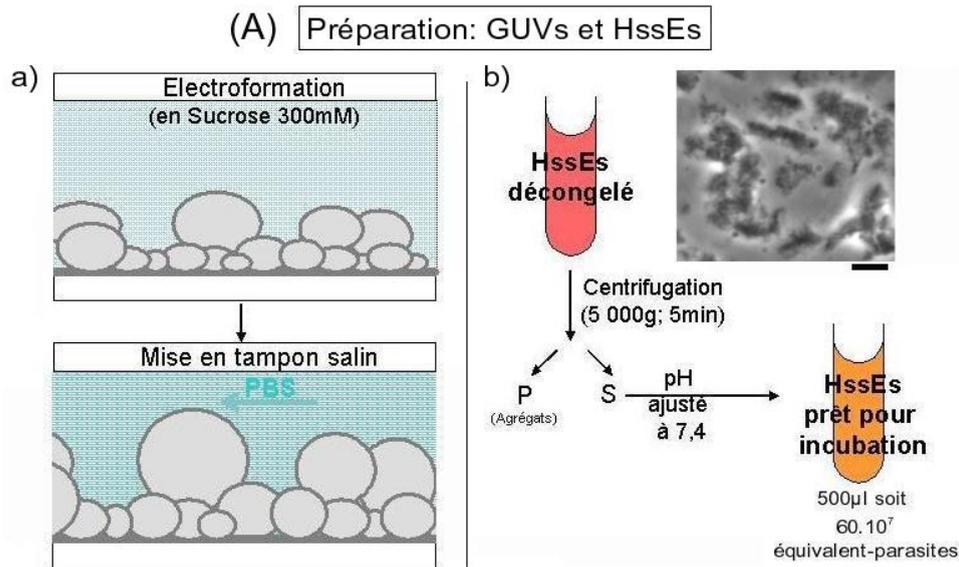


FIG. 5.8: Mode opératoire du marquage en immunofluorescence sur GUVs. Préparation des GUVs HeLa et de la fraction ultrasoluble HssEs. a) Les GUVs HeLa sont électroformées en Sucre 270mM, la nuit précédant l'expérience, puis stabilisées en PBS juste avant injection de la fraction HssEs. b) La fraction HssEs contient de gros agrégats après décongélation (voir encart, barre 10 μm) ; ils sont éliminés par une centrifugation à 5000g pendant 5 minutes. Le pH de la fraction est ensuite ajusté à 7.4 par quelques μl de KOH concentré.

Les GUVs HeLa sont quant à elles, électroformées durant la nuit précédant leur utilisation. Le remplacement de la solution de sucrose à 270mM par une solution "physiologique" riche en macromolécules, lors de l'injection de la fraction HssEs, est susceptible de générer des artefacts, dus au petit décalage d'osmolarité et à la présence d'ions pouvant interagir avec les membranes. Afin d'éviter cela, la solution d'électroformation (sucrose 270mM) est remplacée par une solution de PBS peu avant l'expérience (Fig.5.8, GUVs HeLa). Les GUVs y sont laissées pendant quelques minutes avant l'injection de la fraction ultrasoluble, afin de permettre l'équilibrage entre les solutions interne et externe.

Conditions d'incubation (Fig.5.9)

Les GUVs sont incubées pendant 1h à température ambiante avec 0.5ml de la fraction HssEs (soit 60.10^6 équivalent-parasites) préparée comme indiqué précédemment. La concentration de GUVs dans la chambre est de l'ordre de $30\mu\text{g}$ de lipides par ml. D'après ce que nous avons vu au cours des expériences de biochimie, au cours desquelles les SUVs étaient concentrées à 2mg de lipides par ml, les protéines sont largement en excès par rapport à la concentration globale en lipides de la chambre. L'excès de protéines après incubation est éliminé par passage de 5 ml de PBS.

Ensuite commence l'immunomarquage indirect d'une des protéines GRA : les GUVs sont incubées 1h à température ambiante avec les anticorps primaires puis secondaires, tous deux dilués en PBS, avec un lavage de 5ml de PBS entre les deux incubations. Le volume du dernier lavage est plus important (passage de 10 ml de PBS), afin d'éliminer la fluorescence de la solution environnante.

Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à des fluorophores de la gamme Alexa Fluor, qui ont un bon rendement de fluorescence et une excellente photostabilité. De plus, ils sont hydrophiles,

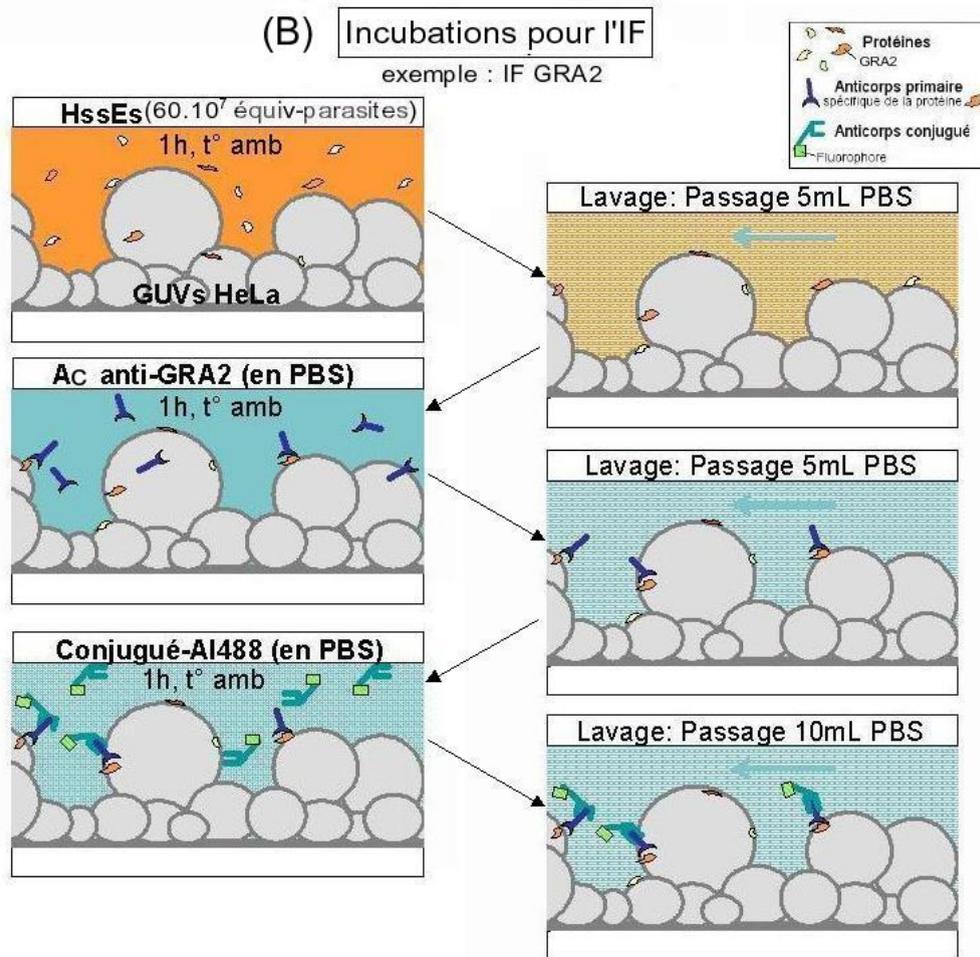


FIG. 5.9: Mode opératoire du marquage en immunofluorescence sur GUVs. Séquence d'incubations. Les GUVs sont incubées tout d'abord avec la fraction HssEs, pendant 1h et à température ambiante. Après un lavage éliminant les protéines non associées aux membranes, les GUVs sont incubées en présence d'anticorps primaires spécifiques d'une protéine GRA (GRA2 par exemple : **Ac anti-GRA2**) pendant 1h et à température ambiante. Après un lavage éliminant les anticorps qui n'ont pas réagi avec les protéines associées aux membranes, les GUVs sont finalement incubées en présence d'anticorps conjugués couplés à un fluorophore (en exemple un anticorps couplé à l'Alexa Fluor-488 : **Conjugué-AI488**). Un dernier lavage permet d'éliminer la fluorescence du fond.

donc peu susceptibles d'induire des interactions non spécifiques avec les GUVs⁹.

Dans certaines expériences, un second marquage a été réalisé sur la même préparation, avec une combinaison différente d'anticorps et un fluorophore dont les spectres d'émission et d'excitation sont distincts de ceux du premier fluorophore utilisé (par exemple, anticorps monoclonal de Souris et conjugué-Alexa488, puis anticorps polyclonal de Lapin et conjugué-Alexa596).

Détection

Les images présentées dans la suite de cette section ont été obtenues par microscopie de fluorescence standard en épi-illumination, avec deux jeux de filtres, l'un adapté à l'Alexa Fluor488 et l'autre, à l'Alexa Fluor596. A chaque fois que cela a été possible, une image en contraste de phase

⁹Au contraire, les fluorophores de la famille Bodipy ainsi que le Texas Red, de caractère hydrophobe, s'associent spontanément aux membranes.

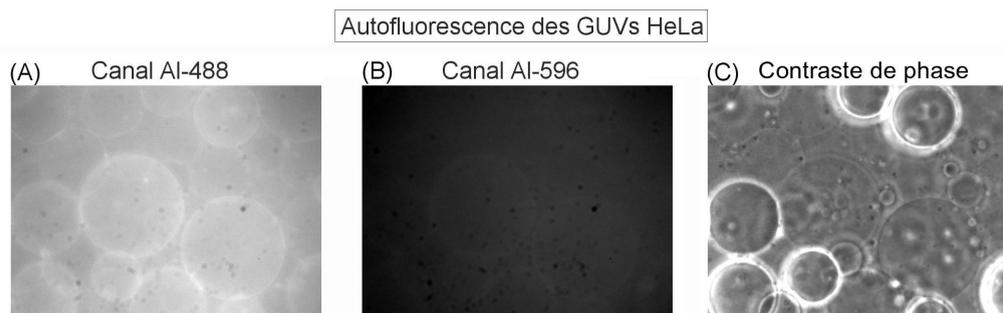


FIG. 5.10: Autofluorescence des membranes des GUVs HeLa. Les GUVs HeLa ont été stabilisées quelques minutes en PBS juste après électroformation. Elles ont ensuite été imagées en fluorescence dans le canal de l’Alexa Fluor488 (image **A**) et de l’Alexa Fluor 596 (image **B**), avec un temps d’acquisition de 5s, ainsi qu’en contraste de phase (image **C**). Pour permettre leur comparaison, les images de fluorescence obtenues dans les deux canaux ont subi les mêmes réglages. Barre 50 μ m.

de la même zone a été réalisée.

L’observation en fluorescence de GUVs HeLa en PBS, avant incubations, a recherché l’autofluorescence éventuelle des membranes des GUVs HeLa dans les canaux correspondant à chacun des deux fluorophores (Fig.5.10). Dans les conditions d’éclairage et de détection caractérisant le microscope, le signal d’autofluorescence des membranes dans le canal de l’Alexa Fluor488 est observé, bien que peu contrasté, sur une image acquise par un temps de pose de 5s (Fig.5.10 **A**). Dans le canal de l’Alexa Fluor596, pour le même temps de pose, le signal apparaît à peine détectable (Fig.5.10 **B**). Afin d’éviter la confusion entre les signaux spécifiques et ce signal d’autofluorescence, l’acquisition des images après immunomarquage s’est faite avec des temps de pose courts (0.5s).

Le signal d’autofluorescence des membranes indique la limite basse de validité des signaux spécifiques obtenus après immunomarquage. Les signaux obtenus après immunomarquage lors d’un temps de pose court (0.5s) se distinguent sans ambiguïté du signal d’autofluorescence. Dans les quelques cas où le signal spécifique après IF n’est détectable qu’après un long temps de pose (5s), j’ai comparé les images avant et après IF avec les mêmes paramètres d’acquisition et d’affichage (grossissement, temps de pose, jeu de filtres, échelles de niveaux de gris) afin de confirmer la spécificité du signal.

5.3.2 Contrôles préliminaires

Contrôle des interactions non spécifiques entre les anticorps et les GUVs HeLa

Afin de pouvoir mener des expériences d’IF concluantes, je me suis assurée que les anticorps utilisés n’interagissent pas de manière non spécifique avec les GUVs HeLa, dans les conditions données par le protocole d’IF sur GUVs (voir Fig.5.8 et 5.9).

En suivant le protocole indiqué, des GUVs HeLa ont été incubées : 1) avec la fraction ultrasoluble HssEs-KOGR2¹⁰, puis 2) avec l’anticorps monoclonal IgG souris anti-GRA2, et enfin 3) son conjugué (anticorps anti-souris) couplé à l’AlexaFluor488. De même, lors d’une autre expérience,

¹⁰Fraction obtenue par sécrétion *in vitro* de parasites de la souche mutante RH-KOGR2, qui n’expriment pas la protéine GRA2.

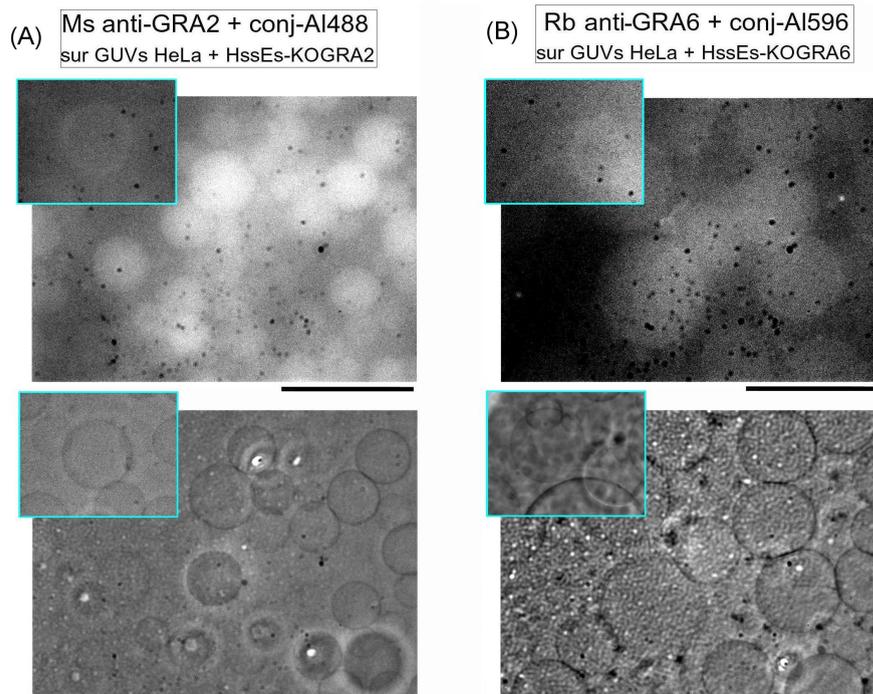


FIG. 5.11: Contrôles des interactions non-spécifiques des anticorps avec les GUVs HeLa. (A) Contrôle d'un anticorps monoclonal et son conjugué. Des GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml de la fraction HssEs-KOGRA2 (soit 6.10^7 équivalent-parasites) centrifugée et de pH ajusté à 7.4, pendant 1h à température ambiante. La protéine GRA2 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA2 (Ms anti-GRA2) et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488 (conj-AI488). (B) Contrôle d'un anticorps polyclonal et son conjugué. Des GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml de la fraction HssEs-KOGRA6 (soit 6.10^7 équivalent-parasites) centrifugée et de pH ajusté à 7.4, pendant 1h à température ambiante. La protéine GRA6 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-GRA6 (Rb anti-GRA6) et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor596 (conj-AI596). Les images en fluorescence (haut), acquises par un temps de pose de 5s, sont placées en vis-à-vis des images en contraste de phase (bas). Les images obtenues avant immunomarquage, mettant en évidence l'autofluorescence des membranes, sont montrées en encart pour comparaison (réglages équivalents). Barres $50\mu\text{m}$.

des GUVs HeLa ont été incubées : 1) avec la fraction ultrasoluble HssEs-KOGRA6¹¹, puis 2) avec l'anticorps polyclonal IgG lapin anti-GRA6, et enfin 3) son conjugué (anticorps anti-lapin) couplé à l'AlexaFluor596 (Fig.5.11).

Avec un temps long d'acquisition (5s), les GUVs apparaissent marquées en volume, indiquant que les anticorps peuvent pénétrer à l'intérieur des GUVs au cours des incubations. Les membranes n'apparaissent pas du tout contrastées par rapport à ce marquage en volume.

L'utilisation de parasites KO permet de réaliser les contrôles d'interactions non spécifiques dans des conditions expérimentales aussi proches que possible du protocole appliqué pour les IFs dans toute la suite de la section. Les combinaisons d'anticorps utilisées n'interagissent pas de manière notable avec les membranes des GUVs HeLa dans les conditions du protocole d'IFI appliqué.

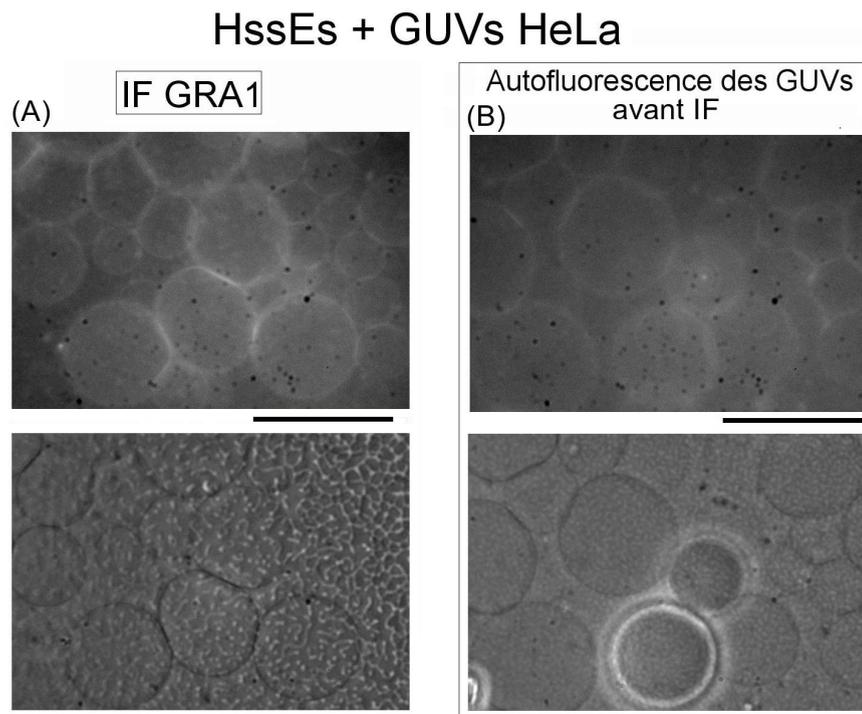


FIG. 5.12: Association de la protéine GRA1 de la fraction HssEs aux GUVs HeLa. (A) Les GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml de la fraction HssEs (soit 6.10^7 équivalent-parasites), de pH ajusté à 7.4, pendant 1h à température ambiante. La protéine GRA1 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA1 et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488. (B) Une image de l'autofluorescence des membranes a été acquise avant immunomarquage, dans les mêmes conditions. Afin de permettre la comparaison visuelle avec le résultat de l'IF GRA1, les deux images en fluorescence ont été réglées selon la même échelle de niveaux de gris. Les images en fluorescence (haut), acquises par un temps de pose de 5s, sont placées en vis-à-vis des images en contraste de phase (bas). Barres $50\mu\text{m}$.

Contrôle "Protéine soluble" : Association de la protéine GRA1 de HssEs aux GUVs HeLa

A titre de contrôle supplémentaire, j'ai effectué sur des GUVs HeLa incubées avec la fraction HssEs, une expérience d'IF sur la protéine GRA1, qui manifeste un comportement de protéine soluble, comme cela a été attesté par toutes les expériences de biochimie décrites au chapitre précédent.

Un faible signal est détecté sur les membranes, par un temps long d'acquisition (5 secondes) (Fig.5.12 A). Afin d'évaluer la spécificité de ce signal, j'ai comparé cette image à celle de l'autofluorescence des membranes obtenues avant les incubations, acquises et traitées de la même façon (Fig.5.12 A). L'autofluorescence des GUVs HeLa est du même ordre de grandeur que la fluorescence observée par IF sur GRA1 : nous atteignons ici la limite de spécificité du signal. On ne peut donc pas conclure que la protéine GRA1 est associée aux GUVs HeLa. La protéine hydrophile GRA1, comme dans les expériences de biochimie, constitue un contrôle "protéine soluble" dans ces expériences sur GUVs : elle ne présente pas d'association notable aux membranes.

Il est intéressant de noter qu'après l'ensemble des incubations du protocole d'IF, le signal non spécifique des membranes reste assez uniforme : il n'y a pas de réorganisation visible des molécules

¹¹Fraction obtenue par sécrétion *in vitro* de parasites de la souche mutante RH-KOGR6, qui n'expriment pas la protéine GRA6.

autofluorescentes au sein des membranes.

La protéine GRA1 n'apparaît pas associée aux membranes des GUVs ; elle représente donc toujours le comportement des protéines solubles. Cette expérience permet de confirmer que les interactions non spécifiques des anticorps avec les GUVs sont tout à fait négligeables.

Bilan : Contrôles négatifs

- Les membranes des GUVs HeLa ont une faible autofluorescence, détectable sur des images obtenues après un temps de pose de 5s. Ce signal non spécifique doit servir de limite basse de validité des signaux détectés par IF. Les anticorps utilisés ne contribuent pas de manière notable au signal non spécifique dans les conditions du protocole appliqué.
- L'autofluorescence des membranes reste uniformément répartie sur les membranes. Ainsi, les motifs de répartition, qui pourraient être observés dans les expériences d'IF qui vont suivre, pourront être attribués sans ambiguïté au marquage spécifique des protéines GRA, et non à une répartition modifiée des molécules autofluorescentes dans les membranes.

5.3.3 Association des protéines GRA2 et GRA6 de HssEs aux GUVs HeLa

Les protéines GRA2 et GRA6 sont toutes deux associées au RNM dans la vacuole, où elles semblent être en interaction [Travier et al., 2007, Labruyere et al., 1999]. Nous allons donc suivre en parallèle, les résultats obtenus pour chacune d'entre elles et tenter d'évaluer si leur interaction est nécessaire pour leur association aux membranes.

Protéine GRA2

Le signal obtenu est intense, les images peuvent être acquises sur un temps court (0.5s), se distinguant sans ambiguïté de l'autofluorescence des membranes. A la surface des GUVs, la répartition du signal indique que la protéine forme un motif "piqueté" réparti de manière assez inhomogène (Fig.5.13 A). Ces points, qui révèlent une forte concentration locale de la protéine GRA2, peuvent correspondre à des agrégats protéiques, mais aussi à des microdomaines membranaires auxquels la protéine s'associerait préférentiellement, du fait d'une courbure (e.g. bourgeons) ou d'une composition lipidique particulière (e.g. micro-domaines). Cependant, ce signal de la membrane des GUVs apparaît peu contrasté en comparaison de celui observé au niveau des fils membranaires et des zones de jonctions entre la GUV et ces fils (Fig.5.13 A).

Dans une zone plus dense en GUVs, GRA2 apparaît essentiellement localisée aux zones de contact entre GUVs, qui apparaissent sous forme plus ou moins circulaire (Fig.5.13 B). On observe, dans certaines zones de la chambre, des fils membranaires marqués de manière ponctuelle : de petites vésicules denses présentes sur les fils apparaissent particulièrement marquées (Fig.5.13 C). Le processus de formation de ces fils n'est pas clair : il est certainement favorisé par l'action mécanique du flux appliqué dans la chambre à plusieurs reprises au cours de l'expérience. Cependant, des protéines de HssEs pourraient y contribuer, étant donné que les GUVs semblaient majoritairement stables dans

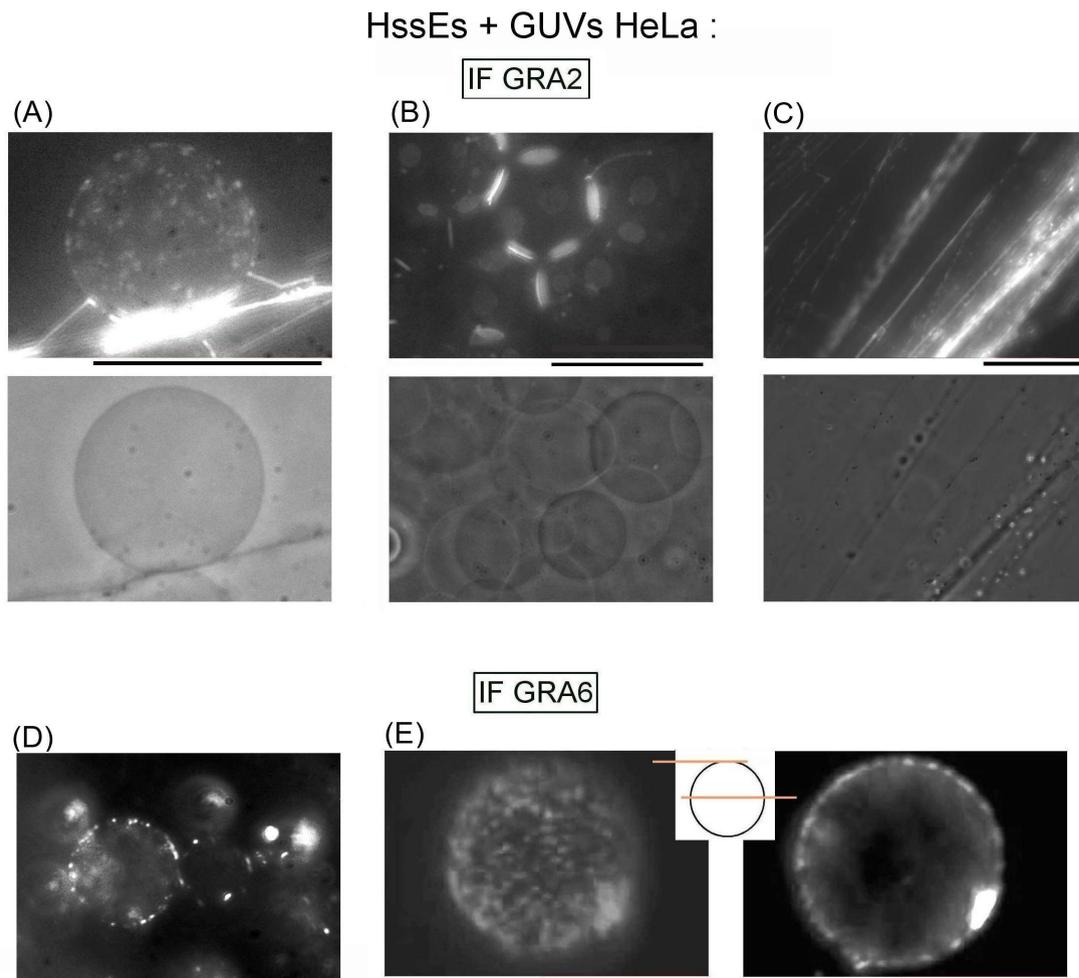


FIG. 5.13: Association des protéines GRA2 et GRA6 de la fraction HssEs aux GUVs HeLa. Des GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml (soit $60 \cdot 10^6$ équivalent-parasites) de la fraction HssEs de pH ajusté à 7.4, pendant 1h à température ambiante. La protéine GRA2 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA2 et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488 (images **A à C**). La protéine GRA6 a été mise en évidence à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-GRA6 et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor596 (images **D,E**). Les images en fluorescence (haut), acquises par un temps de pose de 0.5s (images **A à E**), sont placées en vis-à-vis des images en contraste de phase (bas), quand celles-ci étaient disponibles. En (**E**), une GUV a été observée selon deux plans de mise au point : sommet (gauche) ; équateur (droite). Barres $50\mu\text{m}$.

les tests des conditions de flux appliquées (voir Paragraphe 5.2.3, "Remplacement de la solution d'électroformation par un milieu salin : Application d'un flux").

La protéine GRA2 apparaît clairement associée aux GUVs HeLa, tout comme elle l'était aux SUVs HeLa. Elle manifeste une localisation préférentielle au niveau des jonctions entre GUVs. Elle apparaît par ailleurs associée à la membrane des GUVs selon un motif piqueté, et également à des fils membranaires.

Protéine GRA6

Le signal obtenu pour la protéine GRA6 est également intense (temps de pose 0.5s), mais sa répartition très inhomogène dans la chambre le rend difficile à caractériser (Fig. 5.13 **D**). La protéine

apparaît concentrée en gros grains à la surface des GUVs mais on distingue également un marquage diffus et irrégulier à l'intérieur des GUVs, ce qui semble indiquer la présence de structures internes aux GUVs, moins bien contrastées que les membranes. Les zones de jonction n'apparaissent pas particulièrement marquées par rapport au contour des GUVs.

L'observation à plus fort grossissement d'une GUV selon deux plans différents (équateur et sommet de la GUV) met en évidence à sa surface, un marquage ponctué mais régulier (Fig.5.13 E). Ce motif donne un aspect "hérissé" à la GUV. Cet aspect pourrait être révélateur d'une forte activité de vésiculation en surface des GUVs. L'observation à l'équateur de la GUV montre également un signal diffus à l'intérieur de la GUV.

La protéine GRA6 apparaît clairement associée aux GUVs HeLa, malgré les résultats non concluants obtenus par les méthodes biochimiques sur SUVs. Elle présente un marquage ponctué, en particulier en surface des GUVs. Elle semble également associée à des structures internes aux GUVs.

Interdépendance des protéines GRA2 et GRA6

Les localisations caractéristiques de ces deux protéines ne permettent pas de conclure quant à leur interaction au sein des membranes. Afin d'évaluer l'interdépendance de leurs capacités d'association membranaire, des IFs ont été réalisées sur des GUVs HeLa incubées avec des fractions manquant d'une des protéines : HssEs-KOGRA6 ou HssEs-KOGRA2.

En l'absence de GRA6, le signal obtenu pour GRA2 est plus faible (temps long d'acquisition, 5s) (Fig.5.14 A). GRA2 apparaît essentiellement associée à de petits amas membranaires attenants aux GUVs. Ces structures denses pourraient correspondre à des résidus membranaires issus de GUVs instables.

En l'absence de GRA2, le signal obtenu pour GRA6 est également moins intense (temps long d'acquisition, 5s) (Fig.5.14 B). Les membranes apparaissent marquées irrégulièrement, tandis qu'on distingue toujours le marquage de structures internes. Les zones de contact entre GUVs semblent marquées d'un point intense.

L'absence d'une des deux protéines, GRA2 ou GRA6, semble affecter l'association de l'autre puisque dans les deux cas présentés, le signal obtenu est beaucoup plus faible. GRA2 apparaît concentrée sur de petits amas membranaires, ce qui pourrait signifier qu'elle est sous une forme agrégée en l'absence de GRA6. Il est plus difficile de se prononcer pour GRA6 dont le marquage est toujours inhomogène.

5.3.4 Association de la protéine GRA7 de HssEs aux GUVs HeLa

Le signal obtenu par IF pour GRA7 est intense (temps d'acquisition de 0.5 ou 0.05s). La protéine GRA7 apparaît associée à la membrane des GUVs selon un motif piqueté, réparti de manière homogène à la surface des GUVs (Fig.5.15 A). Les zones de contact entre GUVs apparaissent plus marquées que le reste des membranes (temps de pose de 0.05s) (Fig.5.15 B). On observe, de plus, un

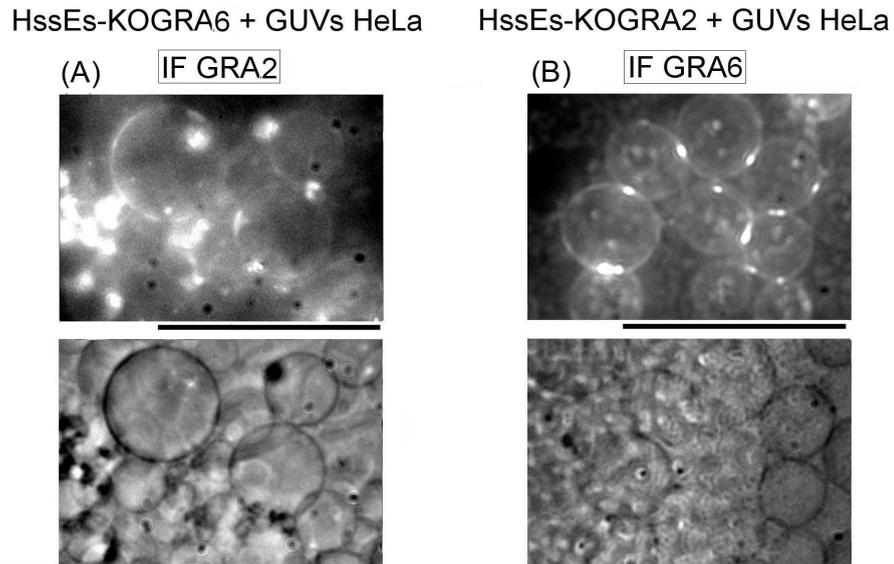


FIG. 5.14: Association de GRA6, en l'absence de GRA2, ou de GRA2, en l'absence de GRA6, aux GUVs HeLa. Des GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml (soit $60 \cdot 10^6$ équivalent-parasites) de la fraction HssEs-KOGR2 (image **A**) ou HssEs-KOGR6 (image **B**) centrifugée et de pH ajusté à 7.4, pendant 1h à température ambiante. La protéine GRA6 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-GRA6 et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor596 (image **A**). La protéine GRA2 a été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA2 et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488 (image **B**). Les images en fluorescence (haut) ont été acquises par un temps de pose de 5s. Barres $50\mu\text{m}$.

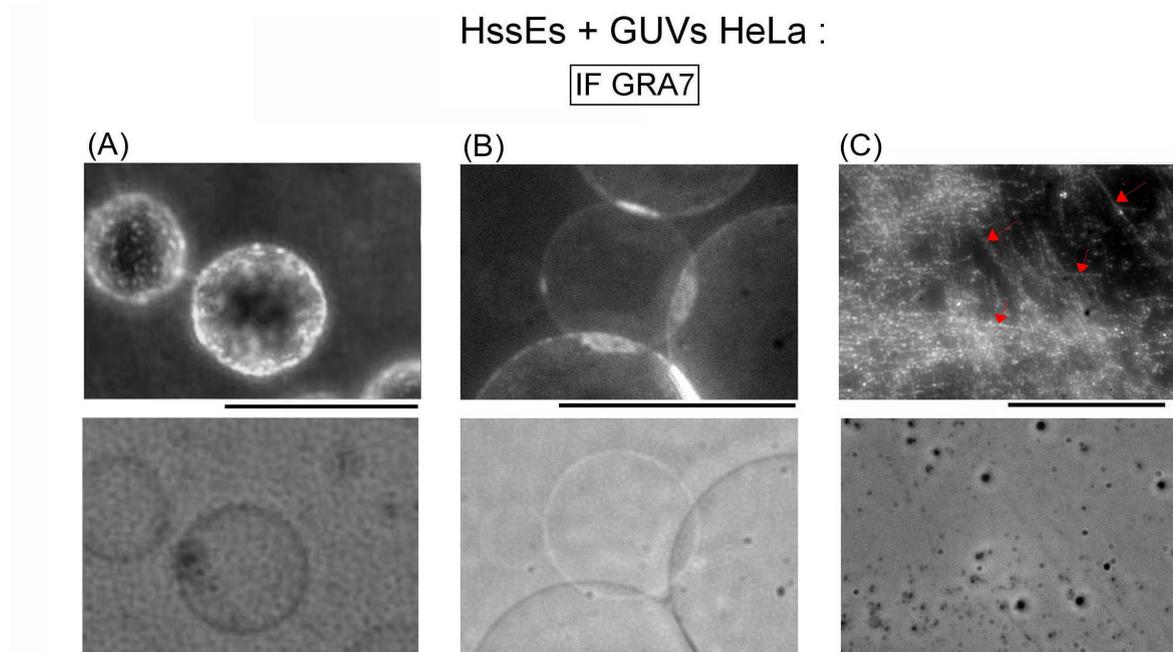


FIG. 5.15: Association de la protéine GRA7 de la fraction HssEs aux GUVs HeLa. Des GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml de la fraction HssEs préalablement centrifugée et de pH ajusté à 7.4, pendant 1h à température ambiante. La protéine GRA7 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA7 et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488. En (C), les flèches indiquent des fils membranaires. Les images en fluorescence (haut), acquises par un temps de pose de 0.5s (images **A,C**) ou 0.05s (image **B**), sont placées en vis-à-vis des images en contraste de phase (bas). Barres $50\mu\text{m}$.

ensemble de fils membranaires entrecroisés qui tapisse le fond de la chambre dans une zone pauvre en GUVs (Fig.5.15 C, flèches). Ce réseau apparaît marqué de manière ponctuelle et il est parsemé de GUVs isolées, non marquées en membrane. De tels fils n'ont pas été observés par IF pour les autres protéines : le marquage GRA7 pourrait avoir mis en évidence une structure particulière, peu visible en contraste de phase.

La protéine GRA7 est associée aux GUVs HeLa, tout comme elle était associée aux SUVs HeLa. Elle forme un marquage piqueté en surface des GUVs et elle apparaît également associée aux zones de contact entre GUVs. De plus, son marquage met en évidence un réseau dense de fils membranaires sur le fond de la chambre d'observation.

5.3.5 Association de la protéine GRA3 de HssEs aux GUVs HeLa

Le signal obtenu par IF pour GRA3 est moins intense que celui obtenu pour GRA2 et GRA6, car il n'est détectable que par des temps de pose de 5s. La répartition diffuse de GRA3 sur les membranes peut expliquer que le signal soit plus faible que celui observé pour les protéines GRA2 et 6. La protéine GRA3 apparaît répartie de manière équivalente sur différents types de structures membranaires : membranes des GUVs, fils (Fig.5.16 A). Les zones de contact apparaissent marquées (Fig.5.16 B) : ces zones semblent plus intenses que le reste des membranes mais le contraste n'est pas aussi marqué que cela a été observé pour GRA2. L'observation d'une GUV selon deux plans différents fait apparaître des reliefs de la membrane (Fig.5.16 C). A la surface de la membrane de la GUV (sommets), GRA3 présente une répartition diffuse mais inhomogène, qui souligne des froissements de la membrane. A l'intérieur de la GUV (équateur), on distingue des structures marquées peu résolues, donc submicroniques, qui semblent constituées de filaments membranaires.

La protéine GRA3 apparaît associée aux GUVs HeLa, tout comme elle l'était aux SUVs HeLa. Sa répartition diffuse fait apparaître des structures membranaires variées : froissements de la membrane des GUVs, structures internes, courts fils entre GUVs.

5.3.6 Association des protéines GRA de HssVac aux GUVs HeLa

Les expériences de biochimie ont mis en évidence le fait que les protéines GRA sont solubilisées sous des formes différentes dans les autres fractions ultrasolubles disponibles : fractions obtenues à partir de parasites extracellulaires (HssTx) ou à partir de cellules infectées (HssVac). Les capacités d'association membranaire des protéines GRA2, 3 et 7 aux SUVs HeLa semblaient conservées sous leur différentes formes de solubilisation dans ces fractions. Afin de confirmer ces résultats, j'ai mené une comparaison des capacités d'association des protéines GRA de la fraction HssVac aux GUVs composées de lipides HeLa.

La protéine GRA2 apparaît, comme après incubation avec HssEs, essentiellement localisée aux zones de contact entre GUVs (Fig.5.17 A). La protéine GRA6 présente un marquage très granuleux et inhomogène qui rend difficile l'interprétation des images (Fig.5.17 B) ; le marquage semble

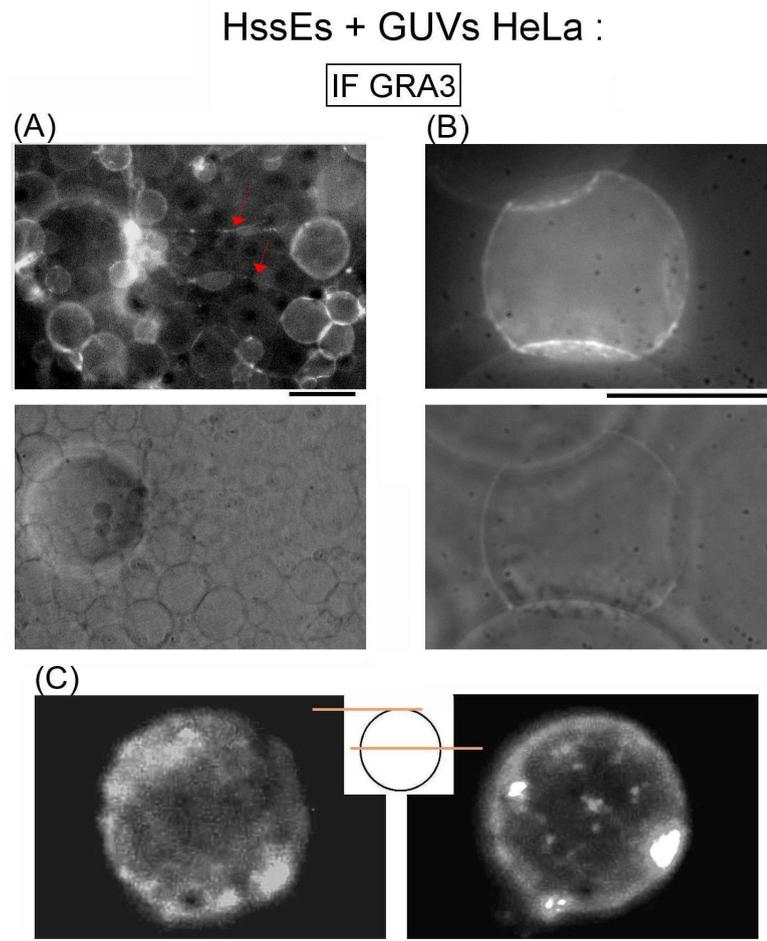


FIG. 5.16: Association de la protéine GRA3 de la fraction HssEs aux GUVs HeLa. Des GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml de la fraction HssEs, centrifugée, de pH ajusté à 7.4, pendant 1h à température ambiante. La protéine GRA3 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA3 et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488 (images **A** à **C**). En (**A**), les flèches indiquent des fils membranaires. En (**C**), une GUV a été observée selon deux plans de mise au point : sommet (gauche) ; équateur (droite). Les images en fluorescence (haut), acquises par un temps de pose de 5s, sont placées en vis-à-vis des images en contraste de phase (bas). Barres 50 μ m.

restreint aux zones de contact entre GUVs qui sont alors marquées d'un "dot" de fluorescence. La protéine GRA3 apparaît marquer les membranes des GUVs mais aussi plus particulièrement, les zones de contact entre GUVs (Fig.5.17 C). La protéine GRA7 présente un marquage membranaire assez diffus sur les membranes des GUVs et leurs zones de contact (Fig.5.17D). Les signaux obtenus sont cependant dans tous les cas, faibles (temps long de pose : 5s), en comparaison avec ceux obtenus après incubation avec HssES.

Les protéines GRA2, 3, 6 et 7 apparaissent associées aux membranes des GUVs HeLa. Cependant, on n'observe pas clairement les structures membranaires particulières (micro-environnements de surface, structures internes, fils) qui avaient été observées après incubation avec la fraction HssEs.

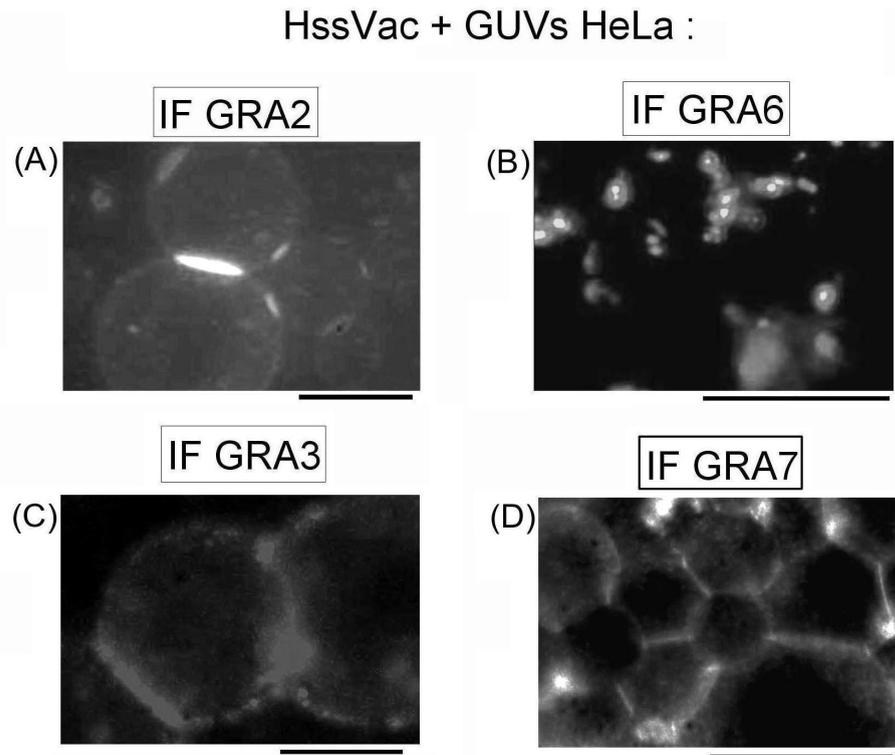


FIG. 5.17: Association des protéines GRA2, GRA6, GRA3 et GRA7 de la fraction HssVac aux GUVs HeLa. Les GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml de la fraction HssVac (soit $15 \cdot 10^7$ équivalent-parasites), pendant 1h et à température ambiante. Une ou deux des protéines GRA ont ensuite été révélées soit à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA2, -GRA3, ou -GRA7, puis son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488, soit à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-GRA6, puis son conjugué couplé à l'Alexa Fluor596. Ces images en fluorescence ont été acquises par un temps de pose de 5s (images **A,C,D**) ou 0.5s (image **B**). Barres d'échelles $50\mu\text{m}$.

Effet de la concentration

Le signal assez faible souligne que moins de protéines GRA s'associent aux membranes des GUVs après incubation HssVac qu'après incubation avec la fraction HssEs. Il est difficile d'évaluer la concentration en protéines GRA de la fraction HssVac, mais cette fraction est généralement beaucoup moins concentrée que la fraction HssEs. J'ai donc testé une fraction HssVac 5 fois plus concentrée (5X) (soit $75 \cdot 10^7$ équivalent-parasites par aliquote de 0.5ml). Un marquage successif des protéines GRA3 (anticorps monoclonal de souris anti-GRA3 puis conjugué anti-souris couplé à l'AlexaFluor488) et GRA2 (anticorps polyclonal de lapin anti-GRA2 puis conjugué anti-lapin couplé à l'AlexaFluor596) a été réalisé sur la même préparation de GUVs.

Les résultats sont mis en évidence sur une GUV observées selon deux plans (équateur et sommet) et dans les deux canaux de fluorescence (Fig.5.18). L'observation du le plan apical met en évidence un marquage en grains fins à la surface des GUVs pour GRA2, tandis que GRA3 présente une répartition en plus gros grains, de manière plus inhomogène, sur fond membranaire diffus, ce qui évoque le bourgeonnement de la GUV.

L'observation équatoriale souligne d'abondantes structures internes à la GUV, bien marquées par l'IF GRA3 ; GRA2 apparaît quant à elle majoritairement concentrée dans la zone de contact située sur la gauche de l'image.

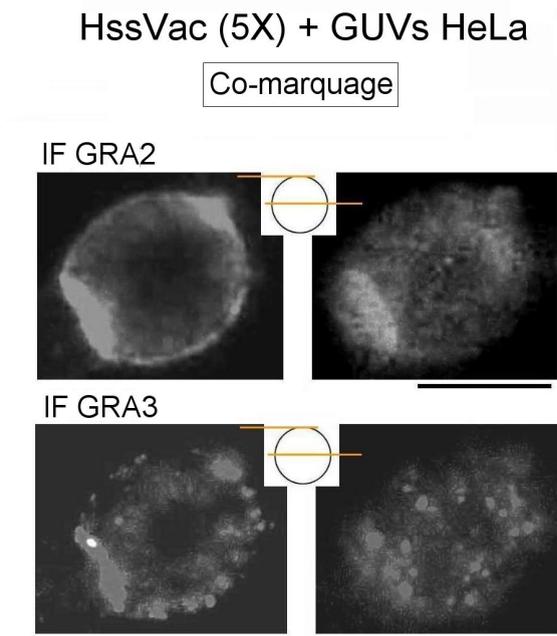


FIG. 5.18: Co-marquage des protéines GRA2 et GRA3 de la fraction HssVac concentrée (5X) associées aux GUVs HeLa. Les GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml de la fraction HssVac5X (soit $75 \cdot 10^7$ équivalent-parasites) pendant 1h et à température ambiante. Premièrement la protéine GRA3 a été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA3 suivi de son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488. Deuxièmement la protéine GRA a été révélée à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-GRA2, puis son conjugué couplé à l'Alexa Fluor596. Ces images en fluorescence ont été acquises par un temps de pose de 0.5s, sur une même vésicule. Barres d'échelles $50\mu\text{m}$.

Après avoir incubé les GUVs HeLa avec la fraction HssVac 5X, le signal obtenu par IF pour les protéines GRA2 et GRA3 est fort. Des structures de surface et internes aux GUVs apparaissent marquées, ce qui pourrait indiquer qu'il faut une concentration suffisante en protéines GRA pour les voir apparaître.

Bilan : Association des protéines GRA vacuolaires aux GUVs HeLa

Les protéines GRA2,3,6,7 de la fraction HssVac s'associent bien aux membranes des GUVs HeLa. Les localisations des protéines GRA de la fraction HssVac donnent des résultats comparables à ceux obtenus après incubation avec la fraction HssEs, à condition de travailler en concentration suffisante. Ces résultats confirment que la forme de solubilisation (sécrétée ou vacuolaire) n'altère ni la capacité d'association aux membranes, ni le comportement membranaire des protéines GRA.

5.3.7 Conclusion : Association des protéines GRA aux GUVs HeLa

1/ Les protéines testées, GRA2,3,6,7, sous leurs formes ultrasolubles sécrétées ou vacuolaires, s'associent bien aux membranes des GUVs HeLa. Elles présentent des caractéristiques de répartition variées :

- GRA2 paraît majoritairement associée aux zones de contact entre GUVs ;
- GRA6 forme un motif ponctué sur les membranes des GUVs et semble également marquer des

structures internes aux GUVs ;

- GRA7 forme un motif ponctué sur les membranes des GUVs et marque les zones de contact, ainsi qu'un réseau dense de fils membranaires ;
- GRA3 présente un marquage plus diffus et met en évidence des froissements des membranes des GUVs, ainsi que des structures internes aux GUVs.

2/ Les déformations membranaires ainsi mises en évidence vont être détaillées dans la section suivante. Il est difficile de déterminer, à ce niveau d'analyse, si les structures particulières observées (fils, bourgeons, petites vésicules) résultent directement des incubations avec la fraction HssEs. La spécificité de ces structures et l'implication éventuelle des protéines GRA dans leur formation seront discutées dans la section suivante de ce chapitre.

3/ Les analyses portant sur les fractions privées d'une protéine GRA (HssEs-KO GRA2 ou HssEs-KO GRA6) sont encourageantes. Elles font apparaître une interdépendance des protéines GRA2 et 6 pour leur association aux membranes des GUVs.

Remarque Le marquage très inhomogène de GRA6 pourrait être dû à l'anticorps polyclonal utilisé pour détecter cette protéine. En effet, c'est une des seules protéines GRA pour laquelle il n'y ait pas d'anticorps monoclonal disponible. Les anticorps polyclonaux ont donc été utilisés avec précaution au cours de ces expériences d'IF. C'est pourquoi très peu de co-marquages sont présentés, malgré tout l'intérêt de ce type d'approche.

5.4 Déformations des GUVs en présence des protéines GRA

Les IF sur les protéines GRA, sur les GUVs incubées avec la fraction HssEs, font apparaître diverses structures membranaires : micro-environnements à la surface des GUVs, structures internes aux GUVs, fils membranaires. Ces déformations membranaires nous amènent à étudier l'implication des protéines GRA dans leur apparition. Cette analyse se rattache à la problématique autour de la fonction des protéines GRA dans la biogénèse de la vacuole : les protéines GRA2, 6 et 7 ont un rôle potentiel dans l'organisation de certaines structures membranaires (RNM, HOSTs).

Dans cette section j'ai cherché tout d'abord à exploiter l'observation, en contraste de phase, des incubations des GUVs HeLa avec la fraction ultrasoluble HssEs. J'ai ensuite recensé les structures membranaires observées en IF : pour cela les images obtenues dans la section précédente sont reprises et présentées différemment, afin de tenter de préciser la nature des structures observées en fluorescence et l'implication des protéines GRA dans leur formation. Cela a nécessité dans certains cas, quelques expériences complémentaires. Cette analyse reste cependant préliminaire, le but de cette section étant d'ouvrir des hypothèses de travail autour des problématiques évoquées.

5.4.1 Suivi des incubations des GUVs HeLa avec la fraction HssEs

Afin mettre en évidence la dynamique de formation des structures membranaires à partir des GUVs, j'ai réalisé des suivis des incubations avec la fraction ultrasoluble HssEs. Les observations ont été réalisées en contraste de phase, puisqu'à ce stade de l'expérience les protéines GRA ne sont pas encore marquées par IF.

Suivi des GUVs HeLa incubées avec la fraction HssEs

La grande majorité des GUVs ne subissent pas de déformations visibles au cours de l'incubation avec la fraction HssEs (Fig.5.19 A). Comme cela est mis en évidence par le contour tracé en pointillés, leur forme et leur diamètre restent constants. Cependant, certaines GUVs manifestent une nette diminution de taille pendant l'incubation (Fig.5.19 B); la GUV montrée dans cette séquence passe d'un diamètre de $37\mu\text{m}$ à $18\mu\text{m}$ au cours de l'heure d'incubation. La formation d'excroissances est visible à la surface de ces GUVs, évoquant un bourgeonnement. L'incubation avec la fraction HssEs apparaît donc pouvoir induire l'instabilité des membranes des GUVs HeLa, cependant ces effets sont très marginalement observés. Par exemple, l'observation d'un champ d'une trentaine de GUVs ne permet pas systématiquement d'en voir une se déformer.

En contrôle, une incubation des GUVs HeLa en milieu D10 a été réalisée, afin d'évaluer les artefacts induits par le changement de solution, et également par les protéines accessoires présentes dans le D10 (protéines du sérum) (Fig.5.19 C). Aucune variation visible n'a pu être mise en évidence au cours des incubations réalisées : le contour tracé en pointillés montre que les GUVs restent stables en taille et en forme. Il faut nuancer ce résultat en précisant que seules deux incubations en D10 ont été suivies, sur un champ d'observation de 10 à 30 vésicules chaque fois.

Implication des protéines GRA

Afin de tester l'implication des protéines GRA dans les reliefs de surface observés sur certaines GUVs, une GUV en cours de déformation a été suivie après l'incubation HssEs, et ce jusqu'à la fin du marquage en IF de la protéine GRA3.

Le suivi des incubations (Fig.5.19 D) met en évidence que les déformations se poursuivent au cours des heures d'incubation avec les anticorps, donc après l'élimination des protéines du HssEs non associées aux membranes. Cela indique un processus actif de déformation, qui n'est pas dû qu'à l'apport continu de nouvelles molécules qui s'associent et déstabilisent la membrane.

Le marquage en IF de la protéine GRA3 montre qu'elle est associée à la GUV bourgeonnante suivie mais également aux GUVs avoisinantes qui n'ont pas manifesté de déformations.

La protéine GRA3 apparaît clairement associée aux reliefs de la GUV centrale. Le marquage par GRA3 des GUVs non déformées laisse envisager deux hypothèses : i) l'association de la protéine n'est pas toujours corrélée à l'apparition de déformations membranaires ; ii) les effets sur les GUVs sont généralement de moindre ampleur et ne résultent pas en altérations dramatiques sur le diamètre et la forme des GUVs.

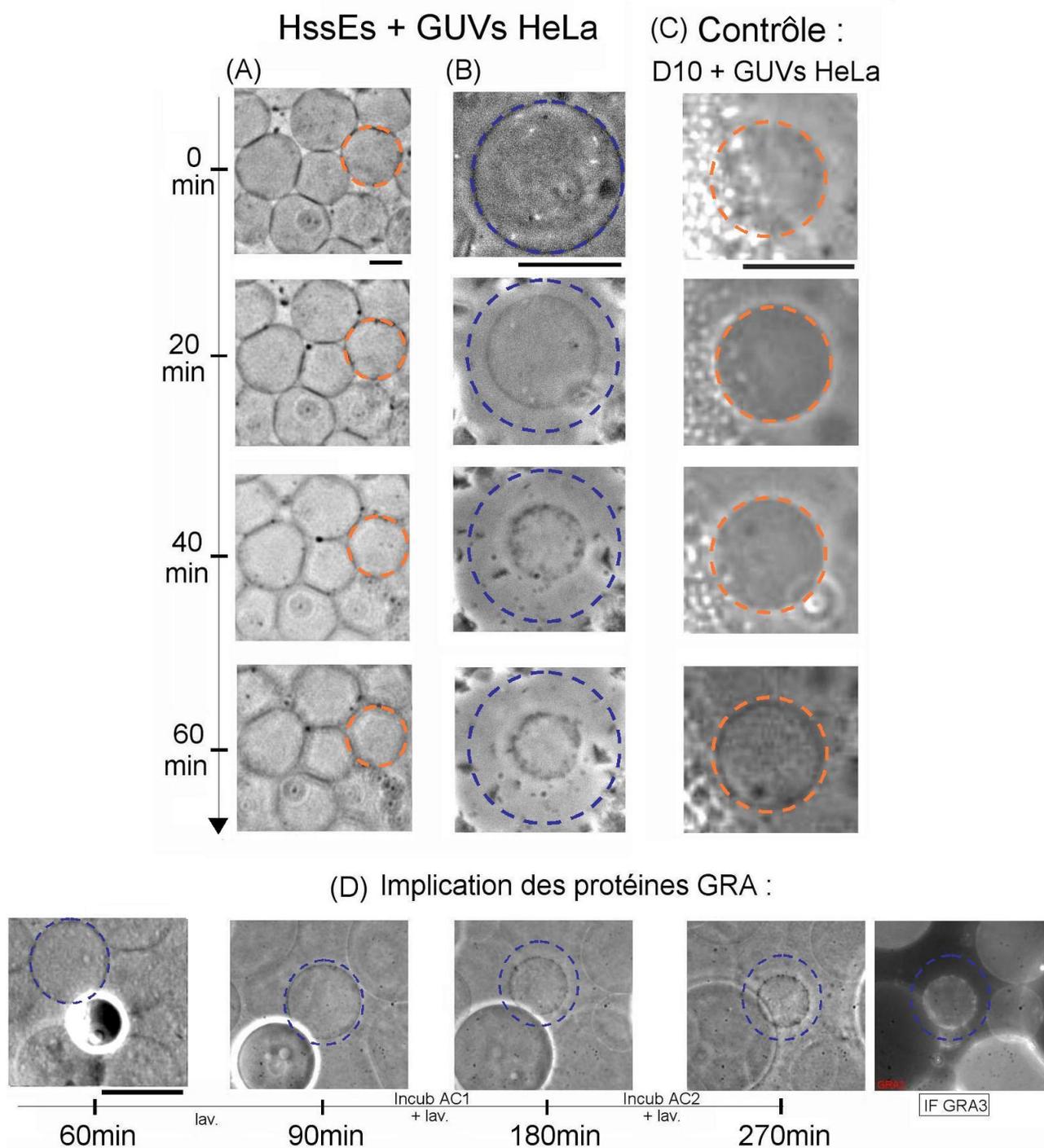


FIG. 5.19: Suivis des GUVs au cours des incubations avec la fraction HssEs ou avec le milieu D10. Après injection de 0.5ml de la fraction HssEs (séries **A,B,D**) ou du milieu D10 (série **C**) dans la chambre d'électroformation, les effets sur les GUVs HeLa ont été suivis en contraste de phase. En **D**, la protéine GRA3 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA3 et son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488. Barres 25 μ m.

Bilan : Suivi des incubations

L'incubation de GUVs HeLa avec la fraction HssEs semble pouvoir produire des déformations sur certaines membranes, qui ne sont pas reproduites par incubation avec le D10. On a pu démontrer l'association d'une protéine GRA (GRA3) aux reliefs membranaires générés, ce qui permet d'envisager son implication dans le processus de déformation. Cependant, cette question ne peut pas être résolue par ces expériences, la fraction HssEs étant riche en protéines autres que les protéines GRA, dont l'influence possible ne doit pas être négligée.

L'IF permet d'obtenir des résultats plus pertinents que ce suivi en contraste de phase, quant à l'effet des protéines GRA sur les membranes des GUVs, bien qu'elle ne donne pas accès à la dynamique des déformations. En effet, le marquage fluorescent permet de distinguer de structures submicroniques si elles sont bien contrastées et la localisation des protéines GRA permet le ciblage des structures dans lesquelles elles interviennent. Cependant, l'idéal serait bien entendu de disposer de protéines préalablement marquées par un fluorophore, ce qui permettrait le suivi de ces protéines dès le début de l'incubation avec les membranes.

Je vais à présent recenser les structures particulières observées et marquées par certaines protéines GRA, et j'essaierai d'en préciser la nature : structures de surface, structures internes des GUVs, réseau de fils.

5.4.2 Structures de surface des GUVs

Les IF des protéines GRA2,6,7 ont révélé un motif piqueté à la surface des membranes (Fig.5.20 A à C). Par contraste, GRA3 semble répartie de manière plus diffuse (Fig.5.20 D) ; elle souligne tout de même l'irrégularité de la membrane en mettant en lumière des froissements de la surface. Pour mémoire le contrôle GRA1, qui ne marque pas d'association notable aux membranes, a montré que l'autofluorescence des membranes reste diffuse et homogène, après le protocole complet d'IF (Fig.5.20 E) : ce n'est donc pas une réorganisation des molécules autofluorescentes qui est à l'origine de ces motifs.

Ainsi ces motifs ponctués ou piquetés sont révélateurs d'une forte concentration locale des protéines GRA2,6 et 7. La ségrégation des protéines dans ces micro-environnements semble indiquer qu'ils se distinguent du reste de la membrane par une composition lipidique (e.g. radeaux lipidiques) et/ou une courbure particulière (e.g. bourgeons) ; cependant on ne peut pas exclure l'existence d'agrégats de protéines, adsorbées ou mal stabilisées dans les membranes, qui tendraient ainsi à s'agréger au sein des membranes.

Association de la protéine GRA7 de HssEs aux GUVs EPC

Afin de déterminer si les marquages ponctués observés correspondent à des agrégats protéiques, une incubation de la fraction HssEs avec des GUVs formées d'EPC a été réalisée, dans les mêmes conditions que celles décrites en début de section pour les GUVs HeLa. Les GUVs EPC, de composition lipidique homogène, ne permettent pas la formation de microdomaines. De plus, elles sont

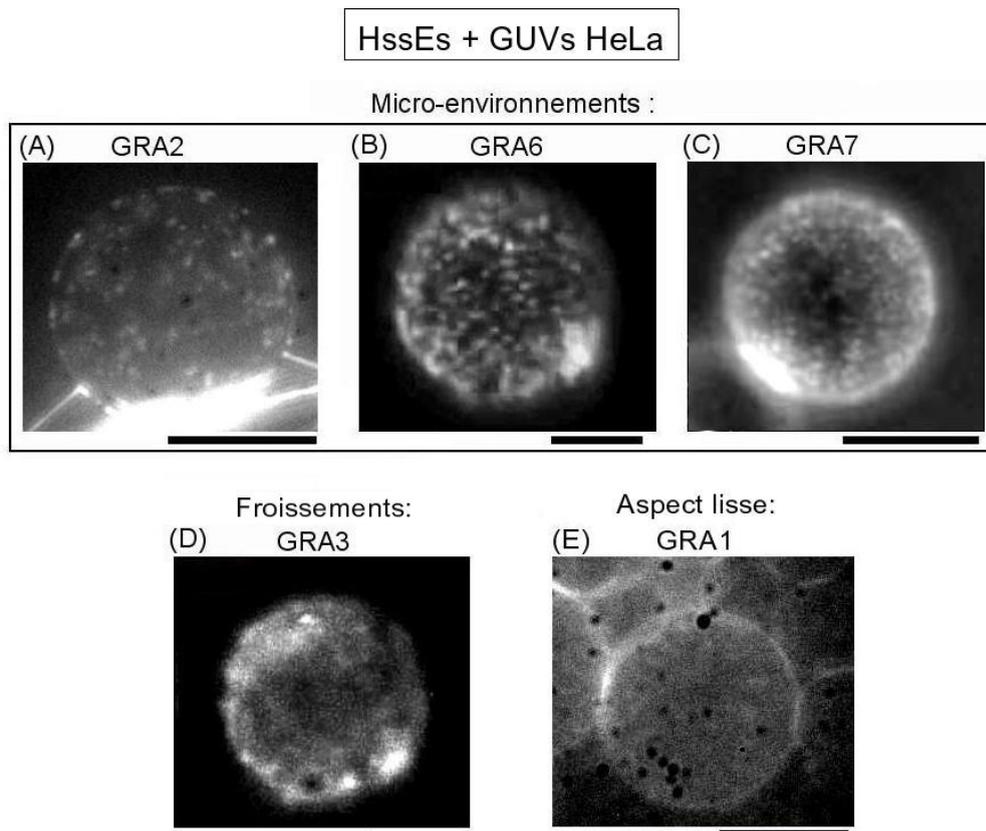


FIG. 5.20: Motifs observés en surface des GUVs HeLa. Les images ont été obtenues lors des expériences d'IF sur des GUVs HeLa après incubation avec la fraction HssEs : IF GRA2 (image **A**), IF GRA6 (image **B**), IF GRA7 (image **C**), IF GRA3 (image **D**) ou IF GRA1 (image **E**). Images issues des figures 5.13, 5.15, 5.16, 5.12. Barres 25 μ m.

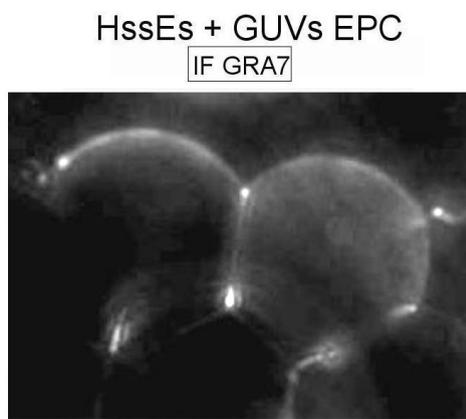


FIG. 5.21: Association de la protéine GRA7 de la fraction HssEs à des GUVs EPC. Des GUVs EPC ont été incubées avec 0.5ml de la fraction HssEs, centrifugée et de pH ajusté à 7.4, pendant 1h à température ambiante. La protéine GRA7 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA7, puis son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488. L'image en fluorescence a été acquise par un temps de pose de 5s. Barre 25 μ m.

peu propices aux déformations puisque les lipides s'organisent en phase lamellaire (phase liquide ordonnée) et ont une courbure spécifique homogène. J'ai choisi de suivre la protéine GRA7 par IF car elle présente un motif ponctué très net et contrasté sur les GUVs HeLa (voir Fig.5.15 A). Les expériences de biochimie ont indiqué, par ailleurs, que cette protéine était capable de s'associer aux SUVs EPC.

Le signal obtenu est faible (détectable par un temps long d'exposition, 5s), indiquant que la protéine s'associe aux GUVs EPC en moins grande proportion qu'aux GUVs HeLa. GRA7 apparaît répartie de manière diffuse à la surface des GUVs, et plus particulièrement aux points extrêmes des jonctions entre GUVs (Fig.5.21).

La protéine GRA7 s'associe aux GUVs EPC. On ne distingue pas de marquage piqueté sur les membranes : cette protéine ne forme pas donc d'agrégats protéiques dans des membranes homogènes formées d'EPC.

Bilan : Structures de surface des GUVs

La formation de micro-environnements, concentrés en protéines GRA2,6,7, semble dépendre de la composition lipidique de la membrane. La ségrégation de protéines et de lipides dans ces domaines pourrait être favorable à la génération de déformations membranaires locales. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de l'irrégularité de la membrane par IF sur GRA3.

5.4.3 Structures internes

Un marquage diffus, indiquant l'existence de structures moins contrastées que les membranes, a été observé à l'intérieur des GUVs à plusieurs reprises, au cours des IF GRA3, mais aussi GRA6 et GRA7 (Fig.5.22 A,B,C). Par ailleurs des structures internes ont également été observées dans les GUVs incubées avec la fraction HssVac (Fig.5.22 C). A fort grossissement et en forçant les contrastes, on distingue des structures qui pourraient correspondre à des filaments de faible diamètre, plus ou moins enchevêtrés.

On ne peut néanmoins pas exclure que ces structures soient des éléments purement protéiques de la fraction ultrasoluble, assemblés entre eux et formant des structures fibreuses. Il est possible que les GUVs encapsulent de grosses molécules au cours du protocole d'IF : lors des lavages, les tensions générées sur les membranes peuvent induire l'ouverture de pores transitoires de plusieurs microns [Karatekin et al., 2003, Sandre et al., 1999]. Cela est mis en évidence par l'encapsulation des anticorps secondaires au cours de la dernière incubation de notre protocole d'IF. Néanmoins les anticorps apparaissent être progressivement libérés lors du lavage subséquent. La persistance des structures décrites ici semble donc indiquer qu'elles sont rattachées aux membranes des GUVs.

Si ces structures sont bien des invaginations de la membrane des GUVs, il est envisageable que des structures équivalentes, dirigées vers l'extérieur des GUVs, soient présentes mais dans ce cas mal contrastées du fait de la continuité du tapis de GUVs. En effet, d'une part, les protéines diffusent presque librement entre les solutions internes et externes des GUVs, comme cela vient d'être expliqué ; d'autre part, à l'échelle d'une protéine, la membrane d'une GUV de plusieurs dizaines de microns de diamètre, peut être considérée comme plane. Ainsi, quelque soit le mécanisme de tubula-

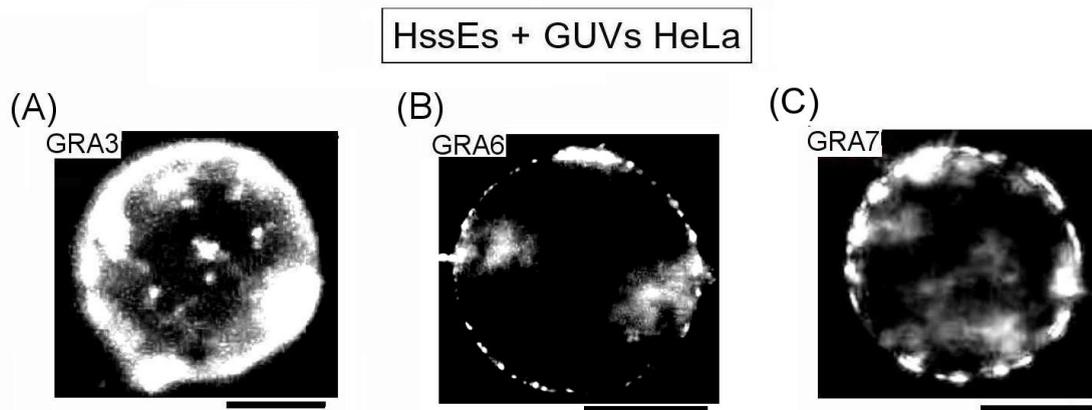


FIG. 5.22: Structures internes des GUVs HeLa. Les images ont été obtenues lors des expériences d'IF sur des GUVs HeLa après incubation avec la fraction HssEs : IF GRA3 (image **A**), IF GRA6 (image **B**) et IF GRA7 (image **C**). Images issues des figures 5.16, 5.13, 5.15. Barres $25\mu\text{m}$.

tion mis en jeu, il devrait produire des protrusions tout autant que des invaginations de la membrane des GUVs.

Bilan : Structures internes aux GUVs

Des structures filamenteuses sont distinguables à l'intérieur des GUVs, et apparaissent rattachées à la membrane des GUVs. Elles pourraient correspondre à des invaginations de ces membranes. Elles sont marquées par les protéines GRA3, 6 et 7.

5.4.4 Réseau de fils membranaires

Les IF GRA2 et GRA7 marquent toutes deux des fils membranaires. Cependant, l'IF GRA7 a fait apparaître un réseau dense de fils, marqué de manière ponctué, qui n'a pas été observé de manière identique par IF sur GRA2. L'observation à fort grossissement des fils marqués par l'IF GRA2 (Fig.5.23 **A**) montre des fils marqués de manière diffuse, avec des zones plus intenses qui semblent correspondre à des irrégularités de la membrane (amas membranaires). L'orientation de ces fils dans la même direction suggère un rôle majeur du flux appliqué dans la chambre dans leur formation.

Par contraste, l'observation à fort grossissement des fils marqués par l'IF GRA7 (Fig.5.23 **B**) montre que la protéine est répartie en segments régulièrement espacés le long du fil. Cette répartition évoque l'assemblage de la protéine en anneaux autour de la membrane. Cette hypothèse a déjà été émise par Coppens et al. suite à leurs observations en microscopie électronique [Coppens et al., 2006]. De plus, les fils apparaissent s'entrecroiser et former un réseau dense, radicalement différent du faisceau observé lors de l'IF GRA2.

Les caractéristiques des fils observés ne peuvent pas être précisées par ces images : leur diamètre apparaît inférieur à $1\mu\text{m}$ et n'est donc pas résolu sur ces images. Leur longueur ne peut pas être mesurée avec précision car leurs extrémités se perdent dans des zones plus riches en GUVs, mais il est clair que certains font plusieurs dizaines de μm .

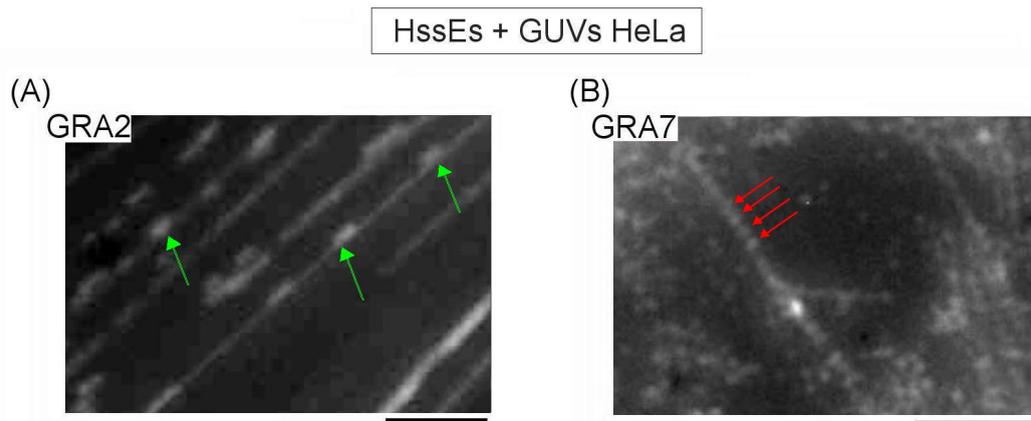


FIG. 5.23: Réseau de fils membranaires. Les images ont été obtenues lors des expériences d'IF sur les GUVs HeLa incubées avec la fraction HssEs : IF GRA2 (image **A**) ou GRA7 (image **B**). En (**A**), les flèches vertes indiquent des amas membranaires, marqués par GRA2. En (**B**), les flèches rouges indiquent le marquage punctiforme et régulier de GRA7. Images issues des figures 5.13, 5.15. Barres $10\mu\text{m}$.

Influence de GRA2

Afin de mettre en évidence un rôle éventuel de GRA2 dans la formation de ce réseau de fils, une IF GRA7 a été réalisée après incubation des GUVs HeLa avec la fraction HssEs-KO GRA2. Le protocole suivi est celui détaillé à la section précédente.

Le signal de fluorescence détecté est intense, détectable sur un temps court d'acquisition (0.5s), comme après incubation des GUVs avec la fraction HssEs : l'absence de GRA2 ne semble pas altérer la capacité d'association de GRA7 aux membranes. Les membranes des GUVs apparaissent marquées en fluorescence de petits points très irréguliers (Fig.5.24 **A**) qui peuvent évoquer l'agrégation de GRA7. On observe toujours des fils marqués par GRA7 dans une zone pauvre en GUVs (Fig.5.24 **B**). L'aspect du réseau semble néanmoins différent de celui observé lors de l'incubation avec HssEs (voir Fig.5.23 **B**) : leur structure semble moins fine et la répartition de GRA7 plus irrégulière ; de nombreuses GUVs y sont accrochées.

L'absence de GRA2 ne semble pas altérer les capacités d'association membranaire de GRA7, mais elle influe par contre sur sa localisation : le marquage GRA7 apparaît beaucoup plus irrégulier en l'absence de GRA2, et le réseau de fils membranaires apparaît moins structuré.

Bilan : Réseau de tubes membranaires

De longues structures tubulaires sont observées dans la chambre, auxquelles GRA2 et GRA7 sont associées : GRA2 de manière assez diffuse, GRA7 en points réguliers. Le flux appliqué dans la chambre joue certainement un rôle en emportant des GUVs attachées au film lipidique, qui tirent donc des fils dans leur sillage. Cependant, la protéine GRA2 pourrait jouer un rôle dans l'homogénéité et l'organisation de ces tubes membranaires.

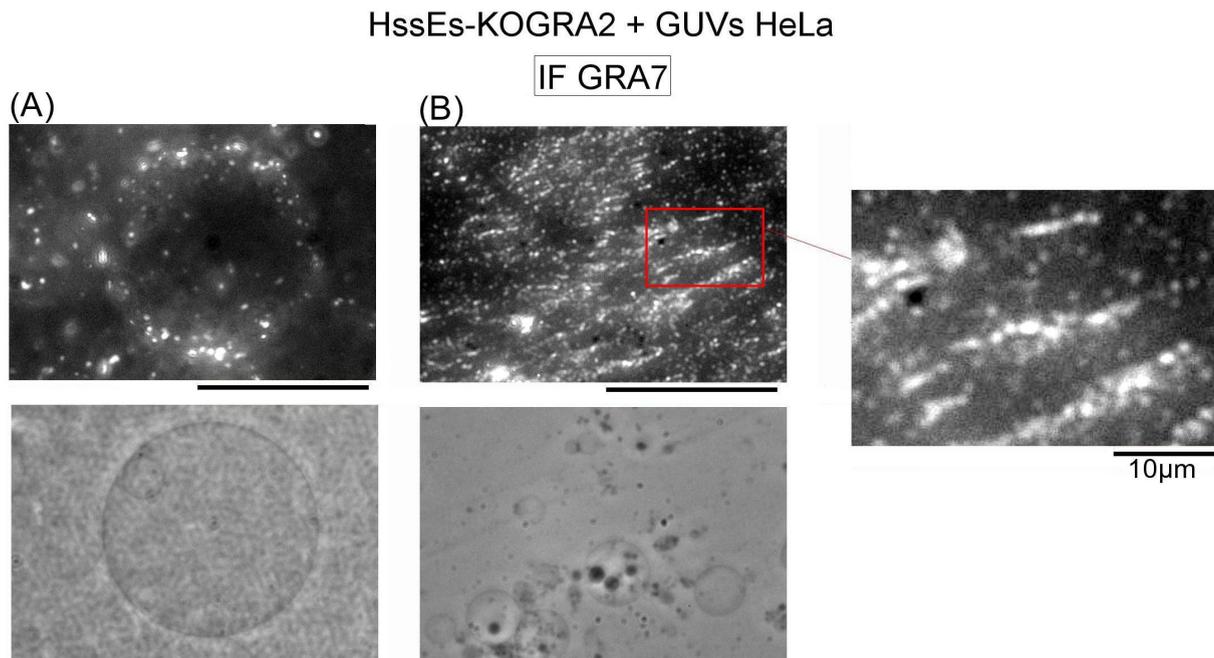


FIG. 5.24: Association de GRA7 de la fraction HssEs-KOGRAM2 à des GUVs HeLa. Des GUVs HeLa ont été incubées avec 0.5ml de la fraction HssEs-KOGRAM2, centrifugée et de pH ajusté à 7.4, pendant 1h à température ambiante. La protéine GRA7 a ensuite été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GRA7, puis son conjugué couplé à l'Alexa Fluor488. Les images en fluorescence ont été acquises par un temps de pose de 0,5s. Barre 50µm (sauf indication contraire). L'encart indique la zone montrée à plus grossissement.

5.4.5 Conclusion : Déformations membranaires

Les incubations des GUVs HeLa avec la fraction HssEs semblent induire des déformations des membranes des GUVs. Il semble donc qu'on puisse impliquer des produits sécrétés par les parasites. L'association de certaines protéines GRA aux structures apparues en fait de bonnes candidates. Les IF sur GUVs sont un outil de choix pour mettre en évidence l'effet de certaines protéines GRA sur les membranes.

1/ Les protéines GRA2, 6, et 7 sont concentrées dans des micro-environnements de la membrane des GUVs. Ces micro-environnements sont sans doute de composition lipidique particulière ; cela pourrait constituer des zones favorisant des déformations.

3/ Les protéines GRA3, 6 et 7 sont associées à des structures formées de filaments et de bourgeons, partant de la membrane vers l'intérieur des GUVs.

2/ Les protéines GRA2 et 7 sont associées à de longues extensions membranaires. La protéine GRA2 semble impliquée dans l'homogénéité des tubes obtenus.

A ce niveau d'analyse, on ne peut pas déterminer à quel stade les protéines GRA s'associent à ces structures : soit avant / au cours de leur formation, auquel cas elles pourraient y être impliquées ; soit *a posteriori*, par préférence pour les propriétés particulières de ces structures (courbure, composition lipidique).

5.5 Conclusion générale

Le fait d'être parvenue à établir une méthode qui permette d'observer les protéines GRA associées à des membranes-modèles est en soi un aboutissement important, qui ouvre de larges perspectives pour la poursuite du sujet. Le système pourrait à présent se prêter à des méthodes plus élaborées de microscopie, en particulier la Spectroscopie à Corrélation de Fluorescence (FCS) dans le but d'étudier la mobilité des protéines.

Les protéines GRA testées, GRA2,3,6,7, apparaissent s'associer spontanément aux GUVs de composition lipidique adaptée (ici mélange HeLa), confirmant les résultats obtenus par des méthodes biochimique sur les SUVs. Des caractéristiques de localisation différentes ont été mises en évidence pour ces protéines, en particulier au niveau de structures membranaires particulières (micro-environnements de surface, froissements, structures internes, réseaux de fils externes), qui seront à discuter. Les protéines GRA semblent de bonnes candidates pour la formation des structures évoquées, même si leur implication directe n'est pas démontrée pour le moment.

Tous ces résultats vont être recoupés avec ceux obtenus par des méthodes biochimiques, au niveau de la Discussion Générale des résultats, afin d'apporter des éléments de réponse aux questions posées à l'origine du projet, en particulier quant aux fonctions des protéines GRA.

Contributions

Annie Viallat (INSERM UMR 600 / CNRS UMR6212, Marseille) est une des instauratrices du projet de par sa compétence dans le domaine des vésicules géantes. Appartenant au LSP au début de ma thèse, elle a largement contribué à la mise en place du travail sur GUVs. Sous sa conduite, un dispositif de micro-injection a été mis en place et testé au cours de mon stage de DEA, puis développé pour l'immunomarquage par Ayman Rammal (Stage de Master1 Physique, Université Joseph Fourier - Grenoble I). Victoria Vitkova (Institute of Solid State Physics, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgarie), en visite au LSP au début de mon travail, a été d'une grande aide sur ce travail préliminaire, en conduisant les premières expériences de micro-injection. Pierre Nassoy (UMR 168 CNRS / Institut Curie, Paris) a généreusement fourni un lot de lames passivées selon différents protocoles, ce qui nous a permis d'identifier un type de traitement adapté à nos conditions expérimentales. Enfin Philippe Moreau (LSP) a joué un rôle majeur pour toutes les réalisations techniques, en particulier pour la conception et la réalisation de la chambre d'électroformation à flux.

Discussion :

Apports à la problématique biologique

et enjeux physiques

Chapitre 6

Bilan et perspectives

Ce chapitre final a pour but de rassembler les résultats obtenus par les deux volets expérimentaux et d'en tirer des hypothèses de travail quant aux caractéristiques des protéines GRA, dans le but d'une poursuite de leur étude *in vitro*. Dans un premier temps, les résultats majeurs obtenus au cours de ces travaux vont être rappelés, en se focalisant sur les protéines GRA_{2,3,6,7} qui ont été les mieux caractérisées, car bien détectables. Les problématiques identifiées et détaillées au Chapitre 2 vont être reprises et commentées à la lumière de ces nouvelles données, et en indiquant les études à compléter à court terme. Enfin des analyses plus approfondies sont proposées sur la base des éléments de réponse apportés, en particulier dans le domaine de la spectroscopie de fluorescence dont nous avons envisagé diverses possibilités d'application au cours de cette thèse. La poursuite de ces études requiert le développement de méthodes permettant la purification des protéines GRA (taggées ou sous formes recombinantes), afin de mieux contrôler les paramètres du système *in vitro*.

6.1 Bilan des résultats

6.1.1 Formes solubles des protéines GRA

L'étude par séparation isopycnique réalisée sur les fractions ultrasolubles a montré que les protéines GRA sont solubilisées sous des formes variables au cours de leur trafic (voir Paragraphe 4.3.2 "Bilan comparatif : formes de solubilisation des protéines GRA"). Les formes des protéines GRA_{3,6,7} présentent un schéma unique d'évolution (Fig. 6.1, resp. en vert, rouge, turquoise) : elles sédimentent dans des zones de faible densité sous leurs formes vacuolaires, et de densités plus élevées sous leurs formes granulaires, en passant par des densités intermédiaires juste après sécrétion. Bien que cette méthode nous donne accès à la densité (relative) et non à la taille des structures séparées, l'interprétation la plus simple de ces données se fait en termes de formation de complexes : on considère que l'augmentation de densité révèle généralement une multimérisation, plutôt qu'une compaction des protéines considérées.

Dans la fraction soluble vacuolaire (cellule infectée), les protéines GRA sont rassemblées dans

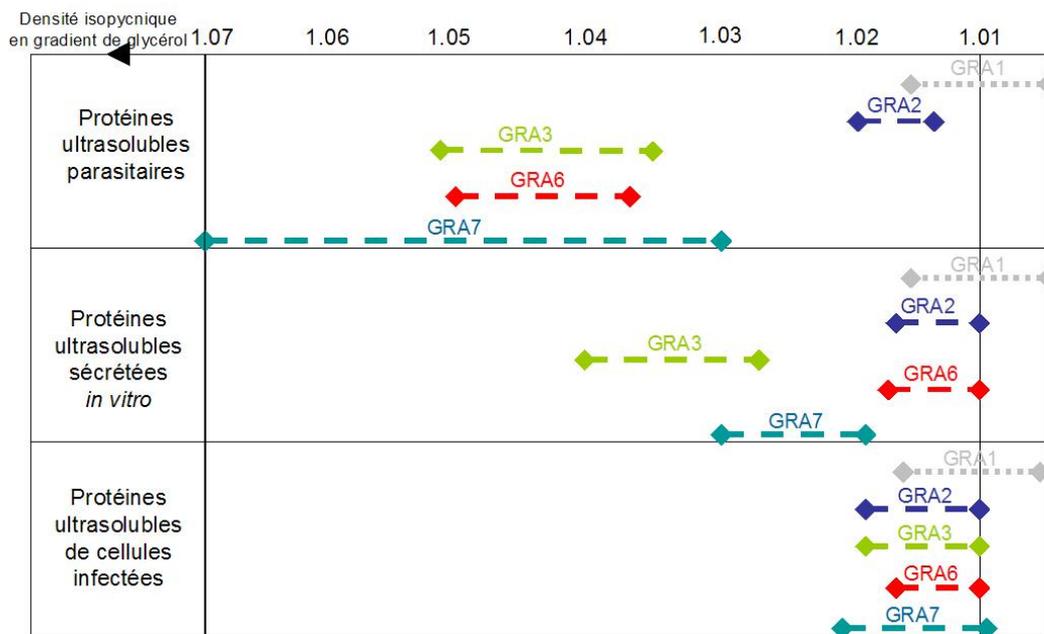


FIG. 6.1: Evolution des densités isopycniques des formes de solubilisation des protéines GRA2,3,6,7 au cours de leur trafic : dans les granules denses, après sécrétion *in vitro* et dans la vacuole.

une zone de faible densité, où on retrouve également le contrôle "protéine soluble" GRA1, indiqué pour comparaison (en gris). Cette faible densité isopycniue indique que les protéines y sont sous des formes monomères ou en petits assemblages.

Dans les autres fractions, la densité plus élevée est révélatrice d'assemblages plus imposants. Dans la fraction soluble sécrétée *in vitro*, il a été montré que ces structures sont maintenues par des interactions essentiellement hydrophobes : cela suggère que ce sont leurs TMDs qui sont impliqués dans la formation de ces structures. Par ailleurs, la présence des lipides du sérum apparaît jouer un rôle majeur pour la solubilisation correcte de ces trois protéines (voir Sous-section 4.2.4 "Rôle des lipides du sérum"), probablement en aidant à isoler les zones hydrophobes du solvant aqueux environnant.

Le cas de la protéine GRA2 est considéré à part car les formes solubles de cette protéine présentent une densité isopycniue beaucoup moins variable, plutôt faible, dans tous les cas : dans les granules denses, après sécrétion *in vitro*, dans la vacuole (Fig.6.1, en bleu). Ce résultat semble indiquer que GRA2 reste disponible à tout moment de son trafic sécrétoire, sous une forme monomère ou en petit assemblage. On peut préciser que des travaux en cours au LAPM suggèrent fortement la dimérisation de cette protéine [Bittame et al., communication personnelle].

6.1.2 Association spontanée des protéines GRA à des membranes-modèles

Les protéines GRA2,3,7 des trois fractions solubles se sont révélées capables de s'associer aux membranes purement lipidiques des GUVs et des SUVs composées de lipides de cellules HeLa, sans apport d'énergie ; cela semble être également le cas de GRA6 malgré des résultats moins clairs (voir Paragraphe 4.3.3 "Evolution des capacités d'interactions membranaires des protéines GRA" et Section 5.3 "Observation en fluorescence des protéines GRA associées aux GUVs").

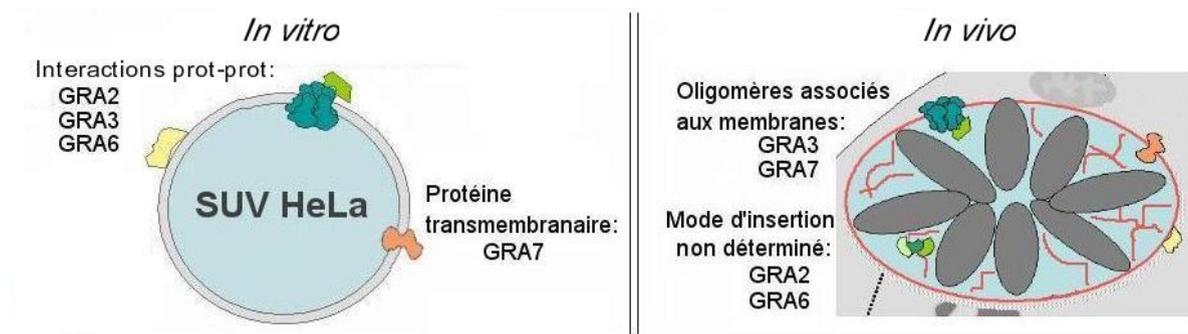


FIG. 6.2: Modes d'association des protéines GRA *in vitro* et *in vivo*.

Cependant leur mode d'association, étudié sur les SUVs HeLa (voir Sous-section 4.4.2 "Mode d'association"), semble variable pour les diverses protéines. Seule GRA7 présente un comportement typique de protéine transmembranaire (Fig. 6.2). Pour les autres protéines GRA, les interactions protéine-protéine semblent jouer un rôle majeur dans leur stabilisation, à la différence de ce qui est observé dans la vacuole où les interactions hydrophobes prédominent.

Nous avons observé que la composition lipidique des SUVs est un paramètre important pour l'association des protéines GRA2 et GRA6, mais pas pour GRA3 et GRA7 : ces dernières sont capables de s'associer à des membranes simples formées d'EPC. Nous avons observé par ailleurs que la protéine GRA2 lie les phosphoinositides, comme cela avait été montré précédemment pour GRA7 [Coppens et al., 2006].

6.1.3 Localisation des protéines GRA associées à des membranes

Les expériences d'immunofluorescence sur GUVs (voir Section 5.3 "Observation en fluorescence des protéines GRA associées aux GUVs") ont révélé des profils de répartition variés des protéines associées aux membranes de GUVs HeLa (Fig. 6.3). A la membrane des GUVs, les protéines GRA2,6,7 apparaissent réparties en micro-environnements, tandis que GRA3 présente un marquage assez diffus. A l'intérieur des GUVs sont distinguées des structures sub-microniques qui correspondent probablement à des enchevêtrements de fils membranaires.

Ainsi les protéines GRA3,6,7 apparaissent associées à des structures qui pourraient être des invaginations des membranes des GUVs : ces protéines peuvent être impliquées dans la génération de ces déformations. Il n'a cependant pas été possible de suivre la dynamique des déformations, du fait du protocole d'IF indirecte appliqué dans ces expériences. On ne peut donc pas conclure si ces protéines GRA sont impliquées dans la génération des formes membranaires auxquelles elles sont associées, ou si l'association a eu lieu postérieurement à la déformation.

Les zones de contact apparaissent fortement marquées par la protéine GRA2, et également par GRA7, bien que de manière moins contrastée. La concentration de GRA2 dans les zones de contact entre GUVs est inattendue et nous incite à envisager un rôle dans la fusion ou l'amarrage de membranes pour cette protéine. Ces deux protéines marquent également de longs fils membranaires, de

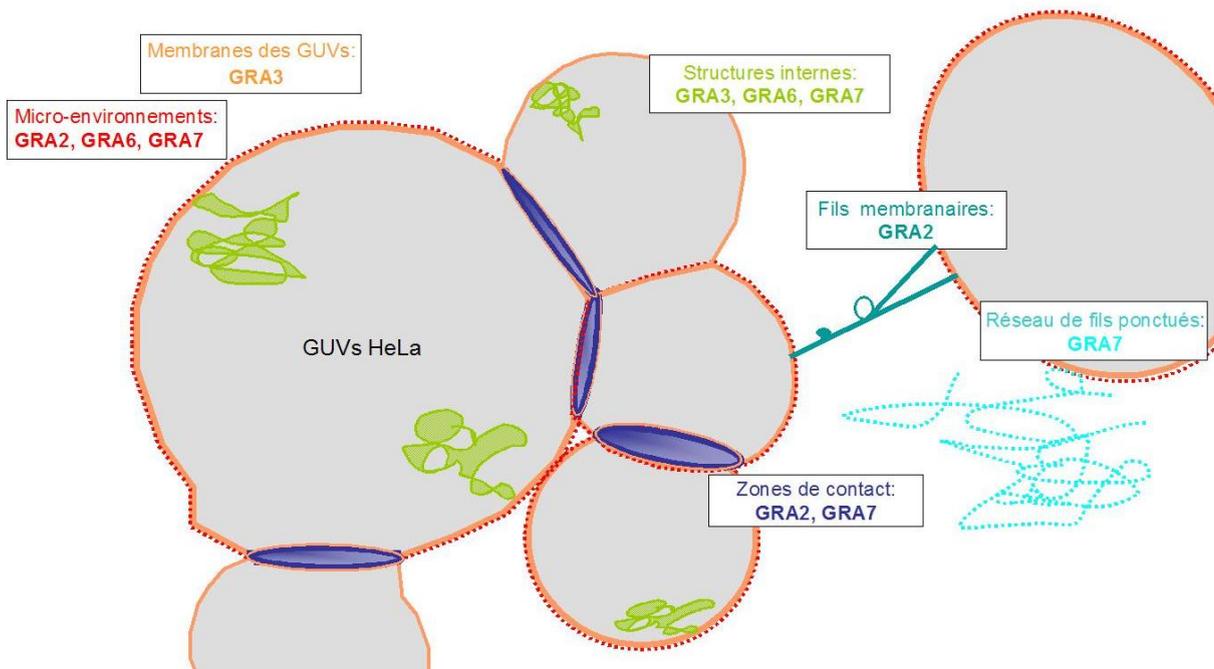


FIG. 6.3: Répartition des protéines GRA sur les membranes des GUVs HeLa.

diamètre sub-micronique, tirés à travers la chambre : GRA2 y est associée de façon diffuse, alors que GRA7 présente un marquage punctiforme régulier. Ici c'est le mécanisme de formation de ces fils qui est peu clair : on ne peut pas complètement exclure que ce soit un artefact dû à l'application de flux dans la chambre d'observation. Cependant le fait que ces deux protéines soient supposées tubulogènes dans la vacuole nous incite à considérer sérieusement l'implication de GRA2 et GRA7 dans la formation de ces fils.

6.2 Protéines GRA en solution : Nature des structures de solubilisation

Les résultats présentés ci-dessus apportent des informations sur le mode de solubilisation des protéines GRA, en particulier celles qui contiennent des TMDs. A ce niveau d'analyse, on ne peut que fournir des hypothèses quant aux structures de solubilisation mises en évidence. Les éléments constituant ces structures ainsi que leur mode d'association sont pour le moment totalement inconnus. Les protéines GRA apparaissent associées à des structures stabilisées par des interactions hydrophobes dans les granules denses et juste après sécrétion *in vitro*. Comment définir ces structures ? La notion de complexe fait généralement référence à des entités assemblées fonctionnellement et spécifiquement. Par opposition, la notion d'agrégats évoque l'association non spécifique, généralement médiée par des interactions hydrophobes, de protéines mal repliées et destinées à la

dégradation. La formation d'agrégats est généralement irréversible.

Je discuterai tout d'abord la question de la nature des structures contenant les protéines GRA solubles, puis je proposerai un scénario potentiel pour le trafic des protéines GRA solubles depuis les granules denses jusqu'à leurs membranes-cibles, sur la base des nouvelles données obtenues.

6.2.1 Dans les granules denses : complexes ou agrégats ?

Le cas des protéines GRA stockées dans les granules denses est particulier, amenant à affiner encore les définitions des complexes et agrégats données ci-dessus. Le contenu des DGs de *T. gondii* est généralement décrit comme agrégé, bien que cette agrégation soit dans ce cas réversible. L'état des connaissances dans le domaine de la sécrétion régulée, qui concerne seulement quelques types cellulaires spécialisés et quelques métazoaires, peut nous aider à définir cet état particulier, bien que les granules denses de *T. gondii* constituent une voie de sécrétion à part. Dans les granules de *Tetrahymena* (protozoaire Cilié), ou dans les granules chromaffines de cellules pancréatiques, les protéines stockées sont compactées dans des réseaux réticulés. Ces réseaux sont constitués d'un petit nombre de protéines de "coeur" capables de cristalliser [Turkewitz, 2004, Nanavati & Fernandez, 1993]. Le processus d'exocytose, généralement déclenché en réponse à la présence de calcium, consiste en un changement de conformation de ces protéines : le réseau subit une expansion brutale qui éjecte son contenu à l'extérieur de la cellule. Ainsi les protéines stockées ne sont pas simplement agrégées ; elles sont au contraire maintenues en ordre compact par le réseau du coeur du granule.

Il est probable que les protéines GRA subissent un arrangement de ce type au sein des granules denses, bien que les DGs n'appartiennent pas vraiment à une voie de sécrétion régulée, en particulier parce que des stades immatures n'en ont pas été observés. Cependant, ce modèle peut permettre de mieux comprendre les résultats obtenus. Dans cette hypothèse, il faut envisager que la lyse des parasites induise une dissociation artificielle, au moins partielle, du coeur et la libération des protéines qui y sont compactées. Les protéines ainsi solubilisées de manière forcée n'auraient pas subi les changements nécessaires pour être fonctionnelles. La densité isopycnique élevée des protéines GRA à TMDs dans la fraction soluble de parasites va dans le sens de cette interprétation. Bien que les protéines GRA2,3,7 aient été capables d'interagir avec les SUVs sous cette forme, leur comportement n'est probablement pas pertinent vis-à-vis du contexte biologique.

6.2.2 Après sécrétion

Interactions entre protéines GRA. Il est très probable que les protéines GRA forment des complexes permettant leur solubilisation lorsqu'elles sont correctement libérées dans la vacuole ; plusieurs éléments indiquent qu'elles interagissent ensemble au sein de ces complexes. Des travaux récents menés au LAPM [Travier et al., 2007] indiquent qu'il existe des interactions labiles entre les protéines GRA dans la fraction soluble de la vacuole. Mes résultats complètent ces données : bien qu'ils ne permettent pas de déterminer la formation effective de complexes, ces nouvelles données indiquent que certaines protéines GRA sont susceptibles d'être en interaction, parce qu'elles se répartissent dans une même zone d'un gradient : par exemple, GRA2,6 lors de la sécrétion *in vitro* et

dans la vacuole, ainsi que GRA3 et GRA7 éventuellement dans ce dernier compartiment. Ces interactions possibles pourraient être précisées en prolongeant l'analyse par séparation isopycnique sur les fractions ultrasolubles obtenues à partir des parasites mutants KO disponibles au LAPM : KO -GRA2, -GRA5, -GRA6 au LAPM [Mercier et al., 2001, Mercier et al., 2002], mais également -GRA3, -GRA7 [Coppens et al., 2006, Martin et al., 2007]. Cette étude permettrait de déterminer les conséquences de l'absence de l'une des protéines GRA sur les formes de trafic des autres. Les données obtenues pourraient compléter de manière intéressante les travaux de caractérisation de ces mutants, qui sont réalisés en grande partie par microscopie électronique.

Interactions avec des lipides. Par ailleurs, mes résultats nous amènent à envisager une forte implication de lipides dans les formes transitoires des protéines GRA lors de leur sécrétion. Le liposome de la fraction sécrétée *in vitro* et celui de la fraction soluble vacuolaire sont encore à réaliser. Cependant l'isolement de vacuoles parasitophores intactes reste impossible à l'heure à l'heure actuelle. Par ailleurs, il n'existe pas de modèle pré-existant dans les cellules eucaryotes : le trafic sous forme soluble de protéines possédant des segments hydrophobes est une problématique peu étudiée, qui concerne une minorité de protéines pour la plupart impliquées dans le transport de lipides (e.g. apolipoprotéines, protéines de transfert de phospholipides) [Segrest et al., 2000, Voelker, 2005]. Un rôle des protéines GRA dans le transport de lipides dans la vacuole peut être envisagé mais semble peu fondé par d'autres données actuelles.

6.2.3 Scénario potentiel du trafic des protéines GRA des granules denses à leurs membranes-cibles

Les formes des protéines GRA retrouvées dans la fraction ultrasoluble sécrétée *in vitro* et dans celle vacuolaire sont différentes. En conjugaison avec la baisse progressive de densité observée pour les protéines GRA3,6,7, cela nous amène à envisager un processus de dissociation en plusieurs étapes. Lors de leur sécrétion, une première étape de dissociation est franchie, permettant la diffusion des protéines dans la vacuole. Au cours de leur diffusion (diffusion périphérique à partir des sites sub-apicaux de sécrétion), elles sont encore progressivement amenées à des formes moins denses, impliquant probablement l'action de protéines de la vacuole qui permettrait de défaire les complexes. Ce dernier stade pourrait permettre l'exposition des domaines hydrophobes des protéines, afin d'interagir avec leurs membranes-cibles.

6.3 Affinités membranaires des protéines GRA

6.3.1 Insertion spontanée ?

Bien que les protéines GRA_{2,3,6,7} s'associent spontanément aux membranes des SUVs et des GUVs HeLa, on ne peut pas conclure quant à leur insertion effective. Les interactions protéine-protéine interviennent autant que les interactions hydrophobes dans l'association des protéines GRA aux membranes, contrairement à ce qui est observé dans la vacuole : cela pourrait indiquer que les protéines GRA ne sont pas bien stabilisées dans les membranes et ont tendance à s'agréger. Cependant l'insertion effective des protéines dans les membranes-modèles n'est pas complètement remise en question. Ce point doit être résolu pour la poursuite de cette étude *in vitro* ; une étude systématique des capacités d'association des protéines GRA, en fonction de la composition lipidique des membranes, permettra de clarifier ces résultats. Afin de déterminer les conditions optimales pour l'insertion des protéines GRA, il doit aussi être envisagé de tester l'effet d'un apport d'énergie, sous forme de GTP ou d'ATP. Ces molécules peuvent aider au changement de conformation nécessaire à l'insertion de certaines protéines [Lee et al., 2005]. Enfin la température pourrait également jouer un rôle important : étant donné le mélange lipidique total utilisé (extrait lipidique total de cellules HeLa), il est probable que la température basse (température ambiante : 20°C) induise artificiellement des séparations de phase dans les membranes.

6.3.2 Ségrégation ou agrégation

Les expériences en IF sur GUVs que nous avons réalisées ont montré que les autres protéines GRA_{2,6,7}, sont concentrées dans des domaines microniques à la surface des GUVs. Deux hypothèses sont à étudier : (i) la ségrégation fonctionnelle des protéines GRA dans des micro-environnements lipidiques ; (ii) l'agrégation non fonctionnelle des protéines due à une mauvaise conformation dans la membrane.

(i) La ségrégation de protéines dans des micro-environnements est un processus observé - entre autres - pour des protéines de rafts, comme la caveoline [Harder & Simons, 1997], dans des régions de forte courbure membranaire. Ces domaines forment une plateforme qui peut servir à de nombreux processus de trafic membranaire et de transduction du signal. Les protéines jouent un rôle majeur en stabilisant ces domaines transitoires. L'accumulation auto-entretenu de protéines anisotropes dans ces domaines peut générer efficacement des déformations, par un mécanisme de type courbure spontanée locale [Iglic et al., 2006]. Les affinités des protéines GRA₂ et GRA₇ pour les phosphoinositides pourraient jouer un rôle dans le recrutement et l'accumulation de ces protéines dans des domaines. Ces affinités n'interviennent pas nécessairement lors de leur association, mais peuvent se manifester une fois associées à la membrane en induisant par exemple un changement de conformation de la protéine.

(ii) Le mode d'association des protéines GRA aux membranes-modèles, basé sur des interactions

protéine-protéine essentiellement, demande de considérer la possibilité d'une mauvaise conformation des protéines GRA dans les membranes des SUVs et des GUVs. Les domaines fluorescents observés peuvent correspondre aux agrégats formés par les protéines qui n'ont pas pu trouver un réarrangement favorable (décalage hydrophobe, décalage de forme) dans la membrane [Lee, 2004].

L'étude de la nature des micro-environnements observés sur les GUVs permettra d'avancer dans ces hypothèses. Il peut être envisagé d'intégrer aux membranes différents marqueurs (phospholipides marqués, marqueurs de rafts [Bagatolli et al., 1999, Solon et al., 2005]), afin de déterminer quels types de lipides co-localisent, éventuellement, avec les protéines GRA.

6.3.3 Mécanismes potentiels de ciblage de protéines GRA aux membranes de la vacuole

Plusieurs mécanismes de ciblage, dépendant de la bicouche et des protéines en interaction, peuvent être proposés. Leur pertinence peut être discutée à la lumière des résultats obtenus dans ce travail.

(i) Reconnaissance de lipides spécifiques (Fig.6.4 A).

J'ai montré que la protéine GRA2 lie les phosphoinositides et est incapable de s'associer à des membranes formées d'EPC : la reconnaissance de ces lipides spécifiques pourrait être nécessaire à son association, comme c'est le cas entre autres pour l'epsine [Horvath et al., 2007, Balla, 2005]. La protéine GRA7 lie également cette famille de lipides [Coppens et al., 2006], mais peut s'associer aux membranes EPC : l'interaction avec ces lipides doit intervenir plus tardivement pour la régulation des fonctions de cette protéine, par exemple afin d'induire un changement de conformation, comme c'est le cas pour une protéine adaptateur de la clathrine [Collins et al., 2002, Balla, 2005]. Bien que la composition lipidique des membranes de la PVM et du RNM ne soit pas connue, leur provenance différente laisse supposer une composition différente. Cette possibilité de ciblage pourra être confirmée ou infirmée par le test systématique de membranes de compositions différentes, en particulier par rapport aux phosphoinositides.

(ii) Sensibilité des protéines à la courbure (Fig.6.4 C).

Les expériences sur GUVs ont montré que les protéines GRA2,6,7 ne se répartissent pas à la surface des GUVs, vésicules de faible courbure, alors que GRA3 y est associée de manière diffuse. Elles sont au contraire associées à des zones de forte courbure (fils de diamètre sub-micronique). Il est donc possible que l'association de ces trois protéines, associées dans la vacuole aux membranes tubulaires des HOSTs ou du RNM, dépende de la courbure de la membrane, comme c'est le cas des protéines à domaines BAR en particulier, ou bien de l'annexine B12 [Lee & Schekman, 2004, Fischer et al., 2007]. La sensibilité des protéines GRA à la courbure des membranes pourra être déterminée par l'utilisation de SUVs calibrées en taille [Drin et al., 2007].

(iii) Machinerie de translocation.

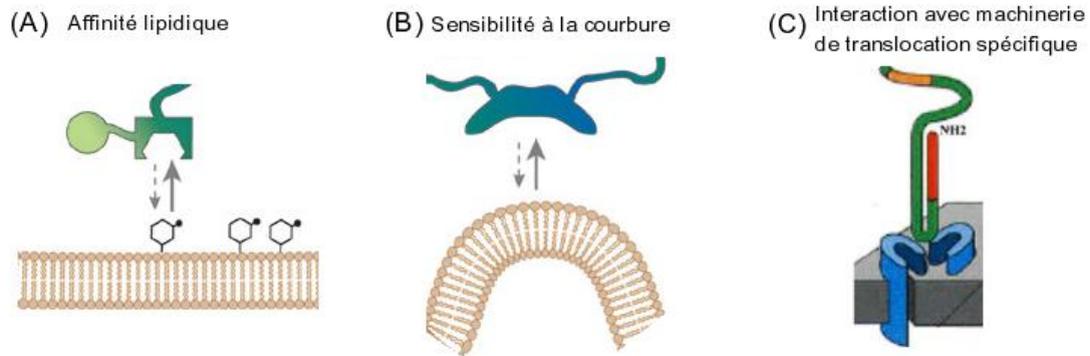


FIG. 6.4: Mécanismes potentiels de ciblage des protéines GRA aux différentes membranes vacuolaires.

L'existence de machineries de translocation différentes dans la PVM et le RNM pourrait également expliquer le ciblage spécifique des protéines GRA. Cependant la validation de cette hypothèse n'est pas dans le registre de cette étude : cela nécessiterait la mise en évidence d'interactions entre protéines GRA et protéines de machinerie de translocation au sein de la vacuole.

Le fait que les protéines GRA apparaissent réparties en deux groupes de densités isopycniques différentes dans la fraction ultrasoluble sécrétée *in vitro*, laisse entendre que les mécanismes évoqués ci-dessus peuvent être complétés par des recrutements entre protéines, pour celles qui ne marqueraient pas de spécificités vis-à-vis des membranes.

6.4 Protéines GRA et déformations membranaires

Les travaux de Coppens et al. [Coppens et al., 2006] ont montré la capacité de tubulation de la fraction sécrétée ultrasoluble. De notre côté, la localisation des protéines GRA par IF sur les membranes des GUVs permet d'envisager des rôles possibles pour certaines des protéines GRA dans ces phénomènes de déformation membranaire. Au vu de l'indépendance des structures tubulaires observées dans la vacuole (RNM et HOSTs en particulier), il semble très probable que deux mécanismes distincts de tubulation soient à l'oeuvre dans la vacuole.

6.4.1 Le point sur une protéine des HOSTs : GRA7

Coppens et al., dans leurs travaux récents [Coppens et al., 2006], ont avancé l'hypothèse de la multimérisation de GRA7 pour la formation d'un manteau protéique contraignant les membranes des HOSTs sous forme cylindrique. Dans nos images par IF sur GUVs, la protéine GRA7 apparaît associée aux divers types de déformations membranaires observées. De plus, elle forme un motif ponctué sur de fins tubes membranaires. Cela pourrait corroborer cette hypothèse.

Mécanisme potentiel de formation des HOSTs. Un scénario de déformation de la PVM pour la formation des HOSTs peut être proposé (Fig.6.5 A). Un rôle générateur de courbure n'est pas requis pour GRA7 : la perturbation initiale de la membrane peut être générée (i) par l'insertion asymétrique d'une protéine dans le feuillet interne à la vacuole, éventuellement GRA7, qui insérerait son TMD en épingle dans la membrane ; et/ou (ii) par la poussée exercée par les microtubules de l'hôte. Le tubule membranaire serait alors stabilisé par la polymérisation de GRA7, formant une charpente cylindrique autour de la membrane.

Dynamique des déformations. Le fait d'utiliser des protéines déjà marquées par un fluorophore (ou en fusion avec une GFP, RFP, YFP) serait bien évidemment une avancée majeure, puisque cela permettrait le suivi en fluorescence dès le début des incubations. Cela permettrait de discriminer en particulier, pour les déformations, entre rôle générateur ou simple reconnaissance *a posteriori* de la courbure par les protéines GRA. Dans ce cas, il serait mieux de travailler sur des GUVs isolées : la méthode de micro-injection des protéines localement serait tout à fait adaptée. Afin de préciser la nature des structures sub-microniques observées en IF, il sera nécessaire de compléter les observations par de l'imagerie confocale.

(A) Mécanisme potentiel de formation des HOSTs



(B) Mécanisme potentiel de formation du RNM

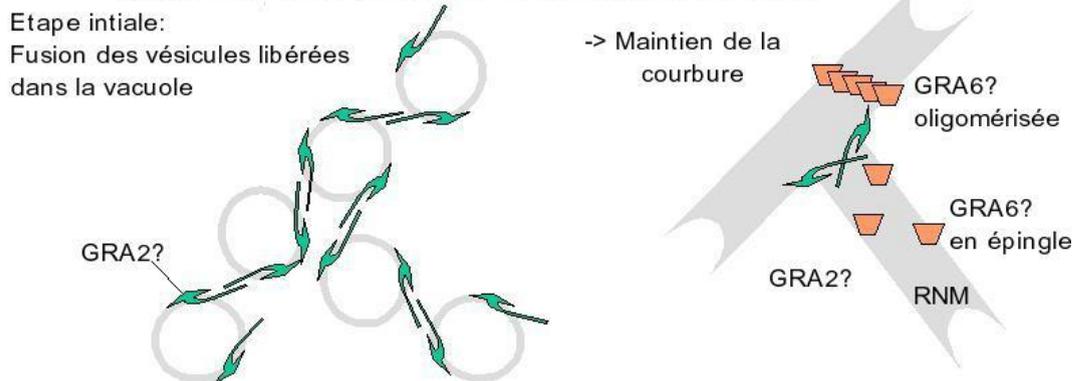


FIG. 6.5: Mécanismes potentiels de formation du RNM et des HOSTs, impliquant certaines protéines GRA.

6.4.2 Le point sur les protéines du RNM : GRA2 et GRA6

Bien que le rôle de GRA2 dans la vacuole, tout comme la fonction du RNM, restent assez indéfinis actuellement, il a été clairement mis en évidence que cette protéine est nécessaire à la formation correcte du RNM [Mercier et al., 2002]. Cette information, ajoutée au fait que l'insertion d'une hélice amphipathique est suffisante pour générer des déformations membranaires [Peter et al., 2004, Zimmerberg & Kozlov, 2006], a amené à la supposer génératrice de déformations. Cependant, les résultats obtenus ici permettent d'envisager une hypothèse alternative, en l'impliquant dans des mécanismes d'amarrage des membranes, sur le modèle de protéines SNAREs par exemple. En effet les protéines SNAREs peuvent s'associer par le biais de leurs hélices amphipathiques et initier ainsi la fusion des membranes auxquelles elles sont associées [Matos et al., 2003].

Mécanisme potentiel de formation du RNM. Le RNM se déploie à partir de petites vésicules : il faut donc des protéines pour assurer leur mise en contact et fusion, ainsi que des protéines pour assurer la stabilisation de la courbure. GRA2 pourrait bien être impliquée dans la première étape, étant donné sa localisation préférentielle dans les zones de contact entre GUVs. Cette hypothèse est soutenue par le fait que dans les mutants déplétés de GRA6, le RNM est remplacé par des assemblages membranaires complexes : la fusion semble donc avoir lieu mais les nanotubes membranaires ne sont pas structurés correctement [Mercier et al., 2002].

Le recoupement de ces données fait émerger un nouveau modèle d'action des protéines du RNM, par analogie avec le processus de re-formation du RE après mitose [Shibata et al., 2006]. Dans ce modèle, GRA2 serait impliquée dans l'amarrage et la fusion des vésicules libérées par le parasite et GRA6, dans leur stabilisation sous forme cylindrique (Fig.6.5 B). Le mécanisme d'action de GRA6 peut être envisagé (i) par l'insertion en épingle à cheveux de son TM, et/ou (ii) par la formation d'une charpente suffisamment rigide autour de la membrane. Les localisations de GRA6, que nous avons observées sur les membranes des GUVs, semblent invalider cette deuxième hypothèse : contrairement à GRA7, GRA6 présente une répartition généralement irrégulière sur les membranes des GUVs.

Mise en évidence du processus. Dans l'idée de vérifier cette hypothèse, une approche plus adaptée pourrait être basée sur celle utilisée par Rapoport et al. [Dreier & Rapoport, 2000, Voeltz et al., 2006] pour observer la formation *in vitro* du reticulum endoplasmique tubulaire. Leur démarche consiste à suivre l'assemblage de petites vésicules (50 à 100nm) en tubules, plutôt que des déformations générées sur des membranes de faible courbure initiale qui nécessitent probablement l'application de forces plus importantes.

6.4.3 Le point sur une protéine de la PVM : GRA3

La construction d'un parasite mutant délété de GRA3 n'a pas pu mettre en évidence d'effet tangible sur la structure de la VP [Craver & Knoll, 2007]. Bien qu'elle soit retrouvée majoritairement localisée à la PVM, GRA3 est également associée au RNM ou aux PVEs. Cette absence de spécificité membranaire se retrouve dans nos résultats de localisation sur les membranes des GUVs,

puisqu'elle se distingue des autres protéines GRA par sa répartition diffuse sur toutes les structures membranaires présentes. Il ne semble pas que cette protéine puisse être impliquée dans des processus de remodelage des membranes.

6.5 Poursuites possibles

6.5.1 Comportement des protéines GRA en solution

Cinétiques d'association des protéines GRA *in vitro*

Afin d'approfondir la question des formes de solubilisation des protéines GRA solubles, une piste possible est de reconstituer leurs interactions en solution *in vitro*, à partir de protéines recombinantes. Si celles-ci peuvent être marquées par un fluorophore, leurs caractéristiques individuelles de diffusion pourraient être étudiées par FCS [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 [Sanchez et al., 2001].

Cinétiques d'association/dissociation des protéines GRA *in vivo*

Il pourrait également être envisagé de réaliser un suivi en FCS *in vivo* des protéines GRA libérées dans la vacuole juste après invasion, sur cellules infectées par *T. gondii*. Il faudrait pour cela disposer de parasites exprimant les protéines d'intérêt en fusion avec une protéine fluorescente (GFP, RFP ou YFP). L'analyse des variations de la mobilité des protéines pourrait permettre de déterminer la réalité du scénario de dissociation des protéines GRA en sortie des granules denses. Cette approche n'a pas pu être mise en oeuvre jusqu'ici car les fusions GRA-xFP ont été tentées en parasites au LAPM mais sans succès : l'expression et le trafic des protéines apparaissent très altérés [Travier et al., 2007]. Cependant les avancées actuelles sur les marqueurs fluorescents fournissent beaucoup de nouvelles possibilités : de nouvelles constructions sont envisagées, en marquant les protéines par des structures beaucoup plus discrètes (e.g. FIAsh-tetracystéine, qui nécessite l'ajout d'un tag de seulement quatre résidus cystéine, qui vont réagir chimiquement avec le petit composé FIAsh) [Hoffmann et al., 2005, Andresen et al., 2004].

6.5.2 Comportement des protéines GRA en membrane

Insertion dans la membrane

Une étude par dichroïsme circulaire, dans la droite ligne de celle proposée ci-dessus, pourrait s'intéresser aux protéines GRA solubles, purifiées, mises en présence de membranes-modèles. Cela pourrait permettre de décrypter les changements de conformation nécessaires au passage d'une forme soluble à une forme membranaire, et de confirmer l'insertion des protéines [Weiss et al., 2003, Wimley & White, 2000].

Associations au sein de la membrane

L'objectif initialement visé, l'analyse par FCS des protéines GRA associées aux membranes des GUVs, semble pour l'instant remis en question par les résultats préliminaires obtenus par IF : les protéines GRA apparaissent concentrées sur certains domaines, certaines structures des membranes, et non pas en diffusion libre dans ces membranes. Quelques essais de FCS sur les GUVs ont bien mis en évidence ce problème : dans le faible volume observé, on observe très peu d'évènements, mais d'une grande brillance. L'application de cette méthode au système-modèle obtenu apparaît donc peu évidente.

Afin de déterminer des interactions entre protéines GRA au sein des membranes, il serait positif de développer les co-marquages en IF sur les GUVs. Il pourrait être fait usage de la méthode de spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence, méthode dérivée de la FCS mais analysant les corrélations entre les caractéristiques de diffusion de deux protéines différentes, marquées par des fluorophores différents [Bacia et al., 2002, Bacia & Schwille, 2003, Kahya, 2006].

Microscopie électronique

Comme le LAPM dispose de certains parasites mutants délétés des protéines GRA, ainsi que de protéines recombinantes bientôt, il semble intéressant de comparer les résultats avec ceux obtenus par Coppens et al. [Coppens et al., 2006], qui démontrent les capacités tubulogéniques du produit de sécrétion *in vitro*. Cette piste a été abordée à la fin de ma thèse, en collaboration avec le Pr. Ricardo Mondragon (CINVESTAV, Mexico, Mexique), mais n'a pour le moment pas donné de résultats concluants. Cette étude est poursuivie actuellement par Amina Bittame (Stage Master2, LAPM).

6.6 Conclusion

Le travail réalisé au cours de ma thèse met en évidence un nouveau moyen d'approcher les questions biologiques par des systèmes-modèles. Ces méthodes sont généralement utilisées en aval du travail de caractérisation du biologiste, afin de répondre quantitativement à des questions extrêmement précises (e.g. forces en jeu). Ici, l'utilisation de membranes-modèles a eu pour but de permettre une approche très large sur tout un groupe de protéines, dans un contexte peu défini, sous l'angle de questions très fondamentales. Nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse, d'ouvrir des pistes d'étude, pour le parasitologue ainsi que pour le physicien. Si des études plus quantitatives doivent être réalisées, ce doit être à partir d'un système réellement minimal, qui nécessite donc la purification des protéines étudiées.

Annexe A

Matériel et méthodes

A.1 Matériel

A.1.1 Souches de toxoplasmes

Au cours de ces travaux, j'ai utilisé la souche sauvage RH ainsi que des souches mutantes réalisées au LAPM, modifiées sur les gènes codant pour les protéines GRA :

- RH, ATCC-50174, isolée en 1937 chez un enfant atteint de toxoplasmose grave [Sabin, 1941] ;
- RH/KOGRA2 [Mercier et al., 1998a] ;
- RH/KOGRA6 [Mercier et al., 2002] ;
- RH/KOGRA2-GRA6 [Mercier et al., 2002] ;
- RH/GRA2-HA-FLAG [Travier et al., 2007] ;
- RH/KOGRA5 [Mercier et al., 2001].

A.1.2 Souches cellulaires

Deux types cellulaires ont été utilisés : les cellules HFF pour la propagation et l'amplification des parasites et les cellules HeLa pour l'extraction de lipides :

- HFF, lignée cellulaire humaine fibroblastique (tissus conjonctifs du prépuce), ATCC-CRL 1634 ;
- HeLa, lignée cellulaire humaine cancéreuse (adénocarcinome du col de l'utérus), ATCC-CCL 2.

A.1.3 Anticorps

Les anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence et d'immunoblot sont répertoriés dans les tableaux [A.1](#) et [A.2](#).

A.1.4 Protéines purifiées

Des protéines recombinantes ont été utilisées pour les expériences de Lipid Overlays. Elles sont produites en bactéries *E. coli* BL21 transformées par le plasmide pGEX 3X/GRA2 (ou GRA1, 6) (fragment HpaI-NarI). Les protéines ont été purifiées par affinité sur glutathion agarose, dialysées en PBS et concentrées [Mercier et al., communication personnelle] :

- GRA1-GST ;
- GRA2-GST ;
- GRA6-GST ;
- GRA9-His (Don de K.D.Z. Adjogble, Heinrich Universität, Düsseldorf).

t

Protéine	PM en kDa	Anticorps primaires	Dilution IF	Dilution IB	Provenance
GRA1	23	Monoclonal de souris TG17-43	1/500	1/20000	Produit au LAPM [Charif et al., 1990]
GRA2	28	Monoclonal de souris TG17-179 Sérum de lapin anti-HIS- GRA2	1/500 1/500	1/15000 1/10000	Produit au LAPM [Charif et al., 1990] L.D. Sibley
GRA3	30	Monoclonal de souris TG2H11	1/500	1/10000	J.F. Dubremetz [Achbarou et al., 1991]
GRA4	40	Sérum de lapin anti-GRA4-HIS	NA	1/10000	L.D. Sibley [Labruyere et al., 1999]
GRA5	21	Monoclonal de souris TG17-113	NA	1/5000	Produit au LAPM [Charif et al., 1990]
GRA6	32	Sérum de lapin anti-HIS- GRA6	1/500	1/10000	L.D. Sibley [Labruyere et al., 1999]
GRA7	29	Monoclonal de souris BATO 214	1/500	1/10000	Innogenetics [Saavedra et al., 1990]
GRA9	41	Sérum de lapin anti-HIS- GRA9	NA	1/2500	K.D.Z Adjogble [Nockemann et al., 1998]
SAG1	30	Monoclonal de souris TG054	NA	1/5000	Produit au LAPM [Rodriguez et al., 1985]

FIG. A.1: Anticorps primaires utilisés lors des expériences d'immunofluorescence (IF) ou d'immunoblot (IB). PM poids moléculaire ; NA non appliqué.

t

Anticorps secondaires	Dilution IF	Dilution IB	Provenance
Alexa Fluor®488 - sérum de chèvre anti-IgG (H+L) de souris	1/1000	NA	Molecular Probes
Alexa Fluor®594 - sérum de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin	1/1000	NA	Molecular Probes
Péroxydase - Sérum de chèvre anti-IgG de souris (H+L)	NA	1/10000	Jackson Immuno Research
Péroxydase - Sérum de chèvre anti-IgG de lapin (H+L)	NA	1/10000	Jackson Immuno Research

FIG. A.2: Anticorps secondaires utilisés lors des expériences d'immunofluorescence (IF) ou d'immunoblot (IB). NA non appliqué.

La protéine GRA2-HA-FLAG a également été utilisée pour les Lipid Overlays. Elle est obtenue à partir d'un lysat de parasites de la souche modifiée RH/GRA2-HA-FLAG, par purification sur colonne d'affinité FLAG [Travier et al., 2007].

A.1.5 Lipides commerciaux

Des lipides commerciaux ont été utilisés pour la formation de SUVs et de GUVs, mais surtout pour les expériences de lipid overlays :

- EPC, phosphatidylcholine ou lécithine de jaune d'oeuf (Sigma), également utilisé pour formation de SUVs et de GUVs ;
- PA, acide phosphatidique de jaune d'oeuf (Sigma) ;
- PE, phosphatidyléthanolamine de jaune d'oeuf (Sigma) ;
- PS, phosphatidylsérine de cerveau de porc (Avanti®polar lipids) ;
- PI, phosphatidylinositol de foie de boeuf (Avanti®polar lipids) ;
- PI(4,5)P₂ phosphatidylinositol diphosphaté de cerveau de porc (Avanti®polar lipids) ;
- cholestérol de foie de porc (Sigma) ;
- sphingomyéline de cerveau de porc (Avanti®polar lipids) ;
- DGDG : don d'Eric Maréchal (UMR5168 CNRS-CEA-INRA-Univ. Joseph Fourier, Grenoble).

A.2 Méthodes de biologie cellulaire

A.2.1 Culture et stockage des tapis cellulaires et des parasites

Les parasites sont propagés et amplifiés par infections de cellules humaines adhérentes HFF maintenues en culture jusqu'à lyse complète du tapis cellulaire. Les cellules, infectées ou non par les parasites, sont cultivées à 37°C, sous 5 % de CO₂, en milieu D10 : Dulbecco Minimum Essential Medium (Gibco), additionné de 10 % de Sérum de veau foetal (SVF) (Bio West), 2 mM de Glutamine (Euromedex), 50 U/ml de Pénicilline et de 50 µg/µl de Streptomycine (Dutscher).

A.2.2 Préparation de protéines ultrasolubles de granules denses (HssTx) : Fractionnement de parasites

Un culot de parasites sauvages, dispersé en PBS (dans un volume minimal de 1ml par T180 de parasites), est lysé par 3 chocs thermiques successifs dans un bain d'azote liquide puis passage à 37°C. Par une centrifugation de 10 min à 17 000 g (13 000 rpm) à 4°C, les gros débris parasitaires (organites) sont rassemblés dans le culot (LSP). par 10 min à 17 000 g (13 000 rpm) à 4°C, la fraction soluble est ultracentrifugée 1 h à 100000g : le culot de centrifugation à haute vitesse (HspTx) contient les débris parasitaires ; le surnageant (HssTx) correspond à la fraction ultra-soluble des parasites, y compris des granules denses.

A.2.3 Préparation de protéines sécrétées ultrasolubles (HssEs) : Sécrétion *in vitro* des protéines granulaires

Selon le protocole développé par Darcy et al. [Darcy et al., 1988], la sécrétion des protéines granulaires est induite en milieu extracellulaire, par incubation des parasites ayant fraîchement lysé leurs cellules-hôtes (48h après infection) pendant 3 h, à 37°C, sous agitation rotative douce, en D10. Les parasites sont pour cela repris en D10 à la concentration de 1, 2.10⁸ parasites/ml. Les parasites (LSP pour "Low Speed Pellet") sont séparés des produits de sécrétion (LSS pour "Low Speed Supernatant ") par centrifugation de 12min à 1 000g (3 000 rpm) et 10min à 17 000g (13 000rpm). La fraction LSS est ultracentrifugée 1h à 100 000g, afin de séparer la fraction ultrasoluble (HssEs) d'éventuels agrégats (HSP).

A.2.4 Préparation de protéines vacuolaires ultrasolubles (HssVac) : Fractionnement de cellules infectées

Des cellules HFF infectées depuis 24h sont lavées en PBS afin d'éliminer les parasites extracellulaires, puis décollées mécaniquement à l'aide d'un grattoir dans du PBS. Après 10 min de centrifugation à 750 g (2 600 rpm) à 4°C, les cellules infectées sont cassées par seringage à travers des aiguilles de 25 G puis de 27 G de diamètre, dans un volume minimal de 0.5 à 2 ml de PBS. Après élimination des débris vacuolaires et cellulaires par 10 min de centrifugation à 750g (2 600rpm) puis 10min à 17 000g (13 000rpm) à 4°C, la fraction soluble est ultracentrifugée 1h à 100 000g, afin de séparer la fraction ultrasoluble de la cellule-hôte et de la vacuole (HssVac) du culot (HSP) contenant les membranes vacuolaires et des cellules hôtes.

A.2.5 Extraction de lipides cellulaires

Des cellules HeLa (non infectées), maintenues en culture jusqu'à confluence, sont lavées en PBS afin d'éliminer le milieu de culture, puis décollées mécaniquement à l'aide d'un grattoir. Les cellules de 10 T180¹ sont concentrées en un culot par centrifugation de 10 minutes à 750 g (2 600 rpm) à 4°C. Les culots sont congelés à -20°C afin de casser les cellules par congélation-décongélation. Ils sont ensuite redispersés dans environ 5ml d'eau, toujours afin de casser les cellules, par choc osmotique. Les lipides sont extraits de ce lysat cellulaire selon le protocole de Bligh et Dyer [Bligh & Dyer, 1959]. Les débris cellulaires sont resuspendus dans un mélange CHCl₃/MeOH (Chloroforme/Méthanol) 2 :1 puis dans un mélange chloroforme/eau 1 :2. La phase organique lourde contenant les lipides est séparée par centrifugation à 1000 g puis évaporée sous argon. Cette étape peut être répétée plusieurs fois si le résidu reste trouble. Pour être utilisé, le résidu sec est remis en solution dans une solution CHCl₃/MeOH 9 :1, pour une concentration finale de quelques mg/ml. Il est en effet difficile d'évaluer la quantité de lipides obtenus. Il faut noter que cette quantité est assez faible : l'extraction des lipides de cellules d'une dizaine de T180 de cellules confluentes ne donne la possibilité que de préparer 300µl de SUVs ou bien une dizaine d'électroformations.

A.3 Préparation de membranes-modèles : SUVs et GUVs

Deux types de membranes-modèles ont été utilisées :

- les SUVs, petites vésicules unilamellaires, pour les expériences de biochimie ;
- les GUVs, vésicules unilamellaires géantes, pour les expériences d'immunofluorescence.

Quelle que soit la méthode de préparation, le principe de formation de vésicules reste le même : les vésicules résultent de l'hydratation progressive de lipides, initialement solubilisés en solvant organique. Dans les préparations de vésicules nanométriques (SUVs), on commence par l'hydratation spontanée d'un film lipidique, qui forme ainsi des vésicules multilamellaires ; on cherche alors à casser les bicouches et à les disperser le plus possible (ici par agitation ultrasonore). Au contraire, pour préparer des GUVs, on doit favoriser le gonflement de membranes d'épaisseur fine (autour de 10nm) mais de surface la plus large possible. Pendant la préparation de vésicules géantes il faut donc favoriser les fusions de membranes et les préserver des ruptures. Il existe de nombreuses variantes selon les auteurs et les applications voulues. Je rapporte ici celles qui ont été utilisées au cours de ce travail et qui ont donné les meilleurs résultats.

A.3.1 Conservation des lipides

Les phospholipides sont des produits sensibles à l'hydrolyse et à l'oxydation. On les conserve à -20°C, à l'abri de l'air et de l'humidité. Les produits commerciaux, provenant de Sigma ou Avanti Polar Lipids, sont conditionnés sous argon, à l'état de poudre ou en solution en chloroforme. Les solutions-mères de lipides sont préparées à 10mg/ml en chloroforme/méthanol 9 :1. L'extrait lipidique HeLa, préparé au LAPM, est conservé à -20°C, par aliquots correspondant à une T180, sous forme de film lipidique.

¹boîtes de culture de 180cm²

A.3.2 Choix des solutions de formation

Les SUVs comme les GUVs doivent être formées dans un milieu d'osmolarité² équivalente à celle de la solution dans laquelle elles vont être incubées par la suite. Ces solutions, qui sont les fractions HssTx, HssEs ou HssVac, ont une salinité et une osmolarité physiologiques, afin de préserver les caractéristiques natives des protéines qu'elles contiennent. L'osmolarité du D10 ou du PBS, milieux dans lesquels sont contenues les protéines de HssTx, HssEs et HssVac, est de 300mOsm.

Les SUVs et les GUVs doivent donc être formées dans des solutions d'osmolarité 300mOsm. Les GUVs ne peuvent pas être formées dans un tel milieu salin car la solution d'électroformation ne doit pas être conductrice. Nous avons donc choisi de les former dans une solution à 270mM de sucrose, d'osmolarité 270mOsm, légèrement inférieure à celle des solutions protéiques. De plus, une solution de sucrose étant plus dense qu'une solution saline, à même densité, cela va permettre de faire sédimenter les GUVs dans les solutions d'incubation, et de mieux les imager, grâce à la différence d'indice entre les deux types de solutions.

Les SUVs peuvent être formées en milieu salin mais il est plus prudent d'éviter les ions divalents qui ont tendance à créer des liaisons entre SUVs ou avec leur substrat. J'ai choisi de les former dans un tampon "classique" de formation des SUVs : Tampon KCl (KCl 100mM, Hepes 10mM pH7.4), dont l'osmolarité est légèrement inférieure à 300mOsm.

A.3.3 Electroformation des GUVs

Principe de la méthode

La méthode d'électroformation des GUVs, développée il y a une vingtaine d'années [Angelova & Dimitrov, 1986], consiste à appliquer un champ électrique, oscillant à basse fréquence (10 Hz), perpendiculairement au film lipidique. La majeure proportion des vésicules obtenues sont unilamellaires et de taille contrôlable entre 10 et 100 μm . Le lipide est déposé directement sur les électrodes, au choix deux fils de platine ou deux lames conductrices.

La grande et la faible polydispersité des diamètres (10 à 100 μm) est due à un phénomène de mûrissement pendant la croissance. Les vésicules ont une petite taille quand elles commencent à pousser sur la surface (2 à 5 μm). Cependant leur tension est élevée car le substrat auquel elles sont encore liées joue le rôle de réservoir de molécules de lipide. On observe alors de nombreux réarrangements où plusieurs vésicules fusionnent en une seule plus grosse. La formation des GUVs démarre par l'apparition de "cloques" sur le film lipidique, qui prennent une forme sphérique en gonflant progressivement par alimentation à partir du film lipidique. Ces cloques ne sont véritablement qualifiées de vésicules qu'à partir du moment où elles deviennent sphériques, étant reliées à l'électrode uniquement par un mince "cou". L'unilamellarité des vésicules ainsi obtenues pourrait venir de ce mode de gonflement du film initialement unilamellaire, par l'effeuillage des bicouches une à une.

Chambre de préparation

L'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO pour indium tin oxyde) est un conducteur électronique qui, en couche mince, a une bonne transparence à la lumière visible³. Des lames carrées 25x25mm sont découpées dans une grande vitre couverte d'une couche mince (2nm) d'ITO (Thomson LCD), de résistivité surfacique de l'ordre de 10Ω . On réalise un contact électrique sur chaque surface d'ITO, en y fixant un fil conducteur par de la laque d'argent. La zone de contact peut être renforcée par de la colle silicone (Loctite Silicomet®AS 311) ou de la pâte à sceller Critoseal®(Fischer). Les deux surfaces, placées en vis-à-vis et maintenues par des espaceurs en téflon à une distance de 1.2mm, forment une chambre, qui va être rendue étanche par de la pâte à sceller. La chambre ainsi constituée a une contenance d'environ 0.8ml (Fig.A.3).

²L'osmolarité correspond à la concentration de molécules osmotiquement actives dans une solution, c'est-à-dire la concentration des solutés qui vont exercer un pouvoir attractif sur les molécules d'eau

³Le verre recouvert d'ITO est utilisé dans l'industrie pour les écrans à cristaux liquides, les pare-brises auto-dégivrants etc..

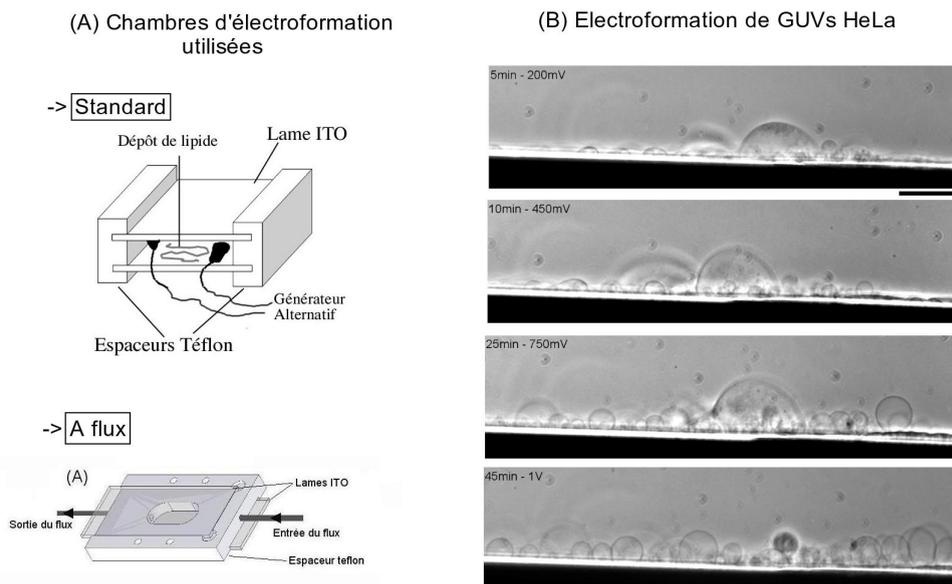


FIG. A.3: Protocole d'électroformation. (A) Schémas des chambres d'électroformation utilisées. Elles sont formées en plaçant en regard les faces conductrices des lames ITO, séparées par des espaceurs en téflon. D'après [Abkarian, 2002]. (B) Quelques étapes de l'électroformation de GUVs à partir de lipides HeLa, sur des électrodes de platine qui permettent leur vue de côté. Barre 50 μm .

Protocole d'électroformation

Les GUVs sont préparées à partir de phosphatidylcholine de jaune d'oeuf (EPC) ou d'extrait lipidique total de cellules HeLa (lipides HeLa), selon le protocole développé par Angelova et al. [Angelova & Dimitrov, 1986, Angelova et al., 1992]. Les lipides sont solubilisés en Chloroforme/Méthanol 9 : 1, à raison de 2mg/ml pour l'EPC, ou de l'équivalent de 3T180 par ml pour les lipides HeLa. Quelques microlitres de lipides sont déposés à l'aide d'une seringue Hamilton sur chacune des lames ITO, afin d'obtenir un film très fin de lipides.

Après l'évaporation des solvants, les lames ITO sont montées sur des espaceurs en téflon afin d'obtenir une chambre, selon le schéma A.3. La solution aqueuse (sucrose) de formation est injectée par un des espaces restés ouverts, qui sont ensuite bouchés à l'aide de pâte à sceller. Les connecteurs des lames ITO sont alors connectés à un générateur alternatif à une fréquence de 10Hz et une amplitude de 0.2V. Cette tension est ensuite augmentée progressivement, jusqu'à 0.9V en 30 minutes. Ensuite, selon le type de lipides, la tension est augmentée par paliers de quelques dixièmes de volt, jusqu'à obtention de vésicules de taille moyenne 10 μm . L'augmentation de la tension dépendant du type de lipides :

- pour des GUVs EPC : la tension est montée par paliers de 0.1V, depuis 0,2 V jusqu'à 1,2-1,4 V, sur une durée totale de l'ordre de 4 heures ;
- pour des GUVs HeLa : la tension est montée par paliers de 0.1V toutes les 5 minutes, depuis 0.2V jusqu'à 0.9V ; puis de 0.2V toutes les 5 minutes, jusqu'à 1.5V environ ; cette tension est ensuite appliquée pendant plusieurs heures (généralement toute une nuit).

La formation des GUVs peut être observée tout au long du processus, en microscopie à contraste de phase. Pour les détacher, un champ alternatif de 4 Hz est appliqué à la fin de la formation, avec une tension de l'ordre du volt pendant quelques minutes. La solution est prélevée avec une aiguille à biseau large (1 mm) pour éviter des cisaillements trop importants. Les GUVs obtenues peuvent être stockées à 4°C pendant quelques jours.

A.3.4 Préparation de SUVs

Les SUVs sont formées à partir des lipides EPC (Sigma) ou d'un extrait lipidique total de cellules HeLa. Ces lipides sont initialement solubilisés en Chloroforme/Méthanol 9 : 1 (à 4mg/ml pour l'EPC ; et l'équivalent de 2T180/ml pour les lipides HeLa). Un volume de 0,5 ml de ces solutions est évaporé au fond d'un tube à hémolyse en verre, afin

d'obtenir un dépôt uniforme. Le film lipidique obtenu est hydraté par 0.3ml de tampon KCl (KCl 100mM, Hepes 10mM pH7.4) afin d'approcher des conditions d'osmolarité et de salinité physiologiques. Le dépôt lipidique, gardé sur glace, est progressivement détaché et réhydraté en vortexant régulièrement. La solution obtenue est turbide.

Afin d'obtenir une population de SUVs plus monodisperse, la solution est soniquée à puissance minimale (150W) pendant 10min, ce qui va casser les couches des vésicules multilamellaires obtenues. La solution obtenue est centrifugée à 12000rpm pendant 10min pour éliminer les débris de titane détaché de la sonde de sonication.

Les SUVs obtenues ont été contrôlées par microscopie électronique.

Caractérisation des SUVs par microscopie électronique à transmission

Les SUVs en Tampon KCl sont adsorbées sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone fin (quelques nanomètres), à base de Formvar (Polyvinyl formal resin). Environ 15 μ l d'un échantillon sont déposés sur une grille, et laissés s'adsorber pendant environ 10 minutes. L'excès d'eau est absorbé à l'aide d'un papier buvard. Une solution contenant un agent contrastant, ici de l'acétate d'uranyl à 1%, est ajoutée sur la grille pendant quelques secondes puis absorbée et rincée dans de l'eau de haute pureté. Celui-ci va se fixer préférentiellement sur les contours des objets adsorbés. De par sa forte masse atomique, le contrastant dévie les électrons dans le diaphragme objectif. Ainsi l'échantillon biologique apparaît plus clair que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative. Les grilles ont été imagées par Microscopie Electronique à Balayage (SEM) (Collaboration R. Mondragon, CINVESTAV, Mexico).

A.4 Méthodes de biochimie

A.4.1 Effets des incubations : Fractionnement et Binding assay

Cette méthode a été utilisée pour deux types d'objectifs :

- tester la solubilité des protéines GRA des différentes fractions HssTx, HssEs et HssVac, après incubation préalable en Tampon KCl, ou sans incubation ;
- tester l'association des protéines GRA de ces fractions à des SUVs.

Les fractions ultrasolubles HssTx, HssEs ou HssVac sont incubées avec des SUVs ou du tampon KCl en proportion volumique 2 :1, pendant 1h sous agitation douce et à température ambiante, ou non incubées. La fraction sédimentée (P) est alors séparée des protéines solubles (S) par ultracentrifugation à 100 000g pendant 1h à 4°C. La fraction soluble est précipitée par 1% d'Acide Trichloracétique. Les fractions obtenues sont analysées par SDS-PAGE puis immunoblot.

A.4.2 Extractions Urée et NP40

La stabilité des protéines GRA associées aux membranes des SUVs ou bien associées à des structures de solubilisation dans la fraction HssEs, est testée par des traitements sur la fraction membranaire P (voir Sous-section A.4.1). Les culots obtenus sont lavés en tampon Tris (Tris 50mM pH8). Les culots sont dispersés dans 150 μ l de tampon Tris. Des aliquots de 50 μ l sont traités pendant 30min sur glace, par des solutions de 1% de NP-40 en tampon Tris, ou 6M d'Urée. En contrôle, un traitement Tris est systématiquement réalisé. Les traitements sont incubés 30 min sur glace. Après ultracentrifugation de 1 h à 100 000 g, les fractions ultrasolubles obtenues après traitement par le Tris ou par l'Urée sont précipitées par 1% d'Acide Trichloracétique, et celles obtenues après traitement par le NP40 sont précipitées par deux volumes d'Acétone. Les fractions sédimentées et solubles sont ensuite analysées par SDS-PAGE puis immunoblot.

A.4.3 Séparation isopycnique

Les gradients linéaires de glycérol sont coulés à l'aide d'un mélangeur, à partir de deux solutions tamponnées (Tris 50mM pH7.4) de glycérol qui donnent les densités extrêmes du gradient : une solution à 1% de glycérol (d=1.01) et une solution à environ 50% de glycérol (d=1.13). Le gradient est coulé en partant des plus hautes densités, au fond du

tube, jusqu'aux plus faibles densités, au sommet du tube. Le gradient est laissé au repos à 4°C pendant 30 minutes au minimum, quelques heures au maximum, avant utilisation.

Le produit à analyser est déposé directement au sommet du gradient, juste avant centrifugation. Le gradient est centrifugé à 100 000 g jusqu'à l'équilibre, soit 15h minimum. Les centrifugations ont été réalisées dans une ultracentrifugeuse Sorvall WXUltra avec rotor à godets mobiles (ou swing-out), qui se réorientent lors de la centrifugation⁴. Le gradient est élué à 4°C à partir d'un trou pratiqué à quelques millimètre du fond du tube à l'aide d'une aiguille. Le contenu est récupéré en une vingtaine de fractions de 500 à 700 µl, numérotées à partir du fond, à l'exception des deux fractions extrêmes qui sont notées B (fond) et T (sommet).

Ces fractions sont ensuite pesées, afin de déterminer leur densité, puis analysées par SDS-PAGE et immunoblot, ou par Dot Blot.

A.4.4 SDS-PAGE et détection des protéines par immunoblot

Afin de déterminer la présence des protéines GRA dans les fractions obtenues lors des différentes expériences de biochimie, le contenu des fractions est séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl-sulfate (SDS). Selon cette méthode, chaque protéine va migrer dans le gel en fonction de sa taille et donc de son poids moléculaire apparent. Une fois les protéines séparées, elles peuvent être mises en évidence par immunoblot, après transfert sur membrane de nitrocellulose.

Séparation des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Les fractions à analyser sont reprises dans du tampon dénaturant 2X (20% Glycérol, 4% SDS, 13% Tampon gel supérieur 4 X (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS), Bleu de Bromophénol). Les extraits protéiques sont dénaturés 10 minutes à 85°C avant d'être séparés sur gel de polyacrylamide (13% - 5%), dans un tampon de migration (25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycine, 0.1 % SDS), selon la technique décrite par Laemmli [Laemmli, 1970]. Afin de calibrer le gel, sont déposés en parallèle des échantillons à analyser des marqueurs de poids moléculaires précolorés (Fermentas). Les protéines du gel sont ensuite révélées par immunoblot après transfert sur membrane de nitrocellulose.

Détection des protéines par immunoblot

Après séparation des protéines sur gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (HybondTMMECLTM, Amersham) selon la technique développée par Towbin et al. (Western Blot) [Towbin et al., 1979]. La membrane est saturée 1h, sous agitation, dans une solution de saturation (PBS, 5% lait écrémé, 5% Sérum de chèvre, 0.05% Tween-20, 0.05% Triton X-114), afin d'éviter les interactions non spécifiques de la membrane avec les anticorps durant les incubations suivantes. La membrane est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire dilué en solution de saturation, pendant 2 h à température ambiante et sous agitation, ou toute une nuit à 4°C, 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) afin d'éliminer les anticorps fixés non spécifiquement. La membrane est ensuite incubée 1 h en présence de l'anticorps secondaire dilué en PBS et 20% de solution de saturation, avant d'être lavée 3 fois (5 min sous agitation) avec la solution de lavage. Les protéines sont révélées par chimioluminescence (SuperSignalTMChemiluminescent Substrate, Pierce). Le signal est mis en évidence par exposition d'un film (HyperfilmTMMECLTM, Amersham) sur la membrane. Les films obtenus sont développés et fixés, puis scannés ; les images sont traitées à l'aide du logiciel ImageJ. Les membranes peuvent être réutilisées, en dés hybridant les anticorps à l'aide d'une solution à pH 2.2 (100 mM Glycine, 1 % SDS et 0.1 % NP40), sous agitation pendant 30 min. La membrane est ensuite lavée 3 fois (5 min sous agitation) en PBS puis à nouveau saturée et réutilisée pour la mise en évidence d'autres protéines.

⁴Quand la rotation du rotor débute les godets (et les tubes qu'ils contiennent), sous l'effet de la force centrifuge, se réorientent et passent en position horizontale. Les particules peuvent donc sédimenter directement dans le fond du tube sans jamais heurter les parois du tube.

A.4.5 Analyses par Dot Blot

Le dot-blot consiste à déposer les protéines en solution directement sur une membrane de nitrocellulose sous forme de points, sans séparation préalable sur gel d'électrophorèse. Nous avons utilisé le système Bio Rad (Bio-Dot Microfiltration Apparatus 96 puits) qui permet de transférer les protéines déposées dans les puits sur la membrane par aspiration, l'appareil étant connecté à une pompe à vide.

Cette méthode a servi à la détection globale des protéines des fractions issues des gradients isopycniques. Des aliquots non dénaturés de 50 µl de chaque fraction sont déposés dans les puits. Les dots de concentration majeure en protéines sont ensuite mis en évidence par coloration au Rouge Ponceau (solution à 0.2g pour 100ml eau, acide acétique 1%), qui est très facile d'emploi mais peu sensible. Dans le cas des gradients avec SUVs, cette méthode a également servi à la localisation des SUVs, qui laissent des dépôts blancs sur les membranes de nitrocellulose colorées au Rouge Ponceau.

A.4.6 Superposition protéines/lipides

Des quantités de 1 à 100pmol de lipides dissous en butanol sont déposés sur membrane de nitrocellulose (HybondTMECLTM, Amersham). La membrane est séchée à température ambiante pendant 1 h, puis saturée 1 h avec 3% d'Albumine bovine dépourvue d'acides gras (Sigma) dans du TBST (50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl et 0.1 % Tween 20). La membrane est incubée sur la nuit à 4°C avec 0.2 µg/ml de GRA2-GST dans du TBST additionné de 3 % d'Albumine sans acides gras puis lavée 6 fois 5 min en TBST avant d'être mise en présence de l'anticorps monoclonal de souris TG17-179 anti-GRA2 dilué en TBST, pendant 1 h. La membrane est lavée 6 fois 5 min en TBST, incubée avec le sérum de chèvre anti-IgG de souris (H+L) - peroxydase dilué en TBST puis lavée 12 fois 5 min en TBST avant d'être révélée par chimioluminescence (SuperSignalTMChemiluminescent Substrate, Pierce). Le signal est mis en évidence par exposition de la membrane contre un film (HyperfilmTMECLTM, Amersham) et traité comme indiqué au Paragraphe A.4.4.

A.5 Méthodes de microscopie optique

A.5.1 Immunomarquage des protéines GRA associées aux GUVs

Préparation de la fraction HssEs et des GUVs HeLa

La fraction HssEs est conservée à -20°C par aliquotes individuelles décongelées juste avant utilisation. Après décongélation, des agrégats de taille importante sont visibles en contraste de phase. Afin d'éliminer ces agrégats qui gênent l'observation des GUVs, la fraction HssEs est fractionnée par une centrifugation à basse vitesse (5000g ; 5min), dont on utilise le surnageant. De plus la fraction HssEs, produite en D10, n'étant pas tamponnée, la solution a un pH assez basique⁵ après décongélation. Le pH, mesuré à 8.5 environ, est ajusté à 7.4 à l'aide de quelques microlitres de KOH concentré.

Les GUVs HeLa sont quant à elles électroformées durant la nuit précédant leur utilisation, et ne sont pas décollées à la fin de l'électroformation. Elles doivent être utilisées le jour-même. Afin d'éviter des artefacts dus à une transition brutale d'osmolarité au moment de l'injection des protéines, la solution d'électroformation (sucrose 270mM) est remplacée par une solution de PBS peu avant l'expérience. Les GUVs y sont laissées pendant quelques minutes avant l'injection de la fraction ultrasoluble, afin de permettre l'équilibration entre les solutions interne et externe.

Conditions d'incubation

Les GUVs sont incubées pendant 1h à température ambiante avec 0.5ml de la fraction HssEs (soit 60.10⁶ équivalent-parasites), ou 0.5ml de la fraction HssVac (soit 15.10⁶ équivalent-parasites), ou 0.5ml de la fraction HssVac 5X (soit

⁵indiqué par un indicateur coloré présent dans le D10, le rouge de phénol.

75.10⁷ équivalent-parasites), préparées comme indiqué précédemment. La concentration de GUVs dans la chambre est de l'ordre de 30 μ g de lipides par ml ; d'après ce qui a été vu en biochimie, où les SUVs étaient concentrées à 2mg de lipides par ml, les protéines sont largement en excès par rapport à la concentration globale en lipides de la chambre. L'excès de protéines après incubation est éliminé par passage de 5 ml de PBS.

Ensuite commence l'immunomarquage indirect d'une des protéines GRA : les GUVs sont incubées 1h à température ambiante avec les anticorps primaire puis secondaire dilués en PBS, avec un lavage de 5ml de PBS entre les deux incubations. Le dernier lavage est plus important (passage de 10 ml de PBS), afin d'éliminer la fluorescence de la solution environnante. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à des fluorophores de la gamme Alexa Fluor, qui ont un bon rendement de fluorescence, une excellente photostabilité, et sont hydrophiles, donc peu susceptibles d'induire des interactions non spécifiques avec les GUVs.

Dans certaines expériences, un second marquage a été réalisé sur la même préparation, avec une combinaison différente d'anticorps et un fluorophore de spectre d'émission et d'excitation distinct (monoclonal de Souris et conjugué-Alexa488, puis polyclonal de Lapin et conjugué-Alexa596).

A.5.2 Observation par microscopie de fluorescence

L'observation par microscopie de fluorescence standard en épi-illumination a été faite sur un microscope inversé Olympus IX-71. La source lumineuse est une lampe à arc à mercure. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont sélectionnées à l'aide de deux jeux de filtres, l'un adapté à l'Alexa Fluor488, et l'autre à l'Alexa Fluor596. Les images sont acquises par une Caméra CoolSnapTMES (Roper Scientific ©Photometrics) conduite par le logiciel associé MetavueTMImaging System (Universal Imaging Corporation). Les traitements d'images ont été réalisés avec ce même logiciel ainsi qu'avec le logiciel ImageJ.

A.5.3 Observation par microscopie à contraste de phase

Les images en fluorescence ont été complétées, à chaque fois que cela a été possible, par des images en contraste de phase permettant d'observer les GUVs : cette méthode permet d'obtenir une image d'amplitude à partir d'un objet de phase. Les objets biologiques et les vésicules ne modifient pas l'intensité de la lumière incidente (différence de luminosité ou de couleur) mais ont un indice de réfraction élevé. Les ondes lumineuses les traversant prennent donc un retard de phase par rapport aux ondes qui traversent le champ environnant. La méthode consiste à éclairer la préparation par un cône creux de lumière, grâce à un condenseur à diaphragme annulaire. La lumière est collectée par un objectif à anneau de phase, anneau qui se situe dans le plan focal arrière de l'objectif. La lumière d'éclairage traverse l'anneau et y subit une atténuation et un décalage de phase de 90° mais par contre, la lumière diffractée par l'objet observé ne subit pas de décalage.

Table des figures

1.1	Classification phylogénétique du phylum de <i>T. gondii</i>	6
1.2	Cycle vital de <i>T. gondii</i>	7
1.3	Cycle de prolifération de <i>T. gondii</i>	12
1.4	Ultrastructure parasitaire	13
1.5	Attachement à la cellule-hôte et invasion	14
1.6	Maturation de la VP	17
1.7	Organisation en rosette d'une vacuole à 16 parasites, 24h après invasion	18
1.8	Egress ou enkystement	19
1.9	Représentation schématique des domaines potentiels des protéines GRA de <i>T. gondii</i>	23
1.10	Représentation schématique de la localisation des protéines GRA avant(parasite extra-cellulaire), pendant(5min après invasion) et après sécrétion (24h post-invasion)	27
1.11	La membrane délimitante de la vacuole parasitophore (PVM), les PVEs et les HOSTs	29
1.12	Structures internes de la vacuole parasitophore : RNM et RB	32
1.13	Altérations ultrastructurales du RNM après délétion de la protéine GRA2 ou GRA6	33
2.1	Formes de solubilisation de protéines à domaines transmembranaires	39
2.2	Processus d'insertion assistée	41
2.3	Processus d'insertion spontanée	42
2.4	Mécanismes de déformations membranaires	45
2.5	Courbure d'une membrane	46
2.6	Courbure générée par insertion d'hélice amphipathique	47
2.7	Courbure générée par mécanisme de charpentage	48
2.8	Courbure générée par le cytosquelette	50
3.1	Contexte et construction du projet	54
3.2	Formation de bicouches lipidiques	55
3.3	Classification des membranes-modèles	56
3.4	Fractions contenant les protéines GRA	57
3.5	Principaux axes d'étude	59
4.1	Observation par TEM de SUVs formées à partir de lipides HeLa	64
4.2	Préparation et contrôles des extraits contenant les protéines GRA	66
4.3	Binding assay : protéines GRA de HssEs et SUVs EPC	69

4.4	Sédimentation des protéines GRA de HssEs	71
4.5	Mesure de la densité des fractions éluées à partir d'un gradient linéaire de glycérol	73
4.6	Séparation isopycnique des protéines GRA de la fraction HssEs (fraîche ou congelée)	75
4.7	Sécrétion <i>in vitro</i> induite par du sérum délipidé	78
4.8	Séparation isopycnique des protéines GRA de la fraction HssEs produite en sérum délipidé	78
4.9	Séparation isopycnique des protéines GRA de HssEs après incubation avec des SUVs HeLa	81
4.10	Fractionnement des protéines GRA de HssTx ou HssVac	83
4.11	Séparation isopycnique des protéines GRA de HssTx	85
4.12	Séparation isopycnique des protéines GRA de HssVac	86
4.13	Evolution des profils de sédimentation des protéines GRA avant, pendant et après sécrétion	87
4.14	Séparation isopycnique des protéines GRA de HssTx après incubation avec des SUVs HeLa	89
4.15	Séparation isopycnique des protéines GRA de HssVac après incubation avec des SUVs HeLa	91
4.16	Evolution des profils de sédimentation des protéines GRA après incubation avec des SUVs HeLa	93
4.17	Caractérisation des interactions membranaires des protéines GRA. Mode opératoire	94
4.18	Comparaison de l'association des protéines GRA de HssVac avec des SUVs HeLa ou EPC	97
4.19	Mode d'association des protéines GRA de HssVac avec des SUVs HeLa	98
4.20	Identification des partenaires lipidiques des protéines GRA	100
5.1	Principe général de l'immunofluorescence indirecte	107
5.2	Electroformation de GUVs HeLa	109
5.3	Comportement des GUVs en milieu salin	111
5.4	Passivation du fond de la chambre d'observation	113
5.5	Micro-injection sur GUVs	113
5.6	Chambre d'électroformation à flux	113
5.7	Réalisation et tests de notre chambre d'électroformation à flux	115
5.8	Mode opératoire du marquage en immunofluorescence sur GUVs. Préparation des GUVs HeLa et de la fraction ultrasoluble HssEs	117
5.9	Mode opératoire du marquage en immunofluorescence sur GUVs. Séquence d'incubations	118
5.10	Autofluorescence des membranes des GUVs HeLa	119
5.11	Contrôles des interactions non-spécifiques des anticorps avec les GUVs HeLa	120
5.12	Association de la protéine GRA1 de la fraction HssEs aux GUVs HeLa	121
5.13	Association des protéines GRA2 et GRA6 de la fraction HssEs aux GUVs HeLa	123

5.14 Association de GRA6, en l'absence de GRA2, ou de GRA2, en l'absence de GRA6, aux GUVs HeLa	125
5.15 Association de la protéine GRA7 de la fraction HssEs aux GUVs HeLa	125
5.16 Association de la protéine GRA3 de la fraction HssEs aux GUVs HeLa	127
5.17 Association des protéines GRA2, GRA6, GRA3 et GRA7 de la fraction HssVac aux GUVs HeLa	128
5.18 Co-marquage des protéines GRA2 et GRA3 de la fraction HssVac concentrée (5X) associées aux GUVs HeLa	129
5.19 Suivis des GUVs au cours des incubations avec la fraction HssEs ou avec le milieu D10	132
5.20 Motifs observés en surface des GUVs HeLa	134
5.21 Association de la protéine GRA7 de la fraction HssEs aux GUVs EPC	134
5.22 Structures internes aux GUVs HeLa	136
5.23 Réseau de fils membranaires	137
5.24 Association de GRA7 de la fraction HssEs-KOGRA2 aux GUVs HeLa	138
6.1 Evolution des densités isopycniques en gradient de glycérol des protéines GRA2,3,6,7 au cours de leurs trafic : dans les granules denses, après sécrétion <i>in vitro</i> , dans la vacuole	144
6.2 Modes d'association des protéines GRA <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	145
6.3 Répartition des protéines GRA sur les membranes des GUVs HeLa	146
6.4 Mécanismes potentiels de ciblage des protéines GRA aux différentes membranes vacuolaires	151
6.5 Mécanismes potentiels de formation du RNM et des HOSTs, impliquant certaines protéines GRA	152
A.1 Anticorps primaires utilisés lors des expériences d'immunofluorescence ou d'immunoblot	158
A.2 Anticorps secondaires utilisés lors des expériences d'immunofluorescence ou d'immunoblot	158
A.3 Protocole d'électroformation	162

Bibliographie

- [Abkarian, 2002] Abkarian, M. (2002). *Dynamique et formes d'enveloppes déformables sous champs externes : vésicules et globules rouges*. PhD thesis, Université Joseph Fourier - Grenoble 1.
- [Achbarou et al., 1991] Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A., Camus, D., & Dubremetz, J. F. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *T. gondii*. *Parasitology*, 103 Pt 3, 321–329.
- [Adamian & Liang, 2002] Adamian, L. & Liang, J. (2002). Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins : polar clamps and serine zippers. *Proteins*, 47(2), 209–218.
- [Adjogble et al., 2004] Adjogble, K. D. Z., Mercier, C., Dubremetz, J.-F., Hucke, C., Mackenzie, C. R., Cesbron-Delauw, M.-F., & Däubener, W. (2004). Gra9, a new *T. gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int J Parasitol*, 34(11), 1255–1264.
- [Afssa, 2006] Afssa (2006). Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation rapport du groupe de travail « *T. gondii* » de l'afssa.
- [Ahn et al., 2006] Ahn, H. J., Kim, S., Kim, H. E., & Nam, H. W. (2006). Interactions between secreted gra proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *T. gondii*. *Korean J Parasitol*, 44(4), 303–312.
- [Ahn et al., 2005] Ahn, H.-J., Kim, S., & Nam, H.-W. (2005). Host cell binding of gra10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *T. gondii*. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(2), 614–620.
- [Ajioka, 1998] Ajioka, J. W. (1998). Toxoplasma gondii : Ests and gene discovery. *Int J Parasitol*, 28(7), 1025–1031.
- [Akashi et al., 1998] Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H., & Kinoshita, K. (1998). Formation of giant liposomes promoted by divalent cations : critical role of electrostatic repulsion. *Biophys J*, 74(6), 2973–2982.
- [Alder & Johnson, 2004] Alder, N. N. & Johnson, A. E. (2004). Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279(22), 22787–22790.
- [Alexander et al., 2005] Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., & Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the moving junction complex of *T. gondii* : a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog*, 1(2), e17.
- [Aliberti et al., 2003] Aliberti, J., Valenzuela, J. G., Carruthers, V. B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., e Sousa, C. R., Fairlamb, A., Ribeiro, J. M., & Sher, A. (2003). Molecular mimicry of a ccr5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol*, 4(5), 485–490.
- [Andresen et al., 2004] Andresen, M., Schmitz-Salue, R., & Jakobs, S. (2004). Short tetracysteine tags to beta-tubulin demonstrate the significance of small labels for live cell imaging. *Mol Biol Cell*, 15(12), 5616–5622.
- [Angelova & Dimitrov, 1986] Angelova, M. & Dimitrov, D. (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 303.
- [Angelova et al., 1992] Angelova, M., Soleau, S., Meleard, P., Faucon, J., & Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external a.c. electric fields. kinetics and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 89, 127–131.
- [Antonny, 2006] Antonny, B. (2006). Membrane deformation by protein coats. *Curr Opin Cell Biol*, 18(4), 386–394.
- [Antonny et al., 2003] Antonny, B., Gounon, P., Schekman, R., & Orci, L. (2003). Self-assembly of minimal copii cages. *EMBO Rep*, 4(4), 419–424.

- [Asai et al., 1995] Asai, T., Miura, S., Sibley, L. D., Okabayashi, H., & Takeuchi, T. (1995). Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *T. gondii*. *J Biol Chem*, 270(19), 11391–11397.
- [Assossou et al., 2003] Assossou, O., Besson, F., Rouault, J.-P., Persat, F., Brisson, C., Duret, L., Ferrandiz, J., Mayençon, M., Peyron, F., & Picot, S. (2003). Subcellular localization of 14-3-3 proteins in *T. gondii* tachyzoites and evidence for a lipid raft-associated form. *FEMS Microbiol Lett*, 224(2), 161–168.
- [Assossou et al., 2004] Assossou, O., Besson, F., Rouault, J.-P., Persat, F., Ferrandiz, J., Mayençon, M., Peyron, F., & Picot, S. (2004). Characterization of an excreted/secreted antigen form of 14-3-3 protein in *T. gondii* tachyzoites. *FEMS Microbiol Lett*, 234(1), 19–25.
- [Bacia et al., 2002] Bacia, K., Majoul, I. V., & Schwille, P. (2002). Probing the endocytic pathway in live cells using dual-color fluorescence cross-correlation analysis. *Biophys J*, 83(2), 1184–1193.
- [Bacia et al., 2004] Bacia, K., Schuette, C. G., Kahya, N., Jahn, R., & Schwille, P. (2004). Snares prefer liquid-disordered over "raft" (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles. *J Biol Chem*, 279(36), 37951–37955.
- [Bacia & Schwille, 2003] Bacia, K. & Schwille, P. (2003). A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods*, 29(1), 74–85.
- [Bagatolli et al., 1999] Bagatolli, L. A., Parasassi, T., Fidelio, G. D., & Gratton, E. (1999). A model for the interaction of 6-lauroyl-2-(n,n-dimethylamino)naphthalene with lipid environments : implications for spectral properties. *Photochem Photobiol*, 70(4), 557–564.
- [Balla, 2005] Balla, T. (2005). Inositol-lipid binding motifs : signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci*, 118(Pt 10), 2093–2104.
- [Bangham, 1993] Bangham, A. D. (1993). Liposomes : the babraham connection. *Chem Phys Lipids*, 64(1-3), 275–285.
- [Bangham et al., 1965] Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*, 13(1), 238–252.
- [Beckmann et al., 2001] Beckmann, R., Spahn, C. M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P. A., Sali, A., Frank, J., & Blobel, G. (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80s ribosome. *Cell*, 107(3), 361–372.
- [Bermudes et al., 1994] Bermudes, D., Peck, K. R., Afifi, M. A., Beckers, C. J., & Joiner, K. A. (1994). Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of toxoplasma gondii. *J Biol Chem*, 269(46), 29252–29260.
- [Bisanz et al., 2006] Bisanz, C., Bastien, O., Grando, D., Jouhet, J., Maréchal, E., & Cesbron-Delauw, M.-F. (2006). *T. gondii* acyl-lipid metabolism : de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J*, 394(Pt 1), 197–205.
- [Bisanz et al., 2007] Bisanz, C., Botté, C., Bastien, O., Cesbron-Delauw, M., & Maréchal, E. (2007). *Current Research in Plant Cell Compartments*, chapter Structure, function and biogenesis of the secondary plastid of apicomplexan parasites. Research Signpost.
- [Black & Boothroyd, 2000] Black, M. W. & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *T. gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(3), 607–623.
- [Bligh & Dyer, 1959] Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8), 911–917.
- [Bonhomme et al., 1998] Bonhomme, A., Maine, G. T., Beorchia, A., Burlet, H., Aubert, D., Villena, I., Hunt, J., Chovan, L., Howard, L., Brojanac, S., Sheu, M., Tyner, J., Pluot, M., & Pinon, J. M. (1998). Quantitative immunolocalization of a p29 protein (gra7), a new antigen of *T. gondii*. *J Histochem Cytochem*, 46(12), 1411–1422.
- [Bout et al., 2002] Bout, D. T., Mevelec, M. N., Velge-Roussel, F., Dimier-Poisson, I., & Lebrun, M. (2002). Prospects for a human toxoplasma vaccine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2(3), 227–234.

- [Bowie, 2005] Bowie, J. U. (2005). Solving the membrane protein folding problem. *Nature*, 438(7068), 581–589.
- [Brambillasca et al., 2006] Brambillasca, S., Yabal, M., Makarow, M., & Borgese, N. (2006). Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J Cell Biol*, 175(5), 767–777.
- [Brambillasca et al., 2005] Brambillasca, S., Yabal, M., Soffientini, P., Stefanovic, S., Makarow, M., Hegde, R. S., & Borgese, N. (2005). Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *EMBO J*, 24(14), 2533–2542.
- [Bukau & Horwich, 1998] Bukau, B. & Horwich, A. L. (1998). The hsp70 and hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351–366.
- [Buss et al., 2002] Buss, F., Luzio, J. P., & Kendrick-Jones, J. (2002). Myosin vi, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic*, 3(12), 851–858.
- [Buxton, 1998] Buxton, D. (1998). Protozoan infections (toxoplasma gondii, neospora caninum and sarcocystis spp.) in sheep and goats : recent advances. *Vet Res*, 29(3-4), 289–310.
- [Buxton & Innes, 1995] Buxton, D. & Innes, E. A. (1995). A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*, 110 Suppl, S11–S16.
- [Carey et al., 2000] Carey, K. L., Donahue, C. G., & Ward, G. E. (2000). Identification and molecular characterization of gra8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *T. gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 105(1), 25–37.
- [Carey et al., 2004] Carey, K. L., Jongco, A. M., Kim, K., & Ward, G. E. (2004). The toxoplasma gondii rhopty protein rop4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot Cell*, 3(5), 1320–1330.
- [Carruthers, 1999] Carruthers, V. B. (1999). Armed and dangerous : *T. gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol Int*, 48(1), 1–10. +++.
- [Carruthers et al., 1999] Carruthers, V. B., Giddings, O. K., & Sibley, L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol*, 1(3), 225–235.
- [Carruthers & Sibley, 1997] Carruthers, V. B. & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, 73(2), 114–123.
- [Cesbron-Delauw et al., 1989] 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. (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *T. gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(19), 7537–7541.
- [Charif et al., 1990] Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M. F., & Capron, A. (1990). *T. gondii* : characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp Parasitol*, 71(1), 114–124. images (secretion DG).
- [Charron & Sibley, 2002] Charron, A. J. & Sibley, L. D. (2002). Host cells : mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *T. gondii*. *J Cell Sci*, 115(Pt 15), 3049–3059.
- [Charron & Sibley, 2004] Charron, A. J. & Sibley, L. D. (2004). Molecular partitioning during host cell penetration by toxoplasma gondii. *Traffic*, 5(11), 855–867.
- [Chaturvedi et al., 1999] Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P. I., Striepen, B., Roos, D. S., & Joiner, K. A. (1999). Constitutive calcium-independent release of *T. gondii* dense granules occurs through the nsf/snap/snare/rab machinery. *J Biol Chem*, 274(4), 2424–2431. +++.
- [Cola et al., 2005] Cola, A. D., Klostermann, E., & Robinson, C. (2005). The complexity of pathways for protein import into thylakoids : it's not easy being green. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 5), 1024–1027.
- [Cole & Lippincott-Schwartz, 1995] Cole, N. B. & Lippincott-Schwartz, J. (1995). Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr Opin Cell Biol*, 7(1), 55–64.
- [Collins et al., 2002] Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., & Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic ap2 complex. *Cell*, 109(4), 523–535.

- [Coppens et al., 1999] Coppens, I., Andries, M., Liu, J. L., & Cesbron-Delauw, M. F. (1999). Intracellular trafficking of dense granule proteins in toxoplasma gondii and experimental evidences for a regulated exocytosis. *Eur J Cell Biol*, 78(7), 463–472.
- [Coppens et al., 2006] Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C., & Joiner, K. A. (2006). *T. gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*, 125(2), 261–274. +++.
- [Coppens et al., 2000] Coppens, I., Sinai, A. P., & Joiner, K. A. (2000). *T. gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol*, 149(1), 167–180.
- [Coppin et al., 2003] Coppin, A., Dzierszinski, F., Legrand, S., Mortuaire, M., Ferguson, D., & Tomavo, S. (2003). Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *T. gondii*. *Biochimie*, 85(3-4), 353–361.
- [Craver & Knoll, 2007] Craver, M. P. J. & Knoll, L. J. (2007). 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*.
- [Cuvelier et al., 2003] Cuvelier, D., Rossier, O., Bassereau, P., & Nassoy, P. (2003). Micropatterned "adherent/repellent" glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates. *Eur Biophys J*, 32(4), 342–354.
- [Darcy et al., 1988] Darcy, F., Deslee, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V., & Capron, A. (1988). Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of toxoplasma gondii. *Parasite Immunol*, 10(5), 553–567.
- [de Souza, 2005] de Souza, W. (2005). Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol*, 123(1), 1–18.
- [de Souza, 2006] de Souza, W. (2006). Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An Acad Bras Cienc*, 78(2), 271–291.
- [Deaton et al., 2004] Deaton, J., Sun, J., Holzenburg, A., Struck, D. K., Berry, J., & Young, R. (2004). Functional bacteriorhodopsin is efficiently solubilized and delivered to membranes by the chaperonin groel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8), 2281–2286.
- [Decoster et al., 1988] Decoster, A., Darcy, F., & Capron, A. (1988). Recognition of *T. gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis : identification of markers of acute and chronic infection. *Clin Exp Immunol*, 73(3), 376–382.
- [den Berg et al., 2004] den Berg, B. V., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., & Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427(6969), 36–44.
- [Denton et al., 1996] Denton, H., Brown, S. M., Roberts, C. W., Alexander, J., McDonald, V., Thong, K. W., & Coombs, G. H. (1996). Comparison of the phosphofruktokinase and pyruvate kinase activities of cryptosporidium parvum, eimeria tenella and *T. gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 76(1-2), 23–29.
- [Doeven et al., 2005] Doeven, M. K., Folgering, J. H. A., Krasnikov, V., Geertsma, E. R., van den Bogaart, G., & Poolman, B. (2005). Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophys J*, 88(2), 1134–1142. +++ reconstitué.
- [Dreier & Rapoport, 2000] Dreier, L. & Rapoport, T. A. (2000). In vitro formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. *J Cell Biol*, 148(5), 883–898. +++.
- [Drin et al., 2007] Drin, G., Casella, J.-F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T. U., & Antonny, B. (2007). A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol*, 14(2), 138–146.
- [Dubey, 1996] Dubey, J. P. (1996). *Medical Microbiology*, chapter *T. gondii*. Univ of Texas Medical Branch, 4th ed edition. images.
- [Dubey & Frenkel, 1973] Dubey, J. P. & Frenkel, J. K. (1973). Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. *J Parasitol*, 59(3), 505–512.

- [Dubremetz et al., 1993] Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., & Joiner, K. A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *T. gondii*/host-cell interaction. *Parasitol Res*, 79(5), 402–408.
- [Duquesne et al., 1990] Duquesne, V., Auriault, C., Darcy, F., Decavel, J. P., & Capron, A. (1990). Protection of nude rats against toxoplasma infection by excreted-secreted antigen-specific helper t cells. *Infect Immun*, 58(7), 2120–2126.
- [Elbert & Hubbell, 1998] Elbert, D. L. & Hubbell, J. A. (1998). Self-assembly and steric stabilization at heterogeneous, biological surfaces using adsorbing block copolymers. *Chem Biol*, 5(3), 177–183.
- [Engelhard et al., 1978] Engelhard, V. H., Guild, B. C., Helenius, A., Terhorst, C., & Strominger, J. L. (1978). Reconstitution of purified detergent-soluble hla-a and hla-b antigens into phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(7), 3230–3234.
- [Epp & Deitsch, 2006] Epp, C. & Deitsch, K. (2006). Deciphering the export pathway of malaria surface proteins. *Trends Parasitol*, 22(9), 401–404.
- [Estes & Mayer, 2005] Estes, D. J. & Mayer, M. (2005). Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber. *Biochim Biophys Acta*, 1712(2), 152–160.
- [Facey & Kuhn, 2004] Facey, S. J. & Kuhn, A. (2004). Membrane integration of e. coli model membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 55–66. +++ voir sec8.
- [Fantini et al., 2002] Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R., & Yahi, N. (2002). Lipid rafts : structure, function and role in hiv, alzheimers and prion diseases. *Expert Rev Mol Med*, 2002, 1–22.
- [Farsad et al., 2001] Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., & Camilli, P. D. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol*, 155(2), 193–200.
- [Farsad et al., 2003] Farsad, K., Slepnev, V., Ochoa, G., Daniell, L., Haucke, V., Camilli, P. D., & Hauke, V. (2003). A putative role for intramolecular regulatory mechanisms in the adaptor function of amphiphysin in endocytosis. *Neuropharmacology*, 45(6), 787–796.
- [Ferguson et al., 1999] Ferguson, D. J., Cesbron-Delauw, M. F., Dubremetz, J. F., Sibley, L. D., Joiner, K. A., & Wright, S. (1999). The expression and distribution of dense granule proteins in the enteric (coccidian) forms of *T. gondii* in the small intestine of the cat. *Exp Parasitol*, 91(3), 203–211.
- [Ferguson, 2004] Ferguson, D. J. P. (2004). Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *T. gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol*, 34(3), 347–360.
- [Finsinger et al., 2000] Finsinger, D., Remy, J. S., Erbacher, P., Koch, C., & Plank, C. (2000). Protective copolymers for nonviral gene vectors : synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther*, 7(14), 1183–1192.
- [Fischer et al., 1998] Fischer, H. G., Stachelhaus, S., Sahn, M., Meyer, H. E., & Reichmann, G. (1998). Gra7, an excretory 29 kda *T. gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol Biochem Parasitol*, 91(2), 251–262.
- [Fischer et al., 2007] Fischer, T., Lu, L., Haigler, H. T., & Langen, R. (2007). Annexin b12 is a sensor of membrane curvature and undergoes major curvature-dependent structural changes. *J Biol Chem*, 282(13), 9996–10004.
- [Ford et al., 2002] Ford, M. G. J., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J. K., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419(6905), 361–366.
- [Gallop et al., 2006] Gallop, J. L., Jao, C. C., Kent, H. M., Butler, P. J. G., Evans, P. R., Langen, R., & McMahon, H. T. (2006). Mechanism of endophilin n-bar domain-mediated membrane curvature. *EMBO J*, 25(12), 2898–2910.
- [Gallusser & Kuhn, 1990] Gallusser, A. & Kuhn, A. (1990). Initial steps in protein membrane insertion. bacteriophage m13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction. *EMBO J*, 9(9), 2723–2729.
- [Gilbert et al., 2006] Gilbert, L., Toivola, J., Vällilehto, O., Saloniemi, T., Cunningham, C., White, D., Mäkelä, A. R., Korhonen, E., Vuento, M., & Oker-Blom, C. (2006). Truncated forms of viral vp2 proteins fused to egfp assemble into fluorescent parvovirus-like particles. *J Nanobiotechnology*, 4, 13.

- [Girard et al., 2004] Girard, P., Pécréaux, J., Lenoir, G., Falson, P., Rigaud, J.-L., & Bassereau, P. (2004). A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys J*, 87(1), 419–429.
- [Goder et al., 2004] Goder, V., Junne, T., & Spiess, M. (2004). Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. *Mol Biol Cell*, 15(3), 1470–1478.
- [Golkar et al., 2007] Golkar, M., Shokrgozar, M.-A., Rafati, S., Musset, K., Assmar, M., Sadaie, R., Cesbron-Delauw, M.-F., & 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(21), 4301–4311.
- [Gregoriadis et al., 2002] Gregoriadis, G., Bacon, A., Caparros-Wanderley, W., & McCormack, B. (2002). A role for liposomes in genetic vaccination. *Vaccine*, 20 Suppl 5, B1–B9.
- [Gruner, 1985] Gruner, S. M. (1985). Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition : a role for nonbilayer lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(11), 3665–3669.
- [Gupta et al., 2005] Gupta, N., Zahn, M. M., Coppens, I., Joiner, K. A., & Voelker, D. R. (2005). Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *T. gondii* arrests its growth. *J Biol Chem*, 280(16), 16345–16353.
- [Hager et al., 1999] Hager, K. M., Striepen, B., Tilney, L. G., & Roos, D. S. (1999). The nuclear envelope serves as an intermediary between the er and golgi complex in the intracellular parasite *T. gondii*. *J Cell Sci*, 112 (Pt 16), 2631–2638.
- [Hajj et al., 2006] Hajj, H. E., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galéotti, N., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G., & Dubremetz, J. F. (2006). The rop2 family of toxoplasma gondii hroptry proteins : proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics*, 6(21), 5773–5784.
- [Halonen & Weidner, 1994] Halonen, S. K. & Weidner, E. (1994). Overcoating of toxoplasma parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J Eukaryot Microbiol*, 41(1), 65–71.
- [Harder & Simons, 1997] Harder, T. & Simons, K. (1997). Caveolae, digs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, 9(4), 534–542.
- [He et al., 2002] He, X., Grigg, M. E., Boothroyd, J. C., & Garcia, K. C. (2002). Structure of the immunodominant surface antigen from the toxoplasma gondii srs superfamily. *Nat Struct Biol*, 9(8), 606–611.
- [Helfrich, 1973] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. *Z Naturforsch [C]*, 28(11), 693–703.
- [Henriquez et al., 2005] 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. (2005). *T. gondii* dense granule protein 3 (gra3) is a type i transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (kkxx) endoplasmic reticulum (er) retrieval motif. *Parasitology*, 131(Pt 2), 169–179.
- [Hessa et al., 2005] Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S. H., & von Heijne, G. (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*, 433(7024), 377–381.
- [High et al., 1994] High, K. P., Joiner, K. A., & Handschumacher, R. E. (1994). Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *T. gondii*. *J Biol Chem*, 269(12), 9105–9112.
- [Hill & Dubey, 2002] Hill, D. & Dubey, J. P. (2002). *T. gondii* : transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*, 8(10), 634–640.
- [Hinshaw & Schmid, 1995] Hinshaw, J. E. & Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, 374(6518), 190–192.
- [Håkansson et al., 2001] Håkansson, S., Charron, A. J., & Sibley, L. D. (2001). Toxoplasma vacuoles : a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J*, 20(12), 3132–3144.
- [Hoff & Carruthers, 2002] Hoff, E. F. & Carruthers, V. B. (2002). Is toxoplasma egress the first step in invasion ? *Trends Parasitol*, 18(6), 251–255.

- [Hoffmann et al., 2005] Hoffmann, C., Gaietta, G., Bünemann, M., Adams, S. R., Oberdorff-Maass, S., Behr, B., Viardaga, J.-P., Tsien, R. Y., Ellisman, M. H., & Lohse, M. J. (2005). A flash-based fret approach to determine G-protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods*, 2(3), 171–176.
- [Horvath et al., 2007] Horvath, C. A. J., Broeck, D. V., Boulet, G. A. V., Bogers, J., & Wolf, M. J. S. D. (2007). Epsin : Inducing membrane curvature. *Int J Biochem Cell Biol*.
- [Howe & Sibley, 1995] Howe, D. K. & Sibley, L. D. (1995). *T. gondii* comprises three clonal lineages : correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*, 172(6), 1561–1566.
- [Howe et al., 1996] Howe, D. K., Summers, B. C., & Sibley, L. D. (1996). Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome viii in *T. gondii*. *Infect Immun*, 64(12), 5193–5198.
- [Hu et al., 2002] Hu, K., Mann, T., Striepen, B., Beckers, C. J. M., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2002). Daughter cell assembly in the protozoan parasite *T. gondii*. *Mol Biol Cell*, 13(2), 593–606.
- [Hughes & van Knapen, 1982] Hughes, H. P. & van Knapen, F. (1982). Characterisation of a secretory antigen from *T. gondii* and its role in circulating antigen production. *Int J Parasitol*, 12(5), 433–437.
- [Igljic et al., 2006] Igljic, A., Hägerstrand, H., Veranic, P., Plemenitas, A., & Kralj-Igljic, V. (2006). Curvature-induced accumulation of anisotropic membrane components and raft formation in cylindrical membrane protrusions. *J Theor Biol*, 240(3), 368–373.
- [Jacobs et al., 1998] Jacobs, D., Dubremetz, J. F., Loyens, A., Bosman, F., & Saman, E. (1998). Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (gra7) from *T. gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 91(2), 237–249.
- [Kahya, 2006] Kahya, N. (2006). Targeting membrane proteins to liquid-ordered phases : molecular self-organization explored by fluorescence correlation spectroscopy. *Chem Phys Lipids*, 141(1-2), 158–168.
- [Kahya et al., 2005] Kahya, N., Brown, D. A., & Schwille, P. (2005). Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry*, 44(20), 7479–7489.
- [Karatekin et al., 2003] Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P.-H., & Brochard-Wyart, F. (2003). Cascades of transient pores in giant vesicles : line tension and transport. *Biophys J*, 84(3), 1734–1749.
- [Karsten et al., 2004] Karsten, V., Hegde, R. S., Sinai, A. P., Yang, M., & Joiner, K. A. (2004). Transmembrane domain modulates sorting of membrane proteins in toxoplasma gondii. *J Biol Chem*, 279(25), 26052–26057.
- [Karsten et al., 1998] Karsten, V., Qi, H., Beckers, C. J., Reddy, A., Dubremetz, J. F., Webster, P., & Joiner, K. A. (1998). The protozoan parasite *T. gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J Cell Biol*, 141(6), 1323–1333.
- [Kasper & Buzoni-Gatel, 1998] Kasper, L. H. & Buzoni-Gatel, D. (1998). Some opportunistic parasitic infections in aids : Candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. *Parasitol Today*, 14(4), 150–156.
- [Köhler, 2006] Köhler, S. (2006). Multi-membrane-bound structures of apicomplexa : Ii. the ovoid mitochondrial cytoplasmic (omc) complex of *T. gondii* tachyzoites. *Parasitol Res*, 98(4), 355–369.
- [Kiefer & Kuhn, 1999] Kiefer, D. & Kuhn, A. (1999). Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage pf3 coat protein without topological control. *EMBO J*, 18(22), 6299–6306.
- [Killian & Nyholm, 2006] Killian, J. A. & Nyholm, T. K. M. (2006). Peptides in lipid bilayers : the power of simple models. *Curr Opin Struct Biol*, 16(4), 473–479.
- [Kim, 2004] Kim, K. (2004). Role of proteases in host cell invasion by *T. gondii* and other apicomplexa. *Acta Trop*, 91(1), 69–81.
- [Koster et al., 2003] Koster, G., VanDuijn, M., Hofs, B., & Dogterom, M. (2003). Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 15583–15588.
- [Labruyere et al., 1999] Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C., & Sibley, L. D. (1999). Differential membrane targeting of the secretory proteins gra4 and gra6 within the parasitophorous vacuole formed by *T. gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 102(2), 311–324.

- [Ladokhin et al., 2002] Ladokhin, A. S., Isas, J. M., Haigler, H. T., & White, S. H. (2002). Determining the membrane topology of proteins : insertion pathway of a transmembrane helix of annexin 12. *Biochemistry*, 41(46), 13617–13626.
- [Laemmli, 1970] Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227, 680–685.
- [Lakey et al., 1992] Lakey, J. H., González-Mañas, J. M., van der Goot, F. G., & Pattus, F. (1992). The membrane insertion of colicins. *FEBS Lett*, 307(1), 26–29.
- [Lanao et al., 2007] Lanao, J. M., Briones, E., & Colino, C. I. (2007). Recent advances in delivery systems for anti-hiv1 therapy. *J Drug Target*, 15(1), 21–36.
- [Lebrun et al., 2007] Lebrun, M., Carruthers, V., & Cesbron-Delauw, M. (2007). *T. gondii : The Model Apicomplexan—Perspectives and Methods*, chapter Toxoplasma secretory proteins and their roles in cell invasion and intracellular survival. Elsevier Publishing, Inc, Oxford, UK.
- [Lecointre & LeGuyader, 2001] Lecointre, G. & LeGuyader, H. (2001). *Classification phylogénétique du vivant*.
- [Lecordier et al., 1999] Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L. D., & Cesbron-Delauw, M. F. (1999). Transmembrane insertion of the *T. gondii* gra5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol Biol Cell*, 10(4), 1277–1287.
- [Lecordier et al., 1993] Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J. L., Maes, P., Tartar, A., Capron, A., & Cesbron-Delauw, M. F. (1993). Molecular structure of a *T. gondii* dense granule antigen (gra 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol Biochem Parasitol*, 59(1), 143–153.
- [Lecordier et al., 1995] Lecordier, L., Moleon-Borodowsky, I., Dubremetz, J. F., Tourvieille, B., Mercier, C., Deslée, D., Capron, A., & Cesbron-Delauw, M. F. (1995). Characterization of a dense granule antigen of *T. gondii* (gra6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol Biochem Parasitol*, 70(1-2), 85–94.
- [Lee, 2004] Lee, A. G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1666(1-2), 62–87. +++.
- [Lee et al., 2002] Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O. A., Ochoa, G.-C., Farsad, K., Wenk, M. R., & Camilli, P. D. (2002). Amphiphysin 2 (bin1) and t-tubule biogenesis in muscle. *Science*, 297(5584), 1193–1196.
- [Lee et al., 2005] Lee, M. C. S., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., & Schekman, R. (2005). Sar1p n-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a copii vesicle. *Cell*, 122(4), 605–617.
- [Lee & Schekman, 2004] Lee, M. C. S. & Schekman, R. (2004). Cell biology. bar domains go on a bender. *Science*, 303(5657), 479–480.
- [Lingelbach & Przyborski, 2006] Lingelbach, K. & Przyborski, J. M. (2006). The long and winding road : protein trafficking mechanisms in the plasmodium falciparum infected erythrocyte. *Mol Biochem Parasitol*, 147(1), 1–8. +++.
- [Lomize et al., 2006] Lomize, M., Lomize, A., Pogozheva, I., & Mosberg, H. (2006). Opm : Orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics*, 22, 623–625. <http://opm.phar.umich.edu/>.
- [Luft et al., 1984] Luft, B. J., Brooks, R. G., Conley, F. K., McCabe, R. E., & Remington, J. S. (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA*, 252(7), 913–917.
- [Magno et al., 2005a] Magno, R. C., Lemgruber, L., Vommaro, R. C., Souza, W. D., & Attias, M. (2005a). Intravacuolar network may act as a mechanical support for toxoplasma gondii inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Tech*, 67(1), 45–52.
- [Magno et al., 2005b] Magno, R. C., Straker, L. C., de Souza, W., & Attias, M. (2005b). Interrelations between the parasitophorous vacuole of toxoplasma gondii and host cell organelles. *Microsc Microanal*, 11(2), 166–174.
- [Mant et al., 2001] Mant, A., Woolhead, C. A., Moore, M., Henry, R., & Robinson, C. (2001). 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*, 276(39), 36200–36206.

- [Maréchal et al., 2002] Maréchal, E., Azzouz, N., de Macedo, C. S., Block, M. A., Feagin, J. E., Schwarz, R. T., & Joyard, J. (2002). Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites. *Eukaryot Cell*, 1(4), 653–656.
- [Marra & Israelachvili, 1985] Marra, J. & Israelachvili, J. (1985). Direct measurements of forces between phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in aqueous electrolyte solutions. *Biochemistry*, 24(17), 4608–4618.
- [Martin et al., 2007] Martin, A. M., Liu, T., Lynn, B. C., & Sinai, A. P. (2007). The toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane : Transactions across the border. *J Eukaryot Microbiol*, 54(1), 25–28.
- [Matos et al., 2003] Matos, M. F., Mukherjee, K., Chen, X., Rizo, J., & Südhof, T. C. (2003). Evidence for snare zippering during ca²⁺-triggered exocytosis in pc12 cells. *Neuropharmacology*, 45(6), 777–786.
- [Matsuoka et al., 1998] Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., & Yeung, T. (1998). Copii-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*, 93(2), 263–275.
- [Mattila et al., 2007] Mattila, P. K., Pykäläinen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V. O., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Lapalainen, P. (2007). Missing-in-metastasis and irsp53 deform pi(4,5)p₂-rich membranes by an inverse bar domain-like mechanism. *J Cell Biol*, 176(7), 953–964.
- [Mazumdar et al., 2006] Mazumdar, J., Wilson, E. H., Masek, K., Hunter, C. A., & Striepen, B. (2006). Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *T. gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(35), 13192–13197.
- [McMahon & Gallop, 2005] McMahon, H. T. & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438(7068), 590–596.
- [Melo et al., 2001] Melo, E. J., Carvalho, T. M., & Souza, W. D. (2001). Behaviour of microtubules in cells infected with *T. gondii*. *Biocell*, 25(1), 53–59.
- [Menger & Keiper, 1998] Menger, F. M. & Keiper, J. S. (1998). Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models. *Curr Opin Chem Biol*, 2(6), 726–732.
- [Mercier et al., 2005] Mercier, C., Adjogble, K. D. Z., Däubener, W., & Delauw, M.-F.-C. (2005). Dense granules : are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites ? *Int J Parasitol*, 35(8), 829–849.
- [Mercier et al., 2007] Mercier, C., Cesbron-Delauw, M., & Ferguson, D. J. (2007). *The biology of T. gondii*, chapter Dense granules of the infectious stages of *T. gondii* : Their central role in the host/parasite relationship. Horizon Scientific Press, Norwich, UK.
- [Mercier et al., 1998a] Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F., & Sibley, L. D. (1998a). The amphipathic alpha helices of the toxoplasma protein gra2 mediate post-secretory membrane association. *J Cell Sci*, 111 (Pt 15), 2171–2180.
- [Mercier et al., 2002] Mercier, C., Dubremetz, J.-F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., & Cesbron-Delauw, M.-F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in toxoplasma parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell*, 13(7), 2397–2409.
- [Mercier et al., 1998b] Mercier, C., Howe, D. K., Mordue, D., Lingnau, M., & Sibley, L. D. (1998b). Targeted disruption of the gra2 locus in toxoplasma gondii decreases acute virulence in mice. *Infect Immun*, 66(9), 4176–4182.
- [Mercier et al., 1993] Mercier, C., Lecordier, L., Darcy, F., Deslee, D., Murray, A., Tourvieille, B., Maes, P., Capron, A., & Cesbron-Delauw, M. F. (1993). Molecular characterization of a dense granule antigen (gra 2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *T. gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 58(1), 71–82.
- [Mercier et al., 2001] Mercier, C., Rauscher, B., Lecordier, L., Deslée, D., Dubremetz, J. F., & Cesbron-Delauw, M. F. (2001). Lack of expression of the dense granule protein gra5 does not affect the development of toxoplasma tachyzoites. *Mol Biochem Parasitol*, 116(2), 247–251.
- [Millard et al., 2007] Millard, T. H., Dawson, J., & Machesky, L. M. (2007). Characterisation of irtks, a novel irsp53/mim family actin regulator with distinct filament bundling properties. *J Cell Sci*, 120(Pt 9), 1663–1672.

- [Miyata & Hotani, 1992] Miyata, H. & Hotani, H. (1992). Morphological changes in liposomes caused by polymerization of encapsulated actin and spontaneous formation of actin bundles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(23), 11547–11551.
- [Molestina & Sinai, 2005] Molestina, R. E. & Sinai, A. P. (2005). Detection of a novel parasite kinase activity at the toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host ikappabalpha. *Cell Microbiol*, 7(3), 351–362.
- [Mordue et al., 1999] Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., & Sibley, L. D. (1999). Invasion by *T. gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med*, 190(12), 1783–1792.
- [Morris & Carruthers, 2003] Morris, M. T. & Carruthers, V. B. (2003). Identification and partial characterization of a second kazal inhibitor in *T. gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 128(1), 119–122.
- [Morris et al., 2002] Morris, M. T., Coppin, A., Tomavo, S., & Carruthers, V. B. (2002). Functional analysis of *T. gondii* protease inhibitor 1. *J Biol Chem*, 277(47), 45259–45266.
- [Morrissette et al., 1997] Morrissette, N. S., Murray, J. M., & Roos, D. S. (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *T. gondii*. *J Cell Sci*, 110 (Pt 1), 35–42.
- [Moudy et al., 2001] Moudy, R., Manning, T. J., & Beckers, C. J. (2001). The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *T. gondii*. *J Biol Chem*, 276(44), 41492–41501.
- [Muniz-Hernandez et al., 2007] Muniz-Hernandez, S., Mercier, C., Mondragn, M., del Carmen, M. G., Cesbron-Delauw, M., Gonzalez, S., & Mondragon, R. (2007). The membranous nanotubular network maintains the spatial organization of toxoplasma parasites during their repplication within the parasitophorous vacuole. (en préparation).
- [Nakaar et al., 2003] Nakaar, V., Ngô, H. M., Aaronson, E. P., Coppens, I., Stedman, T. T., & Joiner, K. A. (2003). Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhostry protein rop2 in *T. gondii*. *J Cell Sci*, 116(Pt 11), 2311–2320.
- [Nakaar et al., 1999] Nakaar, V., Samuel, B. U., Ngo, E. O., & Joiner, K. A. (1999). Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense rna inhibits *T. gondii* proliferation. *J Biol Chem*, 274(8), 5083–5087.
- [Nanavati & Fernandez, 1993] Nanavati, C. & Fernandez, J. M. (1993). The secretory granule matrix : a fast-acting smart polymer. *Science*, 259(5097), 963–965.
- [Neudeck et al., 2002] Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G., & Fischer, H.-G. (2002). Expression variance, biochemical and immunological properties of *T. gondii* dense granule protein gra7. *Microbes Infect*, 4(6), 581–590.
- [Nicolle & Monceaux, 1908] Nicolle, C. & Monceaux, L. (1908). Sur une infection à corps de leishman (ou organismes voisins) du gondi. 147, 763–66.
- [Nockemann et al., 1998] Nockemann, S., Dlugonska, H., Henrich, B., Kitzerow, A., & Däubener, W. (1998). Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kda excreted-secreted antigen (esa) from *T. gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 97(1-2), 109–121.
- [Oberholzer et al., 1999] Oberholzer, T., Nierhaus, K. H., & Luisi, P. L. (1999). Protein expression in liposomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 261(2), 238–241.
- [Ossorio et al., 1994] Ossorio, P. N., Dubremetz, J. F., & Joiner, K. A. (1994). A soluble secretory protein of the intracellular parasite toxoplasma gondii associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J Biol Chem*, 269(21), 15350–15357.
- [Parker & Pattus, 1993] Parker, M. W. & Pattus, F. (1993). Rendering a membrane protein soluble in water : a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem Sci*, 18(10), 391–395.
- [Paschen & Neupert, 2001] Paschen, S. A. & Neupert, W. (2001). Protein import into mitochondria. *IUBMB Life*, 52(3-5), 101–112.

- [Pelletier et al., 2002] Pelletier, L., Stern, C. A., Pypaert, M., Sheff, D., Ngô, H. M., Roper, N., He, C. Y., Hu, K., Toomre, D., Coppens, I., Roos, D. S., Joiner, K. A., & Warren, G. (2002). Golgi biogenesis in *T. gondii*. *Nature*, 418(6897), 548–552.
- [Peter et al., 2004] Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2004). Bar domains as sensors of membrane curvature : the amphiphysin bar structure. *Science*, 303(5657), 495–499.
- [Pollard & Borisy, 2003] Pollard, T. D. & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4), 453–465.
- [Popot & Engelman, 1990] Popot, J. L. & Engelman, D. M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization : the two-stage model. *Biochemistry*, 29(17), 4031–4037.
- [Praefcke & McMahon, 2004] Praefcke, G. J. K. & McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily : universal membrane tubulation and fission molecules ? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2), 133–147.
- [Prigione et al., 2000] Prigione, I., Facchetti, P., Lecordier, L., Deslée, D., Chiesa, S., Cesbron-Delauw, M. F., & Pistoia, V. (2000). T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *T. gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites : characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J Immunol*, 164(7), 3741–3748.
- [Pszenny et al., 2000] Pszenny, V., Angel, S. O., Duschak, V. G., Paulino, M., Ledesma, B., Yabo, M. I., Guarnera, E., Ruiz, A. M., & Bontempi, E. J. (2000). Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *T. gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 107(2), 241–249.
- [Pszenny et al., 2002] Pszenny, V., Ledesma, B. E., Matrajt, M., Duschak, V. G., Bontempi, E. J., Dubremetz, J.-F., & Angel, S. O. (2002). Subcellular localization and post-secretory targeting of tgpi, a serine proteinase inhibitor from *T. gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 121(2), 283–286.
- [Rayapuram & Subramani, 2006] Rayapuram, N. & Subramani, S. (2006). The importomer—a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix. *Biochim Biophys Acta*, 1763(12), 1613–1619.
- [Remington & Desmonts, 1983] Remington, J. & Desmonts, G. (1983). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, (pp. 143–161). Saunders, Philadelphia.
- [Ren et al., 2006] Ren, G., Vajjhala, P., Lee, J. S., Winsor, B., & Munn, A. L. (2006). The bar domain proteins : molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(1), 37–120.
- [Rodriguez et al., 1985] Rodriguez, C., Afchain, D., Capron, A., Dissous, C., & Santoro, F. (1985). Major surface protein of toxoplasma gondii (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur J Immunol*, 15(7), 747–749.
- [Rorman et al., 2006] Rorman, E., Zamir, C. S., Rilkis, I., & Ben-David, H. (2006). Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of *T. gondii* infection. *Reprod Toxicol*, 21(4), 458–472.
- [Roux et al., 2002] Roux, A., Cappello, G., Cartaud, J., Prost, J., Goud, B., & Bassereau, P. (2002). A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 5394–5399.
- [Ruan et al., 2004] Ruan, Q., Cheng, M. A., Levi, M., Gratton, E., & Mantulin, W. W. (2004). Spatial-temporal studies of membrane dynamics : scanning fluorescence correlation spectroscopy (sfcs). *Biophys J*, 87(2), 1260–1267.
- [Saavedra et al., 1990] Saavedra, R., Meuter, F. D., & Hérion, P. (1990). Monoclonal antibodies identify new toxoplasma gondii soluble antigens. *Hybridoma*, 9(5), 453–463.
- [Sabin, 1941] Sabin, A. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.*, 116, 801–807.
- [Saffer et al., 1992] Saffer, L. D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J. F., & Schwartzman, J. D. (1992). Localization of a toxoplasma gondii rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool*, 39(4), 526–530.
- [Samuelson et al., 2000] Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J., & Dalbey, R. E. (2000). Yidc mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature*, 406(6796), 637–641.

- [Sanchez et al., 2001] Sanchez, S. A., Chen, Y., Müller, J. D., Gratton, E., & Hazlett, T. L. (2001). Solution and interface aggregation states of crotoalus atrox venom phospholipase a2 by two-photon excitation fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry*, 40(23), 6903–6911.
- [Sandre et al., 1999] Sandre, O., Moreaux, L., & Brochard-Wyart, F. (1999). Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(19), 10591–10596.
- [Schneider & Toulmay, 2007] Schneider, R. & Toulmay, A. (2007). The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(6), 1224–1232.
- [Schwab et al., 1994] Schwab, J. C., Beckers, C. J., & Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular toxoplasma gondii functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2), 509–513.
- [Schwartzman & Pfefferkorn, 1981] Schwartzman, J. D. & Pfefferkorn, E. R. (1981). Pyrimidine synthesis by intracellular *T. gondii*. *J Parasitol*, 67(2), 150–158.
- [Segrest et al., 2000] Segrest, J. P., Li, L., Anantharamaiah, G. M., Harvey, S. C., Liadaki, K. N., & Zannis, V. (2000). Structure and function of apolipoprotein a-i and high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol*, 11(2), 105–115.
- [Shai, 1999] Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1462(1-2), 55–70.
- [Shibata et al., 2006] Shibata, Y., Voeltz, G. K., & Rapoport, T. A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, 126(3), 435–439.
- [Sibley et al., 1986] Sibley, L. D., Krahenbuhl, J. L., Adams, G. M., & Weidner, E. (1986). Toxoplasma modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J Cell Biol*, 103(3), 867–874.
- [Sibley et al., 1995] Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F., & Cesbron-Delauw, M. F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *T. gondii*. *J Cell Sci*, 108 (Pt 4), 1669–1677.
- [Sibley et al., 1991] Sibley, L. D., Pfefferkorn, E. R., & Boothroyd, J. C. (1991). Proposal for a uniform genetic nomenclature in toxoplasma gondii. *Parasitol Today*, 7(12), 327–328.
- [Sinai & Joiner, 2001] Sinai, A. P. & Joiner, K. A. (2001). The *T. gondii* protein rop2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol*, 154(1), 95–108.
- [Sinai et al., 1997] Sinai, A. P., Webster, P., & Joiner, K. A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *T. gondii* parasitophorous vacuole membrane : a high affinity interaction. *J Cell Sci*, 110 (Pt 17), 2117–2128.
- [Singer & Nicolson, 1972] Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(23), 720–731.
- [Solon et al., 2005] Solon, J., Gareil, O., Bassereau, P., & Gaudin, Y. (2005). Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system. *J Gen Virol*, 86(Pt 12), 3357–3363.
- [Splendore, 1909] Splendore, A. (1909). Sur un nouveau protozoaire du lapin, 2ème note préliminaire. *Bull Soc Path Exot.*, 2, 462.
- [Staneva et al., 2004] Staneva, G., Angelova, M. I., & Koumanov, K. (2004). Phospholipase a2 promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chem Phys Lipids*, 129(1), 53–62.
- [Suetsugu et al., 2006] Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T., & Yokoyama, S. (2006). The rac binding domain/irsp53-mim homology domain of irsp53 induces rac-dependent membrane deformation. *J Biol Chem*, 281(46), 35347–35358.
- [Suss-Toby et al., 1996] Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., & Ward, G. E. (1996). Toxoplasma invasion : the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16), 8413–8418.

- [Sweitzer & Hinshaw, 1998] Sweitzer, S. M. & Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin undergoes a gtp-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, 93(6), 1021–1029.
- [Takei et al., 1995] Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L., & Camilli, P. D. (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by gtp- γ s in nerve terminals. *Nature*, 374(6518), 186–190.
- [Tarleton, 2005] Tarleton, R. L. (2005). New approaches in vaccine development for parasitic infections. *Cell Microbiol*, 7(10), 1379–1386.
- [Tenant-Flowers et al., 1991] Tenant-Flowers, M., Boyle, M. J., Carey, D., Marriott, D. J., Harkness, J. L., Penny, R., & Cooper, D. A. (1991). Sulphadiazine desensitization in patients with aids and cerebral toxoplasmosis. *AIDS*, 5(3), 311–315.
- [Tenter et al., 2000] Tenter, A. M., Heckerth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *T. gondii* : from animals to humans. *Int J Parasitol*, 30(12-13), 1217–1258.
- [Tilley et al., 1997] Tilley, M., Fichera, M. E., Jerome, M. E., Roos, D. S., & White, M. W. (1997). *T. gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. *Infect Immun*, 65(11), 4598–4605.
- [Towbin et al., 1979] Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350–4354.
- [Travier et al., 2007] Travier, L., Braun, L., Musset, K., Hakimi, M. A., Mercier, C., & Cesbron-Delauw, M.-F. (2007). Toxoplasma dense granules proteins : exploration of the interactome before and after secretion into the parasitophorous vacuole. en préparation.
- [Turkewitz, 2004] Turkewitz, A. P. (2004). Out with a bang ! tetrahymena as a model system to study secretory granule biogenesis. *Traffic*, 5(2), 63–68.
- [van Dalen & de Kruijff, 2004] van Dalen, A. & de Kruijff, B. (2004). The role of lipids in membrane insertion and translocation of bacterial proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 97–109.
- [van der Zypen & Piekarski, 1967] van der Zypen, E. & Piekarski, G. (1967). [endodyogeny in *T. gondii*. a morphological analysis]. *Z Parasitenkd*, 29(1), 15–35.
- [van Klompenburg & de Kruijff, 1998] van Klompenburg, W. & de Kruijff, B. (1998). The role of anionic lipids in protein insertion and translocation in bacterial membranes. *J Membr Biol*, 162(1), 1–7.
- [Voelker, 2005] Voelker, D. R. (2005). Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends Biochem Sci*, 30(7), 396–404.
- [Voeltz et al., 2006] Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M., & Rapoport, T. A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*, 124(3), 573–586. +++.
- [von Heijne, 1986] von Heijne, G. (1986). The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J*, 5(11), 3021–3027.
- [von Heijne, 1997] von Heijne, G. (1997). Getting greasy : how transmembrane polypeptide segments integrate into the lipid bilayer. *Mol Microbiol*, 24(2), 249–253.
- [Waterman-Storer et al., 1995] Waterman-Storer, C. M., Gregory, J., Parsons, S. F., & Salmon, E. D. (1995). Membrane/microtubule tip attachment complexes (tacs) allow the assembly dynamics of plus ends to push and pull membranes into tubulovesicular networks in interphase xenopus egg extracts. *J Cell Biol*, 130(5), 1161–1169.
- [Waterman-Storer & Salmon, 1998] Waterman-Storer, C. M. & Salmon, E. D. (1998). Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr Biol*, 8(14), 798–806.
- [Webster, 2001] Webster, J. P. (2001). Rats, cats, people and parasites : the impact of latent toxoplasmosis on behaviour. *Microbes Infect*, 3(12), 1037–1045.
- [Webster et al., 2006] Webster, J. P., Lamberton, P. H. L., Donnelly, C. A., & Torrey, E. F. (2006). Parasites as causative agents of human affective disorders ? the impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *T. gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proc Biol Sci*, 273(1589), 1023–1030.

- [Weiss & Kim, 2000] Weiss, L. M. & Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*, 5, D391–D405.
- [Weiss et al., 2003] Weiss, T. M., van der Wel, P. C. A., Killian, J. A., Koeppe, R. E., & Huang, H. W. (2003). Hydrophobic mismatch between helices and lipid bilayers. *Biophys J*, 84(1), 379–385.
- [White et al., 2001] White, S. H., Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S., & Hristova, K. (2001). How membranes shape protein structure. *J Biol Chem*, 276(35), 32395–32398.
- [White & von Heijne, 2005] White, S. H. & von Heijne, G. (2005). Do protein-lipid interactions determine the recognition of transmembrane helices at the *er* translocon? *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 5), 1012–1015.
- [Wimley & White, 1996] Wimley, W. C. & White, S. H. (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol*, 3(10), 842–848.
- [Wimley & White, 2000] Wimley, W. C. & White, S. H. (2000). Designing transmembrane alpha-helices that insert spontaneously. *Biochemistry*, 39(15), 4432–4442.
- [Yap & Sher, 1999] Yap, G. S. & Sher, A. (1999). Cell-mediated immunity to *T. gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology*, 201(2), 240–247.
- [Yu et al., 2005] Yu, L., Ding, J. L., Ho, B., & Wohland, T. (2005). 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*, 1716(1), 29–39.
- [Zakharov et al., 1998] Zakharov, S. D., Lindeberg, M., Griko, Y., Salamon, Z., Tollin, G., Prendergast, F. G., & Cramer, W. A. (1998). Membrane-bound state of the colicin e1 channel domain as an extended two-dimensional helical array. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8), 4282–4287.
- [Zenner et al., 1999] Zenner, L., Estaquier, J., Darcy, F., Maes, P., Capron, A., & Cesbron-Delauw, M. F. (1999). Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Parasite Immunol*, 21(5), 261–272.
- [Zhou et al., 2006] Zhou, H., Gu, Q., Zhao, Q., Zhang, J., Cong, H., Li, Y., & He, S. (2006). *T. gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing sag1 and gra2 in *Pichia pastoris*. *Parasitol Res*.
- [Zhu et al., 2000] Zhu, G., Keithly, J. S., & Philippe, H. (2000). What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *Int J Syst Evol Microbiol*, 50 Pt 4, 1673–1681.
- [Zimmerberg & Kozlov, 2006] Zimmerberg, J. & Kozlov, M. M. (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(1), 9–19.
- [Zinecker et al., 1998] Zinecker, C. F., Striepen, B., Tomavo, S., Dubremetz, J. F., & Schwarz, R. T. (1998). The dense granule antigen, gra2 of *T. gondii* is a glycoprotein containing o-linked oligosaccharides. *Mol Biochem Parasitol*, 97(1-2), 241–246.

Résumé

Les protéines GRA sont sécrétées par le parasite intracellulaire *Toxoplasma gondii* dans la vacuole parasitophore, où elles interagissent pour la plupart avec deux systèmes de membranes tubulaires : les tubules séquestrant des organites de l'hôte (HOSTs) et le réseau de nanotubes membranaires (RNM). Bien que la plupart des protéines GRA contiennent des domaines transmembranaires potentiels, elles sont sécrétées sous des formes solubles et ne s'associent à des membranes qu'une fois qu'elles ont atteint leurs membranes-cibles dans la vacuole. Cette propriété inhabituelle nous a amenés à les considérer comme des modèles intéressants pour l'étude d'interactions protéine-membrane. J'ai développé deux approches expérimentales pour étudier les interactions des protéines GRA, extraites du parasite ou de la vacuole, avec des membranes-modèles. Premièrement, des approches biochimiques m'ont amenée à caractériser les formes de solubilisation des protéines GRA et leur association avec les membranes des petites vésicules unilamellaires (SUVs). Deuxièmement, j'ai développé une approche par spectroscopie de fluorescence, de protéines GRA associées aux membranes de vésicules unilamellaires géantes (GUVs). Les résultats fournissent des éléments de réponse qui (1) aident à décrypter le trafic des protéines dans le parasite et dans la vacuole et (2) ouvrent la voie pour la mise en place d'un système *in vitro* pour l'étude de la maturation de la vacuole parasitophore et de ses membranes tubulaires internes.

Mots-clés : Interactions protéine-membrane - Protéines GRA - *Toxoplasma gondii* - Membranes-modèles- Spectroscopie de fluorescence - Biochimie.

Abstract

GRA proteins are secreted by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* into the parasitophorous vacuole, where most of them interact with two systems of tubular membranes : the Host Organelle Sequestering Tubules (HOSTs) and the Membrane Nanotubules Network (RNM). Although most of the GRA proteins contain potential transmembrane domains, they are secreted as soluble forms and become membrane-associated only when they reach their target membranes. This unusual property led to consider them as attractive models of protein-membrane interactions. I developed two experimental approaches to study the interactions of GRA proteins, extracted from the parasite or from the vacuole, with model membranes. Firstly, biochemical approaches using Small Unilamellar Vesicles (SUVs) led to characterize the solubilisation forms of GRA proteins and their association with SUVs membranes. Secondly, I developed a Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) model to study the interactions of GRA proteins with membranes by fluorescence spectroscopy methods. The results provide elements 1) which help to decipher the traffic of GRA proteins within the parasite and the PV, and 2) which open the way to set up an *in vitro* minimal system to study the building up of the parasitophorous vacuole and of its associated tubular membranes.

Keywords : Protein-membrane interactions - GRA proteins - *Toxoplasma gondii* - Model membranes - Fluorescence spectroscopy - Biochemistry.